

R-11370

T 1133

UNIVERSIDAD DE SEVILLA

FACULTAD DE FARMACIA

"MUTAGENESIS EN ARCHAEBACTERIA: EFECTOS DE LA

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina EN Halobacterium mediterranei".

i19429952

MUTAGENESIS EN ARCHAEABACTERIA: EFECTOS DE LA
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina EN Halobacterium mediterranei

por

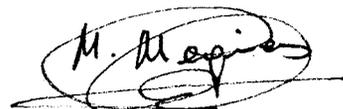
GONZALO BONELO SANCHEZ

El Ponente

Francisco Ruiz Berraquero

El Director

Manuel Megías Guijo



Catedrático Director del
Departamento de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de
la Universidad de Sevilla.

Profesor Adjunto Numerario
de Microbiología de la
Facultad de Farmacia de la
Universidad de Sevilla.

Trabajo presentado para aspirar al Grado de Licenciado en Farmacia.

Universidad de Sevilla

Facultad de Farmacia



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA
FACULTAD DE FARMACIA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Dr. FRANCISCO RUIZ BERRAQUERO, Catedrático Director del
Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia
de la Universidad de Sevilla.

CERTIFICA: Que el trabajo titulado "Mutagénesis en Archaeobacteria:
efectos de la N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina en
Halobacterium mediterranei", realizado por D. Gonzalo
Bonelo Sánchez para optar al grado de licenciado, ha
sido llevado a cabo bajo la dirección del Dr. Manuel
Megías Guijo.

Sevilla, 30 de Septiembre de 1983

Prof. Dr. F. Ruiz Berraquero

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar mi agradecimiento a mi hermana Elena, su dedicación a trabajos menos profundos pero más lucrativos posibilitó la realización de este estudio.

A Manuel Megías, por iniciar y dirigir mis primeros andares por el laboratorio, su competencia en el trabajo y fuera de el es para mi su ejemplo.

A mis compañeros del Departamento: Joaquín, Antonio J., Antonio, Miguel Angel, a cada uno y especialmente a mi singular compañero Paco les debo parte de mi formación dentro y fuera del laboratorio.

Por último y muy especialmente mi agradecimiento al Prof. Francisco Ruiz-Berraquero, Director del Departamento de Microbiología, por la confianza que depositó en mi desde el principio hasta el final de mi trabajo.

A mis padres y hermanos por
su continuo ejemplo.

INDICE GENERAL

INTRODUCCION	1
INTRODUCCION PRIMERA PARTE	2
1. LAS ARCHAEABACTERIAS	2
2. HALOFILISMO	4
2.1. <u>Medios hipersalinos y mecanismo de adaptación a los mismos</u>	4
2.2. <u>Clasificación de los distintos tipos de halofilismo</u>	6
3. MICROORGANISMOS HALOFILOS EXTREMOS	10
3.1. <u>Introducción histórica y estado actual de la taxonomía de los microorganismos halófilos extremos</u>	10
3.2. <u>Características generales de los microorganismos halófilos extremos: Ecología y algunas adaptaciones fisiológicas</u>	12
4. RELACIONES CON LA SAL Y CONCENTRACION DE K ⁺ INTRACELULAR .	14
5. PROTEINAS	16
6. LIPIDOS	18
7. GENETICA Y ACIDOS NUCLEICOS	20
7.1. <u>Genética y ADN</u>	20
INTRODUCCION SEGUNDA PARTE	24
1. NITROSOGUANIDINA	24
1.1. <u>Química de la nitrosoguanidina</u>	24
1.1.1. Estabilidad	24
1.1.2. Reacciones	25

1.2. <u>Biología de la nitrosoguanidina</u>	28
1.2.1. Letalidad	28
1.2.2. Mutagenicidad	29
1.2.2.1. Tipos de mutación	32
1.2.2.2. Mecanismo de mutación	33
PERSPECTIVAS ACTUALES	34
MATERIALES	36
1. MICROORGANISMOS	37
2. PRODUCTOS QUIMICOS	37
2.1. <u>Antibióticos</u>	38
2.2. <u>Otros productos</u>	39
3. TAMPONES	39
3.1. <u>Solución salina</u>	39
3.2. <u>Tampón acetato modificado</u>	40
3.3. <u>Tampón tris-maleato modificado</u>	40
3.4. <u>Tampón citrato-tris-maleato modificado</u>	41
4. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS	42
4.1. <u>Medios líquidos</u>	42
4.1.1. Solución concentrada de sales (30%(p/v))	42
4.1.2. Medio de cultivo líquido	42
4.1.3. Medio para el crecimiento de <u>Haloarcula</u>	43
4.2. <u>Medios para el tratamiento con antibióticos</u>	44
4.3. <u>Medios sólidos</u>	44

METODOS	46
1. CULTIVO DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO	47
2. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS	47
3. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	48
4. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS	49
4.1. <u>Método del gradiente en placa</u>	49
4.2. <u>Test de dilución en tubos de medio líquido</u>	52
4.2.1. Dilución del antibiótico	52
4.2.2. Inóculo	52
4.2.3. Interpretación de los resultados	53
5. TRATAMIENTO CON NITROSOGUANIDINA	53
5.1. <u>En medio sólido</u>	53
5.2. <u>En tampón</u>	54
6. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	54
RESULTADOS Y DISCUSION	56
I. SUSCEPTIBILIDAD DE HALOFILOS EXTREMOS A ANTIBIOTICOS	57
1. ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS	57
1.1. <u>Estudios preliminares de la concentración inhibitoria de los antibióticos por el método del gradiente en placa</u> ..	57
1.2. <u>Estudio de la concentración mínima inhibitoria</u>	58
II. ESTUDIO DE LA LETALIDAD Y LA MUTAGENICIDAD EN <u>Halobacterium mediterranei</u>	72
1. GENERALIDADES	72

2. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO	73
3. ENSAYOS CON NITROSOGUANIDINA	73
3.1. <u>Ensayos preliminares</u>	76
3.1.1. Efecto de la solución de sales sobre la estabi- lidad de la nitrosoguanidina	76
3.1.2. Letalidad en medio sólido	78
3.2. <u>Influencia de la concentración de nitrosoguanidina sobre la letalidad</u>	80
3.3. <u>Letalidad a distintos pHs y a distintos tampones</u>	84
3.4. <u>Título de células durante el tratamiento</u>	90
4. OBTENCION DE RESISTENTES A ANTIBIOTICOS	92
5. ESTUDIO DE LA MUTAGENICIDAD PRODUCIDA POR LA NITROSOGUANI- DINA	95
5.1. <u>Estudio de la aparición de mutantes resistentes a la jo- samicina</u>	95
5.1.1. Efecto de la densidad de siembra en la obtención de mutantes y viables de un cultivo	95
5.1.2. Influencia del medio de tratamiento en la muta- genicidad producida por la nitrosoguanidina ...	97
5.1.3. Influencia del pH en la mutagenicidad y evolu- ción de la misma a lo largo del tiempo	100
RESUMEN Y CONCLUSIONES	107
BIBLIOGRAFIA	110

INDICE DE FIGURAS

Fig. 1.	Estructura de los fosfolípidos	18
Fig. 2.	Preparación del gradiente en placa	50
Fig. 3.	Siembra de la placa en gradiente de antibiótico..	50
Fig. 4.	Determinación de la concentración útil del an- tibiótico ensayado	50
Fig. 5.	Curva de crecimiento de <u>Halobacterium medite-</u> <u>rranei</u>	74
Fig. 6.	Relación entre el número de células y la densidad óptica	75
Fig. 7.	Evolución de la estabilidad de la nitrosogua- nidina	77
Fig. 8.	Capacidad de un cultivo de formar colonias en medios con distintas concentraciones de nitrosoguanidina	79
Fig. 9.	Variación de la letalidad en función de la concentración de nitrosoguanidina y el tiempo, en tampón tris-maleato modificado pH 7,4	81
Fig.10.	Variación de la letalidad en función del tiempo y pHs. en tampón acetato, tris-maleato, y citrato-tris-maleato, todos modificados y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	85
Fig.11.	Variación de la letalidad en función del tiempo y pH en tampón acetato modificado y 250 µg/ml de nitrosoguanidina	88

Fig.12.	Variación de la letalidad con el título de células, en tampón tris-maleato modificado pH 7,4 , 30 minutos y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	89
Fig.13.	Variación de la letalidad con el título de células, en tampón tris-maleato modificado pH 7,4 , 30 minutos y 200 µg/ml de nitrosoguanidina	91
Fig.14.	Variación de la letalidad y mutagenicidad en función del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 5,0 y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	101
Fig.15.	Variación de la letalidad y mutagenicidad en función del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 6,0 y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	102
Fig.16.	Variación de la letalidad y mutagenicidad en función del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 7,4 y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	103
Fig.17.	Variación de la letalidad y la mutagenicidad en función del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 8,5 y 500 µg/ml de nitrosoguanidina	104

INDICE DE TABLAS

Tabla I.	Respuesta a la sal de diferentes microorganismos.	7
Tabla II.	Gradiente de cationes en bacterias halófilas	15
Tabla III.	Utilización de la nitrosoguanidina en bacterias..	30
Tabla IV.	Relación de especies bacterianas utilizadas	37
Tabla V.	Antibióticos utilizados	38
Tabla VI.	Estudio de las MICs para <u>Halobacterium mediterranei</u>	59
Tabla VII.	Estudio de las MICs para <u>Halobacterium hispanicum</u>	60
Tabla VIII.	Estudio de las MICs para <u>Halobacterium larsenii</u> .	61
Tabla IX.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los antibióticos ampicilina y carbenicilina frente a 11 microorganismos halófilos extremos	63
Tabla X.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de los antibióticos cefotaxima, D-cicloserina y bacitracina frente a 11 microorganismos halófilos extremos ..	64
Tabla XI.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de seis antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos	66
Tabla XII.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cinco antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos	68

Tabla XIII.	Concentraciones Mínimas Inhibitorias de cuatro antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos	70
Tabla XIV.	Aparición de mutantes resistentes a antibióticos.	93
Tabla XV.	Efecto de la densidad de siembra en las estimaciones de supervivencia	96
Tabla XVI.	Supervivencia y frecuencia de aparición de mutantes a la josamicina tras tratamiento	98

INTRODUCCION

PRIMERA PARTE

1. LAS ARCHAEBACTERIAS

Las archaeobacterias están comprendidas por tres clases muy diferentes de microorganismos: los metanógenos, los halófilos extremos y los termoacidófilos.

Los metanógenos solo viven donde no exista oxígeno y dispongan de dióxido de carbono e hidrógeno. A pesar de su intolerancia al oxígeno, tienen una distribución universal.

Los termoacidófilos son microorganismos que crecen a temperaturas próximas a los 80 °C, se encuentran en los manantiales de aguas termales sulfurosas. Los termoacidófilos, se desarrollan en manantiales que son extremadamente ácidos, aunque el medio interior de la célula tiene un pH próximo a la neutralidad.

Y el grupo restante de archaeobacterias lo constituye los microorganismos halófilos extremos. Los microorganismos halófilos extremos requieren altas concentraciones de sal para sobrevivir y habitan en medios llamados hipersalinos.

Las archaeobacterias constituyen un grupo reducido de microorganismos que parecen estar relacionados tanto con las bacterias clásicas (eubacterias) como con los organismos eucariotas (Woese, 1981).

Las primeras pruebas en favor de que las archaeobacterias constituyen un tronco evolutivo independiente de eubacterias y de eucariotas provinieron de trabajos de secuenciación del componente 16 S del RNA ribosómico, la secuencia de las archaeobacterias estudiadas distaban de las de los demás procariotas tanto como de las de los eucariotas (Woese, 1981).

Posteriormente se han sucedido pruebas en favor del distanciamiento de las archaeobacterias del resto de los seres vivos. Poseen un tipo de lípidos completamente exclusivo basado en cadenas isoprenoides (di-fitanil) unidas por enlaces éter al glicerol, el t-RNA iniciador de la traducción es portador del aminoácido metionina como en los eucariotas, mientras que en los demás procariotas lo es de N-formil metionina, el factor de elongación en la traducción reacciona con la toxina diftérica como el de los eucariotas (Woese, 1981).

También tienen mecanismos metabólicos exclusivos como la producción de ATP a partir de energía luminosa por el pigmento bacteriorrodopsina. Tienen múltiples tipos de pared, pero ninguna de ellas posee ácido murámico (Woese, 1981).

2. HALOFILISMO

2.1. Medios hipersalinos y mecanismos de adaptación a los mismos

Los medios hipersalinos son medios con una concentración de sal superior a la del agua de mar, se encuentran dentro de lo que se podría clasificar como habitat extremos (Kushner, 1978). Un habitat es extremo si pueden crecer en él algunas clases de organismos mientras que otras clases de organismos no.

Estos medios hipersalinos se dividen en medios talasosalinos y atalasalinos, dependiendo de si la proporción de sales es semejante o no a la del agua de mar. Como ejemplo de estos últimos se encuentran el Mar Muerto y el Lago Wadi Natrum (Brock, 1979). Entre los medios talasosalinos destacan lagos y lagunas como El Gran Lago Salado y las salinas solares. El origen primario de estos medios es el mar, por evaporación del agua y consiguiente concentración de las sales que esta contiene.

El mar contiene cantidades considerables de sales, siendo sodio, magnesio, calcio y potasio sus principales cationes, y cloruros, sulfatos y bromuros los aniones más importantes (Subow, 1931).

Una característica de estos medios hipersalinos es que al ser aguas situadas en zonas cálidas y secas, están sometidas a una fuerte irradiación solar, oscilando la temperatura fuertemente del día a la noche.

La concentración de las sales, por la evaporación del agua provoca una disminución del contenido en oxígeno, por ser muy baja la solubilidad de éste, en medios tan concentrados.

La evaporación del agua de mar concentra no sólo sales sino nutrientes orgánicos e inorgánicos, incluyendo los restos de los organismos que se lisan al aumentar la concentración en sales del agua, convirtiéndose estos habitat en medios muy ricos en nutrientes (Dundas, 1978).

En estos medios hipersalinos existe un problema osmótico para las células, ya que todas las membranas plasmáticas son permeables al agua, y si la concentración osmótica extracelular es superior a la intracelular se producirá un proceso de plasmólisis por salida del agua intracelular hasta igualar la concentración externa, no existiendo ninguna fuerza que evite este proceso sin bloquear a la vez el paso del agua con los solutos necesarios para el metabolismo. Por otra parte, una concentración intracelular tan elevada como la externa, supondría una fuerte disminución de la actividad del agua y la consiguiente inhibición de los procesos metabólicos (Kushner, 1978).

Mientras que los organismos pluricelulares resuelven dicho problema aislandose del exterior mediante tejidos especializados; los microorganismos halófilos presentan otro tipo de solución.

La solución más universal la constituyen los solutos compatibles, normalmente polialcoholes como el glicerol (Borowitzka y Brown, 1974), que

aportan la concentración necesaria para equilibrar la presión osmótica, permitiendo así la actividad de las enzimas. No obstante existe un grupo de microorganismos con cambios profundos adaptado a habitat hipersalinos y que requieren específicamente la presencia de ciertas sales en el exterior; estas son las bacterias halófilas estrictas. Estas bacterias se lisan en ausencia de estas sales aunque el medio contenga una proporción equivalente de cualquier otro soluto como polialcoholes o glúcidos (MacLeod y Onofrey, 1957a; Abram y Gibbons, 1961).

En microorganismos halófilos extremos la naturaleza de la sal es indispensable para su supervivencia y metabolismo, siendo el cloruro sódico insustituible para todo microorganismo halófilo estricto. Ello se debe a la necesidad de mantener la configuración de las proteínas, ya que estos microorganismos están adaptados a concentraciones iónicas intracelulares, concretamente de iones potasio. Dichas proteínas son polianiónicas y requieren determinadas concentraciones de este ion para estabilizar su estructura (Lanyi, 1974).

2.2. Clasificación de los distintos tipos de halofilismo

La mayoría de los autores (Flannery, 1956; Ingram, 1957; Larsen, 1962; Kushner, 1978) coinciden en la dificultad que supone el establecimiento definitivo de una clasificación según los distintos grados de halofilismo. Una de las más recientes es la realizada por Kushner (1978). (Tabla I).

TABLA I. Respuesta a la sal de diferentes microorganismos, según Kushner (1978)

Categoría	Reacción	Ejemplos
No halófilos	Concentración de sales menor de 0,2 M.	La mayoría de eubacterias normales y microorganismos de agua dulce.
Halófilos débiles	Crecimiento en medios con una concentración de sales entre 0,2-0,5 M .	Muchos microorganismos marinos.
Halófilos moderados	Crecimiento en medios con una concentración de sales entre 0,5-2,5 M. Los organismos capaces de crecer con menos de 0,1 M de sal se consideran halófilos facultativos.	Bacterias y algunas algas.
Próximos a halófilos extremos	Crecimiento en medios con una concentración de sales entre 1,5-4,0 M .	<u>Ectothiorhodospira halophila</u> <u>Actinopolyspora halophila</u>
Halófilos extremos	Crecimiento en medios con una concentración de sales entre 2,5-5,2 M (saturación).	<u>Halobacterium</u> y <u>Halococcus</u>
Halotolerantes	No halófilos que pueden tolerar la sal; Si crecen a más de 2,5 M de sal, se deben considerar halotolerantes extremos.	<u>Staphylococcus aureus</u> y otros estafilococos

Establecer una clasificación en base a la respuesta de crecimiento según distintas concentraciones de sales en el medio, pero tiene la dificultad de la cantidad de casos intermedios difíciles de encasillar; existen halófilos moderados que resisten altas concentraciones (Matheson et al., 1976) y halófilos extremos capaces de crecer a concentraciones menores de las establecidas para los mismos (Mullakhanbhai y Larsen, 1975). Según Bayley y Morton (1978), sería más apropiada una clasificación basada en la concentración intracelular de iones, considerando diferentes concentraciones del medio y otros parámetros.

Las bacterias marinas requieren del orden de 0,2 M de ion sodio para su desarrollo óptimo (MacLeod, 1965). Este requerimiento para el ion sodio es específico y no sustituible para otros iones (Richter, 1928; MacLeod y Onofrey, 1957), mientras que para el ion potasio es de unas cien veces inferior.

Se ha comprobado la necesidad de iones sodio en el medio para la realización de diversos procesos metabólicos, como la oxidación de distintos carbohidratos (MacLeod et al., 1958; Payne, 1958; Rhodes y Payne, 1962).

Las enzimas intracelulares implicadas en estas vías no requieren la presencia de iones sodio sino la de iones potasio, esto sugiere que mientras el ion potasio es necesario para la estabilización de las proteínas, el ion sodio se encuentra relacionado con el transporte a través de membranas de distintos substratos (Fein y MacLeod, 1975; Pearce et al., 1977).

Buckmire y MacLeod (1964), sugirieron el caracter polianiónico de la pared celular cuyas cargas deben ser neutralizadas para evitar la lisis celular, ya que ésta no podía evitarse sustituyendo el nivel de presión osmótica por otros solutos como glucosa, glicerol, ni siquiera por otras sales como KCl o NH_4Cl (Pratt y Riley, 1955) pero sí con cationes divalentes como el ión magnesio (MacLeod y Matula, 1961) o poliaminas u otros productos que normalmente evitan la desintegración de un polielectrólito (Brown, 1961).

Parece ser que el ión sodio se encuentra relacionado con la síntesis de la pared celular y ni el ión potasio ni el ión calcio o el ión magnesio pueden sustituir al ión sodio en la formación de una pared normal (Takahashi y Gibbons, 1957).

Los microorganismos halófilos extremos parecen poseer un sistema de homeostasis, de tal forma que el contenido celular es bastante dependiente de la concentración del medio (Larsen, 1962). Por otro lado, se piensa que el ión potasio se encuentra libre en el citoplasma, si no completa, casi completamente, según indican experiencias de síntesis "in vitro" de proteínas (Bayley, 1976).

3. MICROORGANISMOS HALOFILOS EXTREMOS

3.1. Introducción histórica y estado actual de la taxonomía de los microorganismos halófilos extremos

El interés por las bacterias halófilas extremas surgió a causa del descubrimiento de éstos como los causantes del deterioro de artículos o alimentos en los que se utilizaba sal como conservante, el producto se descompone y a la vez aparece una capa superficial de intenso color rojo.

En 1880, Farlow publicó por vez primera que bacterias con pigmentación roja eran las causantes del "rojo del bacalao". A partir de entonces se realizaron numerosas investigaciones en relación con la contaminación producida por estas bacterias (Rappin, 1920; Harrison y Kennedy, 1922; Lloyd et al., 1929; Stuart et al., 1933; Gibbons, 1936; Shewan, 1942; Anderson, 1954, etc.).

En la 6ª edición del Manual de Bergey (1948), los microorganismos halófilos extremos se incluían en cualquier género que correspondiese con algunas de sus características, como pigmentación, tamaño o reacción de Gram.

En la 7ª edición del Manual de Bergey (1957), Elazari-Volcani (1940) sitúa a los bacilos halófilos extremos en el género Halobacterium, dentro de la familia Pseudomonadaceae y a los cocos, en la familia Micrococcaceae.

Por último, el estudio de las características peculiares morfo-fisiológicas de estos microorganismos ha permitido la agrupación, en la 8ª edición del Manual de Bergey (1974), de ambas formas, bacilos y cocos, en la familia Halobacteriaceae que comprende los géneros Halobacterium y Halococcus. Dentro del primero se incluyen las especies Halobacterium salinarium y Halobacterium halobium. En el género Halococcus se reconoce lo una especie, Halococcus morrhuae. Entre ambos géneros se describe una serie de similitudes que los diferencian del resto de los procariotas: requieren más de 12% de NaCl para crecer, metabolismo aerobio, no fermentativo, obtiene la energía de aminoácidos, no poseen mureína en su pared celular, presentan un elevado contenido de iones potasio intracelular, proteínas de marcado carácter ácido, gran contenido en ADN satélite, lípidos de tipo di-fitanil éter y pigmentos isoprenoides.

Ultimamente se han descrito nuevas especies de bacterias halófilas extremas como son Halobacterium sodomense, aislada del Mar Muerto, caracterizándose por un alto requerimiento en magnesio (Oren, 1983) y Halobacterium pharaonis, que es un haloalcalófilo extremo de bajo requerimiento en magnesio, aislado del lago desierto Wadi Natrum, Egipto (Soliman y Trüper, 1982), también son recientes las especies Halobacterium hispanicum, Halobacterium larsenii, aislada por Juez et al.(1983) y Halobacterium mediterranei aislada por Rodríguez-Valera et al.(1983).

Javor et al.(1982) han propuesto recientemente un género nuevo de microorganismos halófilos extremos, caracterizados por presentar morfología celular cuadrada, nombrandolos Haloarcula sinaiensis y Haloarcula californiae.

3.2. Características generales de los microorganismos halófilos extremos:
Ecología y algunas adaptaciones fisiológicas

Los microorganismos halófilos extremos se encuentran en cualquier habitat donde la concentración de sales permita su crecimiento.

Como adaptación a los parámetros ambientales de su habitat, los microorganismos halófilos extremos resisten elevadas temperaturas (más de 55 °C), creciendo óptimamente alrededor de los 40 °C (Gibbons, 1969) y el pH óptimo es cercano a la neutralidad.

A estas bacterias tradicionalmente se les ha considerado como microorganismos con complejos requerimientos nutritivos, con un metabolismo de aminoácidos altamente desarrollado (Onishi et al., 1965; Larsen, 1962).

