

R-2694

T. 102

ACCION MUTAGENICA DE LA NITROSGUANIDINA EN

LACTOBACILLUS PLANTARUM

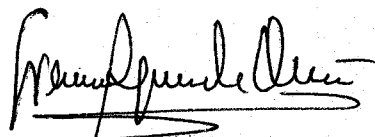
FRANCISCO RODRIGUEZ DE QUIÑONES Y DE TORRES

Facultad de Farmacia-Universidad de Sevilla

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE FARMACIA
BIBLIOTECA

ACCION MUTAGENICA DE LA NITROSOGUANIDINA EN LACTOBACILLUS
PLANTARUM.

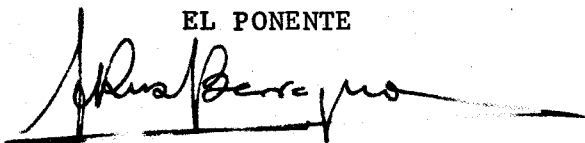
Trabajo realizado para aspirar al Grado de Licenciado en Farmacia por D. FRANCISCO RODRIGUEZ DE QUIÑONES Y DE TORRES.



Sevilla, septiembre 1981

VOBO

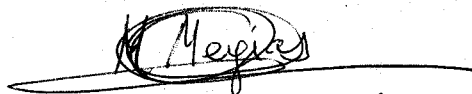
EL PONENTE



Fdo. D. Francisco Ruiz Berraquero
Catedrático de Microbiología

VOBO

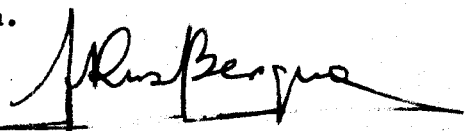
EL DIRECTOR



Fdo. D. Manuel Megías Guijo
Doctor en Ciencias

D. Francisco Ruiz Berraquero, Cate-
drático de Microbiología de la Fa-
cultad de Farmacia, Universidad de
Sevilla,

CERTIFICO, que el presente trabajo
se ha realizado en el Departamento
de Microbiología de la Facultad de
Farmacia, Universidad de Sevilla,
bajo la dirección del Dr. Megías
Guijo, reuniendo las condiciones
exigidas a los trabajos de licen-
ciatura.


Sevilla, septiembre de 1981

MIS AGRADECIMIENTOS:

A todos mis compañeros del Departamento.

Al Prof. Romero Raya, por abrirme las puertas del Departamento y de la Microbiología.

Al Prof. Asuero, por sus consejos y su ejemplo.

A P. Villaverde, por ser como es.

Y, sobre todo, al Prof. Megías Guijo, mi amigo y maestro, que con su extraordinaria calidad humana, su bondad y su excepcional capacidad de trabajo han convertido esta Tesis de Licenciatura en algo llevadero y atractivo.

I N D I C E

I	INTRODUCCION	1
1.	<u>LACTOBACILLUS PLANTARUM</u>	2
2.	EL PROCESO DE ADEREZO DE ACEITUNAS	3
2.1	<u>Operaciones previas</u>	3
2.2	<u>El proceso de aderezo "estilo sevillano"</u>	3
2.2.1	El proceso de "cocido"	4
2.2.2	El proceso de lavado	4
2.2.3	El proceso fermentativo	5
2.2.3.1	Primera fase	5
2.2.3.2	Segunda fase	6
2.2.3.3	Tercera fase	7
3.	ESTUDIO DE LA NITROSOGUANIDINA	8
3.1	<u>Química de la nitrosoguanidina</u>	9
3.1.1	Estabilidad	9
3.1.2	Reacciones	10
3.2	<u>Biología de la nitrosoguanidina</u>	12
3.2.1	Letalidad	12
3.2.2	Mutagenicidad	14
3.2.2.1	Tipos de mutación	18
3.2.2.2	Mecanismos de mutación	18
3.2.3	Otros efectos causados por la nitrosoguanidina ..	19
3.3	<u>Perspectivas actuales</u>	20

II	MATERIALES	21
1.	MICROORGANISMOS	22
2.	PRODUCTOS QUIMICOS	22
2.1	<u>Antibióticos</u>	22
2.2	<u>Azúcares</u>	23
2.3	<u>Otros productos</u>	23
3.	TAMPONES	23
3.1	<u>Tampón acetato</u>	23
3.2	<u>Tampón citrato-fosfato</u>	24
3.3	<u>Tampón fosfato</u>	24
3.4	<u>Tampón M9</u>	25
3.5	<u>Tampón tris-maleato</u>	25
4.	MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS	26
4.1	<u>Aislamiento y conservación</u>	26
4.2	<u>Medios para utilización y/o fermentación de azúcares</u> .	26
4.3	<u>Medios para tratamientos con antibióticos</u>	27
4.4	<u>Medios sólidos</u>	27
III	METODOS	28
1.	TOMA DE MUESTRAS DE FERMENTADORES DE GRAN CAPACIDAD	29
2.	AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS A PARTIR DE SALMUERA	29
3.	CARACTERIZACION DE LACTOBACILOS	29
3.1	<u>Ruta de identificación</u>	29
3.2	<u>Técnica de la tinción de Gram</u>	31
3.3	<u>Crecimiento a 15°C</u>	31
3.4	<u>Utilización de glúcidos</u>	31
4.	CULTIVO DE BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO	31

5. RECuento DE BACTERIAS VIVAS	32
6. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	32
7. TRATAMIENTO CON NITROSO GUANIDINA	32
7.1 <u>En tampón</u>	33
7.2 <u>En medio de cultivo</u>	33
8. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	33
IV RESULTADOS Y DISCUSION	35
CONDICIONES OPTIMAS PARA EL AISLAMIENTO DE MUTANTES EN <u>LACTOBACILLUS PLANTARUM</u>	36
1. GENERALIDADES	36
2. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	36
3. ENSAYOS CON NITROSO GUANIDINA	39
3.1 <u>Título de células durante el tratamiento</u>	39
3.2 <u>Efecto de la densidad de siembra en la obtención de mutantes y viables de un cultivo</u>	41
3.3 <u>Influencia del pH</u>	41
3.3.1 Letalidad a distintos pHs y en distintos tiempos	41
3.3.2 Letalidad en función del pH a lo largo del tiempo	46
3.4 <u>Influencia de la concentración de nitrosoguanidina</u> ..	48
3.5 <u>Influencia del estado fisiológico del cultivo</u>	48
3.5.1 Letalidad en células procedentes de un cultivo en distintas fases de crecimiento	48
4. OBTENCIÓN DE RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	53
5. ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD PRODUCIDA POR LA NITROSO GUANIDINA	55

5.1	<u>Estudio de la aparición de mutantes resistentes a la estreptomina</u>	55
5.1.1	Influencia del medio de tratamiento en la mutagenicidad producida por nitrosoguanidina	55
5.1.2	Influencia del pH en la mutagenicidad	57
5.1.3	Variación de la mutagenicidad con la concentración de nitrosoguanidina	57
5.1.4	Evolución de la mutagenicidad a lo largo del tiempo	60
5.2	<u>Efecto de la incubación tras tratamiento con nitrosoguanidina en la expresión de las mutaciones</u>	62
V	RESUMEN Y CONCLUSIONES	64
VI	BIBLIOGRAFIA	66

I INTRODUCCION

1. LACTOBACILLUS PLANTARUM.

Lactobacillus plantarum pertenece al género Lactobacillus, familia Lactobacillaceae (Parte 16 según el Manual de Bergey, de Buchanan y Gibbons, 1974). Es un bacilo Gram-positivo no esporulado con los extremos redondeados, cuyo diámetro oscila entre 0,9 y 1,2 μm , y cuya longitud es de 3 a 8 μm . Se presenta aislado, en parejas o formando cortas cadenas. Algunas cepas son móviles por flagelos peritricos. Son microaerófilos, con metabolismo homofermentativo que conduce a la formación de ácido DL-láctico o, en algunas ocasiones, a D ó a L-láctico (Dennis y Kaplan, 1960 y 1963; Doelle, 1971; Gasser y Gasser, 1971; Garvie, 1980). Son capaces de crecer desde 15 hasta 45^oC, siendo su temperatura óptima de crecimiento de 30-35^oC.

Fundamentalmente, se aíslan de productos lácteos y fermentaciones de productos vegetales. Desarrolla un papel importante en los procesos homofermentativos lácticos de dichos productos y, entre ellos, de la fermentación de aceitunas verdes aderezadas al "estilo sevillano", de gran importancia en nuestra región.

Hasta el momento son muy pocos los trabajos fisiológicos que hacen referencia concreta a L. plantarum. Como más recientes podemos citar los de Stanaszem et al. (1977) y los de Götz et al. (1980a y 1980b).

Dada la importancia de L. plantarum en el proceso fermentativo antes citado y la notoria aplicación industrial que posee, se ha dedicado parte de la introducción de esta Tesis de Licen-

ciatura al estudio del proceso de aderezo de aceitunas verdes "estilo sevillano" y, fundamentalmente, al estudio de la mutagénesis con nitrosoguanidina en dicho microorganismo, factor importante en la genética de L. plantarum a la hora de seleccionar estirpes de gran interés industrial.

2. EL PROCESO DE ADEREZO DE ACEITUNAS.

2.1 Operaciones previas.

Primeramente se procede a la selección de la variedad de aceituna (Crues, 1930). Tras ello se procede a la recolección, lo que se realiza en determinadas condiciones para que los frutos conserven sus características naturales. Finalmente, acabada la recolección, se procede a la clasificación de los frutos, si bien en algunos casos ésta se realiza tras la fermentación.

Lo más importante de la preparación de la aceituna es el proceso de aderezo propiamente dicho, al que nos referiremos en lo sucesivo.

2.2 El proceso de aderezo "estilo sevillano".

El aderezo de las aceitunas "estilo sevillano" tiene por objeto producir en el fruto una serie de cambios provocados por procesos fisicoquímicos y microbiológicos que conduzcan a la adquisición de las características organolépticas que definen al producto final y que permitan la conservación en condiciones óptimas para su comercialización posterior.

2.2.1 El proceso de "cocido".

La operación fundamental en el aderezo de las aceitunas es el "cocido" de los frutos. Consiste en el tratamiento con solución diluida de sosa cáustica (a una concentración de 2 a 5° Bé) durante 4 a 7 horas y a temperatura ambiente. Este tratamiento provoca cambios que pueden influir sobre el proceso microbiológico. Entre dichos cambios cabe citar:

1. Eliminar el amargor producido por la presencia en el fruto del glucósido "oleuropeína" (Bourquelot y Vintilesco, 1908; Cruess y Alsberg, 1934).
2. Facilitar el proceso fermentativo posterior (Etchells et al., 1966; Fleming et al., 1967, entre otros).
3. Cambios en la permeabilidad de los frutos (Rodríguez de la Borbolla, 1981).
4. Formación de ácidos orgánicos (Rodríguez de la Borbolla, 1981).
5. Pérdida de materia fermentable por eliminación y transformación de azúcares (Rodríguez de la Borbolla, 1981).

Finalmente, es de destacar que la sustitución del "cocido" por el uso de ciertas levaduras (Candida veronae) permite obtener frutos con características bioquímicas favorables a la posterior fermentación (Balloni et al., 1977).

2.2.2 El proceso de lavado.

El principal objetivo de esta operación es, sin duda, eliminar la lejía que permanece adherida a la superficie de los

frutos y una parte, al menos, de la que penetró en su interior, bien libre bien combinada con los ácidos orgánicos.

Aunque la eficacia del lavado depende de muchos factores, la mayoría de los autores sugieren un enjuagado y un lavado corto seguido de otro largo y finalmente un buen escurrido (Rodríguez de la Borbolla et al., 1978 y 1980).

2.2.3 El proceso fermentativo.

Acabado el proceso de lavado se procede a la colocación de las aceitunas en salmuera. Dicha salmuera está preparada normalmente a una concentración del 9 al 10 % en NaCl (Rodríguez de la Borbolla y González Pellisó, 1980a).

Es en la salmuera donde tiene lugar el proceso de fermentación propiamente dicho, el cual ocurre en tres etapas claramente definidas (Vaughn et al., 1943; Merzari y Molina, 1949; Rodríguez de la Borbolla et al., 1956). Estas fases se caracterizan por un desarrollo diferencial de la población microbiana y, en consecuencia, por cambios en las características fisicoquímicas de la salmuera.

2.2.3.1 Primera fase.

Se considera fundamental, ya que en el transcurso de ella la salmuera se transforma en un auténtico medio de cultivo al producirse la salida del zumo de los frutos y por la acción de ciertos microorganismos que se desarrollan en esta fase. Ahora bien, esta transformación de la salmuera debe ser controlada ade

cuadamente con objeto de que sólo se desarrollen los microorganismos más convenientes para el proceso fermentativo (Rejano Navarro et al., 1977; Rodríguez de la Borbolla y González Pellisó, 1980a y 1980b).

Esta fase dura de 2 a 3 días, hasta que el pH desciende desde el valor inicial de aproximadamente 11 unidades (Rodríguez de la Borbolla et al., 1958) hasta unas 6 unidades de pH, lo que coincide con un fuerte desarrollo de los lactobacilos (González Cancho, 1956; Rodríguez de la Borbolla et al., 1969), si bien éstos ya se detectan en las siembras ordinarias 24 horas después de la colocación de las aceitunas en la salmuera (Rodríguez de la Borbolla et al., 1958).

A lo largo de esta fase se desarrolla gran número de microorganismos, entre los que cabe citar, especialmente, a cocos lácticos (Pediococcus y Micrococcus) y a bacilos Gram-negativos no esporulados. También aparecen algunas levaduras y cocos y bacilos Gram-positivos esporulados (González Cancho, 1956; Rodríguez de la Borbolla et al., 1958; González Cancho, 1963; Rodríguez de la Borbolla et al., 1969).

2.2.3.2 Segunda fase.

Tiene una duración de 10-15 días, necesarios para que el desarrollo de los lactobacilos haga descender el pH hasta un valor próximo a 4,5 unidades, lo que determina la desaparición total de la flora acompañante ajena a la verdadera fermentación.

Y dentro de los lactobacilos, es L. plantarum la especie dominante en la fermentación, que representa alrededor del 90 % de

los lactobacilos aislados (González Cancho, 1956 y 1963). Esta especie alcanza su máximo desarrollo entre los 7 y 13 días desde el comienzo de la fermentación, coincidiendo con un pH de 4,5 y disminuyendo su número a partir de esta fecha (González Cancho, 1956).

2.2.3.3 Tercera fase.

Esta fase dura hasta que se agotan las materias fermentables y cesa, por tanto, la formación de ácidos en las salmueras.

La población microbiana en esta fase está formada generalmente por Lactobacillus y levaduras (González Cancho, 1956 y 1963; Rodríguez de la Borbolla et al., 1969).

Hasta el momento se ha establecido la importancia de L. plantarum como principal responsable de la fermentación láctica en el proceso de aderezo de la aceituna verde "estilo sevillano". Cabe también destacar que una de las características fundamentales para que comiencen a desarrollarse los microorganismos del género Lactobacillus es el descenso rápido del pH que tiene lugar en la primera fase del proceso fermentativo. Como hemos indicado, ya en esta primera fase se logran aislar lactobacilos que pueden jugar un papel importante en la disminución de dicho pH.

Con estos antecedentes se intentó abordar la selección de ésteres de L. plantarum que influyesen directamente sobre el

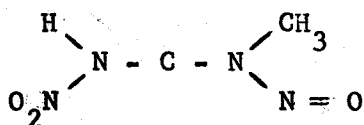
proceso fermentativo. Esta selección se puede realizar de forma natural o por inducción con agentes mutagénicos.

Antes de realizar el estudio y selección de mutantes (superproductores de ácido láctico, resistentes a altas concentraciones de NaCl, etc.) por inducción con agentes mutagénicos, se pretendió establecer cuáles eran las condiciones óptimas y más prácticas para obtener dichos mutantes.

Se eligió como agente mutagénico la nitrosoguanidina, ya que se había trabajado previamente con ella en el laboratorio y porque los resultados obtenidos en otros organismos son absolutamente satisfactorios, como iremos exponiendo en el apartado siguiente.

3. ESTUDIO DE LA NITROSOGUANIDINA.

La N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (MNNG) es conocida por los químicos desde hace más de 30 años (McKay y Wright, 1947).



nitrosoguanidina

Desde el descubrimiento de sus propiedades mutagénicas (Mandell y Greenberg, 1960) se ha empleado rutinariamente en la búsqueda de mutantes en el laboratorio, debido a su capacidad para inducir mutaciones con alta frecuencia y sin

causar una letalidad elevada (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968; Yoshida y Yuki, 1968; Neale, 1976; Kimball, 1978; Cerdá-Olmedo y Ruiz-Vázquez, 1979; Kimball, 1980a y 1980b).

