

**LOS ADITIVOS ALIMENTARIOS COMO POSIBLES  
TOXICOS GENETICOS  
DETERMINACION MICROBIOLOGICA.**

*Miguel D'Aquino y Pilar Santini.*

Orientación Higiene - Departamento de Microbiología.  
Facultad de Farmacia y Bioquímica - Universidad de  
Buenos Aires.

**R E S U M E N**

El objetivo del presente trabajo es seleccionar una metodología sensible que permita establecer rápidamente el potencial mutagénico de sustancias utilizadas como aditivos alimentarios.

Para ello hemos empleado como sistema biológico de prueba el microbiano, siendo éste el primer paso en la investigación de dicho tipo de acción nociva.

El método de detección ensayado por nosotros consiste en investigar el efecto ejercido sobre recombinación genética por los siguientes agentes químicos: Ácidos Monocloroacético, Monoyodoacético y Sódico, m-Bisulfito de potasio, Nitrito de sodio, Auramina y Eritrosina.

Para este tipo de pruebas se ha verificado el efecto ejercido por los agentes mencionados sobre el proceso de transformación genética de una cepa auxotrofa de *Bacillus subtilis*.

Comparativamente se han efectuado ensayos de reversión de características genéticas de cepas de *Salmonella typhimurium*, ya empleadas por otros autores. Se han repetido los mismos ensayos con varias cepas auxotrofas de *Bacillus subtilis* para distintas características genéticas.

En la mayoría de los casos se han obtenido resultados que sugieren modificaciones o alteraciones del proceso de recombinación genética por acción de las drogas ensayadas que se producirían a distintos niveles.

Por el contrario, los resultados obtenidos en los ensayos de rever-

---

*Este trabajo fue presentado en el 41 Triduo de la Asociación Bioquímica Argentina y premiado con el premio ALAN.*

**Recibido el 20-3-77.**

**sión no fueron tan significativos.**

**Lo antes mencionado evidenciaría la mayor sensibilidad brindada por ensayos conjuntos de Recombinación y Reversión para este tipo de detección.**

## **I. INTRODUCCION**

El organismo humano se halla expuesto cotidianamente a la acción de una gran variedad de compuestos químicos naturales y sintéticos, pudiendo tener muchos de ellos un potencial mutagénico y/o cancerígeno que no ha sido puesto en evidencia con los análisis toxicológicos corrientes.

Si tenemos en cuenta el auge de la síntesis orgánica y el destino de muchos de éstos compuestos en la industria de alimentos, fármacos, cosméticos, pesticidas, etc., bien podemos temer los posibles daños genéticos que en forma individual o colectiva podrían acarrear, sobre todo teniendo en cuenta la relación entre actividad cancerígena y mutagénica (1, 2).

Por tal razón, es nuestro propósito colaborar en la selección de métodos que permitan detectar en sistemas biológicos simples el potencial mutagénico de compuestos químicos y poder así extrapolar los resultados en forma aproximada al organismo humano.

Como sistema biológico usamos el microbiano, ya propuesto por muchos autores; entre ellos se encuentran principalmente Ames, Lee y Durston (3), quienes efectúan ensayos de reversión de marcadores genéticos de cuatro variedades de *Salmonella typhimurium* para detectar carcinógenos y mutágenos. Otros autores realizan estudios similares con otras especies bacterianas, como ser: *Escherichia coli* (4), *Klebsiella pneumoniae* y *Citrobacter freundii*.

El método por nosotros propuesto consiste en el empleo de especies auxotrofas de *Bacillus subtilis*; con el mismo estudiamos las posibles anomalías que se producen durante la recombinación genética, es decir que se analiza el resultado de un contacto directo del agente químico en cuestión con el DNA bacteriano, investigando las alteraciones que pueda experimentar éste último en su actividad biológica.

Por otra parte, estudiamos en forma simultánea la reversión de las características genéticas del microorganismo

cuando se halle en contacto con el agente químico. Este análisis de reversión lo efectuamos con cepas de *Salmonella typhimurium* y lo extendemos a distintos auxotrofos de *Bacillus subtilis*, para diversas características genéticas, ya que de ésta forma podemos observar si hay cambios en otros locus del genoma.

De ésta manera efectuamos dos tipos de ensayos, para visualizar:

- a) Acción directa de los agentes químicos sobre el material genético.
- b) Producción de reversión de características genéticas.