Poseen tasas de crecimiento relativamente bajas, probablemente por tener una inferior actividad del agua que el resto de los microorganismos, siendo los tiempos de generación más cortos obtenidos del orden de 7 horas para Halobacterium y de 15 horas para Halococcus (Larsen, 1962).

Estas consideraciones generales fueron modificadas levemente por los resultados obtenidos por Juez (1982), en lo que respecta a requerimientos nutritivos, resistencias a altas temperaturas y velocidades de crecimiento.

A pesar de que en el medio hipersalino el contenido en oxígeno es escaso, estos microorganismos son aerobios estrictos.

Algunas especies de Halobacterium poseen vacuolas de gas, posiblemente con nitrógeno (Larsen et al., 1967) cuya función se ha postulado sería el permitir el ascenso a la superficie del agua, facilitando de esta forma el contacto con el oxígeno del aire (Walsby, 1972).

Todos los microorganismos halófilos extremos poseen pigmentos carotenoides, como protección a la intensa luz solar que habitualmente existe en este tipo de medios como las salinas (Dundas y Larsen, 1962). Se ha demostrado posteriormente que dichos pigmentos no ejercen un papel en la protección frente a radiaciones ultravioletas (Hescox y Carlberg, 1972).

Por otra parte, también el mecanismo de fotorreactivación en la reparación del ADN dañado por la radiación ultravioleta es muy eficaz (Hescox y Carlberg, 1972).

Según Grey y Fitt (1976) la reparación en la oscuridad del ADN no tiene lugar. Hipótesis corroborada por Fitt et al. (1983).

Los halófilos extremos poseen dos mecanismos de producción de energía, en cada uno participa una cromoproteína, que son la bacteriorrodopsina (Stoeckenius, 1967) y la halorrodopsina (Mukohata y Kaji, 1981).

4. RELACIONES CON LA SAL Y CONCENTRACION DE K^+ INTRACELULAR

En los halófilos extremos ya desde un principio se conocen sus requerimientos específicos por determinadas sales para su óptimo crecimiento: 3-5 M de NaCl; 0,1-0,5 M de Mg^{++} y $1,3 \times 10^{-3}$ - $2,5 \times 10^{-3}$ M de K^+ (Brown y Gibbons, 1955).

Una disminución en la concentración de NaCl provoca un cambio en la morfología de los bacilos a formas redondeadas, lisando alrededor de 1 M de NaCl (Abram y Gibbons, 1960; Stoeckenius y Rowen, 1967) pero sin que se produzcan cambios en el volumen total celular por cambios en la morfología, por lo que se supone que el equilibrio osmótico se establece rápidamente y la lisis celular no se puede evitar sustituyendo el NaCl por otros solutos, por ser esta sal imprescindible para mantener la estructura de la pared celular, neutralizando las cargas eléctricas de la misma (Blaurock et al., 1976).

La concentración de ión potasio intracelular en halófilos extremos es muy elevada y depende de la fase de crecimiento de la célula, y sobre todo de la concentración de sales en el medio (Tabla II). Se han calculado valores intracelulares de K^+ que incluso superan los valores necesarios para equilibrar la presión osmótica exterior, lo que indica que junto a iones K^+ libres en el citoplasma existe una proporción de los mismos asociados a polianiones celulares (Gochnauer y Kushner, 1971), neutralizando las cargas de los aminoácidos ácidos en las proteínas de estos microorganismos.

TABLA II. Gradiente de cationes en bacterias halófilas

	Fase de crecimiento	<u>Iones en medio de crecimiento</u>			<u>Iones asociados a la célula</u>			<u>Referencia</u>
		Na ⁺ (M)	K ⁺ (M)	Mg ⁺⁺ (M)	Na ⁺ (M)	K ⁺ (M)	Mg ⁺⁺ (M)	
<u>Halobacterium salinarium</u>	Estacionaria	4,00	3,2 X 10 ⁻²	----	1,37	4,57	---	(1)
<u>Halobacterium cutirubrum</u>	Exponencial	3,40	2,7 X 10 ⁻²	0,10	1,63	2,94	---	(2)
	tardía							
	Exponencial	3,30	5,0 X 10 ⁻²	0,13	0,80	5,32	0,12	(3)
Especies de <u>Halobacterium</u>	Exponencial	3,90	4-7 X 10 ⁻³	0,15	1,20-3,00	3,80-5,50	---	(4)
	Estacionaria	3,90	7,5 X 10 ⁻⁴	0,15	0,50-0,70	3,70-4,00	---	(4)

(1) Cristian y Waltho, 1962

(2) Lanyi y Silverman, 1972

(3) Matheson et al., 1976

(4) Ginzburg et al., 1970

5. PROTEINAS

Las proteínas de los halófilos extremos presentan un carácter netamente polianiónico, por contener un exceso de aminoácidos ácidos.

La conformación de estas proteínas solo es estable mientras en el entorno existan cationes que neutralicen estas cargas.

El ión potasio por su tamaño sería el catión más adecuado en el mantenimiento de la actividad de la proteína (Kim y Fitt, 1977).

Muchas de estas proteínas son termofílicas, lo cual estaría relacionado con la sensibilidad a las bajas temperaturas de los enlaces hidrofóbicos que en parte conforman a la proteína (Lanyi, 1974; Keradjopoulos y Holldorf, 1977).

Los ribosomas requieren 0,1 M de Mg^{++} y 4 M de K^+ para su estabilidad (Bayley y Kushner, 1964; Visentin et al., 1972).

La proteína flagelar en halófilos extremos difiere de la flagelina de otras bacterias y es dependiente de la concentración de sales, cuando estas se eliminan del medio, el flagelo pierde uniformidad en su estructura helicoidal (Dundas, 1977).

La bacteriorrodopsina de peso molecular 25000 daltons, es una proteína con alto porcentaje de aminoácidos hidrofóbicos, sobre todo glicina; no desintegrandose en agua destilada por no contener excesivo número de aminoácidos ácidos.

El grupo cromóforo de la bacteriorrodopsina es el retinal, pigmento semejante al pigmento visual de vertebrados.

Al iluminar células con bacteriorrodopsina, el pH del medio se acidifica, debido a la expulsión de protones por parte de la bacteriorrodopsina (Lozier et al., 1976). El gradiente de protones creado lo utiliza una ATPasa para sintetizar ATP, partiendo de ADP . Es un mecanismo de transformación de la energía luminosa en energía utilizable por la célula (Danon y Stoeckenius, 1973; Hubbard y Rinehart, 1976) aun siendo el crecimiento en microorganismos halófilos extremos aerobio estricto.

Recientemente se ha descrito una segunda molécula proteica con retinal como cromóforo, la halorrodopsina, que promueve el transporte activo de Na^+ hacia el exterior de la célula. Se desconoce el significado fisiológico de este sistema.

El potencial de membrana creado por la halorrodopsina representa, al igual que en el sistema bacteriorrodopsina, una intrusión pasiva de protones acoplada a la síntesis de ATP (Lanyi, 1981; Mukohata y Kaji, 1981).

6. LIPIDOS

Una característica de los halófilos extremos es la estructura de sus lípidos, muy diferente a la que presentan los lípidos de procariotas y de eucariotas.

Los lípidos polares tanto del género Halobacterium como Halococcus, poseen en vez de ácidos grasos, grupos alifáticos ramificados de estructura isoprenoide, uniéndose al glicerol por enlace tipo éter y no éster.

Los lípidos polares, constituyen el 90% de los lípidos totales, comprenden fosfolípidos y glicolípidos.

Entre los fosfolípidos, los más importantes son los mostrados en la Figura 1.

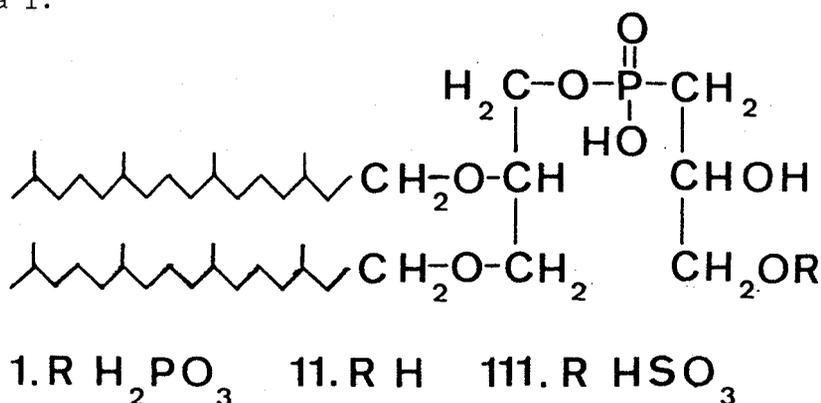


FIGURA 1. Estructura de los fosfolípidos: (1) fosfatidilglicerolfosfato, (11) fosfatidilglicerol, (111) fosfatidilglicerolsulfato (Smallbone y Kates, 1981)

Entre los lípidos no polares se encuentran C_{20} -isoprenoides (escualeno, dihidroescualeno), C_{40} -isoprenoides (licopeno, β -caroteno, vitamina MK_8) y C_{50} -isoprenoides (bacteriorruberas) (Tornabene et al., 1969; Kramer et al., 1972; Kates, 1978).

Rosa et al. (1982) han descrito la existencia de un lípido dieter asimétrico C_{20} - C_{25} en haloalcalófilos, e igualmente Ross et al. (1981) tienen detectado un lípido cromatográficamente similar en Halobacterium sp.

La pigmentación en microorganismos halófilos extremos es frecuente así como en microorganismos halófilos moderados, ésta se debe a los lípidos C_{50} -isoprenoides (Kushwaha et al., 1974). Se encuentran en la membrana plasmática (llamada membrana roja) mientras que el retinal lo está sólo en la membrana purpúrea.

Los lípidos polares se distribuyen también de distinta forma según el tipo de membrana, ambas poseen fosfolípidos pero los glicolípidos sulfatados están presentes solo en la membrana purpúrea (Kates y Kushwaha, 1978). Su mecanismo consiste en impedir la acción del oxígeno singlete y quizás favoreciendo la reparación del ADN por fotorreactivación (Dundas y Larsen, 1962; Hescox y Carlberg, 1972).

Se ha descrito en diferentes bacterias halófilas extremas la presencia de un lípido no polar no isoprenoide como es el indol (Kushwaha et al., 1977). Su origen y significado fisiológico en los microorganismos halófilos extremos es desconocido, posiblemente tenga origen en el metabo-

lismo del triptófano a partir del material proteico, al igual que se encuentra en humanos. Puede también ser responsable parcialmente del olor característico de los cultivos de estas bacterias.

7. GENETICA Y ACIDOS NUCLEICOS

7.1. Genética y ADN

Los primeros mutantes obtenidos fueron descritos por Larsen et al. (1967) por tratamiento con luz ultravioleta de Halobacterium salinarium y Stoeckenius y Kunau (1968) describen mutantes de Halobacterium halobium que habían aparecido espontáneamente y no formaban vacuolas de gas.

Stoeckenius y Kunau (1968) llamaron R_1 al mutante y obtuvieron revertientes tratandolos con 2-aminopurina. Sumper y Herrmann (1976a y b) publicaron trabajos con un mutante doble R_1M_1 el cual carecía de síntesis de bacteriorruberas.

Otro aspecto interesante es el estudio de la variabilidad genética que aparece en Halobacterium halobium. Este microorganismo presenta un grado de variabilidad espontánea muy alta, lo que se ha comprobado mediante la selección de fenotipos fácilmente detectables (mutantes deficientes en la formación de vacuolas de gas (vac), síntesis de bacteriorrubarina (rub) o la síntesis de retinal (ret) bacterio-opsina (ops) ambos componentes de la membrana purpúrea (pum); la frecuencia de aparición de estos mutantes, oscila alrededor de 10^{-2} .

Con excepción de todos los mutantes ret, los mutantes citados presentan alteraciones, por ejemplo inserciones, reordenamientos o deleciones en el plásmido pHH 1 (Simón, 1978; Pfeifer et al., 1981).

El plásmido pHH 1 fue descrito por Weidenger et al. (1979) y es el portador de la información genética para la formación de vacuolas de gas.

El genoma de Halobacterium halobium y otras especies de halófilos extremos fue separado en columna de bisacrilamida/verde-malaquita en dos fracciones que difieren claramente en su contenido Guanina + Citosina $|G|+|C|$. Se demostró que la fracción Adenina + Timina $|A|+|T|$ muestra un alto grado de variabilidad y a menudo esta fracción forma elementos circulares de ADN de varios tamaños. De estos elementos circulares el de mayor tamaño se comporta como un plásmido del que existen un número constante de copias (Pfeifer et al., 1982).

Pfeifer et al. (1982) localizaron el determinante génico para la formación de las vesículas de gas, sobre el ADN circular mayor.

Sapienza y Doolittle (1982) han descrito en las especies Halobacterium halobium y Halobacterium volcanii una organización del genoma con secuencias repetitivas, de forma análoga a la existente en eucariotas. Estas secuencias comprenden varias familias que se encuentran tanto en el ADN plasmídico como en el cromosoma y posiblemente son altamente móviles. Algunas de estas secuencias repetitivas presentan notable homología entre

las diferentes especies. Se sugiere por estos autores la existencia de elementos transponibles y secuencias homólogas entre plásmidos y cromosomas, promoviendo la recombinación entre ambos.

Moore y McCarthy (1969a y b) estudiaron la relación entre diferentes especies de halófilos extremos y varios halófilos moderados, calculando la homología entre las secuencias de ácidos nucleicos. Con el ADN demostraron diferentes grados de homología entre especies de Halobacterium pero no encontraron ninguna homología entre cada uno de ellos y Halococcus morrhuae o algunos de los halófilos moderados estudiados.

Todas las bacterias halófilas estudiadas se caracterizan por la presencia de un componente menor de ADN con un contenido $|G| + |C|$ de 57 a 60 moles por ciento.

En halobacterias el componente menor varía con la especie, desde un 11 a un 36% del total de ADN pero en algunas especies, la cantidad de ADN satélite permanece constante.

La existencia de un ADN minoritario separado físicamente y no dependiente del ADN principal, podría indicar que las halobacterias poseen al menos dos cromosomas.

Una nueva posibilidad de abordar el estudio genético de halobacterias se ha abierto mediante el aislamiento de bacteriofagos que infectan a estos microorganismos.

Hasta el momento se han descrito una serie de bacteriofagos con simetría binal y con su material genético de ADN lineal de doble cadena con redundancia terminal.

Igualmente se ha estudiado el ciclo lítico de algunos de estos fagos, viendo que poseen una alta dependencia de la concentración de sales (Torsvik y Dundas, 1974, 1978 y 1980a y b; Wais et al., 1975; Schnabel et al., 1982; Pauling, 1982).

En la actualidad no se ha realizado ningún estudio de transducción en estos sistemas fagos-bacterias, que aporten pruebas sobre la transferencia de material genético.

La segunda parte de esta introducción se dedicará a realizar un breve repaso sobre el estado actual en que se encuentran los trabajos realizados en bacterias con nitrosoguanidina y estudiar algunas de sus características más relevantes.

INTRODUCCION

SEGUNDA PARTE

1. NITROSOGUANIDINA

La nitrosoguanidina, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, fue sintetizada por primera vez hace más de 30 años (McKay y Wright, 1947). Su comportamiento como agente mutagénico fue estudiado por Mandell y Greenberg (1960). Su uso habitual en el laboratorio para la búsqueda de mutantes se debe a su capacidad de inducir alta frecuencia sin dar lugar a una alta letalidad (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 b; Megías *et al.*, 1981; Rodríguez-Quiñones *et al.*, 1982 y 1983, y como revisión más reciente Gichner y Veleminsky, 1982).

1.1. Química de la nitrosoguanidina

1.1.1. Estabilidad

La nitrosoguanidina es muy inestable en solución, dependiendo directamente del pH, aumentando la inestabilidad al aumentar el pH. 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 próximos

a pH 4,5 y se acelera mucho al aumentar el pH, siendo la vida media diez veces menor a pH 8 que a pH 7.

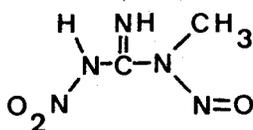
El uso de distintos tampones así como la concentración de los mismos hace que los valores óptimos de estabilidad difieran entre los diferentes autores, ya que ambos factores contribuyen en la variación de la estabilidad de la nitrosoguanidina (McCalla et al., 1968; Lawley y Thatcher, 1970; La Polla et al., 1972).

La luz también influye sobre la estabilidad de la nitrosoguanidina según quedó demostrado por McKay (1948).

La estabilidad de la nitrosoguanidina también se ve influida por la temperatura, si ésta aumenta disminuye la estabilidad (La Polla et al., 1972).

1.1.2. Reacciones

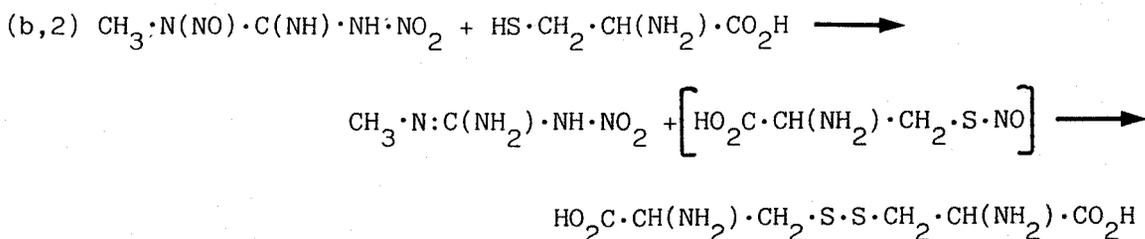
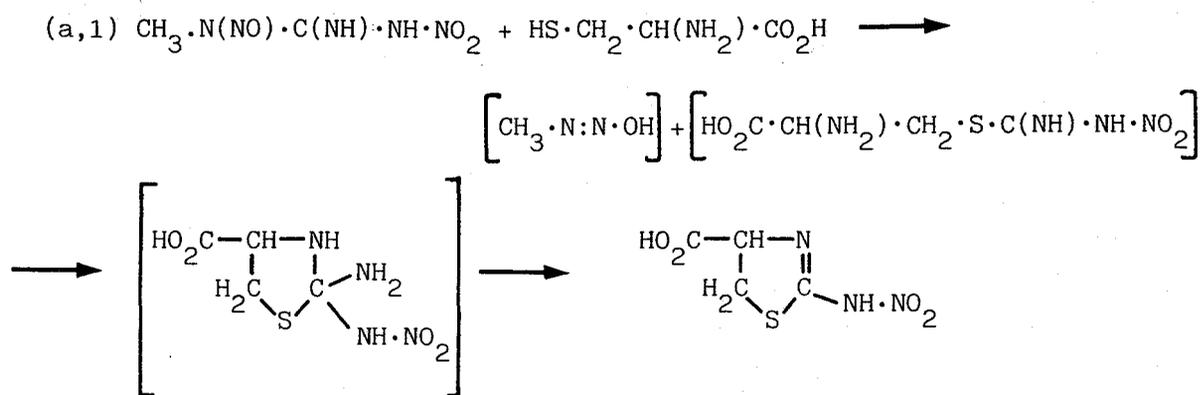
La presencia o ausencia de grupos reaccionables influye en la estabilidad de la nitrosoguanidina.



nitrosoguanidina

Los grupos tioles activan la descomposición de la nitrosoguanidina, como se ha visto por la reacción de la nitrosoguanidina con la cisteína.

La reacción de la nitrosoguanidina con la cisteína implica como mecanismo principal el ataque del tiol ionizado al átomo de carbono, deficiente en electrones, del grupo guanidino, seguido de la ciclación de un intermediario inestable de cadena abierta y de la eliminación de amonio del producto cíclico, para dar el ácido 2-nitraminotiazolina-4-carboxílico. Como segundo proceso fundamental, se ha descrito el ataque del grupo tiol de la cisteína sobre el grupo nitroso de la nitrosoguanidina dando como productos finales la N-metil-N'-nitroguanidina y cisteína (Lawley y Thatcher, 1970):



Una reacción muy estudiada de la nitrosoguanidina es la metilación de los ácidos nucleicos, tanto "in vitro" como "in vivo", a diferentes pHs y medios. Debido a esta reacción metilante, se han aislado derivados metilados de todas las bases excepto de la timina.

Según Haerlin et al., (1970); Lawley y Thatcher, (1970). la metilación es mayor en las condiciones de más alta descomposición.

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

La nitrosoguanidina también produce sobre el ADN despurinización y desaminación.

La metilación de proteínas también se produce por la nitrosoguanidina, pero es más de diez veces menor que la que ocurre con los ácidos nucleicos (Nagao et al., 1969; Lawley y Thatcher, 1970).

1.2. Biología de la nitrosoguanidina

1.2.1. Letalidad

La letalidad y mutagénesis son los efectos biológicos de la nitrosoguanidina que más se han estudiado. La letalidad se ha estudiado en relación con la mutagénesis, más que por sí misma.

La concentración de mutágeno y el tiempo de exposición influyen obviamente sobre la letalidad (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b y 1968; Yoshida y Yuki, 1968; Kondo et al., 1970; Sweet y Moseley, 1976; Jeggo et al., 1978; Schendel et al., 1978; Ruiz-Vázquez y Cerdá-Olmedo, 1980; Megías, 1981; Rodríguez-Quiñones et al., 1983).

También influyen factores externos como el pH (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968; Veleminsky y Gichner, 1970) y la temperatura (Kashara et al., 1971) así como factores internos como el estado celular de crecimiento (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b; Dugle et al., 1973) y la capacidad de reparación (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967a; Ishii y Kondo, 1975; Schendel et al., 1978).

Generalizando puede decirse 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 la letalidad y pH (Adelberg et al., 1965; Cerdá-Olmedo

y Hanawalt, 1968a; Veleminsky y Gichner, 1970; Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983; Rodríguez-Quiñones et al., 1983; Megías et al., 1983) aunque existen algunos casos en que parece no existir esta relación, como en Streptomyces cacaoi (Kasahara et al., 1971) o incluso darse un proceso contrario, como en Chlamydomonas reinhardi (Hyams y Davis, 1971).

El incremento de la temperatura también parece aumentar la letalidad causada por la nitrosoguanidina, variando este efecto según la especie utilizada (Kasahara et al., 1971).

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 cambio de la fuente de carbono (Dugle et al., 1973), estas roturas quizás se deban a despurinización por metilación del N-7 de la guanina (Orgel, 1956), O-6 de la guanina y N-3 de la adenina (Singer, 1975), o por acción de nucleasas celulares sobre el ADN metilado (Strauss y Wahl, 1964; Kimball, 1980b).

1.2.2. Mutagenicidad

La nitrosoguanidina se ha utilizado extensamente como agente mutagénico, empleándose en una amplia variedad de organismos, como bacterias (Tabla III), virus (Schneider et al., 1978), levaduras (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1982 y 1983), algas (Hyams y Davis, 1971;

TABLA III. Utilización de la nitrosoguanidina en bacterias
(Rodríguez-Quiñones, 1982)

Bacterias	Referencia
<u>Agrobacterium tumefaciens</u>	Langley y Kado, 1972
<u>Bacillus megaterium</u>	Arceneaux y Lankford, 1966
<u>Bacillus subtilis</u>	Green y Colarusse, 1964 Yoshida y Yuki, 1968
<u>Corynebacterium</u>	Hill y Gordon, 1967
<u>Cystobacter</u> spp.	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>Lactobacillus plantarum</u>	Rodríguez-Quiñones, 1982
<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

Matagne y Vincenzotto, 1981), protozoos (Kimball, 1970; Podgorsky y Deering, 1980), plantas (Mehandzhiew y Yankoulov, 1981), animales (Vijaykumar y Jain, 1981) y cultivos celulares (Barker y Racham, 1980; Gupta y Goldstein, 1980; Lake et al., 1980).