3.1 Química de la nitrosoguanidina.

3.1.1 Estabilidad.

Desde que se sintetizó por primera vez, se demostró su inestabilidad en solución. Esta inestabilidad depende del pH, aumentando conforme aumenta éste. Según Lawley y Thatcher (1970), la descomposición alcalina requiere la ionización previa de los grupos amino de la MNNG.

En condiciones ácidas, la MNNG produce ácido nitroso (Mandell y Greenberg, 1960) y N-metil-N'-nitroguanidina (McKay y Wright, 1947; McCalla et al., 1968; Lawley y Thatcher, 1970). La máxima estabilidad se ha descrito a pH 5,5 (Mandell y Greenberg, 1960) y a pH 5,0 (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968; Süßmuth y Lingens, 1969; La Polla et al., 1972). Lawley y Thatcher (1970) indican que la descomposición alcalina comienza a valores de pH próximos a 4,5, y se acelera mucho al aumentar el pH, siendo la vida media diez veces menor a pH 8 que a pH 7.

Las variaciones de los valores óptimos de estabilidad encontrados por los diferentes autores se deben a los diferentes tampones usados y a la concentración de los mismos, ya que ambos factores intervienen en la variación de la estabilidad de la nitrosoguanidina (McCalla et al., 1968; Lawley y Thatcher, 1970; La Polla et al., 1972).

La estabilidad de la nitrosoguanidina también se ve influida por la temperatura, aumentando su descomposición al aumentar ésta (La Polla et al., 1972).

McKay (1948) demostró que la luz también influye en la estabilidad de la MNNG. Posteriormente se vio que casi todos los compuestos alquil-nitrosos, incluida la nitrosoguanidina, se destruían con la luz visible o con la luz ultravioleta, produciendo ácido nitroso o sus sales y el correspondiente residuo alquilo (McCalla et al., 1968; Veleminsky, 1978).

Finalmente, influye notoriamente en la estabilidad de la nitrosoguanidina la presencia o ausencia de grupos reaccionables con ella, como veremos a continuación.

3.1.2 Reacciones.

La reactividad de la MNNG se demostró primeramente por su reacción con las aminas primarias como método de preparación de N'-nitroguanidinas N-sustituidas y derivados metilados (McKay, 1948).

Los grupos tioles activan también la descomposición de la MNNG, como se ha visto por la reacción de la misma con la cisteína (Lawley y Thatcher, 1970). Examinada la capacidad de otros tioles, tanto orgánicos como inorgánicos, de catalizar la descomposición de la MNNG, todos dieron resultado positivo. Aminoácidos no tiólicos, como la lisina, histidina, glicina y S-metilcisteína, dieron lugar a descomposiciones muy débiles.

Una de las reacciones que más se ha estudiado en la MNNG es la metilación de los ácidos nucleicos. Esta reacción ha sido estudiada tanto in vitro como in vivo, a diferentes pHs, en diferentes medios, etc.

Como productos de esta actividad metilante de la MNNG se han aislado derivados metilados de todas las bases, a excepción de la timina.

Se cree que la metilación se debe, no a la acción de la MNNG misma, sino a la del diazometano, su producto de descomposición, ya que usualmente se encuentra mayor metilación en las condiciones de más rápida descomposición (Haerlin et al., 1970; Lawley y Thatcher, 1970). Sin embargo, el ADN no ha podido ser metilado por el diazometano ni *in vitro* ni *in vivo* (Süssmuth et al., 1972).

Otros trabajos, en cambio, han confirmado una alta metilación en condiciones de máxima estabilidad de la nitrosoguanidina (McCalla et al., 1968), por lo que se ha propuesto que es la propia nitrosoguanidina el agente metilante, transfiriendo el grupo metilo directamente. Sin embargo, este mecanismo no explica directamente la dependencia de la reacción con el pH.

Otros efectos producidos por la MNNG sobre el ADN son la despurinación y la desaminación.

La MNNG también reacciona con las proteínas, siendo la metilación unas diez veces menor que la que ocurre con los ácidos nucleicos (Nagao et al., 1969; Lawley y Thatcher, 1970), aunque otros autores no han encontrado incorporación alguna de este metilo en las proteínas. El grupo más importante en la reacción con las proteínas es el grupo guanidino, habiéndose encontrado que las proteínas más básicas son las que más se marcan con este grupo (Sugimura et al., 1968; Nagao et al., 1969; Jiménez-Sánchez, 1976b; Pinsky et al., 1979).

3.2 Biología de la nitrosoguanidina.

3.2.1 Letalidad.

El efecto biológico de la nitrosoguanidina mejor estudiado después de la mutagénesis es la letalidad. Este efecto ha sido más estudiado por su relación con la mutagénesis que por sí mismo.

La letalidad está influida, como era de esperar, por la concentración del mutágeno y por el tiempo de exposición (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b y 1968; Yoshida y Yuki, 1968; Kondo et al., 1975; Sweet y Moseley, 1976; Jeggo et al., 1978; Schendel et al., 1978; Schneider et al., 1978; Yamamoto et al., 1978; Ruiz-Vázquez y Cerdá-Olmedo, 1980; Megías, 1981).

Los factores que influyen en la letalidad pueden ser externos, como el pH y la temperatura, o internos, como la capacidad de reparación (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967a; Ishii y Kondo, 1975; Schendel et al., 1978) y el estado celular de crecimiento. En general se puede decir que cualquier factor que active la descomposición de la nitrosoguanidina aumenta la letalidad producida por ésta. Esto se ve claramente con la relación que existe entre letalidad y pH (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968a; Veleminsky y Gihner, 1970; López-Calderón, 1980; Megías, 1981), aunque en algún caso parece no existir esta relación, como ocurre en Streptomyces cacaoi (Kasahara et al., 1971) o incluso darse un proceso contrario, como el mostrado por Hyams y Davis (1971) en Chlamydomonas reinhardi. El incremento de la temperatu

ra también parece incrementar la letalidad producida por la nitrosoguanidina, aunque este fenómeno puede variar con la especie utilizada (Kasahara et al., 1971).

En la letalidad también influye la fase del ciclo en que se encuentre la célula tratada. Pequeñas variaciones en el estado fisiológico y de crecimiento de la célula pueden modificar la letalidad (Jyssum, 1969; Zakharova y Bartoshevich, 1977). Asimismo, se ha encontrado una gran disminución de la letalidad al aumentar el tiempo de generación de Escherichia coli por cambios de la fuente de carbono (Dugle et al., 1973).

Para ver qué parte de la molécula de nitrosoguanidina es la que está implicada en la letalidad, McCalla (1966) y Koshinuma et al. (1970) han estudiado la letalidad causada por productos estructuralmente afines a la MNNG, con diferentes grupos de su molécula sustituidos por otros radicales, encontrándose que la MNNG es más potente que todos los demás.

La causa de la letalidad producida por la nitrosoguanidina podría ser de tipo cromosómico o citoplasmático. Estas dos causas pueden ser diferenciadas en bacterias, ya que si una alta letalidad se corresponde con una disminución del número de cromosomas viables, en caso de que hubiera un solo cromosoma viable en la célula y se indujera una mutación recesiva, esta mutación podría ser expresada y detectada inmediatamente no variando su proporción, selección excluida, después de varias generaciones. Si por el contrario existiesen varios cromosomas idénticos, una mutación recesiva inducida no sería expresada hasta después de varias generaciones, cuando algunas células tuviesen en todos sus cromosomas copias de la mutación (Jiménez-Sánchez, 1976a).

A nivel molecular, la letalidad producida por la nitrosoguanidina parece ser debida a roturas en el ADN (Dugle et al., 1973), roturas que podrían ser causadas por despurinación subsiguiente a la metilación del N-7 de la guanina (Orgel, 1965) o por acción de nucleasas celulares sobre el ADN metilado (Strauss y Wahl, 1964; Kimball, 1980b).

3.2.2 Mutagenicidad.

Desde su descubrimiento como agente mutagénico, la nitrosoguanidina se ha empleado extensamente como mutágeno, utilizándose en una amplia variedad de organismos, como bacterias (Tabla I), virus (Schneider et al., 1978), algas (Hyams y Davis, 1971; Matagne y Vincenzotto, 1981), protozoos (Kimball, 1970; Podgorsky y Deering, 1980), plantas (Mehandzhiew y Yankoulov, 1981; Floria y Ghiorghita, 1981), animales (Vijaykumar y Jain, 1981) y cultivos celulares (Barker y Racham, 1980; Gupta y Goldstein, 1980; Lake et al., 1980; Suter et al., 1980; Peterson, 1981; Hori et al., 1981).

La nitrosoguanidina ha sido también usada en condiciones ambientales muy variadas, desde tratar ADN aislado hasta tratar el organismo completo, en medio de cultivo o en tampón, desde pH 2 hasta pH 9, desde 0,5 $\mu\text{g/ml}$ hasta varios mg/ml , desde 2 minutos hasta varios días de tratamiento, etc.

Y en casi todas las circunstancias es efectiva, por lo que su uso se puede adaptar a muchos organismos y requerimientos experimentales diferentes.

TABLA I. Utilización de la nitrosoguanidina en bacterias.

<u>Bacteria</u>	<u>Referencia</u>
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	Laugley y Kado, 1972
<u>Bacillus megaterium</u>	Arceneaux y Lankford, 1966
<u>Bacillus subtilis</u>	Green y Colarusso, 1964 Yoshida y Yuki, 1970
<u>Gorynebacterium</u>	Hill y Gordon, 1967
<u>Cystobacter spp.</u>	Grimm, 1978
<u>Chlamydomonas geitleri</u>	Necas y Pavingerova, 1980
<u>Enterobacter aerogenes</u>	Lerner <u>et al.</u> , 1964
<u>Escherichia coli</u>	Adelberg <u>et al.</u> , 1965 Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968
<u>Haemophilus influenzae</u>	Kimball y Setlow, 1972 Kimball, 1980a y 1980b
<u>Micrococcus radiodurans</u>	Sweet y Moseley, 1976
<u>Myxococcus xanthus</u>	Grimm, 1978
<u>Neisseria meningitidis</u>	Jyssum, 1969
<u>Polyangium luteum</u>	Grimm, 1978
<u>Rhizobium</u>	Casadesús y Olivares, 1979 Megías <u>et al.</u> , 1981
<u>Salmonella typhimurium</u>	Eisenstark <u>et al.</u> , 1965 Cheli <u>et al.</u> , 1980

La actividad mutagénica de la nitrosoguanidina se ha estudiado principalmente por la inducción de revertientes de resistentes a antibióticos y de revertientes de auxotrofos. Generalmente, los resultados obtenidos por diferentes autores son muy poco comparativos debido a que la producción de mutaciones puede ser modificada por procesos secundarios activos a nivel genotípico (como los mecanismos de reparación) o fenotípico (por variación en las condiciones físicas de la mutagénesis y en la detección de mutantes).

Se deben tener particularmente en cuenta las variables fenotípicas, porque conducen a alteraciones en los resultados finales, y entre ellas hemos de resaltar las condiciones físicas del tratamiento.

La nitrosoguanidina es muy inestable, como hemos estudiado anteriormente, y los cambios en esta estabilidad influyen sobre la acción mutagénica y sobre la supervivencia; un aumento de la mortalidad no tiene que ir acompañado por un aumento proporcional de la mutagénesis. Las comparaciones entre efectos mutagénicos han de hacerse en condiciones que conduzcan a una misma mortalidad.

Así como la letalidad ha sido bastante estudiada variando el medio en que se hace el tratamiento y el estado fisiológico del cultivo, la mutagénesis no se ha beneficiado de estudios comparables. Hay numerosos resultados de mutagénesis con nitrosoguanidina en muy diversas condiciones, pero no hay estudios sistemáticos que permitan comparar los resultados. En general, podemos decir que los mismos factores que intervienen en la estabilidad

del compuesto influyen en su acción mutagénica, si bien no todos influyen de la misma manera.

En el apartado anterior vimos que la letalidad está directamente relacionada con la concentración del mutágeno y el tiempo de tratamiento, pero no sucede lo mismo en la producción de mutaciones cuando se varían estos parámetros, ya que en todos los organismos donde se ha estudiado se ha observado un proceso de saturación de las mutaciones al aumentar el producto de ambos factores por encima de determinado nivel (Adelberg et al., 1965; Jysson, 1969; Kasahara et al., 1970; Smirnov et al., 1971; Jiménez Sánchez y Cerdá-Olmedo, 1975).

La producción de mutaciones depende también del estado fisiológico del cultivo. Esta hipótesis ha sido confirmada en muchos organismos (Adelberg et al., 1965; Burke y Fangman, 1975). Estos resultados sugirieron la posibilidad de que la nitrosoguanidina actuara sobre la región en replicación. Esto fue confirmado por mutagénesis secuencial de un cultivo sincronizado, ya que se observó un considerable incremento en la mutagénesis de cada gen en el momento en que se replicaba ese gen. El orden en que aparecen los máximos de distintos genes concuerda bien con el mapa genético y permite construir un mapa de replicación (Cerdá-Olmedo et al., 1968; Hohlfield y Vielmetter, 1973; Al-Bayatti y Al-Ani, 1977; Zurkowski y Lorkiewicz, 1978).

Igualmente, se han encontrado factores de tipo cultural que favorecen la obtención de mutantes, tales como la glucosa, estudiada en Salmonella typhimurium (Shirai et al., 1980).

3.2.2.1 Tipos de mutación.

Whitfield et al. (1966) encontraron que la nitrosoguanidina producía toda clase de sustituciones de una base por otra, es decir, tanto transiciones como transversiones, pero no encontraron ninguna mutación por cambio de fase. Posteriormente, se demostró que la nitrosoguanidina también puede producir algunas mutaciones de cambio de fase (Riddle y Roth, 1970; Isono y Yourno, 1974; Kimball, 1980b).

No hay pruebas convincentes ni a favor ni en contra de que la metilación altere las propiedades de apareamiento de las bases, lo que daría lugar a mutaciones. La metilación del N-7 parece que induce una despurinación por labilización de la unión de la base con la desoxirribosa. Al ser replicada esta parte del ADN se podría introducir cualquier base, tanto una purina como una pirimidina, dando lugar a una transición o una transversión, o incluso que no se colocase ninguna base, en cuyo caso se produciría una deleción.

3.2.2.2 Mecanismos de mutación.

Los mecanismos de mutagénesis obtenidos variando las condiciones ambientales indican que la metilación no es la causa de la mutación (Singer et al., 1968; Singer y Fraenkel-Conrat, 1969; Kolb y Kaudewitz, 1970).

El grupo esencial de la nitrosoguanidina para la mutagénesis es el grupo nitroso (Koshinuma et al., 1970). La nitrosoguanidina inhibe específicamente la actividad de la ADN-polimerasa-III (Schneider et al., 1978).

Para encontrar mutaciones con la nitrosoguanidina es preciso que haya replicación del ADN después del tratamiento (Kimball y Setlow, 1974; Kimball, 1980b).

3.2.3 Otros efectos causados por la nitrosoguanidina.

La nitrosoguanidina actúa inactivando el ADN transformante al aumentar el pH del medio de cultivo (La Polla et al., 1972).

En bacterias, el tratamiento con nitrosoguanidina da lugar a una disminución en la incorporación de aminoácidos en células no viables, aunque a ritmo muy reducido (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967). Esta disminución de la incorporación de aminoácidos también ha sido observada en células de mamíferos (Anderson y Burdon, 1970).

De la reducción de la incorporación de aminoácidos, y por la reacción de la nitrosoguanidina con las proteínas, se deduce que este mutágeno inhibe a las enzimas presentes en la célula (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967; Anderson y Burdon, 1970).

Actualmente, y tras la aportación de Ruiz-Vázquez (1979) y Ruiz-Vázquez y Cerdá-Olmedo (1980), se ha descubierto una nueva función celular en E. coli indispensable para la inducción de mutantes por nitrosoguanidina.

En tal caso, sea cual sea el mecanismo exacto de la mutagénesis, el hecho de que ésta tenga lugar preferentemente en las zonas de replicación constituye, sin duda alguna, la propiedad más interesante que tiene la nitrosoguanidina y que la habilita para un uso más elegante y preciso que la producción indiscriminada de mutantes.

3.3 Perspectivas actuales.

Después de la exposición de esta primera parte de la Tesis de Licenciatura, es interesante hacer hincapié en el hecho fundamental de los pocos trabajos existentes tanto fisiológicos como genéticos en el género Lactobacillus, y especialmente en L. plantarum. Por lo tanto, el objetivo fundamental de este trabajo ha sido el tratar de dilucidar alguna de las características genéticas de L. plantarum frente a agentes mutagénicos (MNNG). Este aspecto abre un interesante campo en el futuro de L. plantarum, sobre todo en la aplicación de dichos estudios a la mejora genética de los procesos en los que participan de alguna manera Lactobacillus, y especialmente L. plantarum.