En lo que respecta a la primera posibilidad, se estudia el efecto sobre recombinación genética. Dentro de los sistemas posibles hemos elegido el de transformación por ser el que brinda la metodología más ventajosa. Esto se debe a que permite investigar los efectos que puede producir sobre el DNA un agente químico determinado, estudiando la acción del mismo sobre los procesos de captación, incorporación e integración del DNA de un organismo donante en otro receptor.

Como es ya conocido, en el proceso de transformación hay transferencia de información genética por parte del DNA desnudo de una cepa dadora a otra receptora, cuyas células deben encontrarse en un estado denominado de "Competencia", para que produzca la entrada del DNA transformante. Implícitas en el proceso de transformación se encuentran las etapas de incorporación y penetración del DNA a la célula; asociación y recombinación con el genoma receptor y por último expresión fenotípica y replicación de la información genética transferida.

Con respecto a la segunda posibilidad se trata de evidenciar como ya se ha mencionado, la reversión de características genéticas de cepas de *B. subtilis* comparativamente con cepas de *S. typhimurium*, cuando se hallan en presencia de un agente químico determinado.

Es indudable que los ensayos que permitan detectar a los aditivos alimentarios con posible capacidad mutagénica, deben ser efectuados previamente a la aceptación de éstos com-

puestos por los organismos competentes.

Esta práctica se difunde más día a día; la FDA ya indica pautas para el reconocimiento de éste problema tan importante para la salud de las poblaciones, expresándose dentro de las mismas, la necesidad de establecer si un aditivo o compuesto químico produce un daño genético.

La importancia de estimar la producción de este daño, surge de que el mismo puede conducir al desarrollo de cáncer; aun cuando no todos los agentes mutágenos son cancerígenos, un alto porcentaje de cancerígenos se comportan como mutágenos.

En un proceso de evaluación sobre seguridad genética, uno de los aspectos más importantes consiste en conocer si un agente químico produce puntos mutacionales en el material genético.

La dificultad de realizar estas medidas en forma práctica usando modelos mamíferos ha obligado a los toxicólogos genéticos a emplear modelos "in vitro", incluyendo los microbianos.

Si bien la mayoría de los métodos que utilizan este sistema lo hacen buscando reversión de marcadores genéticos de *Salmonella typhimurium*, nuestra metodología incluye la investigación de una acción directa sobre el DNA, observándose si es afectada su actividad biológica por un agente determinado.

Estos estudios pueden efectuarse utilizando especies del género *Bacillus*, mientras que no es posible realizarlos con *Salmonellas* u otras *Enterobacteriáceas*, ya que estas últimas experimentan otro tipo de recombinación genética tal como conjugación o transducción, que no permitirían visualizar la acción directa del compuesto en cuestión sobre el DNA.

En el presente trabajo se tratará de discernir la susceptibilidad de ambas técnicas, reversión y transformación, en la detección del posible efecto mutagénico de aditivos alimentarios.

## **II. MATERIALES Y METODOS:**

### **A) INFLUENCIA SOBRE RECOMBINACION GENETICA:**

#### **1) Cepas Bacterianas:**

<b>Cepa</b>	<b>Genotipo</b>
B. subtilis 168	TRP-
B. subtilis 19	Prototrofo

## 2) Medios de Cultivo:

Se emplearon los siguientes:

Penassay Broth (Antibiotic Medium N° 3 Difco) para la obtención de cultivos masivos.

Medio S. descrito por Spizizen (5) para los ensayos de transformación.

Medio MM, de Davis y Mingioli (6) para los plaques de transformantes a triptofano independencia.

Agar Nutritivo (Difco) para los plaques de viables totales.

Para el desarrollo de competencia se utilizaron:

MC1: Medio S, adicionado de Glucosa (0.5 g/100 ml); Caseína (0.02 g/100 ml); 1 - Histidina (50 µg/ml) y 1 - Triptofano (50 µg/ml).

MC2: Medio S, adicionado de Glucosa (0.5 g/100 ml); Caseína (0.01 g/100 ml); 1 - Histidina (5 µg/ml) y 1 - Triptofano (5 µg/ml).

## 2) Drogas: ensayadas:

Soluciones reguladas de pH 7:

Conservadores:

Acido Monocloroacético

Acido Monoyodoacético

Acido Sórbico

m - Bisulfito de potasio

Fijador de color:

Nitrito de sodio

Colorantes:

Auramina (Clorhidrato de tetrametil-p-diamino-imido-benzofenona).

**Eritrosina (Sal disódica de la tetrayodo fluoresceína)**

**4) Mutágeno control:**

Solución acuosa regulada de pH 7:

N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NMG)

**5) Extracción de DNA transformante:**

Se efectuó a partir de la cepa de *B. Subtilis* 19, Prototrofo, según el método descrito por Polsinelli y Barlati(7).