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

En casi todas las circunstancias empleadas es efectiva, por lo que su uso se puede adoptar a muchos organismos y requerimientos experimentales diferentes.

La nitrosoguanidina es muy inestable, como ya se dijo anteriormente, los cambios en esta estabilidad influyen sobre la acción mutagénica y sobre la supervivencia.

Un aumento de la mortalidad no tiene que conducir a un aumento proporcional de la mutagénesis.

Las comparaciones entre efectos mutagénicos han de realizarse en condiciones que conduzcan a una misma mortalidad.

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.

Ya se ha citado anteriormente que la letalidad está directamente relacionada con la concentración del mutágeno y el tiempo de tratamiento; pero en la producción de mutaciones al variar los parámetros antes citados, se ha observado un fenómeno de saturación de las mutaciones al aumentar el producto de ambos por encima de determinado nivel (Adelberg et al., 1965; Burke y Fangam, 1975).

De lo expuesto anteriormente se pensó que la nitrosoguanidina actuaría sobre la región en replicación del ADN. Por mutagénesis secuencial de un cultivo sincronizado se confirmó la hipótesis anterior, ya que se observó un considerable aumento en la mutagénesis de cada gen en el momento en que se replicaba ese gen. Aparecen los máximos de distintos genes en orden concordante con el mapa genético, pudiéndose construir un mapa de replicación (Cerdá-Olmedo et al., 1968b; Hohlfeld y Vielmetter, 1973; Al-Ani, 1977; Zurkowski y Lorkiewicz, 1978).

1.2.2.1. Tipos de mutación

La nitrosoguanidina produce tanto transiciones como transversiones, según Whitfield et al., (1966), pero no encontraron mutaciones por cambio de bases. Posteriormente se encontró que sí podía dar lugar a cambios de bases (Riddle y Roth, 1970; Isono y

Yourno, 1974; Kimball, 1980b).

La metilación del N-7 de la guanina parece que induce una despurinización por labilización de la unión de la base con la desoxirribosa. Al replicarse esta parte del ADN se podrá producir una transición o transversión por introducción de la correspondiente base o una delección por falta de colocación de la base.

La metilación del O-6 de la guanina puede producir apareamiento de bases equivocados (Gerchman y Ludlum, 1973; Abbott y Saffhill, 1979).

1.2.2.2. Mecanismo de mutación

Variando las condiciones ambientales de mutagénesis se comprueba que la metilación no es la causa de la mutación (Singer et al., 1968; Singer y Fraenkel-Conrat, 1969; Kolb y Kaudewitz, 1970), sino que el grupo esencial de la nitrosoguanidina para la mutagénesis es el grupo nitroso (Koshinuma et al., 1970). Aunque Loveless (1969) indica que la metilación del O-6 de la guanina juega un papel importante en la mutagénesis.

En este sentido Samson y Cairns, (1977) descubrieron un proceso inducible de reparación de los errores producidos por estos agentes alquilantes. Esta respuesta adaptativa está asociada con la capacidad de eliminar eficazmente el grupo metilo introducido en el O-6 de la guanina (Jeggo et al., 1977; Schendel et al.,

1978; Karran et al., 1979; Robins y Cairns, 1979). La actividad responsable de la eliminación del grupo metilo O-6 de la guanina se debe a una proteína: una metil-transferasa (Olsson y Lindahl, 1980; Bogden et al., 1981; Karran et al., 1982; Evensen y Seeberg, 1982).

1.2.3. 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).

Tanto en bacterias como en células de mamíferos se ha observado una disminución en la incorporación de aminoácidos. Por tanto, de esta reducción en la incorporación de aminoácidos unida a la reacción con las proteínas, se deduce que la nitrosoguanidina inhibe a las enzimas presentes en la célula (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b; Anderson y Burdon, 1970).

Independientemente del mecanismo exacto de mutagénesis, ésta se produce en las zonas de replicación del cromosoma, lo cual confiere a la nitrosoguanidina su propiedad más importante.

PERSPECTIVAS ACTUALES

En el presente trabajo se aportan resultados de interés no sólo por el estudio realizado con una nueva archaeobacteria como es Halobacterium mediterranei, halófilo extremo de características peculiares, sino por utilizarse por vez primera un mutágeno químico,

para la obtención de mutantes en microorganismos halófilos extremos, optimizando las condiciones de tratamiento.

En cuanto a la acción antibiótica frente a los microorganismos halófilos extremos, en el presente trabajo se realiza una revisión de los resultados que hasta ahora se conocían, y también se aportan nuevos resultados con otros antibióticos. Sobresaliendo los datos obtenidos, que contrastan con la idea general hasta ahora mantenida que los indicados microorganismos mantenían una alta resistencia a casi la totalidad de los antimicrobianos conocidos.

Por lo tanto el objetivo fundamental de este trabajo ha sido tratar de conocer algunas de las características generales de Halobacterium mediterranei frente a agentes mutagénicos (nitrosoguanidina).

Para la consecución de dicho objetivo fue necesario iniciar este trabajo estudiando la susceptibilidad a antibióticos de los microorganismos halófilos extremos, lo que nos permitió seleccionar posteriormente el antibiótico adecuado para la obtención de resistencia inducida al mismo por tratamiento con el agente mutagénico.

Esta resistencia obtenida se utilizó en experimentos posteriores como marcador genético, que nos permitió estudiar la frecuencia de aparición del mismo en función del tiempo de exposición y distintos pHs del medio de tratamiento.

MATERIALES

1. MICROORGANISMOS

La relación de bacterias utilizadas en este estudio se encuentran en la Tabla IV.

TABLA IV. Relación de especies bacterianas que se han utilizado

Microorganismos	Procedencia
<u>Haloarcula californiae</u>	ATCC 33799
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	ATCC 33800
<u>Halobacterium halobium</u>	CECT 396
<u>Halobacterium hispanicum</u>	ATCC 33960
<u>Halobacterium larsenii</u>	ATCC 33959
<u>Halobacterium mediterranei</u>	ATCC 33500
<u>Halobacterium saccharovorum</u>	ATCC 29252
<u>Halobacterium salinarium</u>	CCM 2084
<u>Halobacterium vallismortis</u>	ATCC 29715
<u>Halobacterium volcanii</u>	DS 2
<u>Halococcus morrhuae</u>	CCM 537

Abreviaturas empleadas:

ATCC, American Type Culture Collection, Rockville, Maryland, USA

CCM, Czechoslovak Collection of Microorganisms, Brno

CECT, Colección Española de Cultivos Tipo, Valencia

2. PRODUCTOS QUIMICOS

2.1. Antibióticos

Los antibióticos utilizados se muestran en la Tabla V. Las concentraciones finales de cada antibiótico en el medio de cultivo fueron variables y se indican en cada caso.

TABLA V. Antibióticos que se han utilizado en los diferentes experimentos

Antibióticos	Marca de referencia
Ampicilina sódica	Beecham Research Laboratories
Bacitracina	Sigma Chemical Company
Carbenicilina disódica	Beecham Research Laboratories
Cefotaxima sódica	Hoechst Iberica S.A.
Cloramfenicol	Sigma Chemical Company
Clindamicina	Upjohn Farmoquímica S.A.
D-Cicloserina	Ega-Chemie
Eritromicina etilsuccinato	Abbott Laboratories S.A.
Espectinomicina clorhidrato	Upjohn Farmoquímica S.A.
Espiramicina base	Rhône-Poulenc Farma S.A.E.
Estreptomicina sulfato	Sigma Chemical Company
Gentamicina sulfato	Sigma Chemical Company
Haloquinona	Dr. A. Zeeck, Universität Göttingen W. Germany
Josamicina (Yamanouchi)	Laboratorios LIADE S.A.

Kanamicina sulfato	Sigma Chemical Company
Lincomicina clorhidrato	Upjohn Farmoquímica S.A.
Neomicina sulfato	Sigma Chemical Company
Novobiocina sódica	Sigma Chemical Company
Rifampicina	Sigma Chemical Company
Troleandomicina	Pfizer S.A.

Todos los antibióticos fueron disueltos en agua, menos los que se indican a continuación:

Bacitracina y troleandomicina en etanol. D-Cicloserina, eritromicina, espiramicina, josamicina, rifampicina, cloramfenicol y haloquinona en metanol.

Se esterilizaron por filtración utilizando membranas Sartorius de 0,45 μm de diámetro de poro.

2.2. Otros productos

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

3. TAMPONES

3.1. Solución salina

En todos los tampones utilizados se añadió un 20% (p/v) de NaCl para mantener la viabilidad de los microorganismos empleados.

3.2. Tampón acetato modificado

Se preparó según Gomori (1955), mezclando en las concentraciones 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 0,1 M	11,55 ml
Solución de NaCl al 20%	100 ml

Solución B

Acetato sódico	16,4 g
Solución de NaCl al 20%	1000 ml

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

3.3. Tampón tris-maleato modificado

Se preparó según Gomori (1955), mezclando en las proporciones adecuadas soluciones 0,2 M de hidróxido sódico (solución B).

De esta forma se prepararon tampones a pHs entre 5,0 y 8,0 unidades.

Solución A

Tris (hidroximetil) aminometano ..	24,2	g
Acido maleico	23,2	g
Solución de NaCl al 20%	1000	ml

Solución B

NaOH 0,2 M	8,0	g
Solución de NaCl al 20%	1000	ml

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

3.4. Tampón citrato-tris-maleato modificado

Se preparó una solución que contenía:

Acido cítrico	2,65	g
Citrato sódico	3,67	g
Tris(hidroximetil)aminometano	1,51	g
Acido maleico	1,45	g
Solución de NaCl al 20%	200	ml

Los distintos pHs se obtuvieron diluyendo 20 ml de esta solución hasta 0,005 M mediante adición de solución de sales y una solución 1 M de NaOH o de HCl en las proporciones adecuadas. De esta forma se prepararon tampones a pHs entre 4 y 8,5 unidades.

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

4. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIAS

4.1. Medios líquidos

4.1.1. Solución concentrada de sales (30% (p/v))

Esta compuesta por:

NaCl	234	g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	39	g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	61	g
CaCl ₂	1	g
KCl	6	g
NaHCO ₃	0,2	g
NaBr	0,7	g
H ₂ O destilada c.s.p.	1000	ml

4.1.2. Medio de cultivo líquido

Se utilizó un medio con un 25% (p/v) de sales totales

(Rodríguez-Valera et al., 1980), que está compuesto por:

Extracto de levadura (Difco)	5	g
Solución concentrada de sales	833,3	ml
Agua destilada	166,7	ml

El pH de los medios se ajustó con NaOH 1 N a 7,4 unidades, el medio se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 20 minutos.

4.1.3. Medio para el crecimiento de Haloarcula

Se empleó el medio recomendado por Javor et al., (1982):

Medio base

KCl	2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	20,0 g
Citrato sódico	3,0 g
NaCl	250,0 g
CaCl ₂	0,2 g
Agua destilada c.s.p.	900 ml

El pH se ajustó a 7,4 unidades con NaOH 1 N .

Se esterilizó el medio base en autoclave a 121 °C durante 15 minutos.

Se dejó enfriar y se le añadió entonces asépticamente las siguientes soluciones:

Solución de peptona bacteriológica

Peptona (Oxoid)	100 g
Agua destilada	1000 ml

Se esterilizó por filtración a través de membranas Sartorius de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Solución de elementos trazas

MnCl ₂ ·4H ₂ O	0,218	g
FeCl ₂ ·4H ₂ O	3,580	g
H ₂ O destilada	1000	ml

Los componentes de esta solución se deben añadir en el orden de la lista y se esterilizó por filtración a través de membrana Sartorius de 0,45 μ m de diámetro de poro.

Composición final del medio de cultivo

Medio base	900	ml
Solución de peptona	100	ml
Solución de elementos trazas ..	1	ml

El pH final del medio debe de ser de 7,4 unidades.

4.2 Medios para el tratamiento con antibióticos

En el caso de tratarse de medios líquidos, las soluciones de antibióticos, previamente estériles, se añadieron asépticamente al medio de cultivo líquido en las cantidades idóneas para conseguir las concentraciones finales deseadas.

4.3 Medios sólidos

Los medios sólidos se prepararon añadiendo 12 g/l de agar (Oxoid Technical, no. 1) a los medios líquidos.

En los casos en que los antibióticos o la nitrosoguani-
dina se incorporaron al medio sólido se mantuvo el medio en sobre-
fusión (45 °C) antes de añadir los mismos.

MÉTODOS

1. CULTIVO DE LAS BACTERIAS EN MEDIO LIQUIDO

Los cultivos líquidos se inocularon a partir de una colonia bacteriana y se incubaron durante toda la noche a 37 °C en un agitador orbital (Lab-Line Instruments, Inc., Melrose Park, Ill. USA) a 200 rpm .

Posteriormente este cultivo inicial se diluyó en medio de cultivo nuevo, dejándolo crecer hasta una concentración próxima a 4×10^8 células/ml, que equivale a una densidad óptica de 0,8 unidades a 520 nm en un espectrofotómetro "Spectronic 20" (Bausch & Lomb).

2. RECUENTO DE BACTERIAS VIVAS

Tras las diluciones oportunas, en solución de sales al 25% (SW-25), se tomaron muestras que contendrían de 100-200 u.f.c. (unidad formadora de colonia) y se extendieron en placas con agar-SW-25 más extracto de levadura (SW-25YE) incubándolas a continuación a 37 °C durante cuatro días, envueltas en bolsas de plástico para conservar un adecuado grado de humedad. Para cada muestra se sembraron tres placas y con ellas se calculó la media.

3. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Se inocularon tubos con medio SW-25YE líquido con 0,2 ml de una suspensión iniciadora del microorganismo cuya densidad óptica era de 0,3 unidades a 520 nm .

Los cultivos así sembrados se incubaron a 37 °C en posición próxima a la horizontal, para conseguir una máxima aireación, en un agitador orbital a 200 rpm y se determinó el crecimiento midiendo periódicamente la densidad óptica a 520 nm y tomando muestras de cultivo para el recuento del número de células viables.

Se pretendió con ello calcular el tiempo de generación del microorganismo.

4. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD A ANTIBIOTICOS

4.1. Método del gradiente en placa

Se eligió la técnica descrita por Carlton y Brown (1981). Se vertieron 10 ml de medio agar-SWYE estéril en una placa de Petri estéril, de 100 mm de diámetro, dejándose enfriar con la placa inclinada, de tal forma que la superficie del medio coincida con el canto inferior de la placa (Figura 2).

Una vez gelificado el agar, la placa se nivela y se añaden 10 ml del medio más antibiótico, se deja enfriar sobre una superficie nivelada, perfectamente horizontal.

De esta forma se consigue un gradiente de concentración del antibiótico desde 0 $\mu\text{g/ml}$ hasta la máxima concentración en el lado opuesto de la placa.

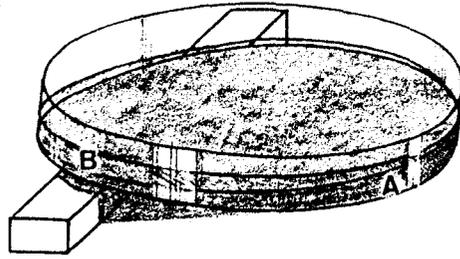


FIGURA 2. Preparación del gradiente en placa.

(A) Medio base con agar; (B) Agar antibiótico.

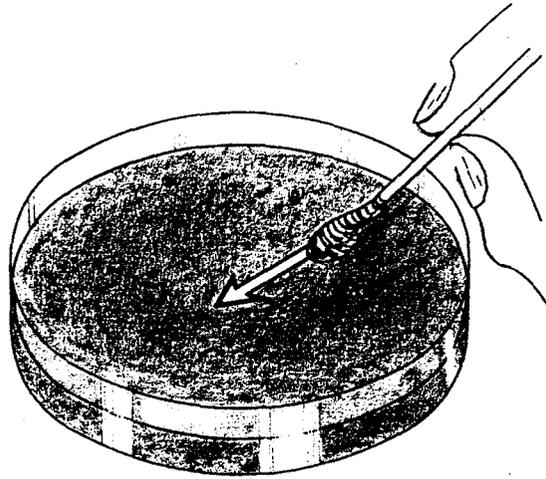


FIGURA 3. Siembra de la placa con el gradiente de antibiótico.

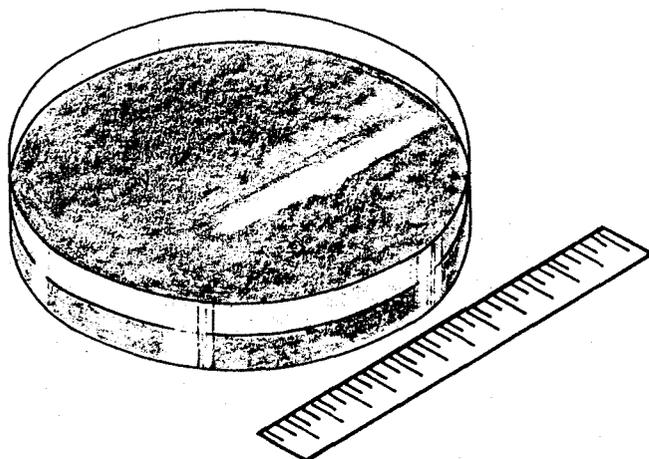


FIGURA 4. Determinación de la concentración útil del antibiótico ensayado.

Se realiza una señal en la superficie inferior de la placa que indique la orientación del gradiente.

Las placas deben prepararse 24 horas antes de su uso, para que se establezca el gradiente de antibiótico y han de utilizarse antes de un tiempo prudencial, con el fin de que el gradiente no desaparezca.

La bacteria a probar se inoculó como una estria continua desde el punto con menor concentración del gradiente hasta el de máxima concentración (Figura 3).

La lectura de las placas se realizó por la ausencia de crecimiento en una zona determinada del gradiente (Figura 4).

4.2. Test de dilución en tubos de medio líquido

4.2.1. Dilución del antibiótico

Se eligió la técnica descrita por Washinton y Sutter (1980). Se prepararon disoluciones de los distintos antibióticos con una concentración de 1500 $\mu\text{g/ml}$ utilizando como disolvente la solución de sales al 25% (p/v).

Al primer tubo se añade 2 ml de la solución de antibiótico. A cada uno de los restantes tubos se añade 1 ml de medio líquido.

Con una pipeta estéril, se transfiere 1,0 ml del primer tubo al segundo. Se mezcla el contenido del segundo tubo y 1,0 ml se transfiere al tercer tubo, así sucesivamente. Al último tubo no se le añade la solución con antibiótico y sirve, por tanto como control.

La concentración del antibiótico en cada tubo será la mitad de la concentración del tubo que le antecede.

4.2.2. Inóculo

El inóculo se preparó ajustando la densidad óptica de un cultivo incubado durante 24 horas, la densidad elegida fue de 0,8 unidades y se diluyó en la proporción 1:200, añadiendo a cada tubo 1 ml del cultivo ajustado.

4.2.3. Interpretación de los resultados

Los resultados se presentan como la mínima concentración inhibitoria (MIC) que se define como la menor concentración de antibiótico capaz de inhibir el crecimiento, visible como turbidez.

5. 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.

5.1 En medio sólido

Se preparó un cultivo en medio líquido y se incubó hasta alcanzar unas 4×10^8 células/ml. Entonces se centrifugó en tubos Eppendorf en una microcentrífuga Eppendorf 5414 durante 60 segundos a 12000 rpm y se resuspendió en solución de sales SW-25.

Se hicieron las diluciones oportunas y se sembraron alícuotas de 0,1 ml de estas soluciones en placas con medio agar-SWYE al que se le había añadido nitrosoguanidina para unas concentraciones finales en placa de 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ y 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

Las placas se incubaron a 37 °C envueltas en papel de aluminio para impedir la descomposición de la nitrosoguanidina por la luz.

5.2. En tampón

Se utilizó la técnica descrita por Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1967) adaptada a Halobacterium mediterranei.

Células que habían estado creciendo en SWYE líquido hasta alcanzar la densidad óptica adecuada, se centrifugaron y se resuspendieron en distintos tampones y pHs según cada caso, indicado en el correspondiente apartado de resultados.

Se añadió nitrosoguanidina a una concentración final de 500 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó a 37 °C en oscuridad y sin agitación, salvo indicaciones contrarias.

Al final del tratamiento deseado se tomaron alícuotas de la suspensión de células, se diluyeron en solución de sales SW-25 estéril, se centrifugaron y se lavaron dos veces con SW-25 estéril, sembrándolas en medio SWYE agar tras las diluciones adecuadas.

6. AISLAMIENTO DE MUTANTES RESISTENTES A ANTIBIÓTICOS

Para la obtención de mutantes resistentes espontáneos, se partió de un cultivo en fase estacionaria, densidad óptica 1,6 .

El factor de dilución empleado dependió de la frecuencia de aparición de cada uno de los mutantes que se buscaba. Estas frecuencias aparecen en la Tabla VI del apartado de resultados.

Para la obtención de mutantes resistentes a la josamicina inducidos por nitrosoguanidina, la siembra en el medio de cultivo con antibiótico se efectuó después del tratamiento indicado en cada caso, realizando las diluciones oportunas.

RESULTADOS Y DISCUSION

I. SUSCEPTIBILIDAD DE HALOFILOS EXTREMOS A ANTIBIOTICOS

El objetivo de este primer apartado de los resultados, fue estudiar el comportamiento de nuevas especies de halófilos extremos frente a diversos antibióticos.

Se creyó interesante probar antibióticos no utilizados hasta el momento en estos microorganismos, incluyendo en el estudio especies de microorganismos halófilos extremos que siendo de reciente aceptación no habían sido estudiadas frente a los antibióticos ensayados en este trabajo.

Con ello, se quiso completar el estudio de la susceptibilidad de los microorganismos halófilos extremos a un gran número de antibióticos y la posibilidad de usar este carácter para determinar sus posibles relaciones taxonómicas.

1. ESTUDIO DE LA SUSCEPTIBILIDAD A LOS ANTIBIOTICOS

1.1. Estudios preliminares de la concentración inhibitoria de los antibióticos por el método del gradiente en placa

Para tener una idea aproximada de la concentración de antibiótico que produce inhibición y posteriormente hacer un estudio detallado de esta zona de inhibición y calcular la mínima concentración inhibitoria, se utilizó el método del gradiente en placa, utilizando como concentración

máxima del antibiótico 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esta técnica es descrita en Métodos apartado 4.1. .

En las Tablas VI , VII y VIII se muestran las inhibiciones producidas por distintos antibióticos frente a Halobacterium mediterranei , Halobacterium hispanicum y Halobacterium larsenii , deduciéndose de los mismos los valores aproximados de concentración de los antibióticos que producen una inhibición visible del crecimiento de estas bacterias. Este valor fue de gran utilidad en el estudio de la MIC de estos antibióticos frente a los distintos microorganismos.

Siempre que queríamos orientarnos sobre las concentraciones de antibiótico que se debían utilizar en experimentos posteriores, se recurrió a dicho "método del gradiente en placa".