II M A T E R I A L E S

1. MICROORGANISMOS.

Lactobacillus plantarum, estirpe silvestre, LS7, aislada de salmuera en segunda fase de fermentación, de aceituna gordal contenida en fermentador de gran capacidad y según se describe en Métodos, apartado 2. Para su aislamiento se utilizó un fermentador con las siguientes características químicas: pH de 4,5 unidades, acidez en ácido láctico de 0,67 % y concentración en NaCl de 7,5° Bé.

Lactobacillus plantarum, estirpes silvestres LS220 y LS221, procedentes de la Colección Americana de Cultivos Tipos, ATCC 8.014 y ATCC 14.431, respectivamente.

2. PRODUCTOS QUIMICOS.

2.1 Antibióticos.

Se utilizaron a las concentraciones finales en el medio de cultivo que se indican a continuación:

Sulfato de estreptomicina(Sigma)	0,5 g/l
Sulfato de kanamicina (Sigma)	25 mg/l
Oxitetraciclina (Antibióticos, S. A.)	10 mg/l
Rifampicina (Sigma)	20 mg/l
Ampicilina (Beecham)	10 mg/l
Cloramfenicol (Sigma)	5 mg/l

Se disolvieron previamente en agua, salvo la rifampicina, que fue disuelta en metanol, y se esterilizaron por filtración utilizando membranas Sartorius de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro.

2.2 Azúcares.

Se utilizaron los siguientes azúcares a una concentración final del 1 % en el medio de cultivo:

Glucosa	(Oxoid)
Lactosa	(Merck)
Gluconato	(Sigma)
Ribosa	(Sigma)
Melibiosa	(Sigma)
Rafinosa	(Sigma)

Se esterilizaron por filtración a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,45 μm de diámetro de poro, mediante porta-filtros de jeringa Millipore.

2.3 Otros productos.

Nitrosoguanidina (N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina), Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, U. S. A.

3. TAMPONES.

3.1 Tampón acetato.

Se preparó según Gomori (1955), mezclando en las proporciones adecuadas soluciones 0,1 M de ácido acético (Solución A) y acetato sódico (Solución B). De esta forma se prepararon tampones a pHs entre 4,0 y 5,5 unidades.

Solución A

Acido acético	11,55 ml
Agua destilada	1000 ml

Solución B

Acetato sódico 16,4 g
Agua destilada 1000 ml

Se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.2 Tampón citrato-fosfato.

Se preparó según McIlvaine (1921), mezclando en las proporciones adecuadas soluciones 0,1 M de ácido cítrico (Solución A) y 0,1 M de hidrógeno-fosfato (Solución B). De esta forma se prepararon tampones a pHs entre 4,0 y 7,0 unidades.

Solución A

Acido cítrico 19,21 g
Agua destilada 1000 ml

Solución B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 53,65 g
Agua destilada 1000 ml

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.3 Tampón fosfato.

Se preparó según Sørensen (1909), mezclando en las proporciones adecuadas 0,2 M de dihidrógeno-fosfato sódico (Solución A) y 0,2 M de hidrógeno-fosfato sódico (Solución B).

El pH deseado (pH 7,0) se consiguió mezclando 39,0 ml de la solución A con 61,0 ml de la solución B, y se completó con agua destilada hasta 200 ml.

Solución A

NaH_2PO_4 27,80 g
Agua destilada 1000 ml

Solución B

$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 27,80 g
Agua destilada 1000 ml

Se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos.

3.4 Tampón M9.

Se preparó mezclando 100 ml de solución concentrada diez veces de Solución M9 con 10 ml de sulfato magnésico 0,1 M, 10 ml de cloruro cálcico 0,01 M y 880 ml de agua destilada estéril.

Solución M9

K_2HPO_4 60 g
 KH_2PO_4 30 g
NaCl 5 g
 NH_4Cl 10 g
Agua destilada, c.s.p. 1000 ml

Se disolvió en el orden indicado y se esterilizó en autoclave a 121°C durante 20 minutos, tras ajustar el pH a 7,0.

3.5 Tampón tris-maleato.

Se preparó según Gomori (1948), mezclando en las proporciones adecuadas soluciones 0,2 M de Tris-ácido maleico (Solución A) y 0,2 M de hidróxido sódico (Solución B). De esta forma se prepararon tampones a pHs entre 5,5 y 8,0.

Solución A

Tris(hidroximetil)aminometano ... 24,2 g
Acido maleico 23,2 g
Agua destilada 1000 ml

Solución B

NaOH 8,0 g
Agua destilada 1000 ml

Se esterilizó al autoclave a 121°C durante 20 minutos.

4. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS.

4.1 Aislamiento y conservación.

El medio base para el aislamiento y conservación en el laboratorio de las estirpes de Lactobacillus fue el medio M.R.S. (de Man, Rogosa y Sharpe) deshidratado (Oxoid), que consta de:

Peptona 10,0 g
Extracto de carne 8,0 g
Extracto de levadura 4,0 g
Glucosa 20,0 g
"Tween" 80 1 ml
 K_2HPO_4 2,0 g
Acetato sódico trihidratado ... 5,0 g
Citrato tri-amónico 2,0 g
 $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ 0,2 g
 $MnSO_4 \cdot 4 H_2O$ 0,05 g
Agua destilada 1000 ml

El medio se ajustó a pH 6,2 y se esterilizó por autoclave a 118°C durante 15 minutos.

4.2 Medios para utilización y/o fermentación de azúcares.

Para la caracterización de las especies de Lactobacillus se empleó el mismo medio M.R.S. pero sustituyendo la glucosa por el

azúcar requerido en cada una de las investigaciones realizadas sobre la utilización y/o fermentación de carbohidratos. Dichos azúcares son los que se indican en Materiales, apartado 2.2.

A los medios así preparados se les adicionó Púrpura de Bromocresol a la concentración de 0,4 g/l como indicador de pH. La detección de gases se hizo con ayuda de campanas Durham dentro del tubo de ensayo.

4.3 Medios para tratamientos con antibióticos.

Los antibióticos, en soluciones previamente esterilizadas por filtración, se añadieron al medio estéril mantenido en sub-fusión a 45°C, para obtener las concentraciones finales indicadas en Materiales, apartado 2.1.

4.4 Medios sólidos.

Los medios sólidos se prepararon adicionando 10 g/l de agar (Oxoid) a los medios líquidos.

III M E T O D O S

1. TOMA DE MUESTRAS DE FERMENTADORES DE GRAN CAPACIDAD.

Para la toma de muestras se emplea un "recoge-muestras" de 2 metros de longitud que se esteriliza por calor seco a 180°C durante 1 hora y 30 minutos. Las muestras se toman en condiciones asépticas, a unos 2 metros de profundidad contados desde el orificio superior del fermentador, desechando siempre la primera y la última de las fracciones de muestra recogida.

2. AISLAMIENTO DE LACTOBACILOS A PARTIR DE SALMUERA.

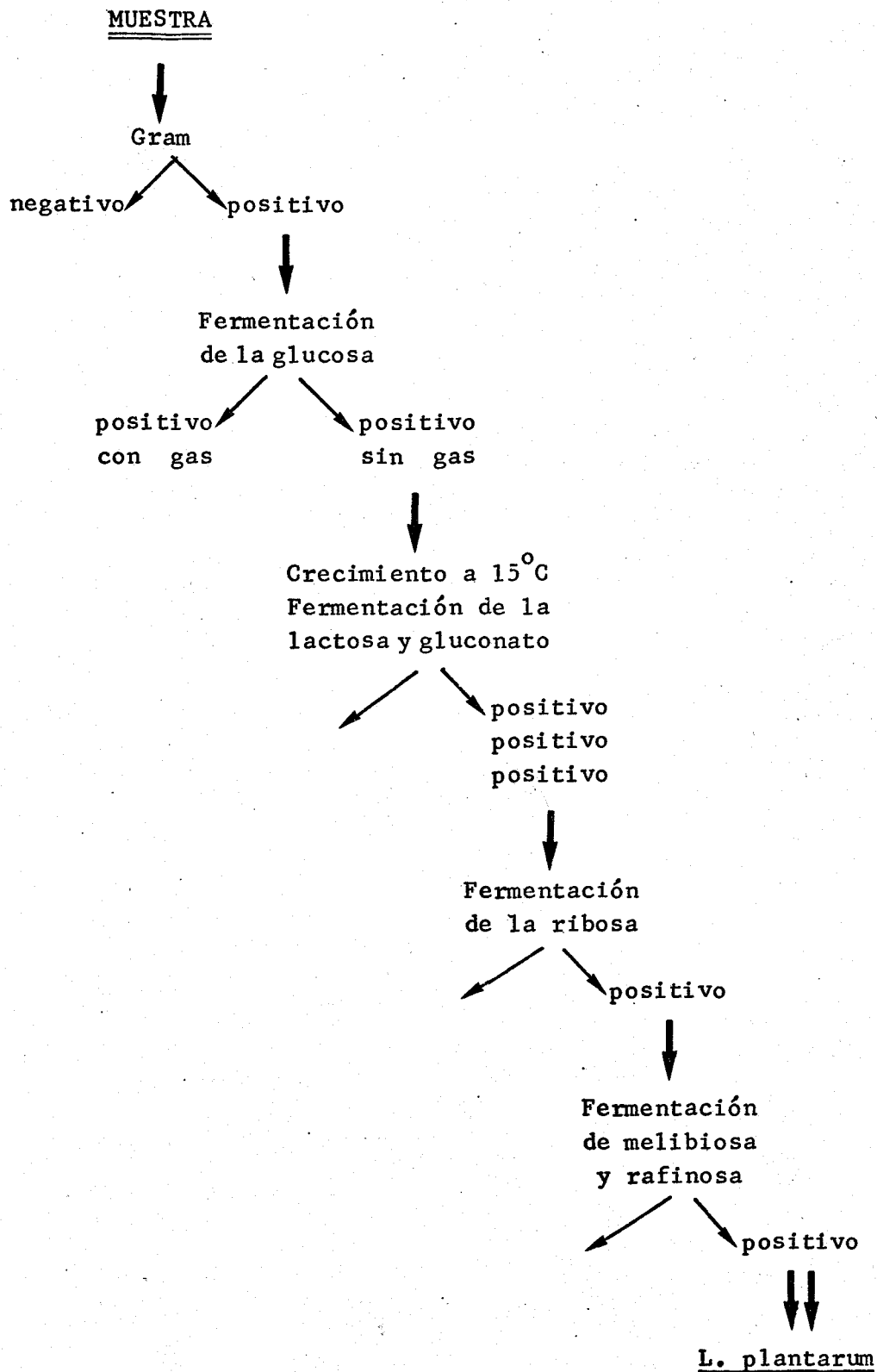
Las muestras recogidas se siembran en placas de Petri con medio agar-M.R.S., fijando en la tapa de las mismas un trozo de papel de filtro impregnado de anetol, con el fin de evitar el crecimiento de las levaduras. Posteriormente se incuban en condiciones microaerófilas a 28°C durante 72 horas.

Las colonias aparecidas se caracterizan posteriormente.

3. CARACTERIZACION DE LACTOBACILOS.

3.1 Ruta de identificación.

Para la caracterización de Lactobacillus plantarum se siguió la línea de identificación marcada por el Manual de Bergey, 8ª edición (Buchanan y Gibbons, 1974). Se han elegido las pruebas bioquímicas necesarias que llevan al perfecto establecimiento de dicha especie. Para ello se utilizaron las pruebas bioquímicas que se mencionan en el siguiente diagrama.



3.2 Técnica de la tinción de Gram.

Los cultivos celulares se tiñen siguiendo la técnica descrita a continuación.

Una vez secas y fijadas por calor, las extensiones se sumergieron durante 1 minuto en una solución de Violeta Cristal al 2% y a continuación se lavaron con una solución yodo-yodurada (lugol) durante 30 segundos. Se escurrieron las preparaciones y se decoloraron con alcohol etílico de 96° durante 10 segundos. Se lavaron enérgicamente con agua abundante y se contrastó con una solución acuosa de safranina al 0,5 %.

3.3 Crecimiento a 15°C.

Se inocularon tubos de M.R.S. líquido y se incubaron en estufa de psicrófilos a 15°C durante 72 horas. Se apreció el crecimiento por aparición de turbidez en el caldo inoculado.

3.4 Utilización de glúcidos.

Las estirpes bacterianas se inocularon en los medios que se describen en Materiales, apartado 4.2. Se investiga en cada caso la producción o no de gas. La lectura de la utilización se determina por el viraje del indicador empleado, considerándola positiva al cambiar de púrpura a amarillo.

4. CULTIVO DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO.

Los cultivos líquidos se inocularon a partir de una colonia bacteriana y se incubaron a 28°C en condiciones microaerófilas

durante 48 horas. A continuación se diluyeron en medio nuevo y se dejaron crecer hasta una concentración aproximada de 4×10^8 células/ml, tomando medida de la densidad óptica a 500 nm con un espectrofotómetro Bausch & Lomb "Spectronic 20".

5. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS.

Después de realizar las diluciones oportunas en tampón M9, se tomaron muestras que se esperaba contuviesen 100-200 u. f. c. (unidad formadora de colonias) y se extendieron en placas con agar-M.R.S., incubándolas seguidamente a 28°C durante 3 días. Para cada determinación se sembraron 3 placas y de ellas se calculó la media.

6. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.

Se sembraron tubos con medio M.R.S. líquido con 0,1 ml de una suspensión del microorganismo cuya densidad óptica era de 0,6 a 500 nm. Los cultivos así sembrados se mantuvieron a 28°C en condiciones microaerófilas, y se determinó el crecimiento midiendo periódicamente la densidad óptica a 500 nm y tomando muestras del cultivo para el recuento del número de células viables. Se pretende con ello establecer el tiempo de generación (t_g) del microorganismo.

7. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA.

La nitrosoguanidina se disolvió en agua destilada a 1 mg/ml, y se dispensó en tubitos a la razón de 1 ml por tubito. Los tubos se guardaron congelados y en oscuridad hasta el momento de ser

utilizados, sin que en ningún caso volvieran a ser congelados.

7.1 En tampón.

Se utilizó la técnica descrita por Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1967) adaptada a L. plantarum. El cultivo de bacterias en fase exponencial (salvo en los experimentos en que expresamente se indique otro estado fisiológico) se lavó dos veces por centrifugación con tampón M9 y se concentró diez veces en el tampón deseado al pH indicado en caso. Se añadió la nitrosoguanidina a las concentraciones finales indicadas en cada caso y se incubó a 28°C, en oscuridad y sin aireación. Después del tratamiento, las células se lavaron dos veces con tampón M9.

7.2 En medio de cultivo.

El tratamiento en medio de cultivo fue en todo similar al utilizado en tampón, con la diferencia de que no se lavó antes del tratamiento, sino que sólo se concentró diez veces en medio fresco.

8. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

Para la obtención de mutantes resistentes a antibióticos (cloramfenicol, rifampicina, kanamicina, estreptomina, ampicilina y tetraciclina) se empleó también el medio M.R.S. Los antibióticos se adicionaron a los medios a las concentraciones que se indican en Materiales, apartado 2.1.

En el caso de mutantes espontáneos, se partió de un cultivo en fase estacionaria. El factor de dilución empleado en cada ca-

so dependió de la frecuencia de aparición de cada uno de los mutantes que se buscaba. Estas frecuencias fueron, en el caso de la rifampicina, de 1×10^{-7} ; en la estreptomicina, de 1×10^{-7} , y en el cloramfenicol, tetraciclina y ampicilina, menores que 10^{-9} .

Cuando se buscaban mutantes resistentes a la estreptomicina o rifampicina inducidos por nitrosoguanidina, la siembra en el medio con el antibiótico se realizó después del tratamiento y efectuando las diluciones apropiadas según cada caso.

IV RESULTADOS Y DISCUSION

CONDICIONES OPTIMAS PARA EL AISLAMIENTO DE MUTANTES EN LAC-
TOBACILLUS PLANTARUM.

1. GENERALIDADES.

Son muchos los trabajos en los que se describe el poder mutagénico de la nitrosoguanidina, tanto en procariotas como en algunas eucariotas. Sin embargo, no se ha descrito el uso de agentes mutagénicos en L. plantarum. En el presente trabajo se pretende establecer cuáles son las condiciones óptimas y más prácticas para la obtención de mutantes de L. plantarum.

De este modo se ha estudiado la influencia de distintos factores en la letalidad, medida como proporción de células capaces de crecer en medio nutritivo después del tratamiento, y en la mutagenicidad, medida por la aparición de colonias resistentes a la estreptomycinina y a la rifampicina.

2. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO.

Las figuras 1 y 2 muestran los resultados de la curva de crecimiento de L. plantarum, estableciéndose un tiempo de generación de 2 horas 30 minutos. La figura 2 establece la relación entre densidad óptica y número de células, en la fase exponencial de crecimiento, muy útil para conocer el número aproximado de células por ml existentes al comenzar cada uno de los experimentos realizados.

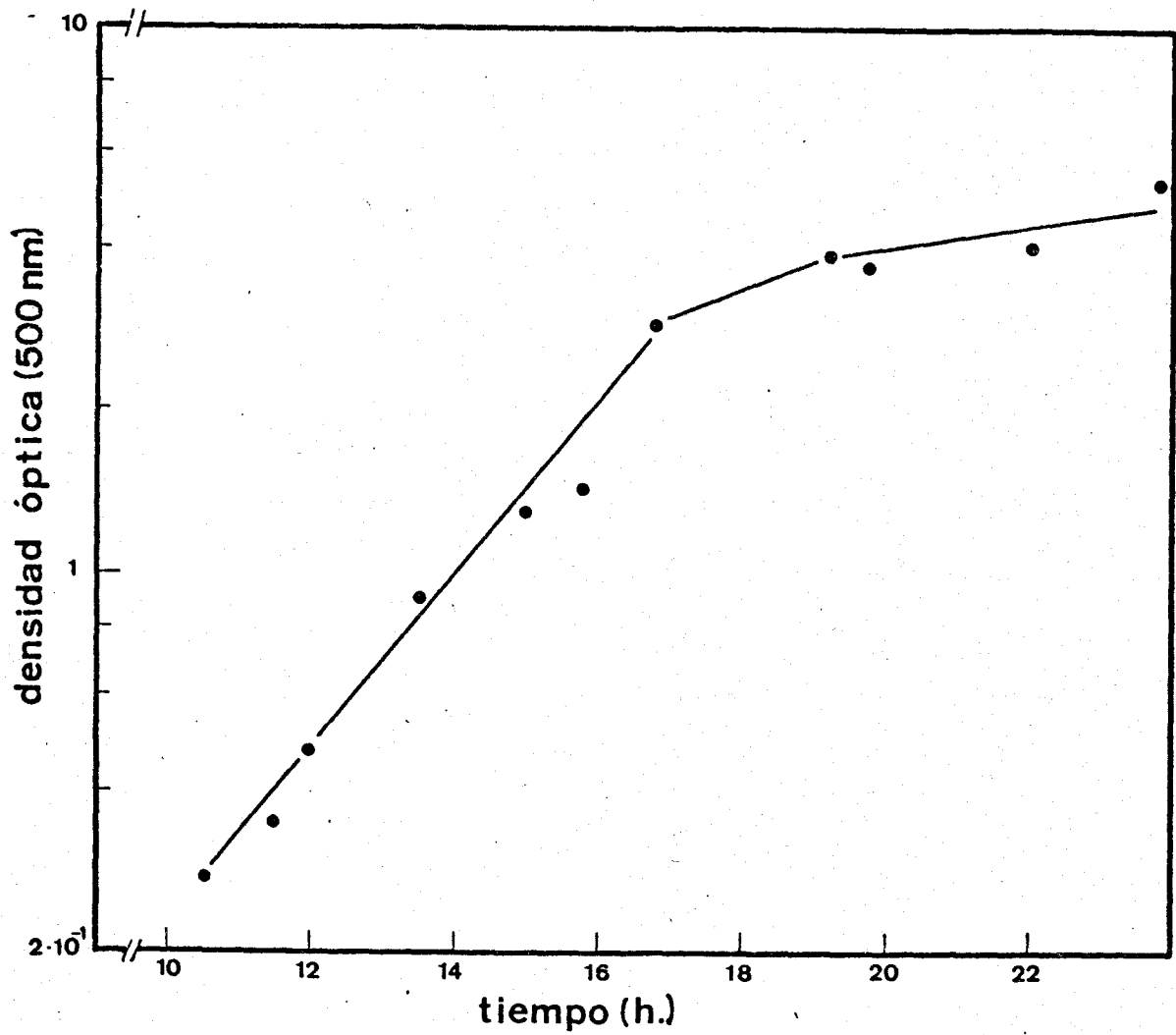


FIGURA 1.- Evolución de la densidad óptica de un cultivo en caldo M.R.S. a lo largo del tiempo.

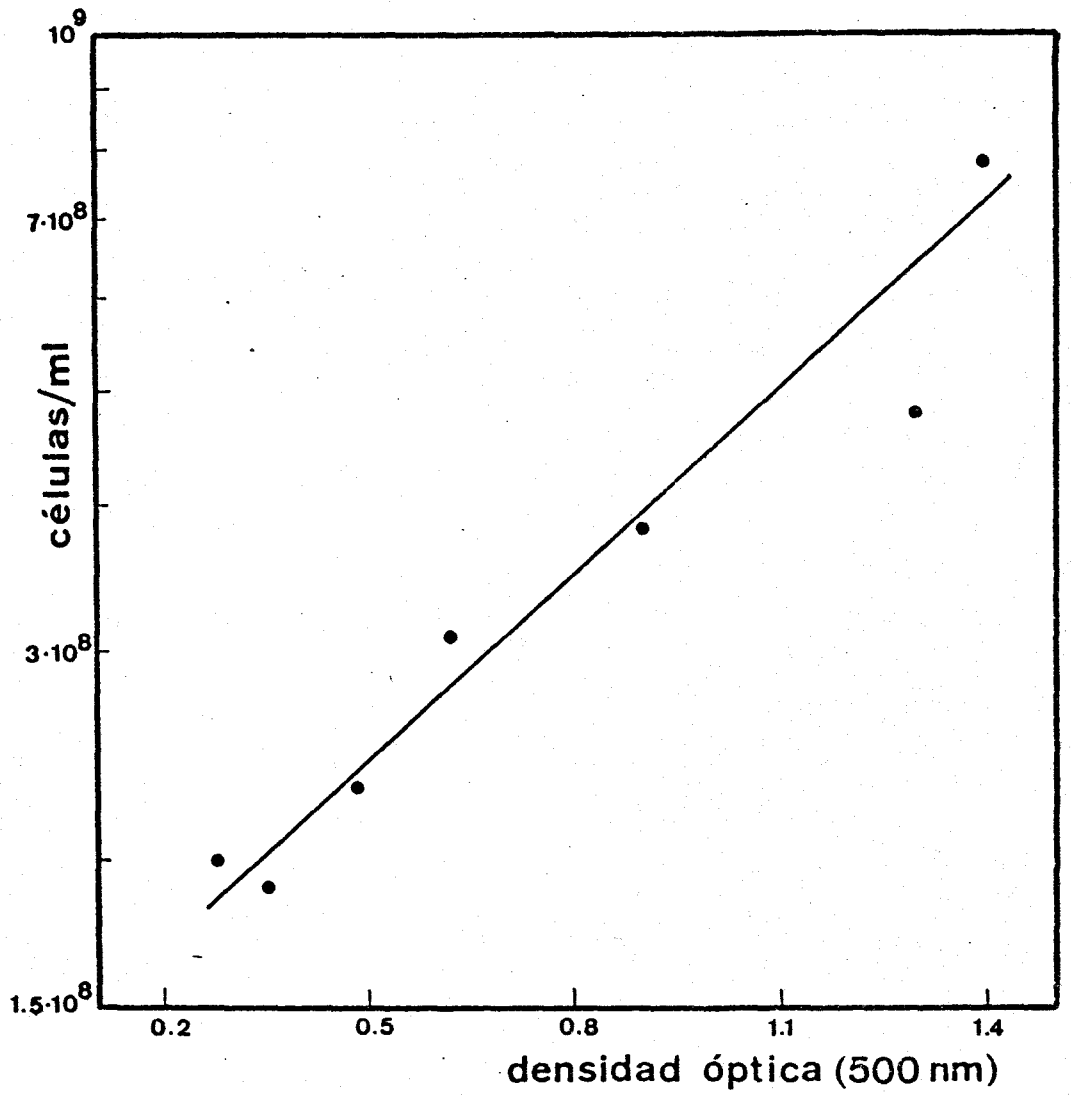


FIGURA 2.- Relación entre el número de células y la densidad óptica, medida a 500 nm, de un cultivo en fase exponencial de crecimiento.

3. ENSAYOS CON NITROSOGUANIDINA.

En todos los organismos, la supervivencia y la frecuencia de mutantes dependen de la concentración del mutágeno y el tiempo de exposición. Además, en bacterias no se ve influida por la agitación del cultivo durante el tratamiento mutagénico, debido, quizás, a que por su menor tamaño las bacterias se mantienen en suspensión durante todo el tratamiento. Por lo tanto, en todos los experimentos realizados prescindiremos de la agitación, incubando a 28°C y en oscuridad.

3.1 Título de células durante el tratamiento.

Otro aspecto interesante fue establecer las suspensiones bacterianas que se deben tratar, ya que, como describen otros autores (López-Calderón, 1980), la accesibilidad de la nitrosoguanidina a las células parece tener importancia.

Se investigó el número de células existentes en la suspensión que se estaba mutagenizando. Para ello se trataron con nitrosoguanidina suspensiones de células de la estirpe bacteriana LS7, que contenían 10^8 , 10^9 y 10^{10} células/ml, respectivamente, provenientes todas del mismo cultivo.

Los resultados de la figura 3 muestran que no influye el título celular de la suspensión que se trate en la letalidad. Sin embargo, en adelante, y por comodidad de trabajo, se utilizarán en todos los experimentos títulos celulares altos, de 10^9 células/ml.

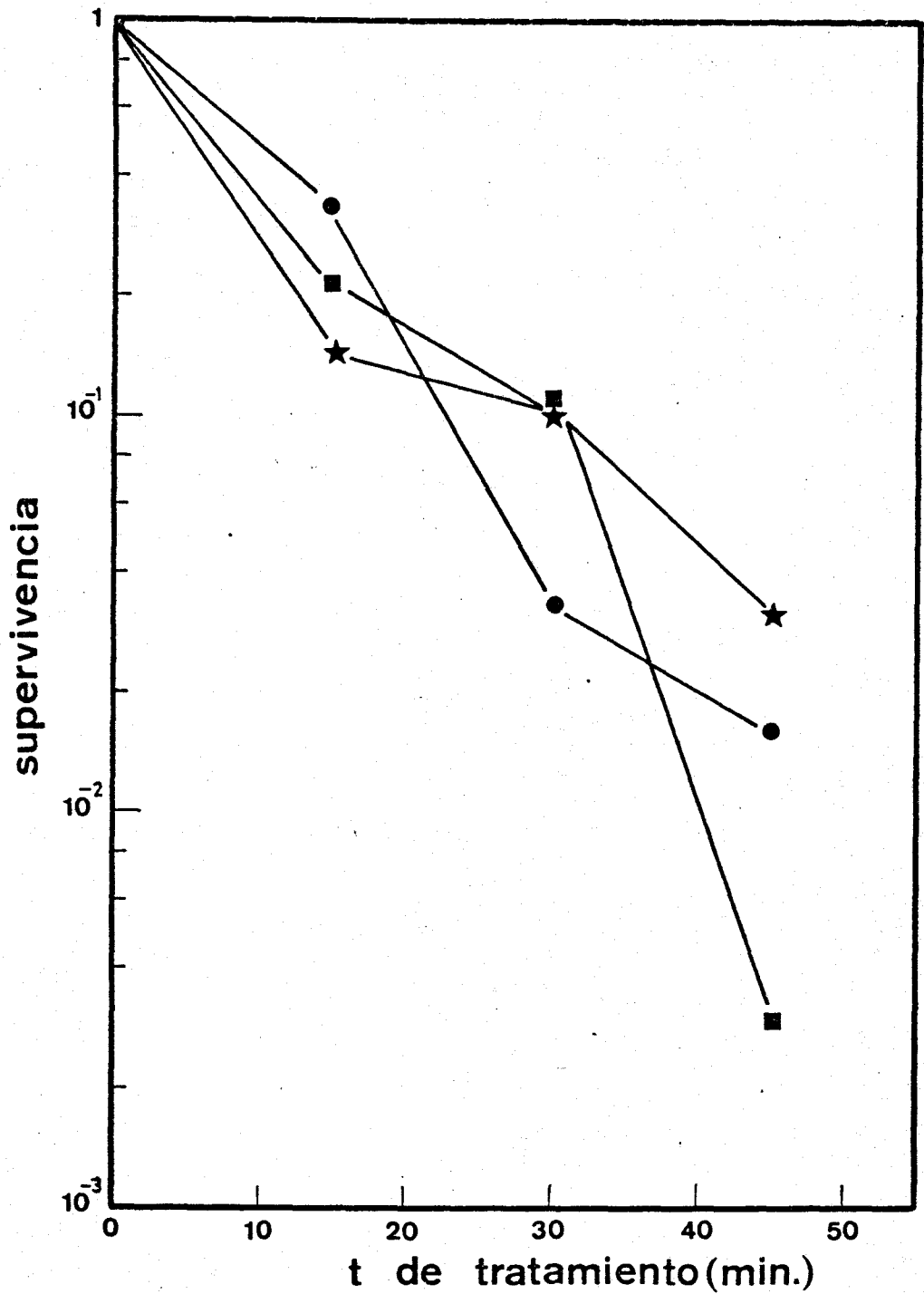


FIGURA 3.- Influencia en la letalidad del título de células durante el tratamiento con nitrosoguanidina. Las suspensiones tratadas contenían (●) 10^8 ; (★) 10^9 , y (■) 10^{10} células/ml.

3.2 Efecto de la densidad de siembra en la obtención de mutantes y viables de un cultivo.

En bacterias se da el caso de que en la detección de mutantes influye la cantidad de células sembradas por caja (Ruiz Vázquez et al., 1978).

Para determinar los títulos de células viables y mutantes después de mutagenizar, se sembraron diversas alícuotas del cultivo utilizando diluciones apropiadas. Como se refleja en las Tablas II y III, hemos constatado que también en L. plantarum tiene importancia la densidad de siembra, tanto para la estimación de la supervivencia como para la frecuencia de mutación. A altas densidades de siembra parece existir una inhibición del crecimiento. A muy bajas densidades la varianza es tan grande que habría de sembrar un número de cajas muy elevado para obtener una determinación fiable. Se procuró, por tanto, emplear factores de dilución que nos dieran alrededor de 100 u.f.c. (unidad formadora de colonia) por caja.

3.3 Influencia del pH.

Los efectos de la nitrosoguanidina en muchos organismos dependen del pH y de la presencia en el medio de ciertos compuestos.

3.3.1 Letalidad a distintos pHs y en distintos tampones.

Se utilizaron tampones acetato, tris-maleato y citrato-fosfato a distintos valores de pH, por ser éstos los de uso más frecuente en los tratamientos mutagénicos con bacterias. En ellos se resuspendieron células procedentes de un mismo cultivo, y se

TABLA II. Efecto de la densidad de siembra en las estimaciones de supervivencia.

concentración de MNNG($\mu\text{g/ml}$)	alícuota	colonias/caja	supervivencia estimada
10	10^{-5}	1654	0,126
	10^{-6}	397	0,304
	10^{-7}	40	0,306
	10^{-8}	5	0,382
100	10^{-5}	699	0,013
	10^{-6}	125	0,094
	10^{-7}	17	0,130
	10^{-8}	4	0,306
1000	10^{-5}	1324	0,051
	10^{-6}	176	0,067
	10^{-7}	19	0,072
	10^{-8}	3	0,115

Se trató una suspensión de células bacterianas a distintas concentraciones de MNNG, en tampón tris-maleato, pH 5,5, durante 15 minutos.

TABLA III. Efecto de la densidad de siembra en las estimaciones de supervivencia y frecuencia de mutación.

Alícuota sembrada (ml)	colonias/caja	supervivencia estimada	Frecuencia de mutación (Rif ^R /10 ⁶ supervivientes)
Siembra en medio M.R.S.:			
10 ⁻⁵	2189	0,156	---
10 ⁻⁶	340	0,242	---
10 ⁻⁷	41	0,292	---
10 ⁻⁸	5,2	0,371	---
Siembra en medio M.R.S. con rifampicina:			
10 ⁻¹	60	---	0,55
10 ⁻²	13	---	1,20
10 ⁻³	2	---	1,85

Se trató una suspensión de bacterias con MNNG a una concentración de 500 µg/ml, en tampón tris-maleato, pH 5,5, durante 15 minutos.

añadió nitrosoguanidina. A 30 y 60 minutos se tomaron muestras que se lavaron por dos veces y se sembraron con las precauciones apropiadas en cajas con medio M.R.S.