La titulación del DNA se efectuó según el método de Burton (8).

**6) Desarrollo de competencia:**

Las células competentes de *B. subtilis* 168, se prepararon según el método descrito por Young y Spizizen (9).

**7) Ensayos de transformación:**

Se efectuaron sometiendo las células competentes a la acción de 2  $\mu\text{g/ml}$  de DNA transformante, a 37 °C, con agitación.

Al cabo de 45 minutos se interrumpió la exposición al DNA por agregado de 20  $\mu\text{g/ml}$  de DNasa y  $10^{-3}$  M de Cloruro de Magnesio, efectuándose a continuación plaques para recuento de viables y de transformantes a triptofano independencia respectivamente.

En todos los casos se corrieron paralelamente controles de retromutación, plaqueando en MM las células competentes no expuestas a la acción del DNA transformante.

**8) Efecto de las drogas ensayadas sobre viabilidad y transformación:**

Los ensayos de transformación se efectuaron en la

forma descrita en presencia de diversas concentraciones de las drogas estudiadas.

Las pruebas se realizaron con concentraciones elevadas de droga, mucho más de lo que ingiere normalmente un individuo. De esta forma aseguramos un amplio margen en la posible acción tóxica, sin descuidar el efecto acumulativo de algunos de estos compuestos en el organismo humano.

Se efectuaron además ensayos de transformación en presencia de 10 y 30  $\mu\text{g/ml}$  de NMG, utilizado como mutágeno control.

## B) INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DISTINTAS CEPAS DE BACILLUS SUBTILIS:

### 1) Cepas bacterianas:

Cepa	Genotipo	
B. subtilis 3308	URA <sup>-</sup>	
B. subtilis 112	TRP <sup>-</sup> ;	PHE <sup>-</sup>
B. subtilis 566	TRP <sup>-</sup> ;	THY <sup>-</sup>
B. subtilis 168	TRP <sup>-</sup>	

### 2) Medios de cultivo:

Se utilizaron los medios ya descritos.

### 3) Drogas ensayadas:

Las mencionadas precedentemente.

### 4) Ensayos de reversión:

De las cepas de B. subtilis señaladas, se efectuaron cultivos masivos en Penassay Broth, incubando overnight, a 37°C, en agitador plano rotatorio.

El subcultivo se efectuó en el mismo medio y en iguales condiciones, incubando durante 4 horas.

Las células bacterianas fueron lavadas con medio

S y resuspendidas en medio S adicionado de Glucosa (0.5 g/100 ml), caseína (0.01 g/100 ml), y sus correspondientes metabolitos requeridos (aminoácidos: 5  $\mu\text{g/ml}$ ; Bases: 1  $\mu\text{g/ml}$ ).

Posteriormente las cédulas bacterianas se pusieron en contacto con las agentes en estudio durante 45 minutos, a 37°C con agitación, utilizándose NMG como mutágeno control.

En todos los casos la concentración de prueba fue de 10  $\mu\text{g/ml}$ , salvo para ácido sórbico que fue ensayado en concentraciones de 10 y 20  $\mu\text{g/ml}$ .

Estas concentraciones fueron seleccionadas en base a los resultados obtenidos en los experimentos de transformación.

Por último se efectuaron plaqueos en MM para verificar la producción de revertantes y en agar nutritivo para control de viabilidad.

### C) INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DIVERSAS CEPAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM:

#### 1) Cepas Bacterianas:

Cepa	Genotipo
S. typhirium 1535	HIS <sup>-</sup>
S. typhimurium 1537	HIS <sup>-</sup>

#### 2) Medios de Cultivo:

Se utilizaron los medios descritos por Ames (3)

#### 3) Drogas ensayadas:

Las mencionadas precedentemente.

#### 4) Ensayos de reversión:

se efectuaron según la técnica descrita por Ames (3) frente a 10  $\mu\text{g/ml}$  de las sustancias estudiadas y a la misma concentración de NMG, empleada como mu-

tágeno control, de acuerdo con el criterio explicado anteriormente.

### ABREVIATURAS

TRP<sup>-</sup>: requerimiento de triptofano  
URA<sup>-</sup>: requerimiento de uracilo  
PHE<sup>-</sup>: requerimiento de fenilalanina  
THY<sup>-</sup>: requerimiento de timina

### III. RESULTADOS Y DISCUSION:

#### A) INFLUENCIA SOBRE RECOMBINACION GENETICA:

En lo que respecta a la influencia sobre recombinación genética, es lógico suponer que si un agente afecta el material genético, la frecuencia de transformación con respecto al control sin droga debe encontrarse afectada.