1.2. Estudio de la concentración mínima inhibitoria

Las concentraciones mínimas inhibitorias (MIC) se estudiaron según la técnica descrita en Métodos, apartado 4.2. .

Los resultados se muestran en las Tablas IX , X , XI , XII y XIII .

En la Tabla IX se muestran los resultados obtenidos con antibióticos de la familia de las penicilinas tales como la ampicilina y la carbenicilina. Todos los microorganismos ensayados fueron resistentes a la concentración máxima probada (1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$) excepto Halobacterium hispanicum cuya MIC para la carbenicilina fue de 1500 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

TABLA VI. Estudio de la concentración inhibitoria de 14 antibióticos sobre el crecimiento de Halobacterium mediterranei . Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C .

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Distancia (mm) ⁽¹⁾	Concentración aproximada ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	500	100 (a)	---
Carbenicilina	500	100	---
Cefotaxima	500	100	---
D-Cicloserina	500	100	---
Troleandomicina	500	40	---
Josamicina	500	10	50
Rifampicina	500	5	25
Novobiocina	500	5	25
Estreptomomicina	500	100	---
Kanamicina	500	100	---
Neomicina	500	100	---
Gentamicina	500	100	---
Espectinomicina	500	100	---
Cloramfenicol	500	40	200

(1) Distancia en mm desde el borde de la zona de inhibición del crecimiento al punto del gradiente con menor concentración del antibiótico.

(a) 100 indica no inhibición del crecimiento.

TABLA VII. Estudio de la concentración inhibitoria de 14 antibióticos sobre el crecimiento de Halobacterium hispanicum . Las placas se incubaron durante 72 horas a 37 °C .

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Distancia (mm) ⁽¹⁾	Concentración aproximada ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	500	100 (a)	---
Carbenicilina	500	100	---
Cefotaxima	---	---	---
D-Cicloserina	500	25	125
Troleandomicina	500	30	150
Josamicina	500	100	---
Rifampicina	500	4	20
Novobiocina	500	4	20
Estreptomina	500	100	---
Kanamicina	500	100	---
Neomicina	500	100	---
Gentamicina	500	100	---
Espectinomicina	500	100	---
Cloramfenicol	500	100	---

(1) Distancia en mm desde el borde de la zona de inhibición del crecimiento al punto del gradiente con menor concentración del antibiótico.

(a) 100 indica no inhibición del crecimiento.

TABLA VIII. Estudio de la concentración inhibitoria de 14 antibióticos sobre el crecimiento de Halobacterium larsenii . Las placas se incubaron 72 horas a 37 °C .

Antibiótico	Concentración ($\mu\text{g/ml}$)	Distancia (mm) ⁽¹⁾	Concentración aproximada ($\mu\text{g/ml}$)
Ampicilina	500	100 (a)	---
Carbenicilina	500	100	---
Cefotaxima	---	---	---
D-Cicloserina	500	100	---
Troleandomicina	500	100	---
Josamicina	500	100	---
Rifampicina	500	20	4
Novobiocina	500	50	10
Estreptomycin	500	100	---
Kanamicina	500	100	---
Neomicina	500	100	---
Gentamicina	500	100	---
Espectinomicina	500	100	---
Cloramfenicol	500	100	---

(1) Distancia en mm desde el borde de la zona de inhibición del crecimiento al punto del gradiente con menor concentración del antibiótico.

(a) 100 indica no inhibición del crecimiento.

Los datos bibliográficos existentes indican que los microorganismos halófilos extremos son resistentes a los antibióticos de la familia de las penicilinas o presentan una MIC muy elevada. Mescher y Strominger (1975) probaron penicilina G sódica y ampicilina, encontrando MICs muy elevadas usando Halobacterium salinarium , Halobacterium cutirubrum y Halobacterium halobium . Hilpert et al. (1981) utilizó penicilina G sódica sobre cinco microorganismos halófilos extremos, no encontrando inhibición del crecimiento.

Estos resultados están de acuerdo con la idea de que los microorganismos halófilos extremos carecen de mureína siendo así que dichos antibióticos inhiben específicamente la tercera etapa de la síntesis de la misma.

En la Tabla X se indican las MIC de los restantes antibióticos ensayados, cuyos mecanismos de acción implican la síntesis de mureína. De los antibióticos estudiados todos aquellos con acción sobre la síntesis de mureína no mostraron actividad alguna a la concentración máxima ensayada; menos la bacitracina, que inhibió el crecimiento a concentraciones comparables a las exigidas por las bacterias normales, excepto en las especies del género Haloarcula y Halobacterium larsenii sobre las que no actuó.

Ya Mescher y Strominger (1975) postularon que la bacitracina debía actuar sobre las halobacterias inhibiendo la síntesis de un componente estructural de su envuelta, según parecía derivarse del hecho que la bacitracina diera lugar a la inhibición del crecimiento junto con un cambio

TABLA IX. Concentraciones Mínimas Inhibitorias (en $\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos ampicilina y carbenicilina, frente a 11 microorganismos halófilos extremos, después de 72 horas de incubación a 37 °C .

	Ampicilina	Carbenicilina
<u>Halobacterium halobium</u>	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium salinarium</u>	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium saccharovororum</u>	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium vallismortis</u>	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium mediterranei</u>	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium hispanicum</u>	N.I.	1500
<u>Halobacterium larsenii</u>	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula californieae</u>	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	N.I.	N.I.
<u>Halococcus morrhuae</u>	N.I.	N.I.

N.I. , no inhibición del crecimiento.

TABLA X. Concentraciones Mínimas Inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) de los antibióticos cefotaxima, D-cicloserina y bacitracina frente a 11 microorganismos halófilos extremos, después de 72 horas de incubación a 37 °C .

	Cefotaxima	D-Cicloserina	Bacitracina
<u>Halobacterium halobium</u>	N.I.	N.I.	94
<u>Halobacterium salinarium</u>	N.I.	N.I.	94
<u>Halobacterium saccharovororum</u>	N.I.	N.I.	94
<u>Halobacterium vallismortis</u>	N.I.	N.I.	94
<u>Halobacterium volcanii</u>	N.I.	N.I.	188
<u>Halobacterium mediterranei</u>	N.I.	1500	47
<u>Halobacterium hispanicum</u>	1500	1500	47
<u>Halobacterium larsenii</u>	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula californieae</u>	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Halococcus morrhuae</u>	N.I.	N.I.	94

N.I. , no inhibición del crecimiento.

de la morfología a formas esféricas.

En cuanto al comportamiento de Halobacterium larsenii y especies de Haloarcula, no puede explicarse con los conocimientos actuales que tenemos en relación a su fisiología. En el caso de Haloarcula su morfología cuadrangular podría contribuir a este comportamiento.

Se ensayaron otros antibióticos de espectro parecido al de la penicilina (Tabla XI) como son los macrólidos y los azúcares complejos (lincomicina y su derivado clorado, clindamicina), que aunque difieren químicamente de los macrólidos poseen un espectro antibacteriano muy parecido.

La eritromicina es el macrólido más utilizado junto con la troleandomicina (TAO), ambos poseen una acción parecida sobre la síntesis proteica.

A la eritromicina, todos los microorganismos halófilos extremos ensayados presentan una MIC entre 188 y 375 $\mu\text{g/ml}$, siendo estos resultados diferentes a los presentados por Hilpert et al. (1981) que indican no inhibición a dicho antibiótico para los halófilos extremos ensayados.

Solamente Halobacterium mediterranei presentó una inhibición aceptable frente a troleandomicina.

La lincomicina fue inactiva para todas las especies ensayadas excepto para Halobacterium hispanicum, sin embargo su derivado clindamicina

TABLA XI. Concentraciones Mínimas Inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) de seis antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos, después de 72 horas de incubación a 37 °C .

	Eritromicina	Troleandomicina	Josamicina	Clindamicina	Lincomicina	Espiramicina
<u>Halobacterium halobium</u>	188	1500	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium salinarium</u>	188	N.I.	N.I.	750	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium saccharovororum</u>	375	1500	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium vallismortis</u>	188	N.I.	N.I.	750	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium volcanii</u>	375	N.I.	N.I.	750	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium mediterranei</u>	375	375	38*	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium hispanicum</u>	188	1500	875	1500	1500	N.I.
<u>Halobacterium larsenii</u>	188	1500	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula californieae</u>	188	N.I.	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	188	N.I.	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Halococcus morrhuae</u>	188	N.I.	N.I.	750	N.I.	N.I.

N.I. , no inhibición del crecimiento.

* La concentración máxima empleada del antibiótico fue de 50 $\mu\text{g/ml}$.

sí presentaba actividad.

En cuanto a la espiramicina, no presentó actividad sobre ninguno de los microorganismos halófilos extremos estudiados.

La josamicina sobresale por su marcada actividad sobre Halobacterium mediterranei. El comportamiento de sensibilidad a la josamicina y troleandomicina de Halobacterium mediterranei en comparación del resto de los halófilos extremos ensayados, puede indicar la existencia de una similitud en el mecanismo de translocación del sitio A al sitio P del peptidil ARN-transferente en la síntesis de proteínas, con el resto de las bacterias sensibles a dicho antibiótico.

Los aminoglucósidos ensayados (Tabla XII), se ven afectados por la acidez y la presencia de sales (especialmente iones polivalentes) presentes en el medio.

Hasta ahora se reconocían a las halobacterias como microorganismos fuertemente resistentes a los aminoglucósidos (Hilpert et al., 1981), justificando esta resistencia no como una propiedad intrínseca de los ribosomas sino como una causa directa de la presencia de Na^+ y Mg^{++} en el medio, sin embargo un aminoglucósido como la kanamicina mostró actividad frente a las especies nuevas Halobacterium mediterranei y Halobacterium hispanicum; asimismo la neomicina poseía actividad frente a halófilos extremos típicos y a la nueva especie Halobacterium hispanicum y marcadamente en especies de Haloarcula.

TABLA XII. Concentraciones Mínimas Inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) de cinco antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos, después de 72 horas de incubación a 37 °C .

	Estreptomina	Kanamicina	Neomicina	Gentamicina	Espectinomicina
<u>Halobacterium halobium</u>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium salinarium</u>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium saccharovororum</u>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium vallismortis</u>	N.I.	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium volcanii</u>	N.I.	N.I.	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium mediterranei</u>	N.I.	1500	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium hispanicum</u>	N.I.	1500	1500	N.I.	N.I.
<u>Halobacterium larsenii</u>	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula californiae</u>	N.I.	N.I.	47	N.I.	N.I.
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	N.I.	N.I.	24	N.I.	N.I.
<u>Halococcus morrhuae</u>	N.I.	N.I.	1500	N.I.	N.I.

N.I. , no inhibición del crecimiento.

Gentamicina y estreptomycin son aminoglucósidos que se afectan de una manera notable por la acidez y los cationes. debido a esto, parece explicarse por qué presentan una inactividad tan marcada (Weisburg and Tanner, 1982)

La rifampicina (Tabla XIII) mostró una buena actividad pero no inhibió a las especies de Haloarcula a concentraciones utilizables, este hecho lo consideramos muy significativo en cuanto a las diferencias que deben de existir en dicho género con los restantes especies halófilas del género Halobacterium .

Cabe destacar las bajas MICs que presentan las especies Halobacterium mediterranei , Halobacterium hispanicum y Halobacterium larsenii respecto al resto de las halófilas extremas. Igualmente son significativas las elevadas MICs que poseen Halobacterium volcanii y Halobacterium morrhuae .

Los resultados obtenidos con cloramfenicol presentan MICs muy elevadas salvo para Halobacterium mediterranei (MIC 141 $\mu\text{g/ml}$) y las especies de Haloarcula . Estos resultados difieren de los presentados por Hilpert et al. (1981) donde las especies de Halobacterium que utilizó no presentaron inhibición del crecimiento.

La haloquinona (Krone et al., 1981) junto con la eritromicina fueron los antibióticos con un comportamiento más uniforme frente a los microorganismos ensayados (Tabla XI y XIII), resaltando la mayor susceptibilidad de las especies nuevas a la haloquinona, inhibidor de la síntesis de ADN.

TABLA XIII. Concentraciones Mínimas Inhibitorias ($\mu\text{g/ml}$) de cuatro antibióticos frente a 11 microorganismos halófilos extremos, después de 72 horas de incubación a 37 °C .

	Rifampicina	Novobiocina	Cloramfenicol	Haloquinona
<u>Halobacterium halobium</u>	24	188	1500	375
<u>Halobacterium salinarium</u>	24	12	1500	375
<u>Halobacterium saccharovororum</u>	12	94	1500	188
<u>Halobacterium vallismortis</u>	94	6	750	750
<u>Halobacterium volcanii</u>	188	188	1500	188
<u>Halobacterium mediterranei</u>	4*	2*	141**	188
<u>Halobacterium hispanicum</u>	4*	8*	1500	47
<u>Halobacterium larsenii</u>	4*	32*	1500	24
<u>Haloarcula californieae</u>	N.I.	N.I.	188	47
<u>Haloarcula sinaiensis</u>	N.I.	N.I.	94	47
<u>Halococcus morrhuae</u>	188	24	750	94

N.I. , no inhibición del crecimiento.

* La concentración máxima del antibiótico empleada fue 500 $\mu\text{g/ml}$.

** La concentración máxima del antibiótico empleada fue 225 $\mu\text{g/ml}$.

La haloquinona, descrita inicialmente como activa frente a tres especies (Ewersmeyer-Wenk et al., 1981), resultó activa frente al resto de las especies ensayadas por nosotros, incluyendo las del género Haloarcula .

II. ESTUDIO DE LA LETALIDAD Y LA MUTAGENICIDAD EN Halobacterium mediterranei

1. GENERALIDADES

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

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 josamicina; antibiótico cuyo mecanismo de acción es similar al de cloramfenicol, pero que carece de acción secundaria sobre el metabolismo de la bacteria.

2. ESTUDIO DE LA CURVA DE CRECIMIENTO

Las Figuras 5 y 6 muestran los resultados de la curva de crecimiento de Halobacterium mediterranei. De la Figura 5 se establece un tiempo de generación de 2 horas y 45 minutos.

La Figura 6 establece la relación entre la densidad óptica y el 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.

3. ENSAYOS CON NITROSOGUANIDINA

En todos los organismos, la supervivencia y la frecuencia de mutantes depende de la concentración de mutágeno y del 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 prescindimos de la agitación, incubando a 37 °C y en oscuridad.

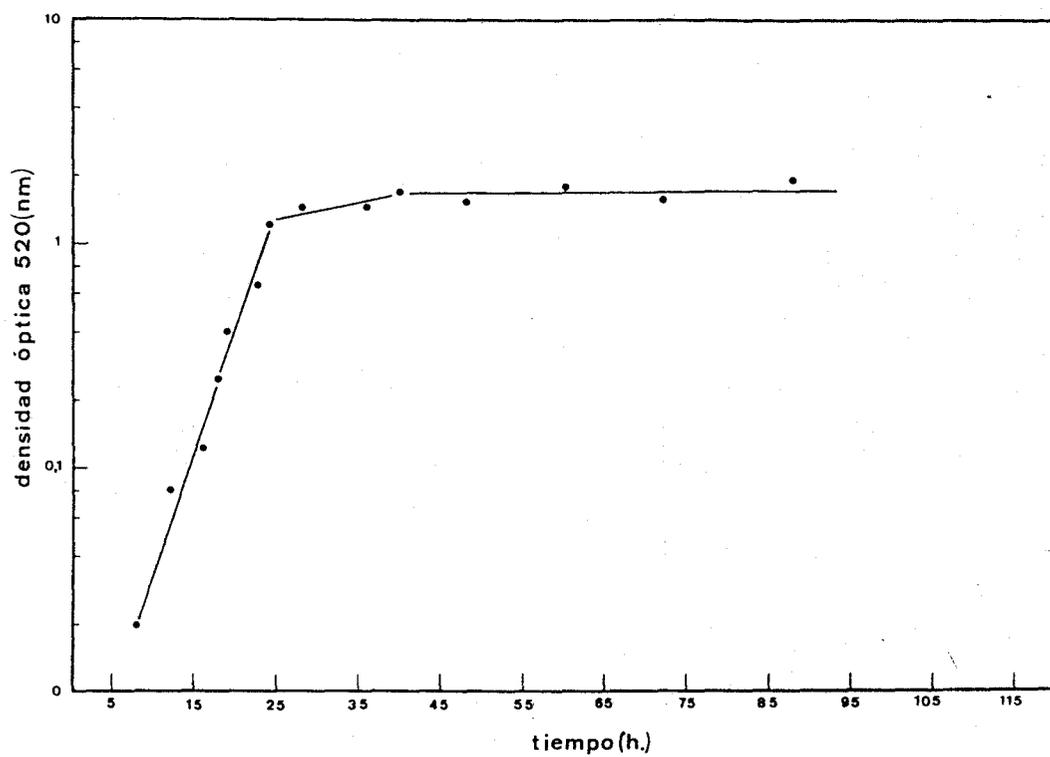


FIGURA 5. Curva de crecimiento de la especie Halobacterium mediterranei en solución de sales al 25 % más 0,5 % de extracto de levadura (SWYE).

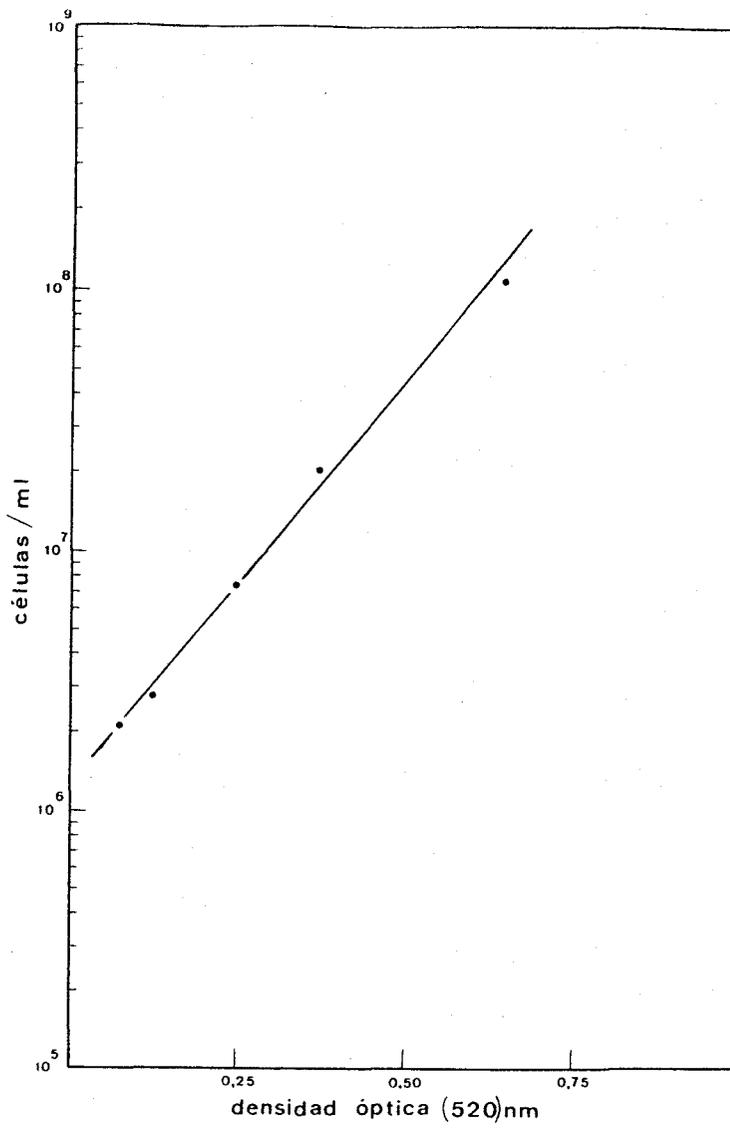


FIGURA 6. Relación entre el número de células y la densidad óptica, medida a 520 nm, de un cultivo en fase exponencial de crecimiento.

3.1. Ensayos preliminares

3.1.1. Efecto de la solución de sales sobre la estabilidad de la nitrosoguanidina

La primera pregunta que se planteó antes de estudiar el efecto de la nitrosoguanidina sobre Halobacterium mediterranei fue si esta estirpe bacteriana era capaz de mantener su viabilidad en los tampones y pHs que se utilizarían posteriormente.

De los resultados que se obtuvieron se deduce que salvo en tampón acetato a pH 4,5, en el que se observó una ligera disminución del título de células ($3,3 \times 10^8$ células/ml) respecto al título de células en el control (se consideró como control la solución de sales al 25% (p/v) (2×10^9 células/ml)), ninguno de los otros tampones y pHs utilizados se alejaron del título celular que presentó dicha estirpe en la solución de sales. Los títulos presentados en los tampones tris-maleato modificado y citrato-tris-maleato modificado oscilaban entre $9,5 \times 10^8$ y $1,7 \times 10^9$ células/ml, cuando la densidad óptica del cultivo era de 0,8 unidades.

De lo que se deduce que estos tampones se pueden utilizar para el estudio de la letalidad y mutagenicidad en Halobacterium mediterranei.

Por otro lado y dado que no existen datos bibliográficos sobre la estabilidad de la nitrosoguanidina a tan alta concentración iónica, se realizó un estudio previo de la estabilidad de dicho mutá-

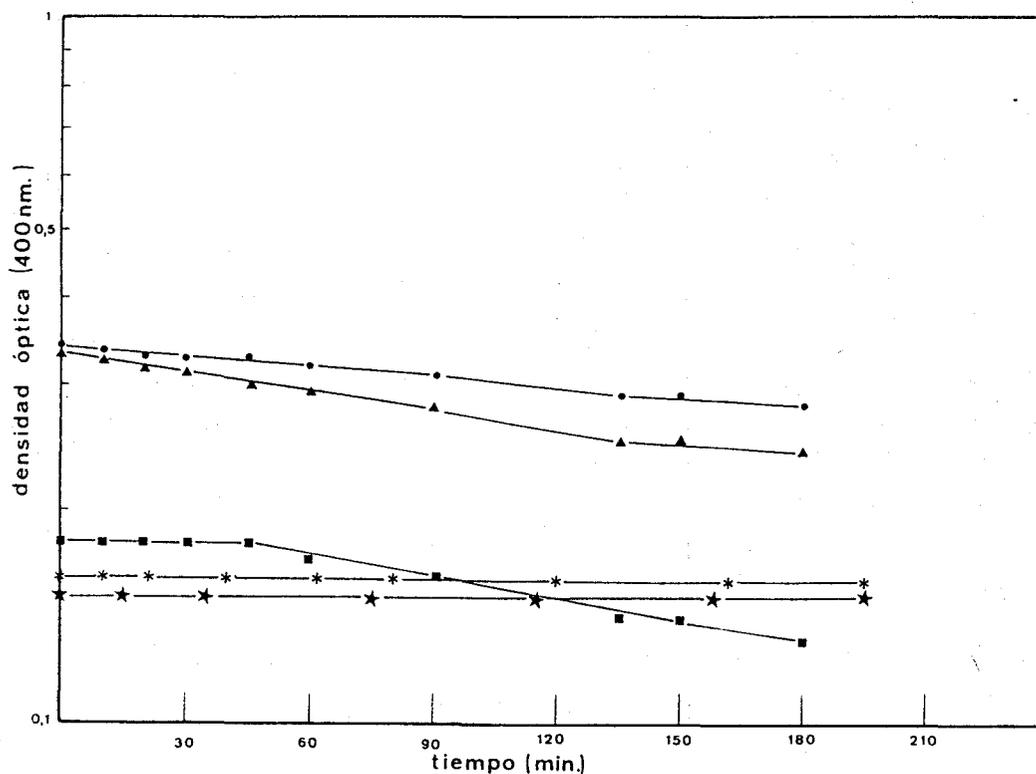


FIGURA 7. Evolución de la estabilidad de la nitrosoguanidina, medida como variación de la densidad óptica a 400 nm a lo largo del tiempo, a distintas concentraciones iniciales y disuelta en diferentes soluciones, manteniendo los tubos siempre en oscuridad e incubados a 37 °C. (●) tampón tris-maleato modificado, pH 7,4 y 200 μg de nitrosoguanidina/ml; (▲) solución de sales (25 %) y 200 μg de nitrosoguanidina /ml; (■) tampón tris-maleato, pH 7,4 y 200 μg /ml de nitrosoguanidina; (*) tampón acetato modificado, pH 5,0 y 500 μg de nitrosoguanidina/ml; (★) tampón citrato-tris-maleato modificado, pH 8,5 y 400 μg de nitrosoguanidina/ml.

geno en solución de sales, tampón tris-maleico modificado, tampón tris-maleico, tampón citrato-tris-maleato modificado y tampón acetato modificado. En la Figura 7 se muestra la evolución de la estabilidad de la nitrosoguanidina a lo largo del tiempo en dichas soluciones y a distintas concentraciones iniciales de nitrosoguanidina. El tampón tris-maleato se utilizó como control de estabilidad de la nitrosoguanidina.

