

Tesis de Posgrado

Acción de los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas sobre la capacidad infecciosa de fago lambda temperado y una mutante virulenta

Coto, Celia Esther

1964

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Coto, Celia Esther. (1964). Acción de los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas sobre la capacidad infecciosa de fago lambda temperado y una mutante virulenta. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1205_Coto.pdf

Cita tipo Chicago:

Coto, Celia Esther. "Acción de los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas sobre la capacidad infecciosa de fago lambda temperado y una mutante virulenta". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1964.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1205_Coto.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

FCEN-BA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Acción de los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas sobre la capacidad infecciosa del fago λ temperado y una variante virulenta

Celia Esther Cote

Resumen presentado para optar
al Título de Doctor en Química

Año 1964

R. de Tesi: 1205

FOYB.A.

El trabajo realizado se puede resumir en tres puntos:

a) Estudio del efecto de los lisados de bacterias sobre el poder infectante del fago λ y una mutante virulenta.

Se trabajó con lisados de bacterias lisogénicas $K_{12}(\lambda)$ W 1895 y no lisogénicas K_{12} W 1485.

Los lisados se obtuvieron sometiendo a las bacterias al efecto de una descompresión brusca. Luego se centrifugaron a 10.000 rpm. para eliminar restos de membranas y bacterias remanentes.

Los ensayos de inhibición de los fagos, se efectuaron incubando el fago con el lisado a 37°C durante 30 minutos.

La inhibición se determinó en base a la disminución del número de placas producidas por el fago en presencia del lisado, respecto de un control. Las bacterias utilizadas fueron las K_{12} W 1485 sensibles a ambos fagos.

También se trabajó con lisados obtenidos a partir de protoplastos de esas mismas cepas.

Los resultados indican que los lisados de las bacterias lisogénicas y no lisogénicas inhiben al fago λ virulento pero no tienen acción sobre el fago temperado.

Los lisados de los protoplastos, se comportan en igual forma.

La inhibición del fago virulento nunca es inferior al 50%. Las variaciones obtenidas (95-50%) dependen de la concentración del poder inhibitorio de cada lisado utilizado.

b) Estudio de las propiedades del lisado de bacterias lisogénicas.

Resultados:

- 1) El lisado es estable a 0°C por lo menos durante 30 días, luego comienza a perder título,
- 2) A los 5 minutos de calentamiento a 56°C, se destruye rápidamente parte de la actividad del lisado. El resto permanece inalterado por lo menos hasta 30 minutos de calentamiento.
- 3) El lisado se inactiva a 100°C.
- 4) Se incubó lisado con DNasa y RNasa ; el poder inhibitorio no se al-

FOYB.A.

tera por efecto de estas enzimas.

- 5) Se inactiva incubando el lisado con 250 μ de tripsina por ml.
 - 6) El lisado dializa parcialmente a 4°C.
 - 7) El lisado precipita por el agregado de ácido tricloroacético al 5% en frío. El precipitado resuspendido en buffer pH 7.0 tiene más actividad que el lisado original.
 - 8) El lisado se puede sedimentar por ultracentrifugación.
 - 9) El caldo donde crecieron las bacterias, a partir de las que se obtuvo el lisado, no tiene actividad inhibitoria.
- e) Interacciones entre lisado y fago.

- 1) La temperatura óptima de contacto fago-lisado es de 37°C.
A 0°C también se produce la unión entre el fago y el lisado, pero en menor proporción.
A 56°C esta unión no tiene lugar.
- 2) La cinética de la inhibición del fago por el lisado a 37°C, indica que la reacción es de primer orden.
La reacción procede rápidamente, hasta que a los 50 minutos se detiene.
- 3) Los experimentos realizados para determinar si el lisado se une al fago temperado, aunque no lo inhiban indican que el lisado no interacciona en ninguna forma con el fago.
Hay que hacer notar que en presencia de lisado, el fago temperado produce un número mayor de placas, que cuando se plaques sin el mismo.
- 4) El efecto del lisado se debe a una acción directa sobre la partícula del fago y no a una interacción con la superficie bacteriana de las bacterias sensibles.

Conclusiones:

Se postula que los receptores bacterianos que pasan a solución al obtenerse el lisado, son los responsables de la inhibición del fago virulento. Como estos receptores no parecen actuar sobre el fago temperado, se deduce que este fago se une a receptores diferentes de los que se une el virulento.

FOENNA.

La inhibición no es debida a la presencia de restos de membrana, porque éstas se eliminan en la centrifugación.