Esto se puede corroborar observando en la tabla 1, el efecto ejercido por el mutágeno control sobre transformación. En este caso vemos que una concentración de 10  $\mu\text{g/ml}$  que no afecta sensiblemente la viabilidad, disminuye considerablemente el número de transformantes lo que se traduce en un marcado descenso de la frecuencia.

En el mismo cuadro puede observarse para el ácido monoyodoacético disminución de transformantes y de viables, no afectándose por lo tanto la frecuencia. Esto indica que el compuesto no ejercería acción sobre el proceso de transformación.

Los resultados obtenidos con ácido sórbico podrían indicar una acción deletérea sobre el material genético, ya que con el incremento de concentración, disminuye la frecuencia de transformación.

Con el nitrito de sodio, sustancia objetada cuando sobrepasa límites tolerables, la viabilidad no es afectada dentro de ciertas concentraciones, pero el porcentaje de transformantes se eleva, lo que indicaría que el compuesto como tal obraría sobre mecanismos de captación del DNA, sin afectar la actividad biológica del mismo. Esto concuerda con los resultados hallados por otros investigadores que demuestran que el nitrito de por sí no ejercería acción mutagénica, resultando pe-

T A B L A N° 1

**INFLUENCIA SOBRE RECOMBINACION GENETICA**  
(Transformación de *Bacillus subtilis* 168)

A G E N T E	Concentra- ción (ug/ml)	Transfor- mantes %	Viabiles %	Frecuencia de trans- formación %
Acido Monocloroacético	5	95	97	98
	10	94	97	97
	50	76	80	85
Acido Monoyodoacético	1	100	100	100
	5	80	70	114
	10	40	40	100
	20	15	15	100
Acido Sórbico	1	95	106	90
	5	92	102	90
	10	88	97	91
	20	75	97	77
	30	73	97	75
m-Bisulfito de potasio	5	94	101	93
	10	92	103	89
	40	92	103	89
Nitrito de sodio	5	270	108	250
	10	215	107	201
	20	100	45	222
Auramina	1	98	98	100
	3	96	99	97
	5	82	92	89
	7	84	92	91
	10	94	46	204
	15	90	42	214
Eritrosina	0.1	71	84	85
	1	38	81	47
	5	38	81	47
	10	20	81	25
	20	9	81	11
N-metil-N'-Nitro- N-nitrosoguanidina	10	50	89	56
	30	3	6	50

ligrosos como mutágenos o cancerígenos los productos de su metabolismo, sobre todo bajo forma de nitrosaminas (10, 11).

Con auramina la frecuencia de transformación se encuentra incrementada a expensas de la disminución de viabilidad, mientras que el porcentaje de transformantes se mantiene sin mayores variaciones. Esto sugeriría que el efecto se produciría selectivamente sobre células no competentes.

Con eritrosina se observa una marcada disminución en el número y frecuencia de transformantes, lo que podría sugerir una acción deletérea sobre material genético.

Para ácido monocloroacético y m-Bisulfito de potasio no se detectan modificaciones significativas en el proceso de transformación.

#### B) INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DISTINTAS CEPAS DE BACILLUS SUBTILIS:

La influencia de los distintos agentes sobre reversión de características genéticas de B subtilis puede observarse en la tabla 2.

T A B L A N° 2

#### INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DISTINTAS CEPAS DE BACILLUS SUBTILIS

A G E N T E (10 $\mu$ g/ml)	REVERSION DE B. SUBTILIS					
	3308 URA	112 TRP	566 PHE	168 TRP	THY	TRP
Acido Monocloroacético	—	—	—	—	—	—
Acido Monoyodoacético	—	—	—	—	—	—
Acido Sórbico	—	—	—	—	—	—
m-Bisulfito de Potasio	—	—	—	—	—	—
Nitrito de Sodio	—	—	—	—	—	—
Auramina	—	—	—	—	—	—
Eritrosina	—	—	—	—	—	—
N-Metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	+	—	—	—	+	—

Para este tipo de ensayos y para el mutágeno control, se obtuvo una respuesta significativa con los marcadores URA y THY.

Aún cuando no se ha evidenciado reversión con las drogas ensayadas, insistimos en efectuar esta técnica por lo menos con dos marcadores, dado que el tipo de mutación que se produce con distintos compuestos químicos puede ser diferente, afectándose uno u otro locus según el caso.