Los resultados se presentan en la figura 4. En ella llaman la atención dos hechos. La diferencia de letalidad en los tampones, claramente visible a pH 5,5, donde el tampón tris-maleato presenta una supervivencia muy baja a dicho pH frente a la presentada por los tampones acetato y citrato-fosfato. El otro hecho a destacar es la supervivencia que se presenta en tampón tris-maleato a pHs superiores a 7.

La molaridad de los componentes de cada uno de los tampones es la misma a los distintos pHs. No así su estado de ionización, que depende del pH. Por tanto, el que la nitrosoguanidina mate más o menos a un pH determinado podría achacarse bien directamente a la concentración de H^+ , bien a la fuerza iónica del tampón a ese pH.

Las diferencias observadas entre los tampones a un mismo pH podrían ser debidas a diferencias en las fuerzas iónicas o a la naturaleza de las sustancias tamponantes.

En todo caso, dado que la supervivencia obtenida al utilizar el tampón tris-maleato está comprendida entre el 5 y 20 %, se eligió como medio para realizar la mutagénesis en los sucesivos experimentos.

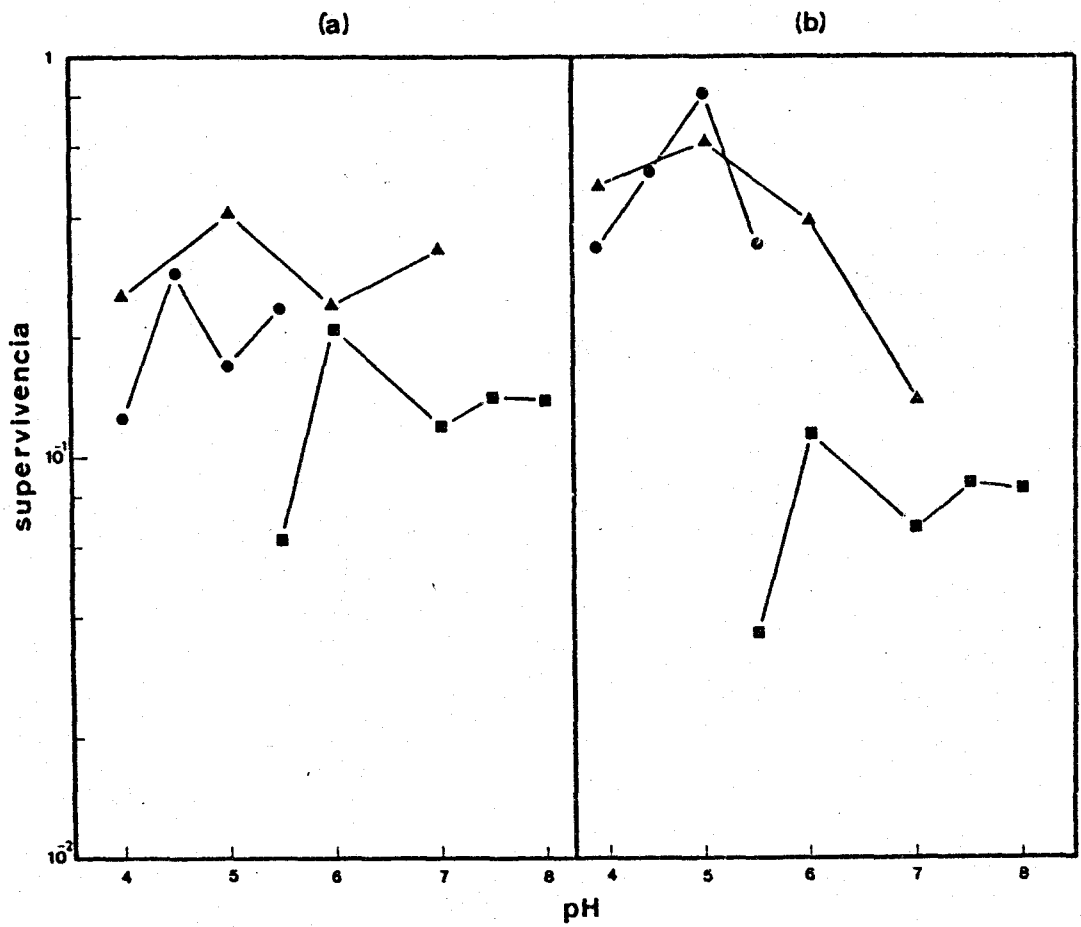


FIGURA 4.- Letalidad producida por tratamientos de 30 minutos (a) y 60 minutos (b), con nitrosoguanidina en (●) tampón acetato; (■) tampón tris-maleato, y (▲) tampón citrato-fosfato.

3.3.2 Letalidad en función del pH a lo largo del tiempo.

Para completar los resultados expuestos en el apartado anterior, se estudió la evolución de la letalidad a lo largo del tiempo en uno de los tampones empleados. En la figura 5 se muestran los resultados obtenidos en tampón tris-maleato a pH 5,5; 6; 7; 7,5 y 8. De la gráfica se deduce que todas las curvas de supervivencia a la nitrosoguanidina presentan un comportamiento heterogéneo de la población, existiendo una fase rápida de muerte, que afectaría a las células más sensibles (aproximadamente un 80 %), y una fase lenta de muerte correspondiente a las menos sensibles, que deben constituir un 20 % de la población.

Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1967) y Megías (1981) encontraron varios mecanismos para la letalidad a diferentes pHs. Sin embargo, de los resultados obtenidos en este trabajo se puede deducir que en L. plantarum sólo existe un mecanismo de letalidad.

Como se observaba en la figura anterior (fig. 4), la máxima letalidad en tampón tris-maleato se consigue a pH 6, disminuyendo ligeramente a pHs superiores y bruscamente a pHs inferiores a éste, especialmente a pH 5,5. Estos resultados difieren de los obtenidos por Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1980a) en Escherichia coli, pero en los otros tampones utilizados coinciden con la apreciación indicada por estos autores, quienes encontraron una máxima supervivencia a pH 5, disminuyendo ésta drásticamente cuando se variaba el pH hacia cualquiera de ambos extremos de la escala, lo cual indica la existencia de una estrecha relación entre descomposición de la nitrosoguanidina y letalidad.

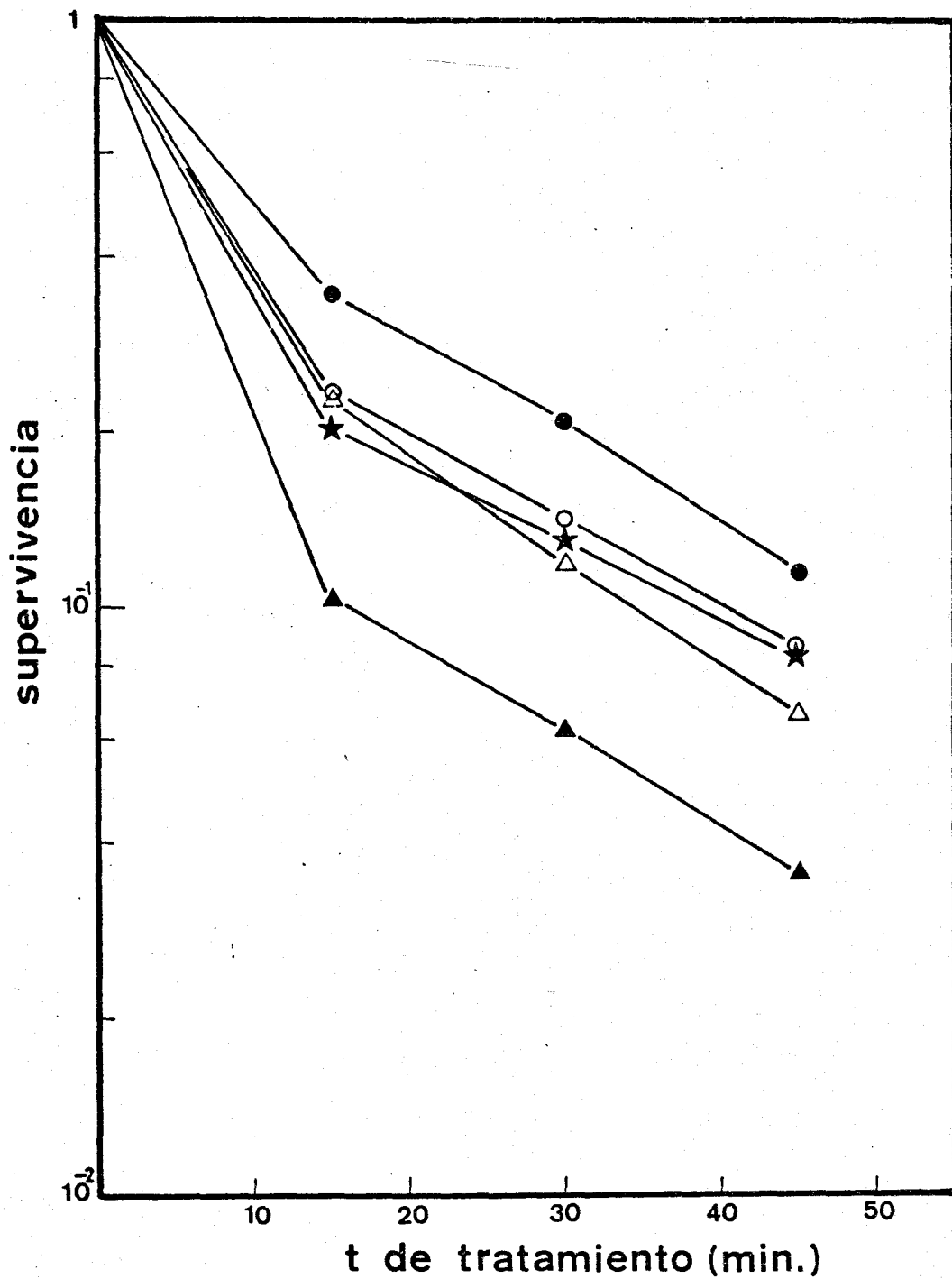


FIGURA 5.- Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad producida por nitrosoguanidina en tampón tris-maleato a varios valores de pH. (▲) 5,5 unidades; (●) 6,0 unidades; (△) 7,0 unidades; (○) 7,5 unidades, y (★) 8,0 unidades.

3.4 Influencia de la concentración de nitrosoguanidina.

Se han utilizado concentraciones crecientes de nitrosoguanidina, estudiando la letalidad a lo largo del tiempo. En la figura 6 se muestran los resultados obtenidos al tratar una suspensión bacteriana a las concentraciones de 10, 100, 500 y 1000 μg de nitrosoguanidina por ml. Se observa una disminución de la supervivencia al aumentar la concentración de nitrosoguanidina.

La obtención de una alta supervivencia a concentraciones elevadas de nitrosoguanidina, que difieren de las obtenidas en otras bacterias (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968), puede explicarse por el tiempo de generación de L. plantarum (2 horas 30 minutos), superior al de dichas bacterias. Estos resultados coinciden con los presentados por Megías et al. (1981) sobre Rhizobium trifolii, cuyo tiempo de generación es similar al de L. plantarum.

3.5 Influencia del estado fisiológico del cultivo.

Actualmente se acepta que la nitrosoguanidina ejerce su acción preferentemente en las regiones cromosómicas que se encuentran en replicación. Por tanto, cabe pensar que las más altas frecuencias de mutación deben obtenerse tratando cultivos en fase exponencial de crecimiento, y de hecho así ocurre en E. coli (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b).

3.5.1 Letalidad en células procedentes de un cultivo en distintas fases de crecimiento.

La figura 7 muestra la evolución del número de células de un cultivo en caldo M.R.S. a lo largo del tiempo. Las muestras para

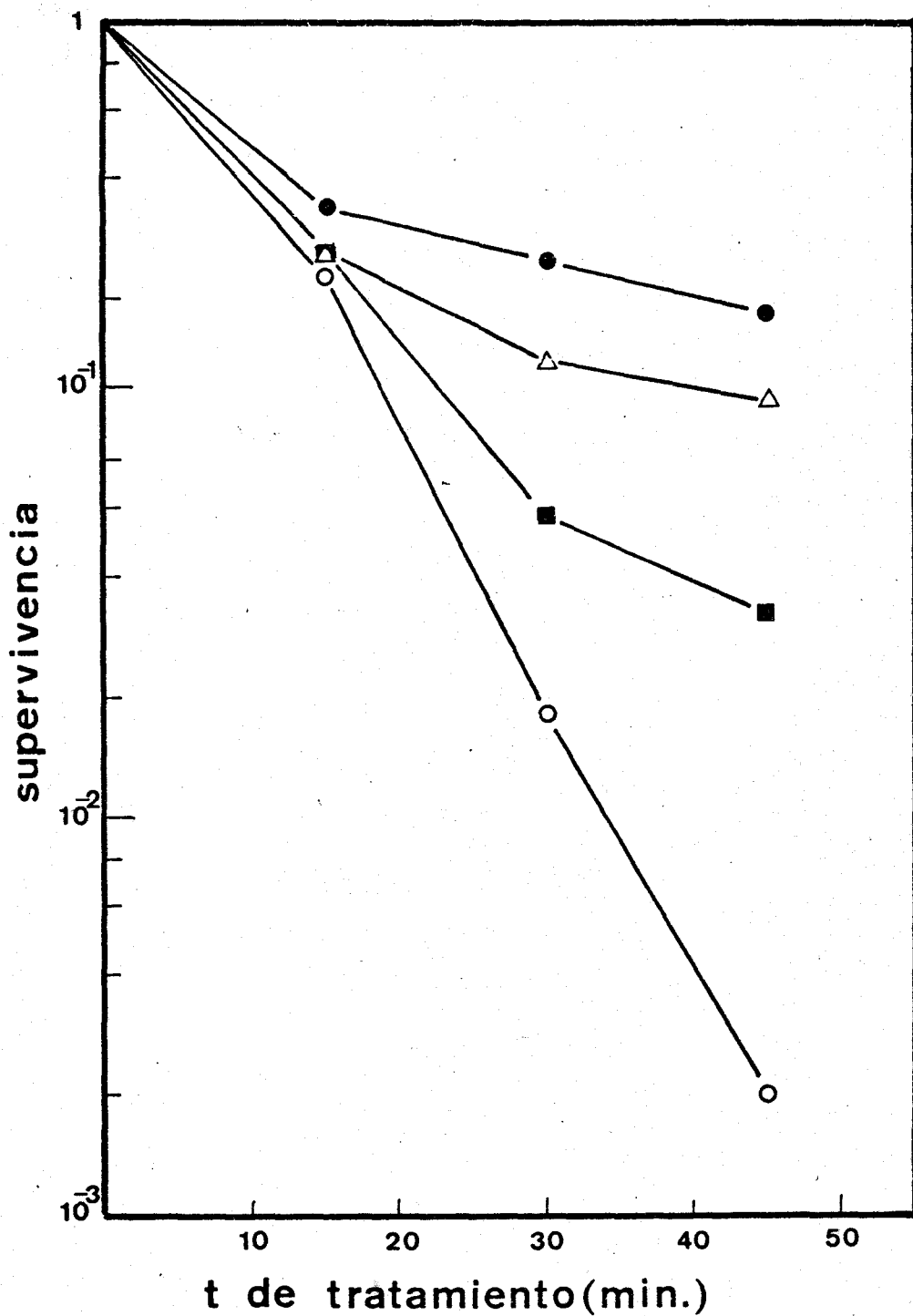


FIGURA 6.- Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad producida a distintas concentraciones de nitrosoguanidina en tampón tris-maleato (pH 5,5). (●) 10 µg/ml de MNNG; (△) 100 µg/ml de MNNG; (■) 500 µg/ml de MNNG, y (○) 1000 µg/ml de MNNG.

los tratamientos con nitrosoguanidina se tomaron en los puntos de la curva indicados por las flechas. En el punto A se considera que el cultivo se encuentra en fase "lag"; el B se considera en fase exponencial, y el C, en fase estacionaria.

Los resultados de estos tratamientos se muestran en la figura 8. Como se aprecia en la gráfica, la supervivencia es elevada en los estados fisiológicos en los que la célula no está en pleno desarrollo de crecimiento, y la letalidad a lo largo del tiempo es diferente a la observada en fase exponencial de crecimiento.