De esta figura se deduce que la nitrosoguanidina se mantiene estable en todas las soluciones empleadas durante las tres horas que duró el experimento y sin apreciarse desviación sobre la curva control; este tiempo de experimentación fue siempre superior a los que se utilizaron en los experimentos posteriores.

Se deduce pues que la alta concentración iónica no afecta a la estabilidad de la nitrosoguanidina.

3.1.2. Letalidad en medio sólido

La Figura 8 muestra la capacidad de un cultivo de formar colonias en medio que contiene distintas concentraciones de nitrosoguanidina.

Se observa cierta inhibición a partir de $1 \mu\text{g}$ de nitrosoguanidina por ml por placa, llegando a ser la letalidad de hasta un 70% del cultivo inicial sembrado. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Calderón y Cerdá-Olmedo (1983). Este experimento

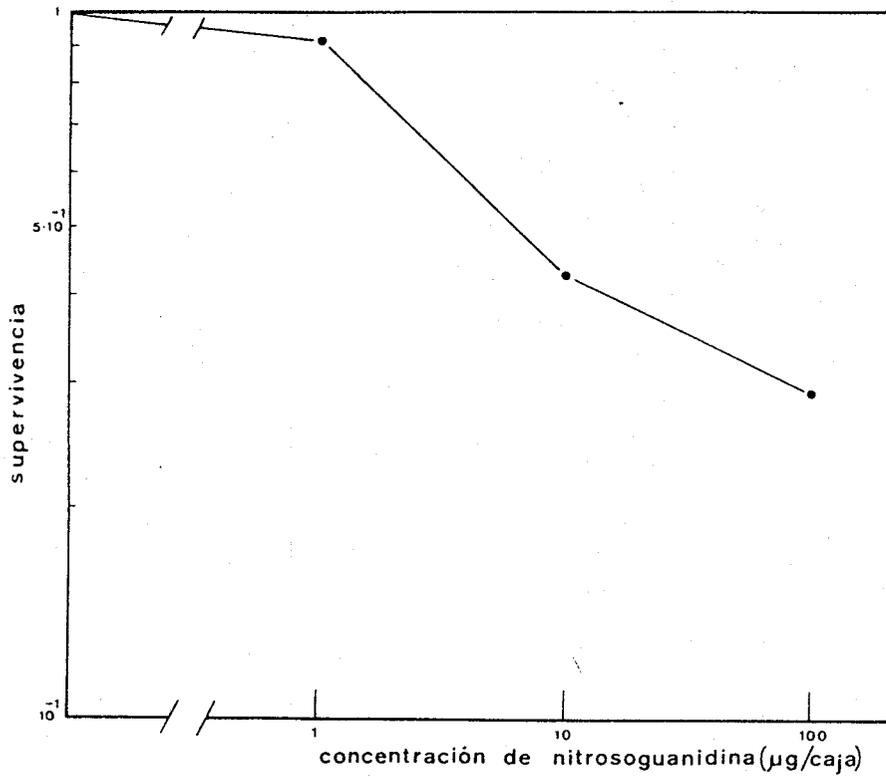


FIGURA 8. Capacidad de un cultivo de formar colonias en medios que contengan distintas concentraciones de nitrosoguanidina. La incubación se realizó a 37 °C y en oscuridad.

nos puede orientar sobre la concentración de nitrosoguanidina que se debe emplear para obtener frecuencias de supervivencia entre el 1 y el 10% (Neale, 1976); de la figura se deduce que estas concentraciones deben de ser superiores a 100 $\mu\text{g/ml}$ por extrapolación de los valores ensayados, ya que no pueden ser corroborados experimentalmente por los impedimentos intrínsecos del experimento (se rebasan los límites de seguridad).

3.2. Influencia de la concentración de nitrosoguanidina sobre la letalidad

Se han utilizado concentraciones crecientes de nitrosoguanidina, estudiando la letalidad a lo largo del tiempo.

En la Figura 9 se muestran los resultados obtenidos al tratar una suspensión bacteriana de 2×10^8 células/ml a las concentraciones de 10 , 50 , 100 , 250 , y 500 μg de nitrosoguanidina por mililitro.

Se observa una disminución de la supervivencia al aumentar la concentración de nitrosoguanidina.

La obtención de una alta supervivencia a concentraciones elevadas de nitrosoguanidina difieren de las obtenidas en otras bacterias (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1968) pero están de acuerdo con los datos obtenidos en Rhizobium trifolii (Megías et al., 1981), en Lactobacillus plantarum (Rodríguez-Quiñones et al., 1982) y en

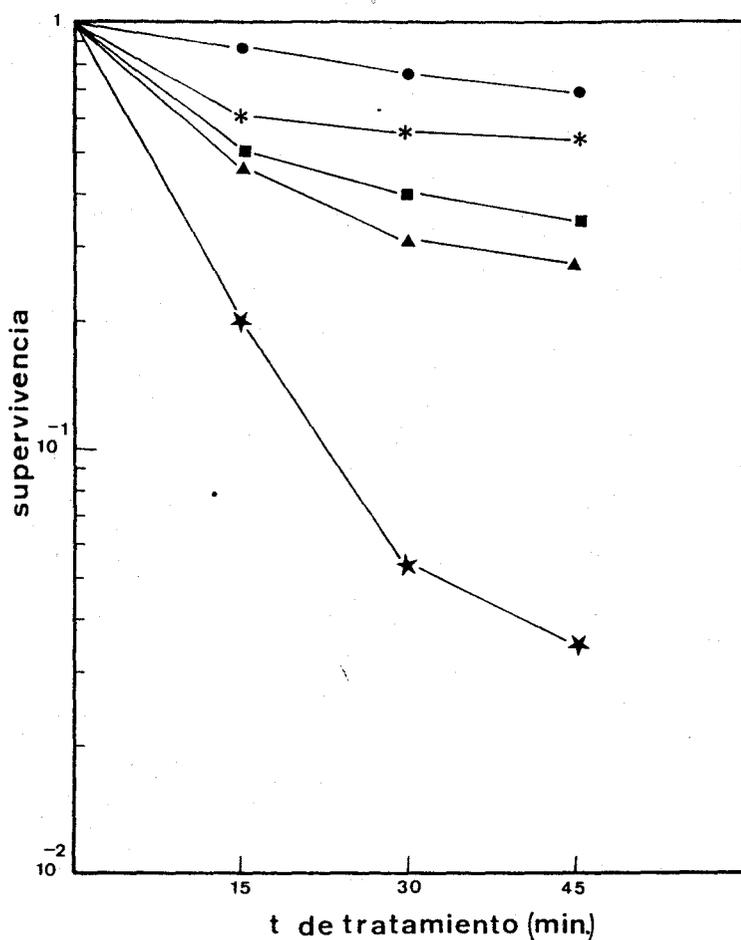


FIGURA 9. Variación de la letalidad producida a distintas concentraciones de nitrosoguanidina a lo largo del tiempo de tratamiento en tampón tris-maleato modificado pH 7,4 . (●) 10 µg de MNNG/ml; (*) 50 µg de MNNG/ml; (■) 100 µg de MNNG/ml; (▲) 250 µg de MNNG/ml; (★) 500 µg de MNNG/ml.

Micrococcus radiodurans (Rebeyrotte, 1983) y que pueden explicarse por la similitud existente entre los tiempos de generación de Halobacterium mediterranei y las especies citadas.

El hecho que una estirpe bacteriana presente un tiempo de generación largo puede ser debido a un tiempo de replicación del cromosoma bacteriano prolongado o a un tiempo de septación de la bacteria parental elevado.

Dado que el tamaño del cromosoma de Rhizobium trifolii es similar al tamaño del cromosoma de Escherichia coli y que no existen formación de multihorquillas en Rhizobium trifolii (Zurkowski y Lorkiewicz, 1977) cabe suponer que la velocidad de replicación en Rhizobium trifolii es menor que en Escherichia coli, y como ya se ha indicado en la introducción, la nitrosoguanidina actúa a nivel de punto de replicación (Cerdá-Olmedo et al., 1968) puede especularse que son necesarias mayores dosis de nitrosoguanidina para producir el mismo efecto letal a tiempos iguales de tratamiento.

Este hecho podría justificarnos que sean necesarias igualmente dosis altas de nitrosoguanidina en Halobacterium mediterranei.

La curva de supervivencia, con sus dos pendientes, que se muestra tras un tratamiento con nitrosoguanidina a la concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$ nos indicaría la existencia de más de un mecanismo de letalidad producida por el mutágeno, ya que exis-

ten dos subpoblaciones con distinta sensibilidad a la nitrosoguanidina.

Aproximadamente el 90% de la población es altamente sensible a la acción de la nitrosoguanidina, mientras que el 10% restante de la población es más resistente a la actuación de la nitrosoguanidina.

La subpoblación más resistente de células nos indica un segundo mecanismo de letalidad en el cual o bien no existen en las células varios objetivos que han de ser inactivados por la nitrosoguanidina para que éstas mueran, o bien la acción letal debe vencer la resistencia opuesta por el mecanismo 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 μg de nitrosoguanidina por ml (Cerdá-Olmedo y Hanawalt, 1967b; Guerola *et al.*, 1971) como a un 1 μg de nitrosoguanidina por ml (Jiménez-Sánchez, 1974) puede ser considerado como un mecanismo de diferenciación de la célula para evitar una mayor letalidad. La síntesis de ADN encontrada después del tratamiento de células en tampón, es únicamente síntesis reparadora (Cerdá-Olmedo y Hanawalt 1967a y 1967b) y no replicación normal.

3.3. Letalidad a distintos pHs y a distintos tampones

Se utilizaron tampón acetato modificado, tampón tris-maleato modificado y tampón citrato-tris-maleato modificado 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 a continuación se añadió nitrosoguanidina. A 30 y 60 minutos se tomaron muestras que se lavaron por dos veces y se sembraron con las diluciones adecuadas en placas de medio SWYE .

En la Figura 10 se muestran los resultados obtenidos. Lo primero que se deduce es que a concentraciones tan elevadas de nitrosoguanidina en tampón acetato modificado producen una mortalidad siempre superior al 99,9% , lo que nos indica que si el tratamiento mutagénico tuviese que realizarse en tampón acetato modificado se tiene que disminuir la concentración de nitrosoguanidina a emplear.

La evolución a los distintos pHs en tampón citrato-tris-maleato modificado presenta un máximo a pH bajo, comprendido entre 5 y 6 , cuya supervivencia oscila entre el 4 y el 20% ; comportamiento similar se presenta cuando el tiempo de tratamiento fue de 30 minutos. Igualmente, cuando el tiempo de tratamiento con nitrosoguanidina fue de 30 minutos a pH entre 7 y 7,5 se presenta una supervivencia del 1 al 3% , también idónea para trabajar en mutagénesis.

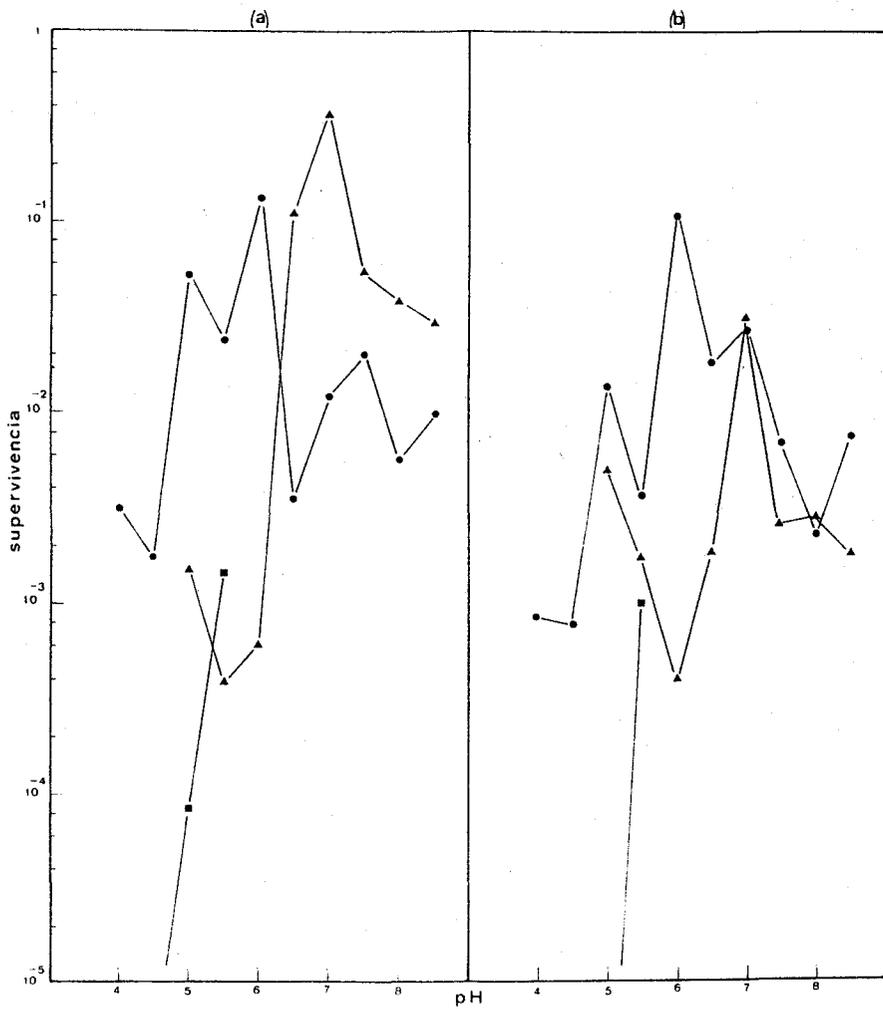


FIGURA 10. Letalidad causada por tratamiento con nitrosoguanidina de 30 min (a) y 60 min (b), a la concentración de 500 μg de nitrosoguanidina/ml en tampón acetato (■), en tampón tris-maleato (▲), y en tampón citrato-tris-maleato (●), todos ellos modificados.

La curva que se obtuvo a distintos pHs con tampón tris-maleato modificado a 30 minutos presentó un óptimo de supervivencia a 6,5 y 7,5 , disminuyendo bruscamente tras un tratamiento de 60 minutos. A pH 7 quizás el tiempo óptimo de tratamiento en este tampón debería ser de 60 minutos.

Comparando los valores obtenidos con tampón citrato-tris-maleato modificado y tris-maleato modificado se observó un comportamiento más predecible en tampón tris-maleato modificado.

No obstante de estas gráficas quedan muchos datos inexplicables aunque se hayan realizados los experimentos cinco veces. No explicamos por ejemplo la menor letalidad que aparece tras un tratamiento de 60 minutos con nitrosoguanidina en tampón tris-maleato modificado a pH 5 y 5,5 .

Los datos obtenidos en estos experimentos indican que la letalidad más baja en tampón tris-maleato modificado se encuentra desviada a valores de pH superiores a 6,5 ; que está en contradicción con los datos bibliográficos aportados por Mandell y Greenber (1960) Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1968) Süßmuth y Lingens (1969) La Polla et al. (1972) Calderón y Cerdá-Olmedo (1983).

Aunque es difícil explicar los datos aquí obtenidos, estarían de acuerdo con la hipótesis de Calderón y Cerdá-Olmedo (1983) de que aunque la mortalidad de cada uno de los componentes de cada

tampón 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 deberse bien directamente a la concentración de hidrogeniones o bien a la fuerza iónica del tampón a ese pH .

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

En la Figura 11 se muestran las curvas de supervivencia a distintos pHs en tampón acetato modificado a una concentración de 250 μg de nitrosoguanidina por ml y a 30 y 60 minutos de tratamiento.

De la misma se deduce que a concentraciones inferiores de nitrosoguanidina se obtienen valores de supervivencia comprendidos entre el 1 y el 10% , observándose una disminución de la letalidad al aumentar el pH .

Estos datos obtenidos en tampón acetato modificado indican que puede ser un soporte ideal para la mutagénesis con nitrosoguanidina, pero Halobacterium mediterranei a pHs inferiores a 5,5 presenta un sedimento tras la centrifugación muy difícil de disgregar, lo que es un gran inconveniente para realizar trabajos rutinarios de mutagénesis.

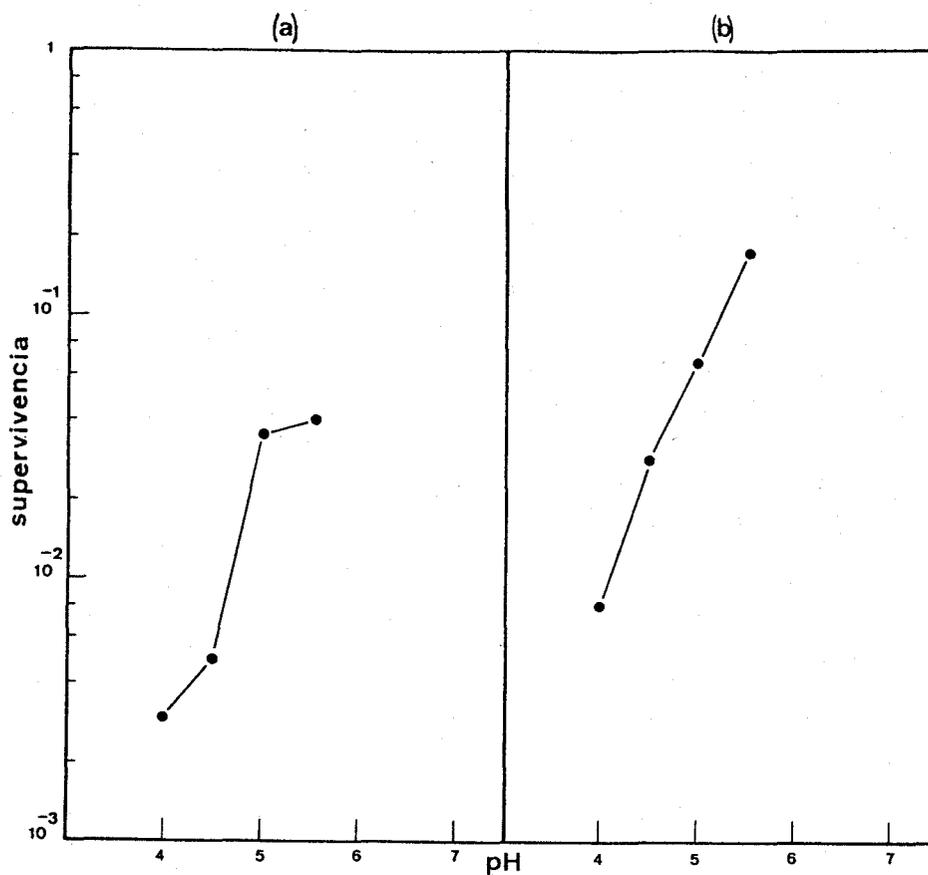


FIGURA 11. Letalidad causada por tratamiento con nitrosoguanidina a una concentración de $250 \mu\text{g}$ de MNNG/ml durante 30 min (a) y 60 min (b) en tampón acetato modificado.

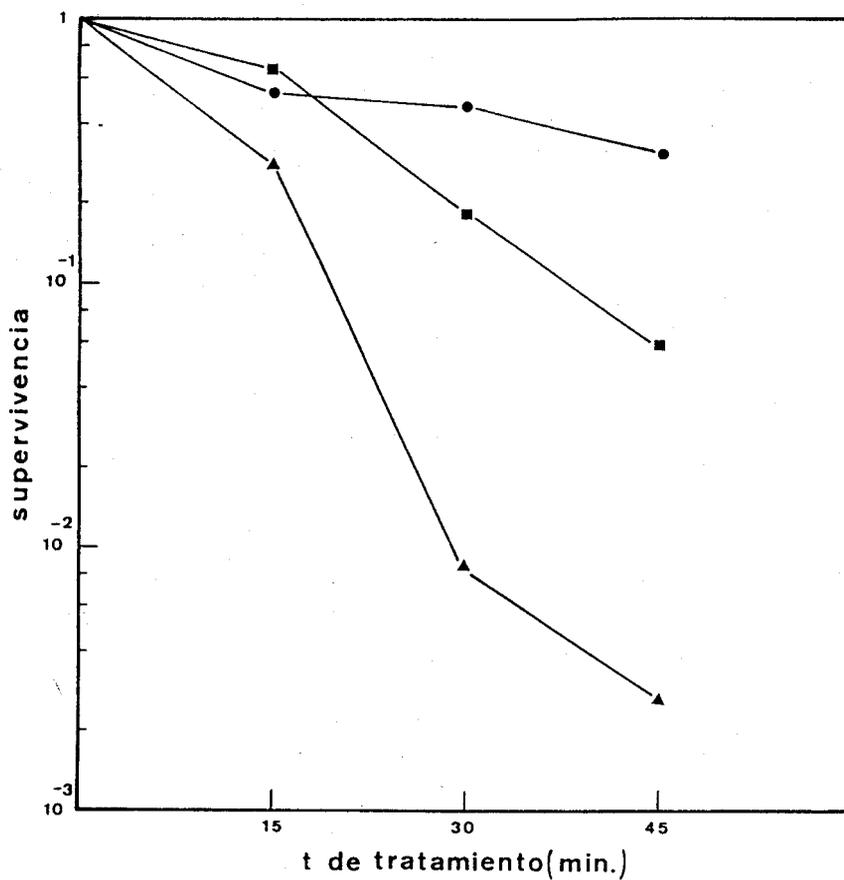


FIGURA 12. Influencia en la letalidad del título de células durante el tratamiento con MNNG ($500 \mu\text{g/ml}$) en tampón tris-maleato modificado, pH 7,4 durante 30 min. Las suspensiones tratadas contenían (\blacktriangle) 10^7 ; (\blacksquare) 10^8 y (\bullet) 10^9 células/ml.