**C) INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DIVERSAS CEPAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM:**

En la tabla 3 puede visualizarse que la respuesta obtenida en este caso es similar a la observada con *B. subtilis*, para los marcadores URA y THY.

**T A B L A N° 3**

**INFLUENCIA SOBRE REVERSION DE CARACTERISTICAS GENETICAS DE DIVERSAS CEPAS DE SALMONELLA TYPHIMURIUM**

A G E N T E (10 $\mu$ g/ml)	REVERSION DE <i>S. TYPHIMURIUM</i>	
	1535 HIS	1537 HIS
Acido Monocloroacético	—	—
Acido Monoyodoacético	—	—
Acido Sórbico	—	—
m-Bisulfito de Potasio	—	—
Nitrito de Sodio	—	—
Auramina	—	—
Eritrosina	—	—
N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina	+	+

**IV. CONCLUSIONES:**

De acuerdo con los resultados obtenidos podemos señalar:

1) que el sólo ensayo de reversión de un marcador genético no es suficiente para descartar una sustancia como posible agente mutagénico, si tenemos en cuenta sobre todo lo observado con los distintos auxotrofos de *B. subtilis*, en cuanto a respuesta frente al mutágeno control.

2) que la prueba de transformación, como mecanismo de recombinación genética, realizada simultáneamente con pruebas de reversión, ofrece una metodología sensible y económica que posibilita una rápida selección presuntiva de agentes químicos de acción genética desconocida.

Lo antedicho nos permite deducir finalmente que la realización simultánea de ambas técnicas, como ensayos preliminares, permite establecer con mayor certeza ulteriores prioridades de estudio en el campo de acción mutagénica de aditivos alimentarios.

#### SUMMARY

**Food additives and its probable genetic toxicity-microbiological assay.**

In the present work we intend to find an accurate methodology to establish in an easy way the mutagenic potential of drugs employed as food additives.

For that purpose we first selected a microbiological system for performing this assay. The method assayed consisted of investigating the effect exerted on genetic recombination by the following chemical agents: Chloroacetic Acid, Iodoacetic Acid, Sorbic Acid, Potassium Metabisulfite, Sodium Nitrite, Auramine and Erythrosine.

The activity of these agents was detected though their effect on the transformation of an auxotrophic strain of *Bacillus subtilis*.

Comparative assays of reversion of characters have been made with strains of *Salmonella typhimurium* already used by other authors.

These assays have also been repeated with several auxotrophic strains of *Bacillus subtilis* and different genetic characters have been studied.

Most results suggest that changes in the recombination process should have occurred at different levels according with the drugs assayed.

On the other hand, the results of reversion have not been significant enough.

We think that more accuracy is afforded by both the recombination and the reversion assay developed to other for this kind of detection.

**B I B L I O G R A F I A**

- 1) De Serres, F. J. - The correlation between carcinogenic and mutagenic activity in shortterm tests for mutation induction and DNA repair. *Mutation Res.* 31: 203-204, 1975.
- 2) Hollaender, A. - Recommendations for Workshop on the Evaluation of Chemical mutagenicity data in relation to population risk. *Environ. Health Perspect.* 6: 229-232, 1973.
- 3) Ames, B. H.; F. D. Lee y W. E. Durston. - An Improved Bacterial test system for the detection and classification of mutagens and Carcinogens. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 70: 782-786, 1973.
- 4) Green, M. M. L. y W. J. Muriel. - Mutagen Testing using TRP+ Reversion in *E. coli*. *Mutation Res.* 38: 3-32, 1976.
- 5) Spizizen, J. - Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by dextoxyribonucleate. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 44: 1072-1078, 1958.
- 6) Davis, B. y E. Mingioli. - Mutants of *Escherichia coli* requiring methionine or vitamin B<sub>12</sub>. *J. Bacteriol.* 60: 17-28, 1950.
- 7) Polsinelli, M. y S. Barlati. - Effects of periodate on competence in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* 49: 267-275, 1965.
- 8) Burton, K. - A study of the conditions and mechanism of diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. *Biochem. J.* 62: 315-323, 1956.
- 9) Young, F. y J. Spizizen. - Physiological and genetic factors affecting transformation of *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 81: 823-829, 1961.
- 10) Magee, P. N. y J. M. Barnes - Carcinogenic nitroso compounds. *Advan. Cancer Res.* 10: 163-167, 1967.
- 11) Sandler, J.; F. Schweirisberg y P. H. Menz - Untersuchungen uber die Entstehung cancerogener Nitrosoamine im Magen *Z. Physiol. Chem.* 349: 1691-1697, 1968.