La curva de supervivencia en fase estacionaria parece indicar la ausencia de una parte de la población más sensible al agente mutagénico, incluso apreciándose un ligero punto de inflexión a 15 minutos de tratamiento, lo que nos podría indicar la existencia de un segundo mecanismo de letalidad en el cual o bien existiesen en la célula varios objetivos que han de ser inactivados por la nitrosoguanidina para que ésta muera, o bien la acción letal debe vencer la resistencia opuesta por el mecanismo de reparación. Cabe pensar que esta influencia del estado de crecimiento celular sobre la letalidad producida por la nitrosoguanidina se explique por la existencia del proceso de reparación. Si los daños causados por la nitrosoguanidina no son reparados antes de ser replicados, podrán ser causa de daño letal. Cuanto más lenta sea la replicación habrá mayor posibilidad de reparar a tiempo los daños producidos por la nitrosoguanidina. El hecho de que el punto de replicación se detenga al añadir el mutágeno, tanto a 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b; Guerola et al., 1971)

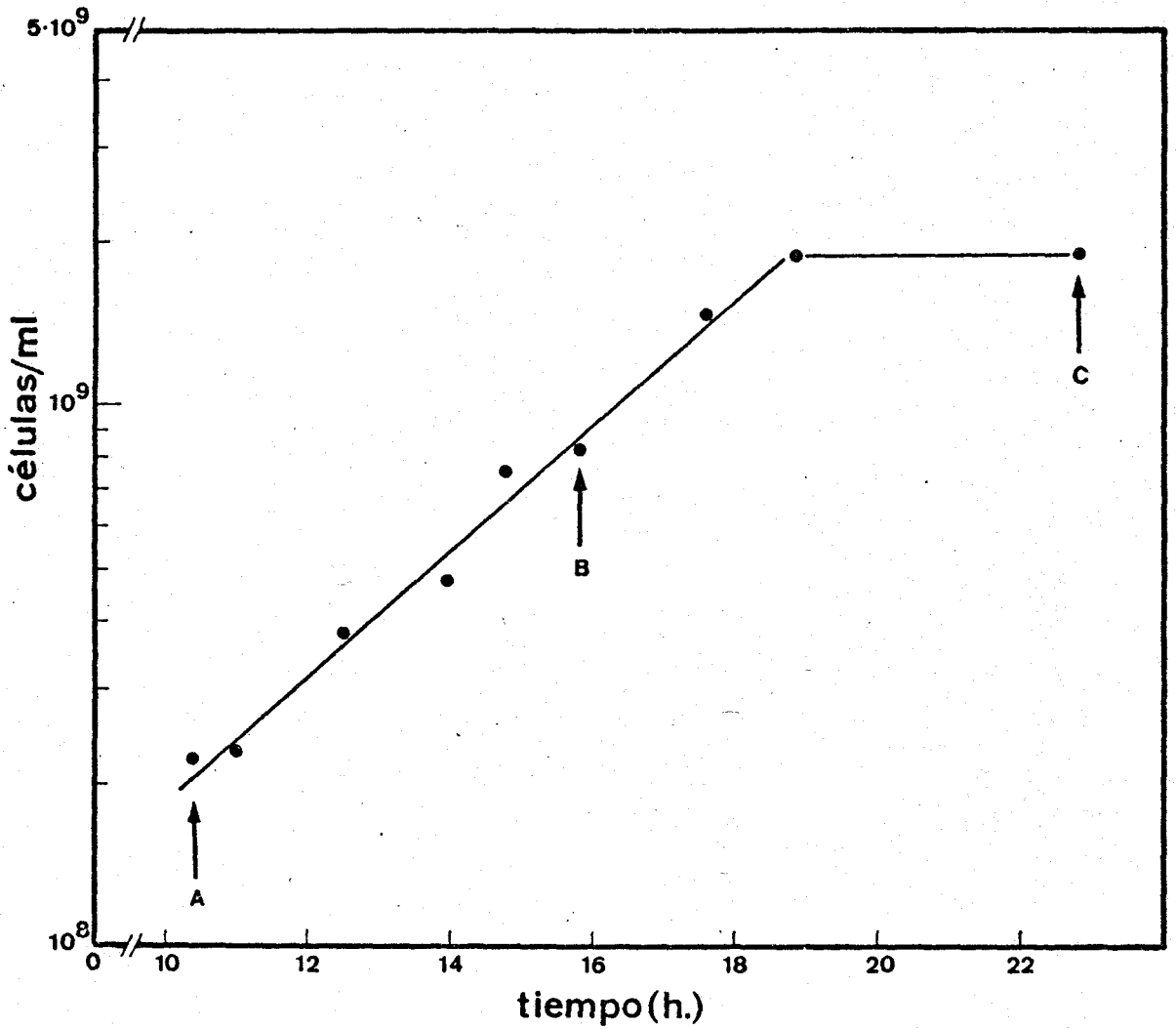


FIGURA 7.- Evolución del número de células de un cultivo en medio M.R.S. Las flechas indican los momentos en que se tomaron las muestras para los tratamientos con nitrosoguanidina.

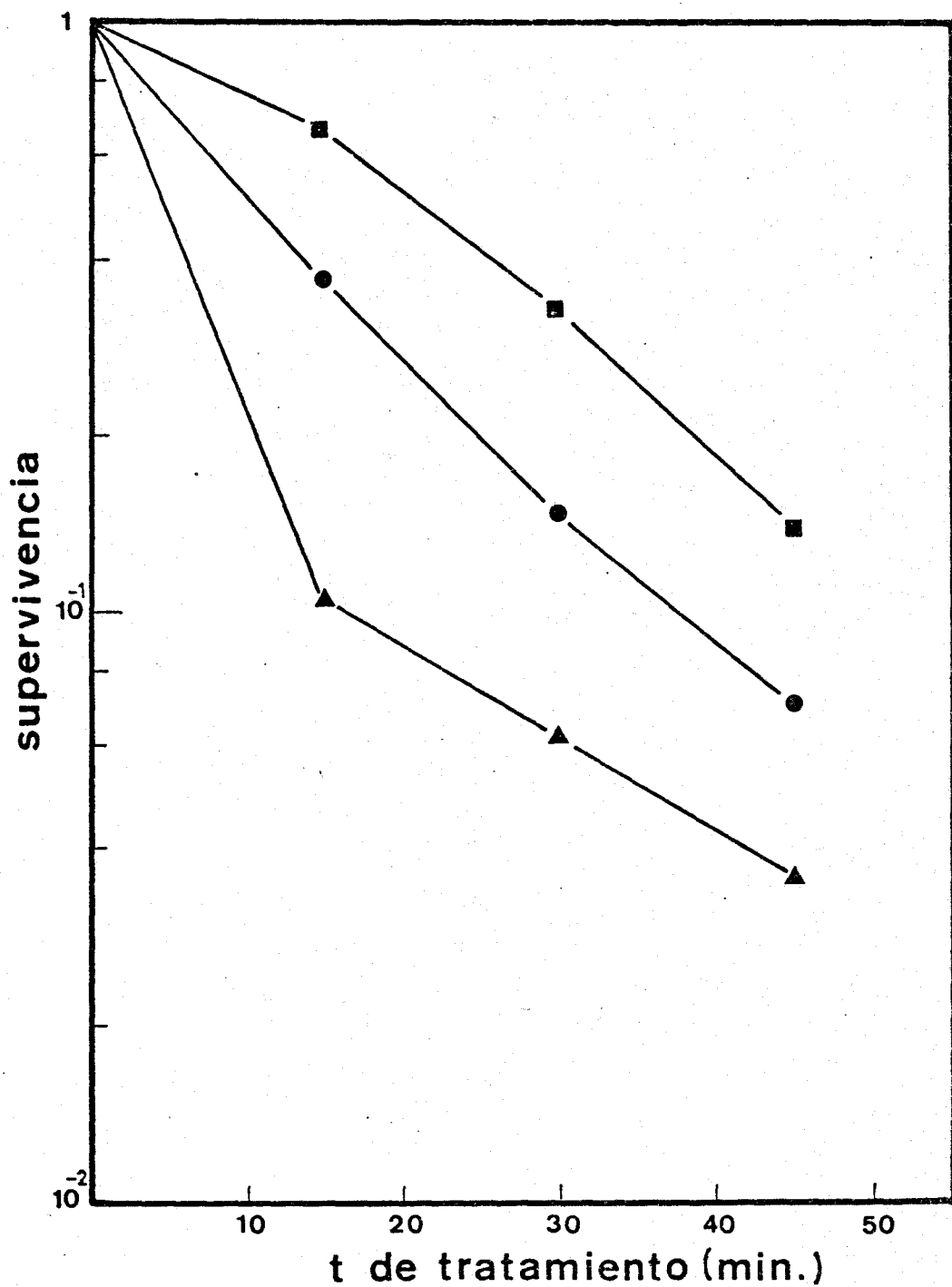


FIGURA 8.- Letalidad en cultivos a distintas fases de crecimiento: (●) "lag"; (▲) exponencial y (■) estacionaria, producida por la nitrosoguanidina a 500 $\mu\text{g/ml}$, durante 30 minutos de tratamiento en tampón tris-maleato pH 5,5.

como a 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (Jiménez-Sánchez, 1974), puede ser considerado como un mecanismo de defensa de la célula para evitar una mayor letalidad. La síntesis de ADN encontrada inmediatamente después del tratamiento en células en tampón, es únicamente síntesis reparadora (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967a y 1967b), y no replicación normal.

La curva que aparece en la fase "lag" de crecimiento indica que todas las células presentan el mismo comportamiento frente a la acción letal de la nitrosoguanidina.

De los resultados obtenidos se deduce que en la fase exponencial de crecimiento el cultivo se encuentra en estado óptimo para su tratamiento con nitrosoguanidina.

4. OBTENCION DE RESISTENTES A ANTIBIOTICOS.

Dado que en la bibliografía no se presentan estudios sobre la resistencia de L. plantarum a los antibióticos, se ha querido realizar un estudio preliminar sobre obtención de mutantes espontáneos resistentes a los antibióticos más habituales en estudios genéticos, para su utilización posterior en el estudio de la mutagenicidad producida por nitrosoguanidina.

Los resistentes espontáneos a los antibióticos (Materiales, apartado 2.1) se obtuvieron según se indica en Métodos, apartado 8.

En la Tabla IV se muestran los resultados obtenidos, de los que se puede deducir que L. plantarum es resistente a la kanamicina, como era de esperar, y que sólo se han obtenido resistentes de forma espontánea a la rifampicina y estreptomycin, con fre-

TABLA IV. Aparición de mutantes espontáneos resistentes a anti-bióticos.

título de células	fenotipos seleccionados	nº de células en agar nutritivo	nº de células resistentes a antibióticos	frecuencia espontánea de mutación
10 ⁸	Kan ^R	2,83 x 10 ⁸	1,23 x 10 ⁸	4,34 x 10 ⁻¹
	Cml ^R	2,83 x 10 ⁸	---	>10 ⁻⁸
	Tet ^R	2,83 x 10 ⁸	---	>10 ⁻⁸
	Rif ^R	2,83 x 10 ⁸	3,56 x 10 ²	1,25 x 10 ⁻⁶
	Amp ^R	2,83 x 10 ⁸	---	>10 ⁻⁸
	Str ^R	2,75 x 10 ⁸	5,70 x 10 ²	7,07 x 10 ⁻⁶
10 ⁹	Kan ^R	1,08 x 10 ⁹	7,80 x 10 ⁸	7,22 x 10 ⁻¹
	Cml ^R	1,08 x 10 ⁹	---	>10 ⁻⁹
	Tet ^R	1,08 x 10 ⁹	---	>10 ⁻⁹
	Rif ^R	1,08 x 10 ⁹	6,26 x 10 ²	5,79 x 10 ⁻⁷
	Amp ^R	1,08 x 10 ⁹	---	>10 ⁻⁹
	Str ^R	1,41 x 10 ⁹	4,00 x 10 ²	2,85 x 10 ⁻⁷

Los signos indican el fenotipo al que confiere resistencia el anti-biótico. Kan, kanamicina; Cml, cloramfenicol; Tet, tetraciclina; Rif, rifampicina; Amp, ampicilina, y Str, estreptomicina.

cuencias de aparición de mutantes resistentes aproximadamente iguales a las descritas en la bibliografía.

A la vista de estos resultados, se emplearon los antibióticos mencionados para estudiar la mutagenicidad producida por la nitrosoguanidina, mediante la búsqueda de mutantes resistentes inducidos.

5. ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD PRODUCIDA POR LA NITROSOGUANIDINA.

5.1 Estudio de la aparición de mutantes resistentes a la estreptomycinina.

Se ha elegido la estreptomycinina, entre otros antibióticos, para el estudio de la mutagenicidad producida por nitrosoguanidina, debido a que se producen en ella altas frecuencias de mutación con este mutágeno (Silengo et al., 1967).

5.1.1 Influencia del medio de tratamiento en la mutagenicidad producida por nitrosoguanidina.

Se han empleado varios medios tamponados y medios de cultivo para realizar la mutagénesis, estudiándose la letalidad producida a tiempo fijo y la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a la estreptomycinina, sembrando directamente en medio M.R.S. con el antibiótico. La Tabla V muestra los resultados obtenidos, indicando los pHs a los que se encontraban los medios. De estos resultados se deduce que el medio idóneo para realizar la mutagénesis, con mayor aparición de mutantes resistentes inducidos, es el tampón tris-maleato a pH 5,5. El tratamiento en caldo M.R.S. conduce usualmente a una menor frecuencia de mutación que en tam

TABLA V. Supervivencia y frecuencia de aparición de mutantes a la estreptomicina tras tratamientos con nitrosoguanidina a 500 $\mu\text{g/ml}$, en distintos medios y durante 30 minutos de contacto.

Medio de tratamiento	pH	supervivencia	Frecuencia de mutación ($\text{Str}^{\text{R}}/10^6$ supervivientes)
T. fosfato	7,0	0,180	22,03
T. acetato	4,5	0,385	8,10
T. tris-maleato	5,5	0,057	73,75
Medio M.R.S. (a)	5,0	0,278	24,66
Medio M.R.S.	6,2	0,239	16,52

(a) El tratamiento se realizó sin lavar las células antes de la adición del agente mutagénico.

pón tris-maleato. Esto se puede explicar por la presencia en el caldo M.R.S. de mayor cantidad de grupos reaccionables con la nitrosoguanidina, procedentes de los extractos de carne y levadura.

Resultados opuestos a los encontrados indicarían una mayor mutagenicidad en medios completos que en tampón tris-maleato pH 5,5 (Kimball, 1980b).

A partir de este momento, pues, para el estudio de la mutagenicidad producida por la nitrosoguanidina se empleará tampón tris-maleato a pH 5,5 como vehículo del tratamiento.

5.1.2 Influencia del pH en la mutagenicidad.

En este apartado se estudia la aparición de mutantes resistentes a la estreptomicina tras tratamiento con nitrosoguanidina a diferentes pHs en tampón tris-maleato.

En la figura 9 se observan los resultados obtenidos, apreciándose una mayor eficacia en la obtención de resistentes a la estreptomicina a valores de pH de 7,4. De esta gráfica cabría deducir que el pH idóneo para la mutagénesis con nitrosoguanidina sería el indicado. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1968a) y López Calderón (1980), aunque no parece ser un efecto general en todos los organismos, ya que en Streptomyces cacaoi no se da esta relación.

Pero, dado que la letalidad correspondiente a pH 7,4 es inferior que la obtenida a pH 5,5, hemos creído conveniente, aun teniendo en cuenta que la aparición de mutantes resistentes a la estreptomicina a pH 5,5 es menor que al pH anteriormente indicado, seguir usando dicho valor de pH en lo sucesivo. Además, como se indica en la bibliografía (Neale, 1976), se deben elegir valores de la letalidad que estén comprendidos entre el 5 y el 10 %.