3.4. Título de células durante el tratamiento

Un aspecto interesante en el estudio de la letalidad con nitrosoguanidina fue establecer los títulos celulares que se deben tratar, ya que como describen otros autores (Calderón y Cerdá-Olmedo, 1983), la accesibilidad de la nitrosoguanidina a las células debe de tener importancia puesto que a mayor número de células existentes en la suspensión, menor será el número de moléculas del mutágeno que penetren en el citoplasma bacteriano.

Se investigó el número de células existentes en las suspensiones que se estaban mutagenizando. Para ello se trataron con nitrosoguanidina suspensiones de células que contenían 10^7 , 10^8 y 10^9 células por ml respectivamente, provenientes todas del mismo cultivo. Los resultados se muestran en la Figura 12, observándose que los títulos muy altos (10^9 células/ml) influyen en la letalidad cuando la concentración de nitrosoguanidina empleada fue de $500 \mu\text{g/ml}$.

En la Figura 13 se presentan los resultados obtenidos cuando los distintos títulos celulares se trataron a la concentración de $200 \mu\text{g}$ de nitrosoguanidina por ml. Este experimento se realizó para estudiar si a concentraciones menores de nitrosoguanidina se observaba un fenómeno similar al anteriormente descrito, mostrándose que los tres títulos celulares probados presentan comportamientos similares.

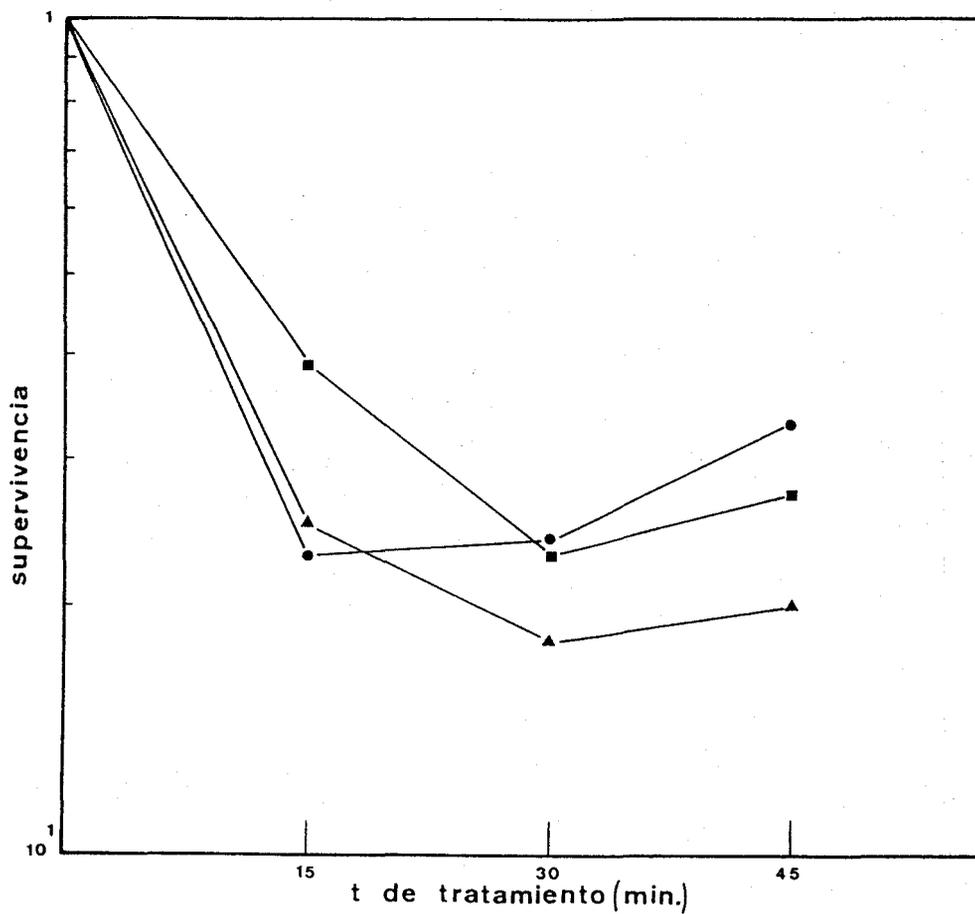


FIGURA 13. Influencia en la letalidad del título de células durante el tratamiento con MNNG (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en tampón tris-maleato modificado, pH 7,4 durante 30 min. Las suspensiones tratadas contenían (▲) 10^7 ; (■) 10^8 y (●) 10^9 células/ml.

De ambas figuras se propone la existencia, en el cultivo expuesto, de subpoblaciones celulares de distinta susceptibilidad a los efectos letales de la nitrosoguanidina.

A dosis bajas estaríamos observando la respuesta de las poblaciones más sensibles y a dosis mayores se vá exterminando a las poblaciones más resistentes.

En adelante, para mutagenizar se prepararon suspensiones de aproximadamente 10^8 células/ml , con lo que se pretendió minimizar las diferencias debidas a este factor que se pudieran encontrar.

4. OBTENCION DE RESISTENTES A ANTIBIOTICOS

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

Los resistentes espontáneos a los antibióticos bacitracina, cloramfenicol, eritromicina, josamicina, novobiocina y rifampicina, se obtuvieron según se indica en Métodos apartado 6 .

En la Tabla XIV se muestran los resultados obtenidos,

TABLA XIV. Aparición de mutantes espontáneos resistentes a antibióticos

Fenotipo seleccionado	Concentración del antibiótico ($\mu\text{g/ml}$)	Título celular sembrado	Número de células resistentes al antibiótico	Frecuencia espontánea de mutación
Bac ^R	70	$1,60 \times 10^{10}$	$6,20 \times 10^3$	$3,85 \times 10^{-7}$
Cml ^R	250	$2,47 \times 10^9$	$1,58 \times 10^4$	$6,39 \times 10^{-4}$
	350	$1,61 \times 10^{10}$	$9,50 \times 10^3$	$5,90 \times 10^{-7}$
	500	$1,61 \times 10^{10}$	---	$<10^{-10}$
Ery ^R	500	$2,47 \times 10^9$	---	$<10^{-9}$
Jos ^R	70	$2,47 \times 10^9$	$2,06 \times 10^4$	$2,47 \times 10^{-6}$
	150	$1,61 \times 10^{10}$	$5,30 \times 10^4$	$3,30 \times 10^{-6}$
	250	$1,61 \times 10^{10}$	$8,40 \times 10^3$	$5,21 \times 10^{-7}$
Nov ^R	5	$1,61 \times 10^{10}$	---	$<10^{-10}$
	8	$1,61 \times 10^{10}$	---	$<10^{-10}$
	10	$2,47 \times 10^9$	---	$<10^{-9}$
Rif ^R	6	$1,61 \times 10^9$	---	$<10^{-9}$
	15	$1,61 \times 10^9$	---	$<10^{-9}$

Los signos indican el fenotipo al que confiere resistencia el antibiótico. Bac, bacitracina; Cml, cloramfenicol; Ery, eritromicina; Jos, josamicina; Nov, novobiocina y Rif, rifampicina.

de ellos se puede deducir que Halobacterium mediterranei presenta frecuencia espontánea comprendida entre 10^{-4} y 10^{-7} a bacitracina, cloramfenicol y josamicina. De los tres antibióticos indicados los más interesantes con fines genéticos son los que actúan inhibiendo la síntesis de proteínas por lo tanto se realizó un estudio más a fondo empleando distintas concentraciones de cloramfenicol y josamicina.

Aunque la frecuencia espontánea de mutación al cloramfenicol a concentraciones de 250 $\mu\text{g/ml}$ fue elevada ($6,39 \times 10^{-4}$), no se eligió, dado que podría interferir en los estudios de mutagenicidad.

A la vista de estos resultados, se empleó la josamicina a la concentración de 70 $\mu\text{g/ml}$, 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 josamicina

Se ha elegido la josamicina entre otros antibióticos para el estudio de la mutagenicidad producida por la nitrosoguanidina, debido a que se produce en Halobacterium mediterranei altas frecuencias de mutación con este mutágeno.

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

En bacterias y levaduras se dá el caso de que en la detección de mutantes influye la cantidad de células sembradas por caja (Ruiz-Vázquez et al., 1978; Calderón, 1979; Rodríguez-Quifones, 1982).

Para determinar los títulos de células viables y mutantes después de mutagenizar, se sembraron diversas alícuotas del cultivo utilizando diluciones adecuadas. Como se refleja en la Tabla XV se muestra que también en Halobacterium mediterranei tiene importancia la densidad de siembra, aunque sólo para la estimación de la supervivencia a diferencia de los datos bibliográficos anteriormente aportados, que afectaba también a la estimación de la frecuencia de mutación.

A altas densidades de siembra parece haber una inhibición del crecimiento. A muy bajas densidades la varianza es tan

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

Diluciones utilizadas	Colonias/ cajas	Colonias obtenidas tras tratamiento con nitrosoguanidina/caja	Supervivencia estimada	Frecuencia de mutación espon- tánea ($Jos^R/10^6$ supervivientes)	Frecuencia de mutación indu- cida ($Jos^R/10^6$ supervivientes)
Siembra en medio SWYE					
10^{-4}	---	827	0,04		
10^{-5}	2130	61	0,10		
10^{-6}	600	9	0,30		
10^{-7}	67	---	---		
10^{-8}	3	---	---		
Siembra en medio SWYE con josamicina					
10^{-1}	215	17		3,38	27,86
10^{-2}	17	1		2,67	16,39
10^{-3}	2	---		3,15	-----

Se trató una suspensión de bacterias con nitrosoguanidina (MNNG) a una concentración de 500 $\mu\text{g/ml}$, en tampón tris-maleato, pH 5,5 durante 30 minutos.

grande que habría que sembrar un número de cajas muy alto para obtener una determinación fiable.

Se procura por tanto, emplear factores de dilución que dieran alrededor de 100 u.f.c./caja .

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

Se han empleado varios medios tamponados, solución de sales y medio de cultivo para realizar la mutagénesis, estudiándose la letalidad producida a tiempo fijo y la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a la josamicina, sembrando directamente en medio SWYE con el antibiótico.

La Tabla XVI muestra los resultados obtenidos, indicando los pHs a los que se encontraban los medios. De estos resultados se deduce que todos los tratamientos mutagénicos con nitrosoguanidina en distintos medios aumentan la frecuencia de aparición de mutantes resistentes a la josamicina, que espontáneamente para este experimento fue de 5×10^{-6} . La mayor aparición de mutantes resistentes a josamicina por inducción con nitrosoguanidina se consigue a pHs de 5,5 (tampón acetato) y 6,0 (tampón citrato-tris-maleato), aunque estos valores no difieren grandemente con los obtenidos tras tratamiento en tampón tris-maleato pH 7,4 .

TABLA XVI. Supervivencia y frecuencia de aparición de mutantes a la josamicina tras tratamiento

Medio de tratamiento	pH	Supervivencia	Frecuencia de mutación (Jos ^R /10 ⁶ supervivencia)
Tampón acetato	5,5	0,002	80
Tampón tris-maleato	7,4	0,100	50
Tampón citrato-tris- maleato	6,0	0,270	70
Tampón citrato-tris- maleato	7,5	0,160	10
Solución de sales	7,0	0,270	30
Medio SWYE ^(*)	7,4	0,130	10

Se trató una suspensión de bacterias con MNNG a una concentración de 500 µg/ml durante 30 minutos. Todos los tampones utilizados son modificados.

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

En principio sería aconsejable utilizar para obtener una mayor mutagenicidad el tampón acetato pH 5,5 pero dada la alta letalidad que se consigue a estos valores, es posible que el fondo genético de los mutantes así obtenido esté alterado, por lo tanto en principio descartamos este tampón como vehículo idóneo de mutagénesis.

En tampón citrato-tris-maleato se observa que a mayor letalidad decrece la aparición de mutantes resistentes a la josamicina, lo que indicaría que este tampón sería un buen soporte de mutagénesis, en trabajos posteriores se confirmará esta hipótesis.

Finalmente se ha elegido el tampón tris-maleato por ser el más ampliamente usado en la bibliografía como soporte idóneo del tratamiento con nitrosoguanidina, dando una letalidad adecuada y un aumento de la frecuencia espontánea de mutantes josamicina resistentes, relativamente alta.

En experimentos, que posteriormente se indican, se han conseguido aumentos de hasta 50 veces en la frecuencia espontánea de mutación.

El tratamiento en medio SWYE conduce usualmente a una menor frecuencia de mutación que en tampón tris-maleato, esto se puede explicar por la presencia en el medio de SWYE de mayor cantidad de grupos reaccionables con la nitrosoguanidina procedentes

del extracto de levadura.

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

5.1.3. Influencia del pH en la mutagenicidad y evolución de la misma a lo largo del tiempo

Como se indica en la bibliografía (Neale, 1976), se deben elegir valores de supervivencia que estén comprendidos entre el 1 y el 10% para obtener una mutagenicidad adecuada.

Conocido este dato y después de realizar el estudio minucioso de los experimentos expuestos hasta el momento, se creyó oportuno realizar el estudio de la influencia del pH en la mutagenicidad eligiendo solamente uno de los tampones (tampón tris-maleato). Por otro lado Cerdá-Olmedo y Hanawalt (1980a) en Escherichia coli realizaron la observación de que el máximo de supervivencia en dicho tampón se obtiene a pH 5, disminuyendo ésta drásticamente cuando se variaba el pH hacia cualquiera de los extremos de la escala, lo cual indica la existencia de una estrecha relación entre la descomposición de la nitrosoguanidina y la letalidad.

Como ya se indicaba en la Figura 6 parte (a), la máxima supervivencia en tampón tris-maleato se consigue a valores de pH 7

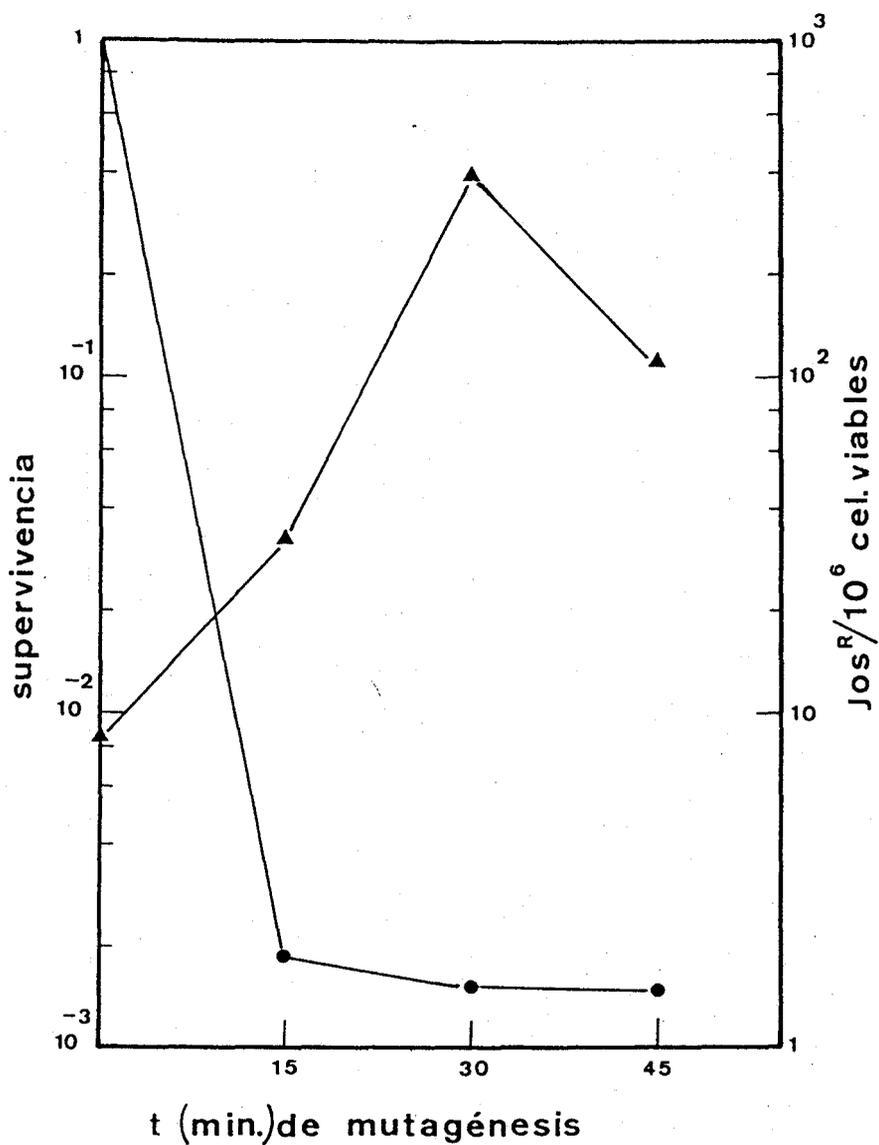


FIGURA 14. Variación de la letalidad y mutagenicidad producida con MNGG a 500 $\mu\text{g/ml}$, a lo largo del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 5,0 . (●) supervivencia, (▲) frecuencia de mutantes resistentes a la josamicina, seleccionados tras tratamiento.

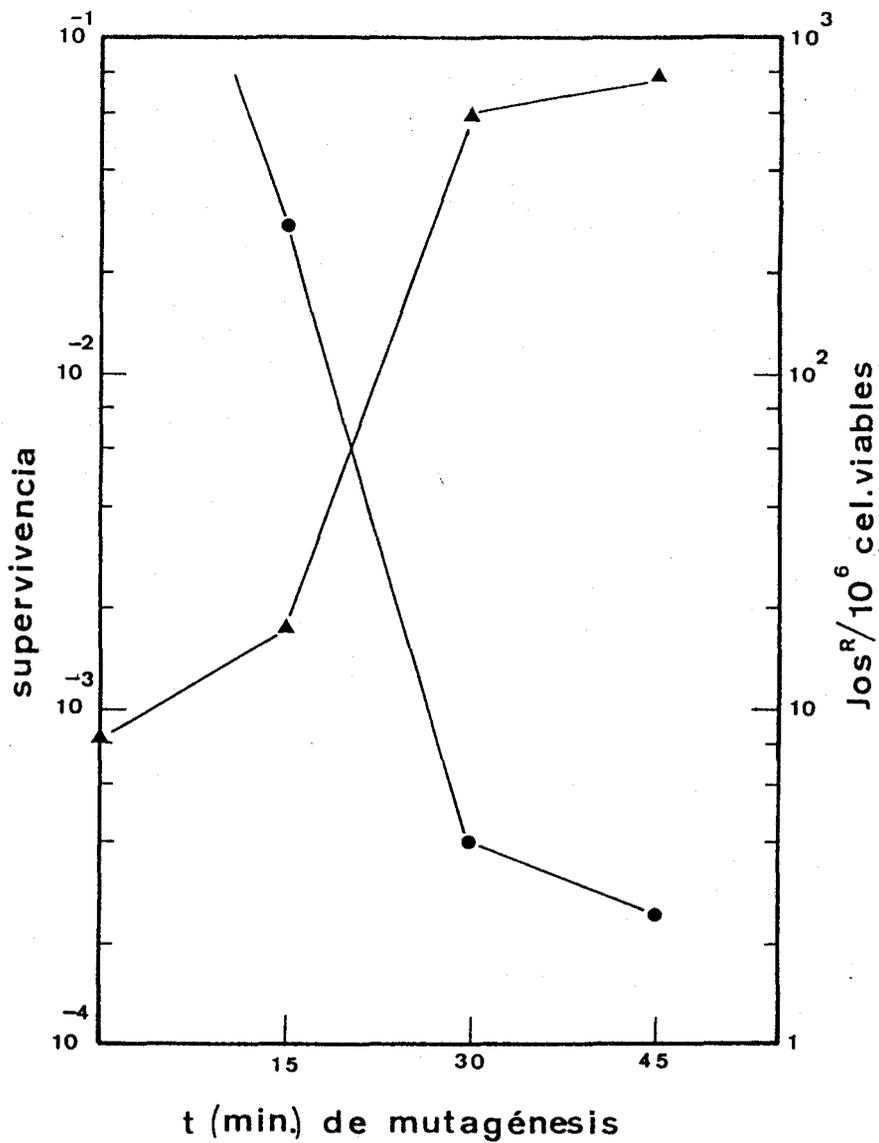


FIGURA 15. Variación de la letalidad y mutagenicidad producida con MNNG a 500 $\mu\text{g/ml}$, a lo largo del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 6,0. (●) supervivencia, (▲) frecuencia de mutantes resistentes a la josamicina, seleccionados tras tratamiento.

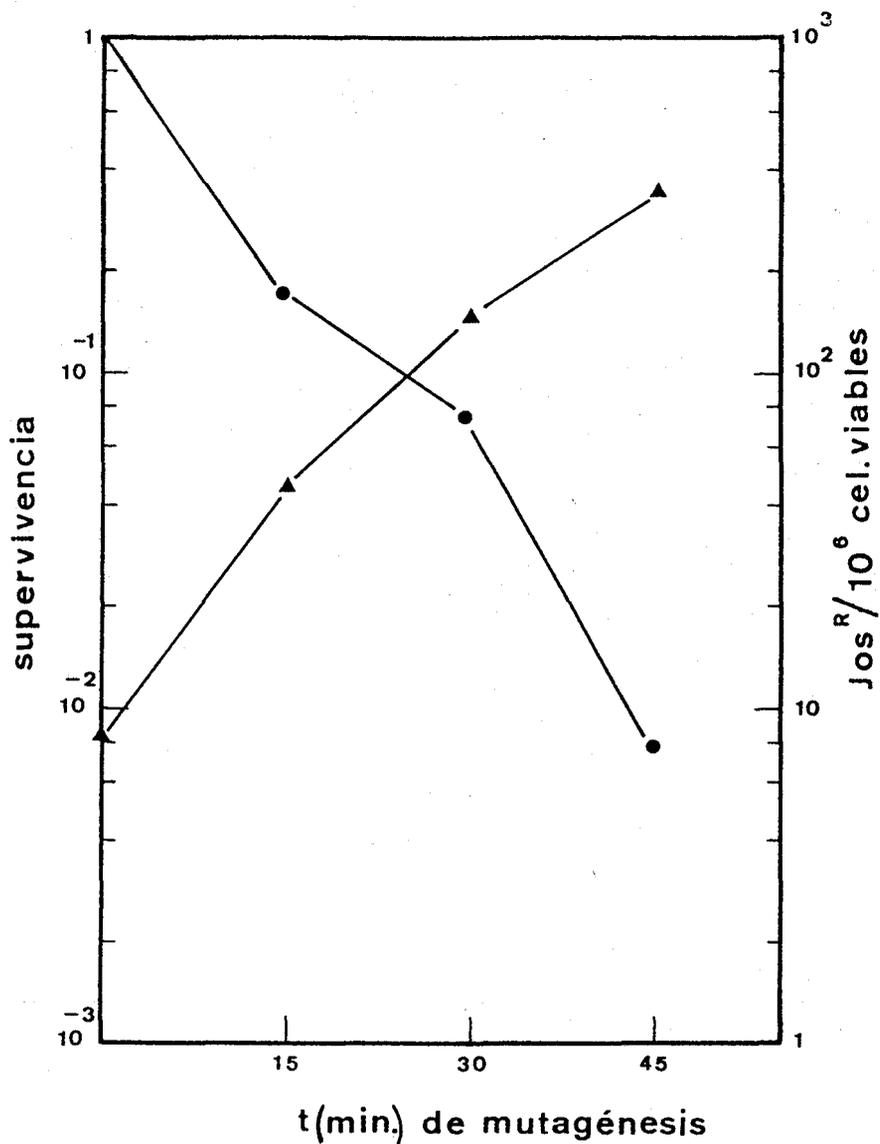


FIGURA 16. Variación de la letalidad y mutagenicidad producida con MNNG a 500 $\mu\text{g/ml}$, a lo largo del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 7,4 . (●) supervivencia, (▲) frecuencia de mutantes resistentes a la josamicina, seleccionados tras tratamiento.