5.1.3 Variación de la mutagenicidad con la concentración de nitrosoguanidina.

En la figura 10 se estudia la evolución de la letalidad a distintas concentraciones de nitrosoguanidina y la mutagenicidad medida como aparición de mutantes resistentes a la estreptomicina. De la misma se puede deducir que concentraciones superiores a 500 $\mu\text{g/ml}$ dan tasas de aparición de mutantes resistentes

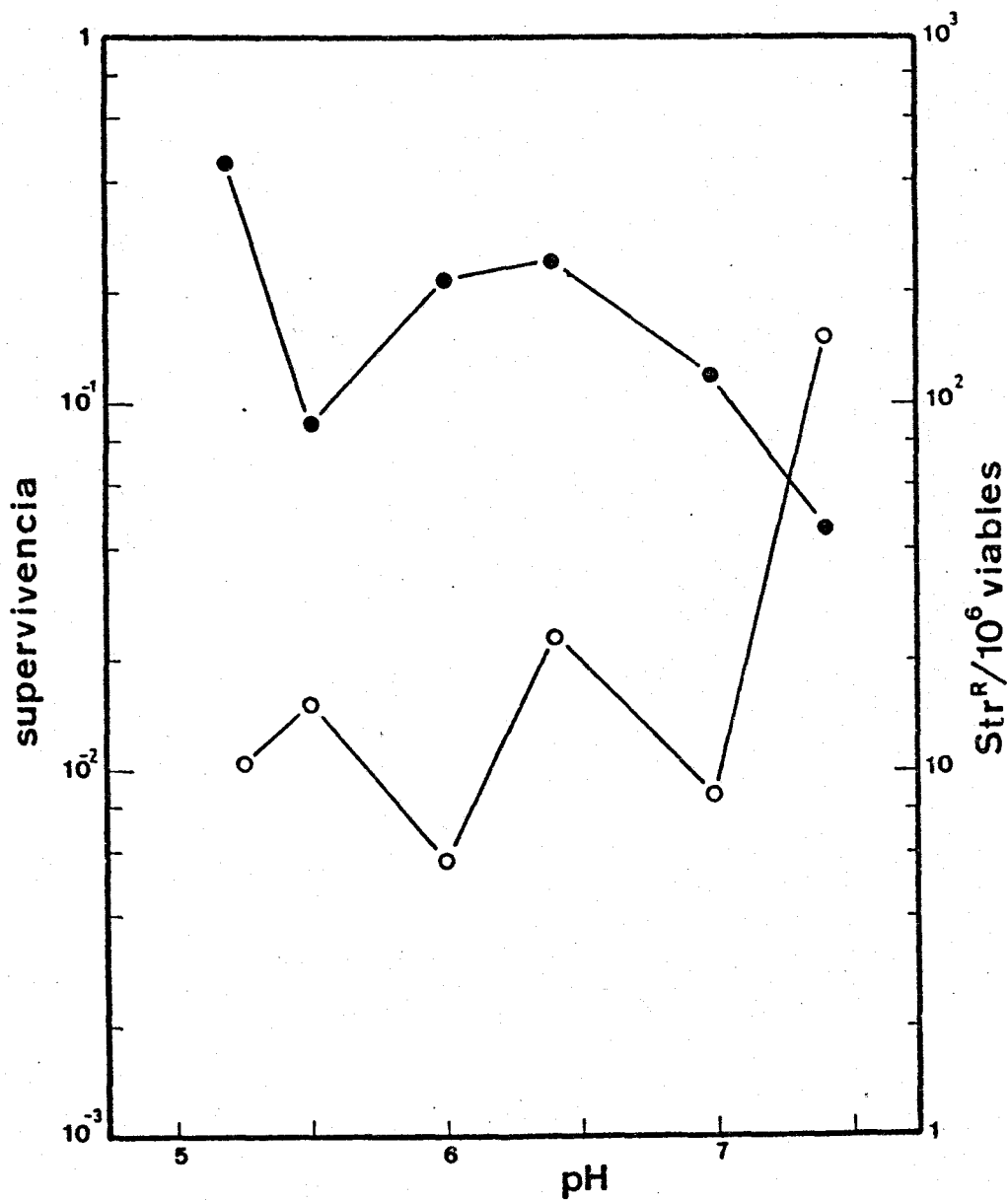


FIGURA 9.- Letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina a 500 μg del mutágeno por ml, durante 30 minutos de tratamiento en tampón tris-maleato a diferentes pHs. (●) supervivencia; (○) frecuencia de mutantes seleccionados después del tratamiento.

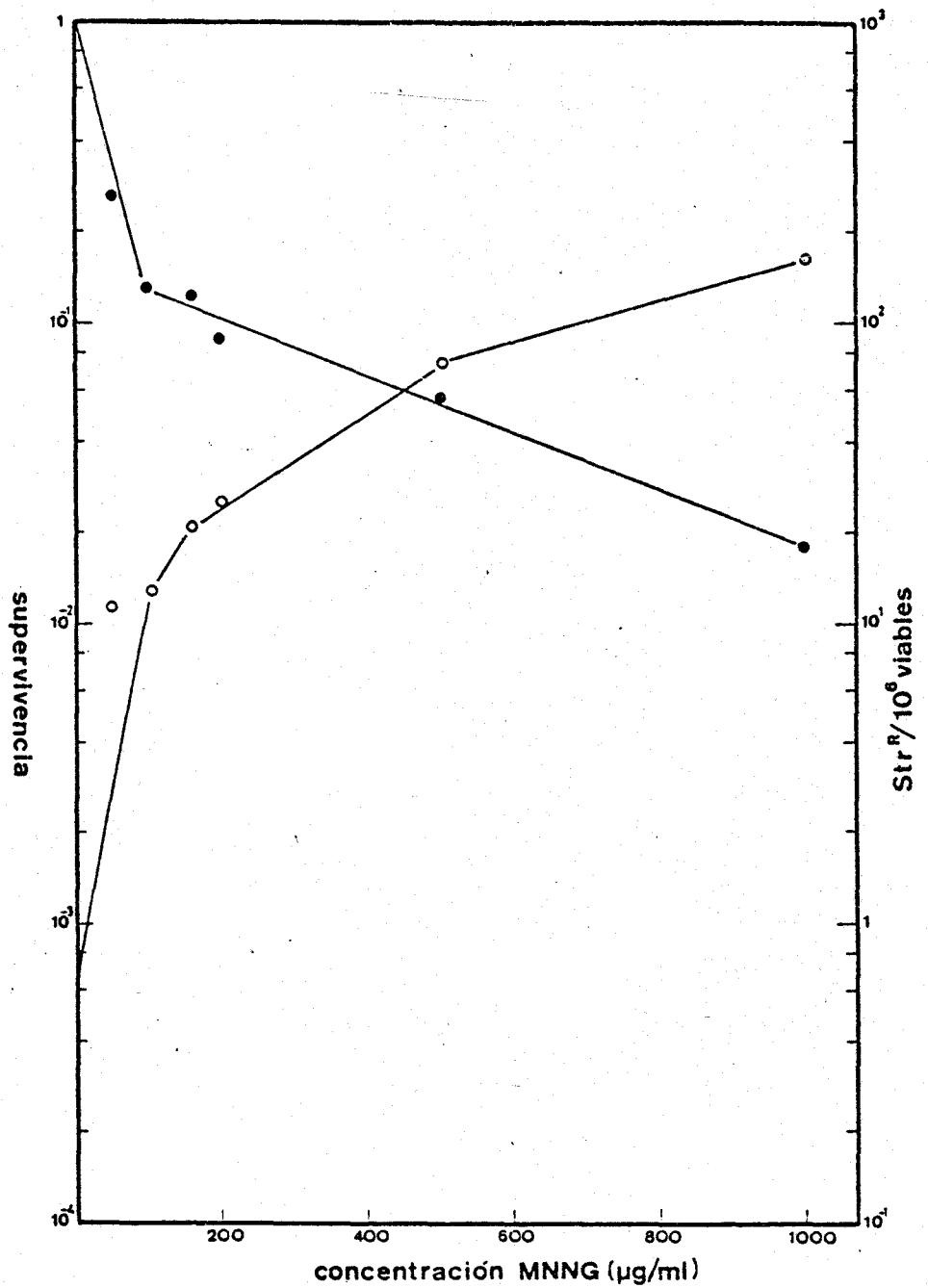


FIGURA 10.- Letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en tampón tris-maleato (pH 5,5), durante 30 minutos de tratamiento, a diferentes concentraciones del mutágeno. (●) supervivencia; (○) frecuencia de mutantes seleccionados después del tratamiento.

a la estreptomycinina mayores, lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos por Kimball (1980b) en Haemophilus influenzae, que consigue un aumento de mutantes resistentes a la novobiocina al aumentar la concentración del mutágeno.

Ya que la letalidad que se produce a esas concentraciones es inferior al 5 %, hemos creído conveniente la utilización de concentraciones de nitrosoguanidina menores o iguales que 500 $\mu\text{g/ml}$.

La concentración empleada en los experimentos siguientes será de 500 $\mu\text{g/ml}$, ya que se obtiene a esa concentración valores de aparición de mutantes resistentes a la estreptomycinina superiores en dos órdenes de magnitud a las demás concentraciones.

5.1.4 Evolución de la mutagenicidad a lo largo del tiempo.

Con este experimento se trató de establecer el tiempo óptimo de tratamiento con el agente mutagénico en L. plantarum.

Para ello, como se muestra en la figura 11, se estudió la letalidad y mutagenicidad producidas a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ a lo largo del tiempo. De la gráfica se deduce, y por razonamientos análogos a los del apartado anterior, que el tiempo óptimo de tratamiento oscila entre los 20 y los 30 minutos. Por comodidad de trabajo y de acuerdo con los datos presentados en la bibliografía (Megías, 1981), hemos creído conveniente utilizar 30 minutos como tiempo óptimo de tratamiento.

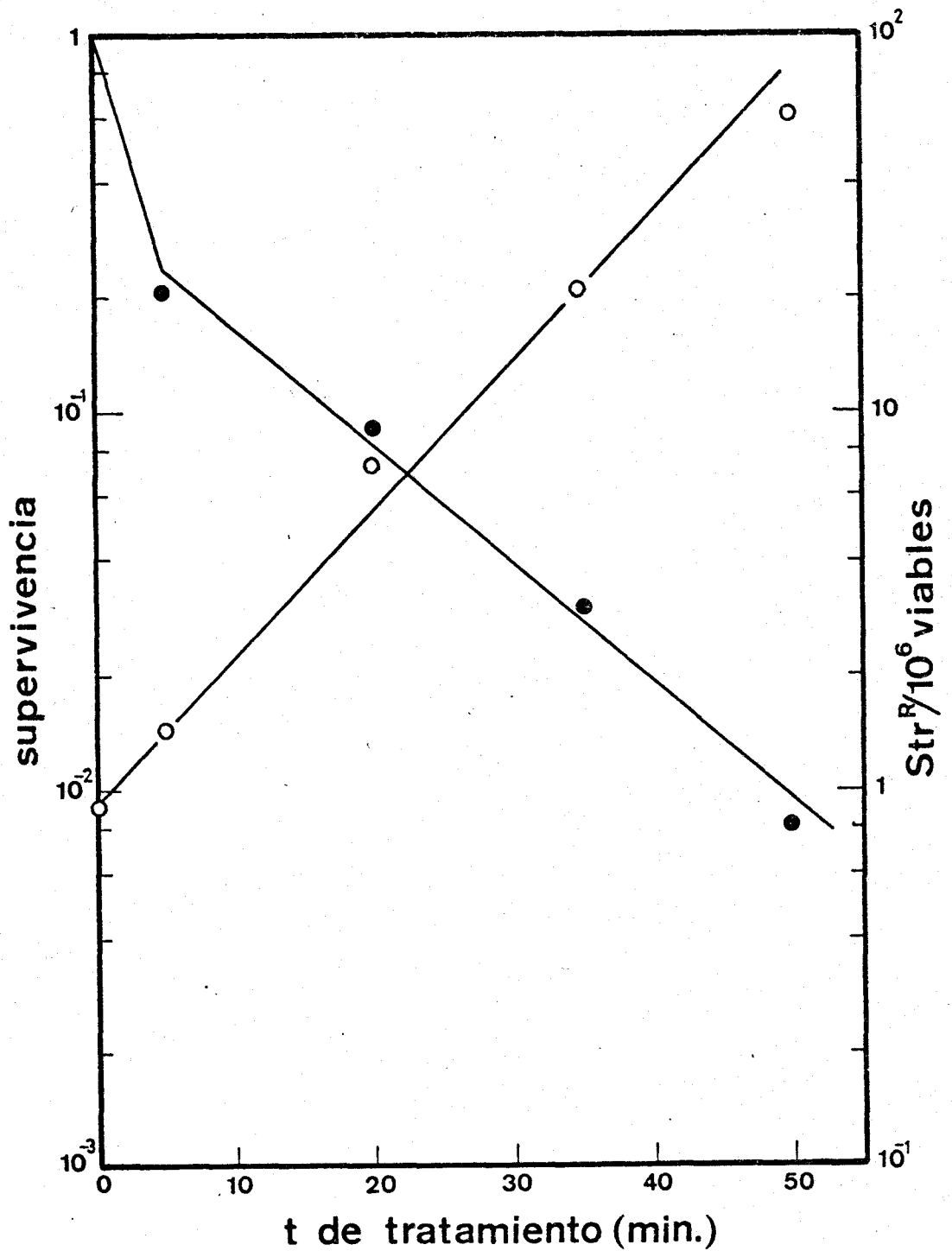


FIGURA 11.- Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, en tampón tris-maleato a pH 5,5. (●) supervivencia; (○) frecuencia de mutantes seleccionados después del tratamiento.

5.2 Efecto de la incubación tras tratamiento con nitrosoguanidina en la expresión de las mutaciones.

Kaudewitz (1955) encontró que la frecuencia de revertientes inducidos por la luz ultravioleta de una estirpe auxotrofa para la lisina de Salmonella typhimurium era mayor si se le permitía crecer varias generaciones antes de sembrar en medio selectivo. El mismo efecto se ha encontrado en otros organismos.

Se prepararon cultivos en medio M.R.S. y se trataron con nitrosoguanidina, se resuspendieron en el medio del que procedían y se incubaron durante unas 24 horas con aireación.

La figura 12 muestra la letalidad y la aparición de colonias resistentes a la rifampicina. Esto último, la aparición de resistentes a la rifampicina, se midió en placas con el antibiótico sembradas inmediatamente después del tratamiento y después de recrecimiento en medio líquido.

De los resultados expuestos en la gráfica, se observa que las diferencias en las frecuencias de aparición de mutantes resistentes a la rifampicina antes y después de incubación en medio M.R.S. no son significativamente diferentes incluso a niveles de significación del 1 %, según los datos obtenidos mediante test de igualdad de porcentajes.

Por lo tanto, y de acuerdo con lo que sugiere Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1967b), esta invariabilidad en la frecuencia de mutación tras la incubación, indica que L. plantarum en las condiciones fisiológicas de cultivo empleadas posee un solo cromosoma.

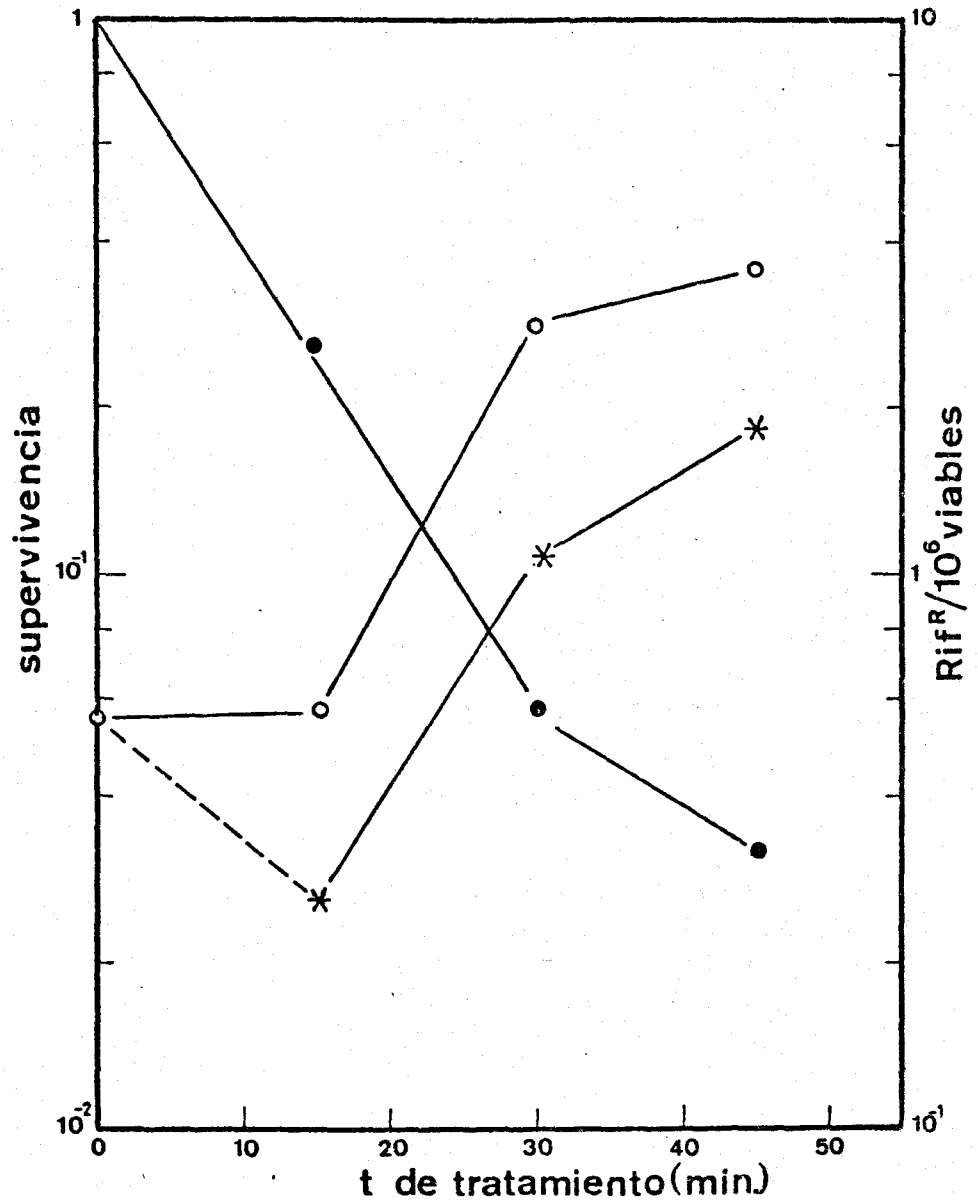


FIGURA 12.- Variación con el tiempo de tratamiento de la letalidad y mutagenicidad producidas por nitrosoguanidina en tampón tris-maleato pH 5,5. (●) supervivencia; (O) frecuencia de mutantes seleccionados inmediatamente después del tratamiento, y (*) frecuencia de mutantes seleccionados tras una incubación de 21 horas en caldo M.R.S. después del tratamiento.

V RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado la acción mutagénica de la nitrosoguanidina en una estirpe de L. plantarum aislada de fermentadores de gran capacidad, estableciéndose las condiciones óptimas y más prácticas para el uso de dicho mutágeno y la obtención de mutantes. De los resultados expuestos se llega a las siguientes conclusiones:

1. La acción de la nitrosoguanidina en Lactobacillus plantarum responde generalmente al modelo de mutagénesis descrito en bacterias.
2. Lactobacillus plantarum presenta, en la mayoría de los casos, un comportamiento heterogéneo de la población frente a la acción letal de la nitrosoguanidina.
3. Lactobacillus plantarum posee un solo cromosoma en las condiciones fisiológicas que se utilizaron en los tratamientos con nitrosoguanidina, lo que indicaría su condición de haploide.
4. Como consecuencia de los resultados expuestos, se establecieron como condiciones adecuadas para el tratamiento con nitrosoguanidina de Lactobacillus plantarum las siguientes: tratar títulos celulares de 10^9 células/ml, suspendidas en tampón tris-maleato, a pH 5,5, con 500 μg de nitrosoguanidina/ml, durante 30 minutos, a 28°C , en oscuridad y sin agitación.

VI BIBLIOGRAFIA

- ADELBERG, E. A., MANDEL, M. y CHEIN-CHING-CHEN, G. (1965) Biochem. Biophys. Res. Commun., 18:788.
- AL-BAYATTI, K. y AL-ANI, F. (1977) Bull. Coll. Sci., 18:194.
- ANDERSON, R. y BURDON, G. (1980) Cancer Res., 30:1773.
- ARCENEUX, J. L. y LANKFORD, C. E. (1966) Biochem. Biophys. Res. Commun., 24:370.
- BALLONI, W., PAOLETTI, C., FLORENZANO, G., PELAGATTI, O. y CURACHI, A. (1977) Riv. Ital. Sostanze Grasse, 54:351.
- BARKER, C. J. y RACKHAM, B. D. (1980) Genet. Abs., 12:54.
- BOURQUELOT, E. y VINTILESCO, T. (1908) Comp. Rendu., 147:533.
- BUCHANAN, R. E. y GIBBONS, N. E. (ed.). (1974) Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. The Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- BURKE, W. y FANGMAN, W. L. (1975) Cell., 5:263.
- CASADESUS, J. y OLIVARES, J. (1979) Mol. gen. Genet., 174:203.
- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1967a) Mutat. Res., 4:369.
- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1967b) Biochem. Biophys. Acta, 142:450.
- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1968a) Mol. gen. Genet., 101:191.

- CERDA-OLMEDO, E. y HANAWALT, P. C. (1968b) Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXIII:599.
- CERDA-OLMEDO, E. y REAU, P. (1970) Mutat. Res., 9:399.
- CERDA-OLMEDO, E. y RUIZ-VAZQUEZ, R. (1979) Genetics of industrial microorganisms. O.K. Sebek & A. I. Laskin (ed.). Washington D.C.
- CERDA-OLMEDO, E., HANAWALT, P. C. y GUEROLA, N. (1968) J. Mol. Biol., 33:705.
- CRUESS, W. V. (1930) Agr. Exp. Sta. Bull., 498.
- CRUESS, W. V. y ALSBERG, L. (1934) J. Am. Chem. Soc., 56:2115.
- CHELI, G., DE FRANCESCO, D., PETRULLO, L. A., McCOY, E. C. y ROSENKRANZ, H. S. (1980) Mutat. Res., 74:145.
- DENNIS, D. y KAPLAN, N.O. (1960) J. Biol. Chem., 235:810.
- DENNIS, D. y KAPLAN, N. O. (1963) Biochem. Z., 338:485.
- DOELLE, H. W. (1971) J. Bacteriol., 108:1284.
- DUGLE, D. L., CAMPBELL, C. E., MEEKER, B. E. y GILLESPIE, C. J. (1973) Mutat. Res., 18:237.
- EISENSTARK, A., EISENSTARK, R. y SICKLE, R. V. (1965) Mutat. Res., 2:1.
- ETCHELLS, J. L., BORG, A. F., KITTEL, J. D., BELL, T. A. y FLEMING, H. P. (1966) Appl. Microbiol., 14:1027.

- FLEMING, H. P., WALTER, W. M. y ETCHELLS, J. L. (1969) Appl. Microbiol., 18:856.
- FLORIA, F. G. y GHIORGHITA, G. I. (1981) Genet. Abs., 13:36.
- GARVIE, E. I. (1980) Microbiol. Rev., 44:106.
- GASSER, F. y GASSER, C. (1971) J. Bacteriol., 106:113.
- GOMORI, G. (1948) Proc. Soc. Exptr. Biol. Med., 68:354.
- GOMORI, G. (1955) Methods in Enzymology. S. P. Colowick & N. D. Kaplan (ed.). Nueva York.
- GONZALEZ CANCHO, F. (1956) Grasas y Aceites, 7:81.
- GONZALEZ CANCHO, F. (1963) Microbiol. Españ., 16:221.
- GOTZ, F., SEDEWITZ, B. y ELSTNER, E. F. (1980a) Arch. Microbiol., 125:209.
- GOTZ, F., ELSTENER, E. F., SEDEWITZ, B. y LENGFELDER, E. (1980b) Arch. Microbiol., 125:215.
- GREEN, D. M. y COLARUSSO, L. J. (1964) Biochem. Biophys. Acta, 89:277.
- GRIMM, K. (1978) J. Bacteriol., 135:748.
- GUEROLA, N., INGRAHAM, J. L. y CERDA-OLMEDO, E. (1971) Nature, 230:122.

GUPTA, R. S. y GOLDSTEIN, S. (1980) *Mutat. Res.*, 73:331.

GUTIERREZ, C. S. y BONINO, A. (1960) *Experimenta*. Universidad Nacional de Cuyo.

HAERLIN, R., SUSSMUTH, R. y LINGENS, F. (1970) *Febs Letters*, 9:175.

HILL, I. D. y GORDON, A. (1967) *Biotech. Bioeng.*, 9:91.

HOHLFELD, R. y VIELMETTER, W. (1973) *Nature*, 242:130.

HORI, T., MURATA, M. y UTSONOMIYA, J. (1981) *Genet. Abs.*, 13:38.

HYAMS, J. y DAVIS, D. R. (1971) *Mutat. Res.*, 14:381.

ISHII, Y y KONDO, S. (1975) *Mutat. Res.*, 27:27.

ISONO, S. y YOURNO, J. (1974) *J. Mol. Biol.*, 82:355.

JEGGO, P., DE FAIS, M., SAMSON, L. y SCHENDEL, P. (1978) *Mol. gen. Genet.*, 157:1.

JIMENEZ-SANCHEZ, A. (1974) Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

JIMENEZ-SANCHEZ, A. (1976a) *Mol. gen. Genet.*, 145:113.

JIMENEZ-SANCHEZ, A. (1976b) *Mol. gen. Genet.*, 162:299.

JIMENEZ-SANCHEZ, A. y CERDA-OLMEDO, E. (1975) *Mutat. Res.*, 28:337.

JYSSUM, K. (1969) J. Bacteriol., 99:757.

KASAHARA, H., UDAKA, S. y IKEDA, Y. (1971) Agr. Biol. Chem., 35:
226.

KAUDEWITZ, N. F. (1955) Z. Naturforsch, 10:562.

KIMBALL, R. F. (1970) Mutat. Res., 9:261.

KIMBALL, R. F. (1978) Mutat. Res., 55:85.

KIMBALL, R. F. (1980a) Mutat. Res., 72:347.

KIMBALL, R. F. (1980b) Mutat. Res., 72:361.

KIMBALL, R. F. y SETLOW, J. K. (1972) Mutat. Res., 14:137.

KIMBALL, R. F. y SETLOW, J. K. (1974) Mutat. Res., 22:1.

KOLB, H. y KAUDEWITZ, F. (1970) Mutat. Res., 10:85.

KONDO, S., ICHIKAWA, H., IWO, K. y KATO, T. (1970) Genetics, 66:
187.

KOSHINUMA, K., IWAHARA, S., KAMYLLA, S., NAKADATE, M. y SUZUKI,
I. (1970) Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci., Tokyo, 88:118.

LAKE, R. S., KROPTO, M. L., McLACHLAN, S., PEZZUTTI, M. R., SHOE-
WAKER, R. H. y IGEL, H. J. (1980) Mutat. Res., 74:357.

LA POLLA, J. P., HARRIS, C. M. y VARY, J. C. (1972) Biochem. Bio-
phys. Res. Commum., 49:133.

- LAUGLEY, R. A. y KADO, C. I. (1972) *Mutat. Res.*, 14:277.
- LAWLEY, P. D. y THATCHER, C. J. (1970) *Biochem. J.*, 116:693.
- LERNER, S. A., WU, T. T. y LIN, C. C. (1964) *Science*, 146:1313.
- LOPEZ-CALDERON, I. (1980) Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- MANDELL, J. D. y GREENBER, J. (1960) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3:575.
- MATAGNE, R. F. y VINCENZOTTO, C. (1981) *Genet. Abs.*, 13:86.
- McCALLA, D. R. (1966) *J. Protozoology*, 13:472.
- McCALLA, D. R., REUVERS, A. y KITAI, P. (1968) *Can. J. Biochem. Physiol.*, 46:807.
- McILVAINE, T. C. (1921) *J. Biol. Chem.*, 49:183.
- McKAY, A. F. (1948) *J. Am. Chem. Soc.*, 70:1974.
- McKAY, A. F. y WRIGHT, G. F. (1947) *J. Am. Chem. Soc.*, 69:3028.
- MEGIAS, M. (1981) Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.
- MEGIAS, M., CAVIEDES, M. A., PALOMARES, A. J. y PEREZ-SILVA, J. (1981) *J. Bacteriol.* En prensa.
- MEHANDZHIEV, A. D. y YANKOULOV, M. T. (1981) *Genet. Abs.*, 13:56.

- MERZARI, A. H. y MOLINA, J. S. (1949) *Cienc. e Invest.*, 5:500.
- NAGAO, M., YOKOSHIMA, T., HOSOY, H. y SUGIMURA, T. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 192:19.
- NEALE, S. (1976) *Mutat. Res.*, 32:229.
- NECAS, J. y PAVINGEROVA, D. (1980) *Genet. Abs.*, 12:75.
- ORGEL, L. E. (1965) *Adv. Enzym.*, 27:289.
- PETERSON, A. R. (1981) *Genet. Abs.*, 13:38.
- PINSKY, S. D., TEW, K. D., SMULSON, M. E. y WOOLLEY, P. V. (1979) *Cancer Res.*, 39:923.
- PODGORSKI, G. y DEERING, R. A. (1980) *Mutat. Res.*, 74:459.
- REJANO NAVARRO, L., GONZALEZ CANCHO, F. y R. DE LA BORBOLLA, J. M. (1977) *Grasas y Aceites*, 28:255.
- RIDDLE, D. L. y ROTH, J. R. (1970) *J. Mol. Biol.*, 54:131.
- ROBY, H. R. (1960) *Experimenta. Universidad Nacional de Cuyo.*
- RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M. (1981) *Grasas y Aceites*, 32:181.
- RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M. y GONZALEZ PELLISO, F. (1980a) *Grasas y Aceites*, 31:111.
- RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M. y GONZALEZ PELLISO, F. (1980b) *Grasas y Aceites*, 31:197.

RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M. y REJANO NAVARRO, L.
(1978) Grasas y Aceites, 29:281.

RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M., FERNANDEZ DIEZ, M. J.,
GONZALEZ CANCHO, F. y CORDON CASANUEVA, J. L. (1969) Grasas y
Aceites, 20:55.

RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M., GOMEZ HERRERA, C.,
GONZALEZ CANCHO, F. y FERNANDEZ DIEZ, M. J. (1958) Grasas y Acei
tes, 9:118.

RODRIGUEZ DE LA BORBOLLA Y ALCALA, J. M. et al. (1956). Madrid.

RUIZ-VAZQUEZ, R. (1979) Tesis Doctoral. Universidad de Sevilla.

RUIZ-VAZQUEZ, R. y CERDA-OLMEDO, E. (1980) Mol. gen. Genet.,
178:625.

RUIZ-VAZQUEZ, R., PUEYO, C. y CERDA-OLMEDO, E. (1978) Mutat. Res.,
54:121.

SCHENDEL, P. F., DEFAIS, M., JEGGO, P., SAMSON, L. y CAIRNS, J.
(1978) J. Bacteriol., 135:466.

SCHNEIDER, S., BERNSTEIN, C. y BERNSTEIN, H. (1978) Mol. gen.
Genet., 167:185.

SHIRAI, A., UMEZAWA, K., MATSUSHIMA, T. y SUGIMURA, T. (1980)
Mutat. Res., 72:73.

SILENGO, L., SCHLESSINGER, D., MANGIAROTTI, G. y APIRION, D.
(1967) Mutat. Res., 4:701.

- SINGER, B. y FRANKEL-CONRAT, H. (1969) *Biochemistry*, 8:3266.
- SINGER, B., FRAENKEL-CONRAT, H., GREENBERG, J. y MICHELSON, A. M. (1968) *Science*, 160:1235.
- SMIRNOV, G. B., FAVORSKAYA, V. N. y SKAVRONSKAYA, A. G. (1971) *Mol. gen. Genet.*, 111:357.
- SORENSEN, S. P. L. (1909) *Biochem. Z.*, 21:131.
- STANASZEM, P. M., SNELL, J. F. y O'NEILL, J. J. (1977) *Appl. Env. Microbiol.*, 34:237.
- STRAUSS, B. S. y WAHL, R. (1964) *Biochem. Biophys. Acta*, 80:116.
- SUGIMURA, T., FUJIMURA, J., NAGAO, M., YOKOSHIMA, T. y HASEGAWA, M. (1968) *Biochem. Biophys. Acta*, 170:247.
- SUSSMUTH, R. y LINGENS, F. (1969) *Z. Naturforsch.*, 246:903.
- SUSSMUTH, R., HAERLIN, R. y LINGENS, F. (1972) *Biochem. Biophys. Acta*, 269:276.
- SUTER, W., BRENNAUD, J., McMILLAN, S. y FOX, M. (1980) *Mutat. Res.*, 73:171.
- SWEET, D. M. y MOSELEY, B. E. B. (1976) *Mutat. Res.*, 34:175.
- VAUGHN et al. (1943) *Agr. Exp. Sta. Bull.*, 678:14.
- VELEMINSKY, J., GICHNER, T. y POKORNY, S. (1968) *Biologia Plantarum*, 10:85.

VIJAYKUMAR, N. K. y JAIN, H. K. (1981) Genet. Abs., 13:613.

YAMAMOTO, K., KONDO, S. y SUGIMURA, T. (1978) J. Mol. Biol.,
118:413.

YOSHIDA, Y. y YUKI, S. (1968) J. Genet., Japan, 43:173.

ZAKHAROVA, G. M. y BARTOSHEVICH, Y. E. (1977) Genetika, 13:468.

ZURKOWSKI, W. y LORKIEWICZ, Z. (1978) Acta Microbiol. Pol., 27:
309.

FE DE ERRATAS

	dice	debe decir
página 8 línea 17	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \diagup \\ \text{N}-\text{C}-\text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O}_2\text{N} \quad \quad \text{N}=\text{O} \end{array}$	$\begin{array}{c} \text{H} \quad \quad \text{NH} \quad \quad \text{CH}_3 \\ \diagdown \quad \quad \diagup \\ \text{N}-\text{C}-\text{N} \\ \diagup \quad \diagdown \\ \text{O}_2\text{N} \quad \quad \text{N}=\text{O} \end{array}$
página 46 línea 17	letalidad	supervivencia
página 54 TABLA IV	>	<
página 70 línea 4	Febs	FEBS
página 72 línea 6	GREENBER	GREENBERG