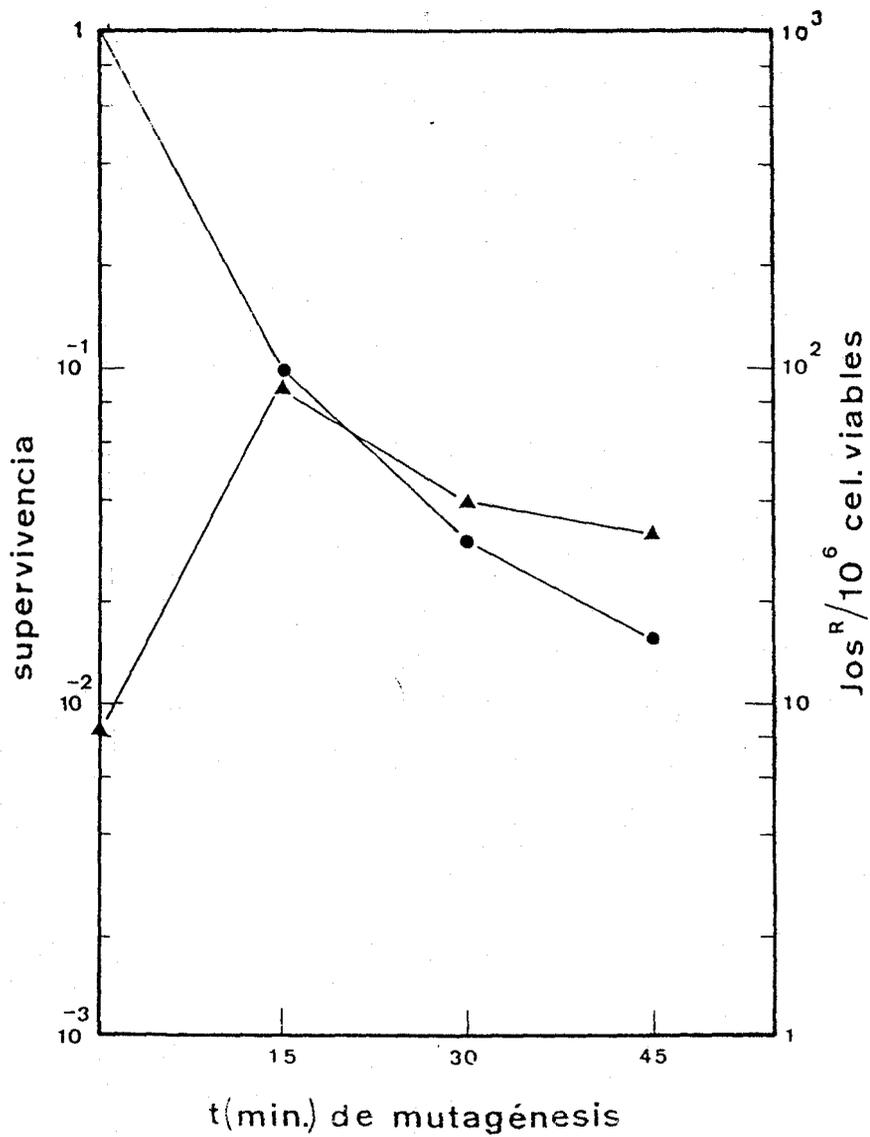


FIGURA 17. Variación de la letalidad y mutagenicidad producida con MNNG a 500 $\mu\text{g/ml}$, a lo largo del tiempo en tampón tris-maleato modificado pH 8,5 . (●) supervivencia, (▲) frecuencia de mutantes resistentes a la josamicina, seleccionados tras tratamiento.

disminuyendo bruscamente a pH menores, bajando incluso 100 veces la supervivencia a pH 5 .

Estos resultados encontrados van en contra de los obtenidos por Calderón y Cerdá-Olmedo (1983); Megías et al. (1983) y Rodríguez-Quñones et al. (1983).

Dados estos antecedentes, en las Figuras 14, 15 , 16 y 17 se estudió la letalidad y mutagenicidad producida a una concentración de 500 g de nitrosoguanidina por ml a lo largo del tiempo, en tampón tris-maleato a pHs 5,0 ; 6,0 ; 7,4 ; y 8,5 .

De estos resultados se deduce que a pHs inferiores disminuye altamente la supervivencia pero se obtienen rendimientos en la producción de mutantes resistentes a la josamicina cuando el tratamiento que se realiza es de 30 minutos; así como a pH 6,0 el incremento es de 75 veces, mientras que a pH 7,4 dicho incremento es de 18 veces.

Es evidente que si solamente se considerase la mutagenicidad como factor a tener en cuenta al elegir el vehículo de realización de mutagénesis, se debería tomar como idóneo el tampón tris-maleato pH 6,0 pero como se debe combinar la letalidad y mutagenicidad, es evidente que aquel pH que produce una letalidad idónea para obtener un fondo genético limpio en el mutante que queremos obtener fue tris-maleato pH 7,4 .

De la discusión antes expuesta se puede concluir que el vehículo idóneo es tampón tris-maleato modificado pH 7,4 y que basándonos en la suposición de Neale (1976) sobre la supervivencia que se debe utilizar para obtener una mutagenicidad adecuada, debemos elegir como tiempo de tratamiento 30 minutos.

RESUMEN Y CONCLUSIONES

Se ha estudiado la susceptibilidad de 11 microorganismos halófilos extremos frente a 20 antibióticos diferentes. Igualmente se ha investigado la acción mutagénica de la nitrosoguanidina en una estirpe de Halobacterium mediterranei, 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. De los microorganismos halófilos extremos probados, el más sensible fue Halobacterium mediterranei, presentando como característica más relevante la alta sensibilidad a la josamicina.
2. Las especies del género Haloarcula fueron muy resistentes a la mayoría de los antibióticos probados, pero presentan una alta sensibilidad a la neomicina, antibiótico que en el resto de los halófilos extremos o es inactivo o presenta una MIC muy elevada.
3. La acción de la nitrosoguanidina en Halobacterium mediterranei responde generalmente al modelo de mutagénesis descrito en bacterias.
4. Halobacterium mediterranei presenta en la mayoría de los casos un comportamiento heterogéneo de la población frente a la acción letal de la nitrosoguanidina.
5. La mayor mutagenicidad de la nitrosoguanidina sobre Halobacterium mediterranei se presentó a pHs ácidos, mientras que la supervivencia idónea se obtuvo a pHs próximos a la neutralidad.

6. Como condiciones óptimas para obtener Halobacterium mediterranei resistentes a la josamicina, se recomienda: tratar suspensiones que contengan 10^8 células/ml , en tampón tris-maleato modificado, 50 mM , pH 7,4 con 500 μ g de nitrosoguanidina por ml durante 30 minutos a 37 °C sin agitación y en oscuridad.

BIBLIOGRAFIA

- ABRAM, D. and GIBBONS, N. E. (1960). "Turbidity of suspensions and morphology of red halophilic bacteria as influenced by sodium chloride concentration". *Can. J. Microbiol.*, 6: 535-543.
- ABRAM, D. and GIBBONS, N. E. (1961). "The effect of chlorides of monovalent cations, urea, detergents, and heat on morphology and the turbidity of suspensions of red halophilic bacteria". *Can. J. Microbiol.*, 7: 741-750.
- ADELBERG, E. A., MANDEL, M. and CHEIN-CHING-CHEN, G. (1965). "Optimal conditions for mutagenesis by nitrosoguanidine in E. coli K-12". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 18: 788-795.
- AL-BAYATTI, K. and AL-ANI, F. (1977). "A chromosome replication map of Rhizobium meliloti strain X". *Bull. Coll. Sci.* 18: 3-25.
- ANDERSON, H. (1954). "The reddening of salted hides and fish". *Appl. Microbiol.*, 2: 64-69.
- ANDERSON, R. and BURDON, G. (1970). "Nitrosoguanidine: Reactions of possible significance to biological activity with mammalian cells". *Cancer Res.* 30: 1773-1781.
- BARKER, C. J. and RACKHAM, B. D. (1980). "The induction of sister chromatid exchanges in cultered fish cells (Ameca splendens) by carcinogenic mutagens". *Genet. Abs.* 12: 8989-G12.
- BAYLEY, S. T. (1976). "Information transfer : salt effects". In: "Extreme Enviroments" Ed. by Hilton R. Heindrich. pp. 119-136. Academic Press 1976, New York y London.

- BAYLEY, S. T. and KUSHNER, D. J. (1964). "The ribosomes of the extremely halophilic bacterium, Halobacterium cutirubrum". J. Mol. Biol. 9: 654-669.
- BAYLEY, S. T. and MORTON, R. A. (1978). "Recent developments in the molecular biology of extremely halophilic bacteria". CRC Critical Reviews in Microbiology. November 1978: 151-204.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 6^a ed. 1948. R. S. Breed, E. G. D. Murray y A. P. Hitches eds. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 7^a ed. 1957. R. S. Breed, E. G. D. Murray y N.R. Smith eds. Balliere, Tindall & Cox, London.
- BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, 8^a ed. 1974. R. E. Buchanan y N. E. Gibbons eds. Williams & Wilkins, Baltimore.
- BLAUROCK, A. E., STOECKENIUS, W., OESTERHELT, D. and SCHERPHOF, G. L. (1976). "Structure of the cell envelope of Halobacterium halobium". J. Cell Biol. 72: 1-22.
- BOGDEN, J. M., EASTMAN, A. and BRESNICK, E. (1981). "A system in mouse liver for the repair of O-6-methylguanine lesions in methylated DNA". Nucl. Acids Res. 9: 3089-3103.
- BOROWITZKA, L. J. and BROWN, A. D. (1974). "The salt relations of marine and halophilic species of unicellular green alga, Dunaliella. The role of glycerol as a compatible solute". Arch. Microbiol. 96: 37-52.
- BROCK, T. D. (1979). "Ecology of saline lakes". From "Selected papers from strategies of microbial life in extreme enviroments". M. Shilo Ed. Berlin: Dahlem Konferenzen.

- BROWN, A. D. (1961). "The peripheral structures of gram-negative bacteria. I. Cell wall protein and the action of a lytic enzyme system of a marine pseudomonad". *Biochem. Biophys. Acta*, 48: 352-361.
- BROWN, A. D. and CHO, K. Y. (1970). "The walls of the extremely halophilic cocci: Gram-positive bacteria lacking muramic acid". *J. Gen. Microbiol.* 62: 267-270.
- BROWN, A. D. and SHOREY, C. D. (1963). "The cell envelopes of two extremely halophilic bacteria". *J. Cell. Biol.* 18: 681-689.
- BROWN, H. J. and GIBBONS, N. E. (1955). "The effect of magnesium, potassium and iron on the growth and morphology of red halophilic bacteria". *Can. J. Microbiol.* 1: 486-494.
- BUCKMIRE, F. L. A. y MACLEOD, R. A. (1964). "Mechanism of lysis of marine bacterium". *Bacteriol. Proc.* pp. 41.
- BURKE, W. and FANGMAN, W. L. (1975). "Temporal order in yeast chromosome replication". *Cell* 5: 263-269.
- CALDERON, I. L. (1979). "Mutación y comutación inducidas por nitrosoguanidina en la levadura Saccharomyces cerevisiae". Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
- CALDERON, I. L. and CERDA-OLMEDO, E. (1982). "Induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmatic mutations in Saccharomyces cerevisiae". *Current Genetic* 6: 237-243.
- CALDERON, I. L. and CERDA-OLMEDO, E. (1983). "Induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmatic mutations in Saccharomyces cerevisiae". *Mutation Res.* 108: 133-146.

- CARLTON, B. C. and BROWN, B. J. (1981). In: Manual of Methods for General Bacteriology pp. 230. Gerhardt, P., Murray, R. G. E., Costilow, R. N., Nester, E. W., Wood, W. A., Krieg, N. R. and Phillips, G. B. eds. American Society for Microbiology.
- CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P. C. (1967a). "Repair of DNA damaged by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli". Mutation Res. 4: 369-371.
- CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P. C. (1967b). "Macromolecular action of nitrosoguanidine in Escherichia coli". Biochem. Biophys. Acta 142: 450-464.
- CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P. C. (1968a). "Diazomethane as the active agent in nitrosoguanidine mutagenesis and lethality". Mol. Gen. Genet., 101: 191-202.
- CERDA-OLMEDO, E. and HANAWALT, P. C. (1968b). "The replication of the Escherichia coli chromosome studied by sequential nitrosoguanidine mutagenesis". Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., XXXIII: 599-607.
- CERDA-OLMEDO, E. y RUIZ-VAZQUEZ, R. (1979). "Genetics of industrial microorganisms". O. K. Sebek & A. I. Laskin eds. Washington D. C.
- CHRISTIAN, J. H. B. and WALTHO, J. A. (1962). "Solute concentrations within cells of halophilic and non halophilic bacteria". Biochim. Biophys. Acta, 65: 506-508.
- DANON, A. and STOECKENIUS, W. (1974). "Photophosphorylation in Halobacterium halobium". Proc. Nat. Acad. Sci. 71: 1234-1238.

- DE ROSA, M., GAMBACORTA, A., NICOLAUS, B., ROSS, H. N. M., GRANT, W. D. and BU'LOCK, J. D. (1982). "An assymetric archaebacterial diether lipid from alkaliphilic halophiles". *J. Gen. Microbiol.* 128: 343-348.
- DUGLE, D. L., CAMPBELL, C. E., MEEKER, B. E. and GILLESPIE, C. J. (1973). "Correlation between lethality and DNA single-strand breaks in Bacillus subtilis cells treated with nitrosoguanidine". *Mutation Res.* 18: 237-245.
- DUNDAS, I. D. (1977). "Physiology of Halobacteriaceae". *Adv. Microbiol. Phisiol.* 15: 85-120.
- DUNDAS, I. D. (1978). "The normal Halobacteriaceae, the general physiology and taxonomy of a well adapted and highly successful group of microorganisms". In: "Energetics and structure of halophilic microorganisms". (S. R. Caplan and M. Ginzburg, eds.), pp. 641-651. Elsevier/North-Holland Biomedical Press.
- DUNDAS, I. D. and LARSEN, H. (1962). "The physiological role of the carotenoid pigments of Halobacterium salinarium". *Arch. Microbiol.* 44: 233-239.
- EVENSEN, G. and SEEBERG, E. (1982). "Adaptation to alkylation resistance involves the induction of a DNA glycosylase". *Nature (London)* 296: 773-775.
- EWERSMEYER-WENK, B., ZAHNER, H., KRONE, B. and ZEECK, A. (1981). "Metabolic products of microorganisms. 207. Haloquinone, a new antibiotic active against halobacteria. I. Isolation, characterization and biological properties". *J. Antibiot.* 34: 1531-1537.

- FARLOW, W. G. (1880). "Of the nature of the peculiar reddening of salted codfish during the summer season". U. S. Comm. Fish and Fisheries, Rept. 1878 (pt.6), 969-973.
- FEIN, J. E., and MACLEOD, R. A. (1975). "Characterization of neutral amino acid transport in a marine pseudomonad". J. Bacteriol. 124: 1177-1190.
- FITT, P. S., SHARMA, N. and CASTELLANOS, G. (1983). "A comparison of liquid-holding recovery and photoreactivation in halophilic and non-halophilic bacteria". Biochem. Biophys. Acta 739: 73-78.
- FLANNERY, W. L. (1956). "Current status of knowledge of halophilic bacteria". Bacteriol. Rev. 20: 49-66.
- GIBBONS, N. E. (1936). "Bacteria associated with reddening of salt fish". J. Biol. Board. Can., 3: 11-77.
- GIBBONS, N. E. (1969). "Isolation, growth and requirements of halophilic bacteria". In: "Methods in Microbiology", vol. 3B, pp. 169-183. J. R. Norris y D. W. Ribbons eds. Academic Press, New York.
- GICHNER, T. and VELEMINSKY, J. (1982). "Genetic effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its homologs". Mutation Res. 99: 129-242.
- GINZBURG, M., SACHC, L. and GINZBURG, B. Z. (1970). "Ion metabolism in a Halobacterium I. Influence of age of culture on intracellular concentrations". J. Gen. Physiol. 55: 187-207.

- GOCHNAUER, M. B. and KUSHNER, D. J. (1971). "Potassium binding, growth, and survival of an extremely halophilic bacterium". *Can. J. Microbiol.* 17: 17-23.
- GOMORI, G. (1955). "Preparation of buffers for use in enzyme studies". *Methods in Enzymology*, Acad. Press (New York), 1: 138-146.
- GREY, V. L. and FITT, P. S. (1976). "Evidence for the lack of deoxy-ribonucleic acid dark-repair in Halobacterium cutirubrum". *Biochem. J.* 156: 569-575.
- GUEROLA, N., INGRAHAM, J. L. and CERDA-OLMEDO, E. (1971). "Induction of closely linked multiple mutations by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". *Nature (London)* 230: 122-125.
- GUPTA, R. S. and GOLDSTEIN, S. (1980). "Diphtheria toxin resistance in human fibroblast cell strains from normal and cancer-prone individuals". *Mutation Res.* 73: 331-338.
- HAERLIN, R., SUSSMUTH, R. and LINGENS, F. (1970). "Mechanism of mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG). V. Methylation of DNA by N-trideuteriomethyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (D₃-MNNG). *FEBS Letters* 9: 175-176.
- HARRISON, F. C. and KENNEDY, M. E. (1922). "The red discoloration of cured codfish". *Proc. and Trans. Roy. Soc. Can. Section 5*, 16: 101-152.
- HENDERSON, R. and UNWIN, P. N. T. (1975). "Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy". *Nature (London)* 257: 28-34.
- HESCOX, M. A. and CARLBERG, D. M. (1972). "Photoreactivation in Halobacterium cutirubrum". *Can. J. Microbiol.* 18: 981-985.

- HILPERT, R., WINTER, J., HAMMES, W. and KANDLER, O. (1981). "The sensitivity of archaebacteria to antibiotics".
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 2: 11-20.
- HOHLFELD, R. and VIELMETTER, W. (1973). "Bidirectional growth of the Escherichia coli chromosome". Nature 242: 130-132.
- HUBBARD, J. S. and RINEHART, C. A. (1976). "Bacteriorhodopsin formation in Halobacterium halobium". Can. J. Biochem. 22: 1274-1281.
- HYAMS, J. and DAVIS, D. R. (1971). "The induction and characterization of cell wall mutants of Chlamydomonas reinhardi". Mutation Res. 14: 381-389.
- INGRAM, M. (1957). "Microorganism resisting high concentrations of sugar or salt". Symp. Soc. Gen. Microbiol. 7: 90-133.
- ISONO, S. and YOURNO, J. (1974). "Non-suppressible addition frameshift in Salmonella". J. Mol. Biol. 82: 355-360.
- JAVOR, B., REQUADT, C. and STOECKENIUS, W. (1982). "Box-shaped halophilic bacteria". J. Bacteriol. 151: 1532-1542.
- JEGGO, P., DEFAIS, M., SAMSON, L. and SCHENDEL, L. P. (1977). "An adaptative response of E. coli to low levels of alkylating agent: comparison with previously characterized DNA repair path ways". Mol. Gen. Genet. 157: 1-9.

- JIMENEZ-SANCHEZ, A. (1974). "Mutagenesis y replicación en células de Escherichia coli tratadas con bajas concentraciones de nitrosoguanidina". Tesis Doctoral, Departamento de Genética, Facultad de Ciencias, Universidad de Sevilla.
- JUEZ, G. (1982). "Aislamiento, estudio taxonómico, ultraestructural y molecular de nuevos grupos de halófilos extremos". Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidad de Alicante.
- JUEZ, G., RODRIGUEZ-VALERA, F., VENTOSA, A. and KUSHNER, D. (1983). "Two new carbohydrate-utilizing species: Halobacterium hispanicum and Halobacterium larsenii". Int. J. Syst. Bacteriol. sometido a publicación.
- JYSSUM, K. (1969). "Origin and sequence of chromosome replication in Neisseria meningitidis: influence of a genetic factor determining competence". J. Bacteriol. 99: 757-763.
- KARRAN, P., LINDAHL, T. and GRIFFIN, B. (1979). "Adaptative response to alkylating agents involves alteration in situ of O-6-methyl-guanine residues in DNA". Nature (London) 280: 76-77.
- KARRAN, P., EJELMGREN, T. and LINDAHL, T. (1982). "Induction of a DNA glycosylase for N-methylated purines is part of the adaptive response to alkylating agents". Nature (London) 296: 770-773.

- KASHARA, H., UDAKA, S. and IKEDA, Y. (1971). "Temperature dependency of the mutagenic action of nitrosoguanidine in Streptomyces cacaoi". Agr. Biol. Chem. 35: 226-232.
- KATES, M. (1978). "The phytanyl ether-linked polar lipids and isoprenoid neutral lipids of extremely halophilic bacteria". Chem. Fats. other Lipids 15: 301-342.
- KATES, M. and KUSHWAHA, S. C. (1978). "Biochemistry of the lipids of extremely halophilic bacteria". In: Energetics and structure of halophilic microorganisms. S. R. Caplan and M. Ginzburg, eds. 1978. pp. 461-480.
- KERADJOPOULOS, D. and HOLLIDORF, A. W. (1977). "Thermophilic character of enzymes from extreme halophilic bacteria". FEMS Microbiol. Lett. 1: 179-182.
- KIM, E. K. and FITT, P. S. (1977). "Partial purification and properties of Halobacterium cutirubrum L-Alanine dehydrogenase". Biochem. J. 161: 313-320.
- KIMBALL, R. F. (1978). "The relation of repair phenomena to mutation induction in bacteria". Mutation Res., 55: 85-120.
- KIMBALL, R. F. (1970). "Studies on the mutagenic action of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Paramecium aurelia with emphasis on repair processes". Mutation Res. 9: 261-271.

- KIMBALL, R. F. (1980a). "A possible mechanism for an interaction between post-replication recombination repair and base misincorporation in mutation induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Haemophilus influenzae". Mutation Res. 72: 347-359.
- KIMBALL, R. F. (1980b). "Further studies on the induction of mutation in Haemophilus influenzae by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine: lack of an inducible error-free repair system and the effect of exposure medium". Mutation Res. 72: 361-372.
- KOLB, H. and KAUDEWITZ, F. (1970). "Action of nitrosoguanidine on transforming DNA of Bacillus subtilis". Mutation Res. 10: 85-90.
- KONDOS, S., ICHIKAWA, H., IWO, K. and KATO, T. (1970). "Base-change mutagenesis and prophage induction in strains of E. coli with different DNA repair capacities". Genetics 66: 187-217.
- KOSHINUMA, K., IWAHARA, S., KAMIYA, S., NAKADATE, M., and SUZUKI, I. (1970). "Screening test on antimicrobial actions. VIII. Mutagenic and prophage-inducing activities of 1-substituted-3-nitro-1-nitrosoguanidine derivatives". Bull. Nat. Inst. Hyg. Sci. Tokyo 88: 118-123.

- KRAMER, J. K. G., KUSHWAHA, S. C. and KATES, M. (1972). "Structure determination of the squalene, dihydrosqualene and tetrahydrosqualene in Halobacterium cutirubrum". Biochim. Biophys. Acta 270: 103-110.
- KRONE, B., HINRICHS, A. and ZEECK, A. (1981). "Metabolic products of microorganisms. 208. Haloquinone, a new antibiotic active against halobacteria. II. Chemical structure and derivatives". J. Antibiot. 34: 1538-1543.
- KUSHNER, D. J. (1978). "Life in high and solute concentrations: Halophilic bacteria". In: Microbial life in extreme environments (Ed. by D. J. Kushner) pp. 317-368, Academic Press, London.
- KUSHNER, D. J., BAYLEY, S. T., BORING, J., KATES, M. and GIBBONS, N. E. (1964). "Morphological and chemical properties of cell envelopes of the extreme halophile, Halobacterium cutirubrum". Can. J. Microbiol., 10: 483-497.
- KUSHNER, D. J. and ONISHI, H. (1968). "Absence of normal cell wall constituents from the outer layers of Halobacterium cutirubrum". Can. J. Biochem. 46: 997-998.
- KUSHWAHA, S. C., GOCHNAUER, M. B., KUSHNER, D. J. and KATES, M. (1974). "Pigments and isoprenoid compounds in extremely and moderately halophilic bacteria". Can. J. Microbiol. 20: 241-245.

- KUSHWAHA, S. C., KATES, M. and KRAMER, J. K. G. (1977). "Occurrence of indole in cells of extremely halophilic bacteria". Can. J. Microbiol. 23: 826-828.
- LAKE, R. S., KROPTO, M. L., MCLACHLAN, S., PEZZUTTI, M. R., SHOEWAKER, R. H. and IGEL, H. J. (1980). "Chemical carcinogen induction of DNA-repair synthesis in human peripheral blood monocytes". Mutation Res. 74: 357-377.
- LANYI, J. K. (1971). "Studies of the electron transport chain of extremely halophilic bacteria". J. Biol. Chem. 246: 4552-4559.
- LANYI, J. K. (1974). "Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria". Bacteriol. Rev. 38: 272-290.
- LANYI, J. K. (1981). "Halorhodopsin: a second pigment in Halobacterium halobium". Trends in Biochemical Sciences, Feb. 81: 60-62.
- LANYI, J. K. and SILVERMAN, M. P. (1972). "The state of binding of intracellular K^+ in Halobacterium cutirubrum". Can. J. Microbiol., 18: 993-995.
- LA POLLA, J. P., HARRIS, C. M. and VARY, J. C. (1972). "Properties of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine and its action on Bacillus subtilis transforming DNA". Biochem. Biophys.

Res. Commun., 49: 133-138.

LARSEN, H. (1962). "Halophilism". The Bacteria vol. IV: The physiology of growth. J. C. Gunsalus and R. Y. Stanier eds. pp. 297-342, Academic Press, London.

LARSEN, H. (1967). "Biochemical aspects of extreme halophilism". Adv. Microbiol. Physiol. 1: 97-132.

LARSEN, H., OMANG, S. and STEENSLAND, H. (1967). "On the gas vacuoles of the halobacteria". Arch. Mikrobiol. 59: 197-203.

LAWLEY, P. D. y THATCHER, C. J. (1970). "Methylation of deoxyribonucleic acid in cultured mammalian cells by nitrosoguanidine". Biochem. J. 116: 693-707.

LLOYD, D. J., MARRIOT, R. H. and ROBERTSON, M. E. (1929). "Read heat in salted hides". J. Intern. Soc. Leather Trades Chemists, 13: 538-569.

LOVELESS, A. (1969). "Possible relevance of O-6 alkylation of deoxyguanosine to the mutagenicity and carcinogenicity of nitrosoamines of nitrosoamides ". Nature (London) 223: 206-207.

LOZIER, R. H., NEEBERGER, W., BOGOMOIRI, R. A., HWANG, S. and STOECKENIUS, W. (1976). "Kinetics and stoichiometry of

light-induced proton release and uptake from purple membrane fragments, Halobacterium halobium cell envelopes, and phospholipid vesicles containing oriented purple membrane".

Biochim. Biophys. Acta 440: 545-556.

McCALLA, D. R., REUVERS, A. and KITAI, P. (1968). "Inactivation of biologically active N-methyl-N-nitroso compounds in aqueous solution: effect of various conditions of pH and illumination". Can. J. Biochem. Physiol., 46: 807-811.

MACLEOD, R. A. (1965). "The question of the existence of specific marine bacteria". Bacteriol. Rev. 29: 9-23.

MACLEOD, R. A., CLARIOGE, G. A., HORI, A. and MURRAY, J. F. (1958). "Observations the function of sodium in the metabolism of marine bacteria". J. Biol. Chem. 232: 829-834.

MACLEOD, R. A. and MATULA, T. I. (1961). "Solute requeriments for preventing lysis of some marine bacteria". Nature 192: 1209-1210.

MACLEOD, R. A. and ONOFREY, E. (1957a). "Nutrition and metabolism of marine bacteria III. The relation of sodium and potassium to growth". J. Cell. Comp. Physiol. 50: 389-401.

- MANDELL, J. D. and GREENBERG, J. (1960). "A new chemical mutagen for bacteria, 1-methyl-3-nitro-1-nitrosoguanidine". *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 3: 575-577.
- MATAGNE, R. F. and VICENZOTTO, C. (1981). "Isolation of original amino acid, vitamin and carbon source mutants in the green alga Scenedesmus obliquus". *Genet. Abs.* 13: 6261-G13.
- MATHESON, A. T., SPROTT, G. D., McDONALD, I. J. and TESSIER, H. (1976). "Some properties of an unidentified halophile: growth characteristics, internal salt concentration, and morphology". *Can. J. Microbiol.* 22: 780-786.
- MCKAY, A. F. (1948). "A new method of preparation of diazomethane". *J. Am. Chem. Soc.* 70: 1974-1975.
- MCKAY, A. F. and WRIGHT, G. F. (1947). "Preparation and properties of nitrosoguanidine". *J. Am. Chem. Soc.* 69: 3028-3030.
- MEGIAS, M. (1981). "Construcción del mapa de ligamiento de Rhizobium trifolii RS 176". Tesis Doctoral, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.
- MEGIAS, M., PALOMARES, A. J. and RUIZ-BERRAQUERO, F. (1983). "Action of N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Rhizobium trifolii". *FEMS Microbiol. Lett.* sometido a publicación.

- MEHANDZHIEV, A. D. and YANKOVLOV, M. T. (1981). "Studies on the combined effect of gamma rays and N-nitroso-N-methyurethane in P. sativum and H. vulgare". Genet. Abs. 13: 2404-G13.
- MESCHER, M. F. (1981). "Glycoproteins as cell-surface structural components". TIBS. Trends Biochem. Sci. 6: 97-99.
- MESCHER, M. F. and STROMINGER, J. L. (1975). "Bacitracin induces sphere formation in Halobacterium species which lack a wall peptidoglycan". J. Gen. Microbiol. 89: 375-378.
- MESCHER, M. F. and STROMINGER, J. L. (1976a). "Structural (shape-maintaining) role of the cell surface glycoprotein of Halobacterium salinarium". Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73: 2687-2691.
- MESCHER, M. F. and STROMINGER, J. L. (1976b). "Purification and characterization of a prokaryotic glycoprotein from the cell envelope of Halobacterium salinarium". J. Biol. Chem. 251: 2005-2014.
- MESCHER, M. F., STROMINGER, J. L. and WATSON, S. W. (1974). "Protein and carbohydrate composition of the cell envelope of Halobacterium salinarium". J. Bacteriol. 120: 945-954.

- MOORE, R. L., McCARTHY, B. J. (1969a). "Characterization of the deoxyribonucleic acid of various strains of halophilic bacteria". J. Bacteriol. 99: 248-254.
- MOORE, R. L. and McCARTHY, B. J. (1969b). "Base sequence homology and renaturation studies of the deoxyribonucleic acid of extremely halophilic bacteria". J. Bacteriol. 99: 255-262.
- MUKOHATA, Y. and KAJI, Y. (1981). "Light-induced membrane-potential increase, ATP synthesis, and proton uptake in Halobacterium halobium R₁mR catalyzed by halorhodopsin: Effect of N,N'-Di-tert-butyl-4-hydroxybenzylidenemalononitrile (SF 6847). Arch. Biochem. Biophys. 206: 72-76.
- MULLAKHANBHAI, M. F. and LARSEN, H. (1975). "Halobacterium volcanii spec. nov., a Dead Sea Halobacterium with a moderate salt requirement". Arch. Microbiol. 104: 207-214.
- NAGAO, M., YOKOSHIMA, T., HOSOI, H. and SUGIMURA, T. (1969). "Interaction of nitrosoguanidine with ascites hepatoma cells in vitro". Biochem. Biophys. Acta 192: 191-199.
- NEALE, S. (1976). "Mutagenicity of nitrosamides and nitrosamidines in microorganisms and plants". Mutation Res. 32: 229-266.

- OESTERHELT, D. and STOECKENIUS, W. (1973). "Functions of a new photoreceptor membrane". Proc. Nat. Acad. Sci. USA 70: 2853-2857.
- OLSSON, M. and LINDAHL, T. (1980). "Repair of alkylated DNA in Escherichia coli, methyl group transfer from O-6-methylguanine to a protein cysteine residue". J. Biol. Chem. 255: 10569-105771.
- ONISHI, H., McCANCE, M. E. and GIBBONS, N. E. (1965). "A synthetic medium for extremely halophilic bacteria". Can. J. Microbiol., 11: 365-373.
- OREN, A. (1983). "Halobacterium sodomense sp. nov. a Dead Sea Halobacterium with an extremely high magnesium requirement". Int. J. Syst. Bacteriol. 33: 381-386.
- ORGEL, L. E. (1956). "The chemical basis of mutation". Adv. Enzym. 27: 289-346.
- PAULING, C. (1982a). "Bacteriophages of Halobacterium halobium: isolation from fermented fish sauce and primary characterization". Can. J. Microbiol. 28: 916-921.
- PAULING, C. (1982b). "Replication of bacteriophage in Halobacterium halobium". Abstracts Annual Meeting 1982: H 104 American Society for Microbiology.

- PAYNE, W. J. (1958). "Studies on bacterial utilization of uronic acids. III. Induction of oxidative enzymes in a marine isolate". J. Bacteriol. 76: 301-307.
- PEARCE, S. M., HILDEBRANDT, V. A. and LEE, T. (1977). "Third system for neutral amino acid transport in a marine pseudomonad". J. Bacteriol. 130: 27-47.
- PFEIFER, F., EBERT, K., WEIDINGER, G. and GOEBEL, W. (1982). "Structure and functions of chromosomal and extrachromosomal DNA in Halobacteria". Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3: 110-119.
- PFEIFER, F., WEIDINGER, G. and GOEBEL, W. (1981a). "Characterization of plasmids in halobacteria". J. Bacteriol. 145: 369-374.
- PODGORSKY, G. and DEERING, R. A. (1980). "Quantitation of induced mutation in Dictyostelium discoideum. Characterization and use of a methanol-resistance mutation assay". Mutation Res. 74: 459-468.
- PRATT, D. and RILEY, W. (1955). "Lysis of marine bacterium in salt solutions". Bacteriol. Proc. pp. 26.
- RAPPIN, D. (1920). "The dangers of the table salt". J. Am. Med. Assoc. 75: 618-619.

- REBEYROTTE, N. (1983). "Induction of mutation in Micrococcus radiodurans by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". Mutation Res. 108: 57-66.
- RHODES, M. E. and PAYNE, W. J. (1962). "Further observations on effects of cations on enzyme induction in marine bacteria". Ant. van Leeuwenhoek J. Microbiol. Serol. 28: 302-314.
- RICHTER, O. (1982). "Natirum: Ein notwendiges Nährelement für eine marine mikroärophile Leuchtbakterie". Anz. Oesterr. Akad. Wiss. Math. Naturw. K1, 101: 261-292.
- RIDDLE, D. L. and ROTH, J. R. (1970). "Suppressors of frameshift mutations in Salmonella typhimurium". J. Mol. Biol. 54: 131-144.
- ROBINS, P. and CAIRNS, J. (1979). "Quantitation of the adaptative response to alkylating agents". Nature (London) 280: 74-76.
- RODRIGUEZ-QUIÑONES, F. (1981). "Acción mutagénica de la nitrosoguanidina en Lactobacillus plantarum". Tesis de Licenciatura, Departamento de Microbiología, Facultad de Farmacia, Universidad de Sevilla, 1981.

- RODRIGUEZ-QUIÑONES, F., MEGIAS, M., PALOMARES, A. J. and RUIZ-BERRAQUERO, F. (1982). "Nitrosoguanidine mutagenesis in Lactobacillus plantarum". Microbios Letters 20: 76-77.
- RODRIGUEZ-QUIÑONES, F., PALOMARES, A. J., MEGIAS, M. and RUIZ-BERRAQUERO, F. (1983). "Influence of several variable for MNNG mutagenesis in Lactobacillus plantarum". J. Gen. Microbiol. sometido a publicación.
- RODRIGUEZ-VALERA, F., JUEZ, G. and KUSHNER, D. J. (1983). "Halobacterium mediterranei spec. nov., a new carbohydrate-utilizing extreme halophile". System. Appl. Microbiol. en prensa.
- RODRIGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F. and RAMOS-COMERZANA, A. (1980). "Behaviour of mixed populations of halophilic bacteria in continuous culture". Can. J. Microbiol. 26: 1259-1263.
- RONCERO, M. I. G., ZABALA, C., CERDA-OLMEDO, E. (1983). "Mutagenesis in multinucleate cells: the effects of N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on Phycomyces spores". Mutation Res. en prensa.
- ROSS, H. N. M., COLLINS, M. D., TINDALL, B. J. and GRANT, W. D. (1981). "A rapid procedure for the detection of archaeobacterial lipids in halophilic bacteria". J. Gen. Microbiol. 123: 75-80.

- RUIZ-VAZQUEZ, R. and CERDA-OLMEDO, E. (1980). "An Escherichia coli mutant refractory to nitrosoguanidine mutagenesis".
Mol. Gen. Genet. 178: 625-631.
- RUIZ-VAZQUEZ, R., PUEYO, C. and CERDA-OLMEDO, E. (1978). "A mutagen assay detecting forward mutations in an arabinose-sensitive strain of Salmonella typhimurium". Mutation Res. 54: 121-129.
- SAMSON, L. and CAIRNS, J. (1977). "A new pathway for DNA repair in Escherichia coli". Nature (London) 267: 281-283.
- SAPIENZA, C. and DOOLITTLE, W. (1982). "Repeated sequences in the genomes of Halobacteria". Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3: 120-127.
- SCHENDEL, P. F., DEFAIS, M., JEGGO, P., SAMSON, L. and CAIRNS, J. (1978). "Pathways of mutagenesis and repair in Escherichia coli exposed to low levels of simple alkylating agents". J. Bacteriol. 135: 466-473.
- SCHNABEL, H., ZILLIG, W., PFAFFLE, M., SCHNABEL, R., MICHEL, H. and DELIUS, H. (1982). "Halobacterium halobium phage ϕ H". EMBO J. 1: 87-92.
- SCHNEIDER, S., BERNSTEIN, C. and BERNSTEIN, H. (1978). "Recombination repair of alkylation lesions in phage T 4. I. N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine". Mol. Gen. Genet. 167: 185-195.

- SHEWAN, J. M. (1942). "Some bacteriological aspects of fish preservation".
Chemistry and Industry, 20: 312-314.
- SIEWERT, G. and STROMINGER, J. L. (1967). "Bacitracin: an inhibitor
of the desphosphorilation of lipid pyrophosphate, an
intermediate in biosynthesis of the peptidoglycan of
bacterial cell walls". Biochemistry, 57: 767-773.
- SIMON, R. D. (1978). "Halobacterium strain 5 contains a plasmid
which is correlated with the presence of gas vacuoles".
Nature 273: 314-317.
- SINGER, B. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1969a). "Chemical modification
of viral ribonucleic acid. VII. The action of methylating
agents and nitrosoguanidine on polynucleotides including
tobacco mosaic virus ribonucleic acid". Biochemistry 8:
3260-3266.
- SINGER, B. and FRAENKEL-CONRAT, H. (1969b). "Chemical modification
of viral ribonucleic acid. VIII. The chemical and biolo-
gical effects of methylating agents and nitrosoguanidine
on tobacco mosaic virus". Biochemistry 8: 3266-3269.
- SINGER, B., FRAENKEL-CONRAT, H., GREENBERG, J. and MICHELSON, A. M.
(1968). "Reaction of nitrosoguanidine with tobacco
mosaic virus and its RNA". Science 160: 1235-1237.

- SMALLBONE, B. W. and KATES, M. (1981). "Structural identification of minor glycolipids in Halobacterium cutirubrum". Biochim. Biophys. Acta 665: 551-558.
- SOLIMAN, G. S. H. and TRUPER, H. G. (1982). "Halobacterium pharaonis sp. nov., a new, extremely haloalkaliphilic archaebacterium with low magnesium requirement". Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. C 3: 318-329.
- STEENSLAND, H. and LARSEN, H. (1969). "A study of the envelope of the Halobacteria". J. Gen. Microbiol. 55: 325-336.
- STOECKENIUS, W. and KUNAU, W. H. (1968). "Further characterization of particulate fractions from lysed cell envelopes of Halobacterium halobium and isolation of gas vacuole membranes". J. Cell. Biol., 38: 336-357.
- STOECKENIUS, W. and ROWEN, R. (1967). "A morphological study of Halobacterium halobium and its lysis in media of low salt concentration". J. Cell. Biol. 34: 365-393.
- STRAUSS, B. S. and WAHL, R. (1964). "The presence of breaks in the deoxyribonucleic acid of Bacillus subtilis treated in vivo with the alkylating agent, methane-sulfonate". Biochem. Biophys. Acta 80: 116-126.
- STUART, L. S., FREY, R. W. and JAMES, L. H. (1933). "Microbiological

studies of salt in relation to the reddening of salted hides". U. S. Dep. Agr. Tech. Bull. 383.

SUBOW, N. N. (1931). "Oceanographical tables". Commissariat of USSR Hydro-Meteorological Committee of USSR (Oceanographical Institute of USSR) Moscow, 1931.

SUMPER, M. and HERRMANN, G. (1976a). "Biosynthesis of purple membrane: control of refined syntesis by bacterio-opsin". FEBS Lett. 71: 333-336.

SUMPER, M. and HERRMANN, G. (1976b). "Biogenesis of purple membrane: regulation of bacterio-opsin syntesis". FEBS Lett. 69: 149-152.

SUSSMUTH, R., HAERLIN, R. and LINGENS, F. (1972). "The mode of action of nitrosoguanidine in mutagenesis. VII. The transfer of the methyl group of nitrosoguanidine". Biochem. Biophys. Acta 269: 276-286.

SWEET, D. M. and MOSELEY, B. E. B. (1976). "The resistance of Micrococcus radiodurans to killing and mutation by agents which damage DNA". Mutation Res. 34: 175-186.

TAKAHASHI, I. and GIBBONS, N. E. (1957). "Effect of salt concentration of the cellular nucleic acids of Micrococcus halodenitricans". Can. J. Microbiol. 3: 687-694.

TORNABENE, T. G., KATES, M., GELPI, E. and ORO, J. (1969).

"Occurrence of squalene, di- and tetrahydrosqualenes, and vitamin MK₈ in an extremely halophilic bacterium, Halobacterium cutirubrum". J. Lipid Res. 10: 294-303.

TORSVIK, T., DUNDAS, I. D. (1974). "Bacteriophage of Halobacterium salinarium". Nature 248: 680-681.

TORSVIK, T. and DUNDAS, I. D. (1978). "Halophilic phage specific for Halobacterium salinarium str.1 ". In: Energetics and structure of halophilic microorganisms. S. R. Caplan and M. Ginzburg, eds.

TORSVIK, T. and DUNDAS, I. D. (1980). "Persisting phage infection in Halobacterium salinarium str.1 ". J. Gen. Virol. 47: 29-36.

VELEMINSKY J. and GICHNER, T. (1970). "The influence of pH on the mutagenic effectiveness of nitroso compounds in Arabidopsis". Mutation Res. 10: 43-52.

VIJAYKUMAR, N. K. and JAIN, H. K. (1981). "Comparative studies on induced mutations with physical and chemical mutagens in Drosophila melanogaster: Parte I. Specificity and spectrum of mutations". Genet. Abs. 13: 3689-G13.

VISENTIN, L. P., CHOW, C., MATHESON, A. T., YAGUCHI, M. and ROLLIN,

- F. (1972). "Halobacterium cutirubrum ribosomes".
Biochem. J. 130: 103-110.
- VOLCANI, B. E. (1940). "Studies on the microflora of the dead sea".
Doctoral Thesis. Hebrew University. Jerusalem.
- WAIS, A. C., KON, M. and MACDONALD, R. E. (1975). "Salt-dependent bacteriophage infecting Halobacterium cutirubrum and Halobacterium halobium". Nature 256: 314-315.
- WALSBY, A. E. (1972). "Structure and function of gas vacuoles".
Bacteriol. Rev. 36: 1-32.
- WASHINGTON II, J. A. and SUTTER, V. L. (1980). In E. H. Lennette, A. Balows, W. J. Hausler, Jr. and J. P. Truant eds. Manual of Clinical Microbiology. ASM. Washington, D. C., pp. 453-458.
- WEIDINGER, G., KLOTZ, G. and GOEBEL, W. (1978). "Large plasmid from Halobacterium halobium carrying genetic information for gas vacuole formation". Plasmid 2: 377-386.
- WHITFIELD, H. J., MARTIN, R. G. and AMES, B. N. (1966). "Classification of aminotransferase (C gene) mutants in the histidine operon". J. Mol. Biol. 21: 335-355.

WOESE, C. R. (1981). "Archibacterias". *Investigación y Ciencia*. Agosto, 1981. pp. 94-102 .

YAMAMOTO, K., KONDO, S. and SUGIMURA, T. (1978). "Mechanism of potent mutagenic action of N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidine on intracellular phage Lambda". *J. Mol. Biol.* 118: 413-430.

YOSHIDA, Y. and YUKI, S. (1968). "Action of nitrosoguanidine in Bacillus subtilis". *Japan J. Genet.* 43: 173-179.

ZAKHAROVA, G. M. and BARTOSHEVICH, Y. E. (1977). "Dependence of mutagenic activity on the physiological state of the cell". *Genetika* 13: 468-476.

ZURKOWSKI, W. and LORKIEWICZ, Z. (1977). "Bidirectionae replication of the chromosome in Rhizobium trifolii". *Molec. Gen. Genet.* 156: 215-219.

* ABBOTT, P.J. and SAFFHILL, R. (1979). "DNA synthesis with methylated Poly(dC-dG) templates, evidence for a competitive nature to miscoding by O⁶-methylguanine". *Biochim. Biophys. Acta* 562: 51-61.

* GERCHMAN, L.L. and LUDLUM, D.B. (1973). "The properties of O⁶-methylguanine in templates for RNA polymerase". *Biochim. Biophys. Acta* 308: 310-316.

* WEISBURG, W.G. and TANNER, R.S. (1982). "Aminoglycoside sensitivity archaeobacteria". FEMS Microbiol. Lett. 14: 307-310.