Las propiedades del lisado señalan la presencia de una proteína como responsable de la inhibición. Sin descartar que dicha proteína forme parte de una molécula mas compleja.

Plotz

FOYMA

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Acción de los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas sobre la capacidad infecciosa del fago λ temperado y una mutante virulenta

Celia Esther Coto

Tesis presentada para optar al
Título de Doctor en Química.

Año 1964

TESIS: 1205

Este trabajo fue realizado bajo la
dirección del Profesor Dr. Armando
Santiago Parodi

— a ni madre —

← A mi esposa →

Agradezco:

Al Prof. Dr. Armando S. Parodi por su guía constante, su apoyo moral y porque de él aprendí a incursionar en el difícil campo de la Ciencia.

Al Ing. Juan I. Valencia porque sin su intervención no hubiera podido iniciarme en el estudio de los bacteriófagos y los virus.

Al Dr. Simón Lajmanovich por sus estimulantes críticas.

Al Dr. Marcelo Frigerio por su infinita paciencia para ayudarme a resolver algunos problemas.

A mis compañeros por su cooperación amistosa en múltiples circunstancias.

Objeto del trabajo:

Las bacterias lisogénicas poseen la propiedad de ser resistentes a la infección del fago que llevan como profago.

El objeto primitivo de éste trabajo, fué investigar cuál era la causa responsable de la inmunidad en las bacterias lisogénicas.

Se sabía que la inmunidad estaba asociada a la presencia del profago pero no se conocía su mecanismo.

Los genetistas trataron de interpretar este problema, investigando las relaciones entre el profago y el cromosoma y los cruzamientos entre bacterias lisogénicas y no lisogénicas.

En la actualidad, estos estudios han derivado en una teoría, en la que se atribuye la inmunidad a la presencia de un represor citoplasmático constituido por RNA.

Otros investigadores pensaron que la responsable de la inmunidad era una proteína presente en el citoplasma de bacterias.

La hipótesis del trabajo que aquí se presenta fué suponer que al poner en contacto las bacterias lisogénicas con el fago, éste induciría la formación de una proteína semejante al interferón que producen las células cuando se las cultiva en presencia de virus muerto.

Se comenzó a trabajar poniendo en contacto fago λ con bacterias lisogénicas; se dejaron en contacto a 37°C y luego se separaron las bacterias se lavaron y se lisaron.

El lisado se incubó con bacterias sensibles que luego se infectaron con fago.

Paralelamente se hicieron controles incubando bacterias sensibles con el lisado de bacterias que no habían estado en contacto con el fago.

No se encontraron diferencias entre el número de placas producidas por el fago en presencia del lisado y en los controles.

El mismo experimento se repitió con el fago λ virulento, manteniendo el lisado presente durante un solo ciclo de reproducción del fago. Se observó entonces, que después del período latente, en vez de aumentar el número de fagos presentes como sería de esperar, este número disminuía

2

Esto no ocurría en el caso del λ temperado, por lo que consideramos de interés investigar el comportamiento del fago temperado frente a los lisados bacterianos, comparando con el fago virulento, ya que la hipótesis original no pudo ser confirmada.

Los resultados obtenidos con los lisados y el comportamiento de los fagos son los que se detallan en este trabajo.

Los métodos y las técnicas empleadas fueron puestas a punto y algunas modificadas por la autora, en los laboratorios de la Cátedra de Microbiología y Parasitología, Facultad de Ciencias Médicas.

Introducción :

Existe en la naturaleza un determinado tipo de bacterias llamadas lisogénicas.

Una bacteria lisogénica es aquella que transmite hereditariamente el poder de producir bacteriófago en ausencia de toda infección extrínseca reciente.

Esta propiedad representa para la bacteria un poder potencial letal. Los bacteriófagos capaces de establecer sistemas lisogénicos se llaman temperados (Jacob, F.; A. Lwoff; L. Siminevitch et Wallman E. L.; 1953)(1).

Si sometemos a la acción de un fago temperado un cultivo de bacterias sensibles en crecimiento, una fracción de las mismas se lisa, en tanto que otra fracción sobrevive y comienza a ser lisogénica.

Estas bacterias que han adquirido lisogenia tienen las mismas propiedades que las que la han obtenido naturalmente y el fago que producen es del mismo tipo que el que las lisogenizó. El carácter lisogénico adquirido es estable.

La lisogenia está ampliamente distribuida entre diferentes especies bacterianas y actualmente según afirma Hayes N. (1964) (2) debe considerarse como el estado normal de una bacteria y no como un estado excepcional.

La lisogenia corresponde a una relación íntima entre los materiales genéticos de una bacteria y un fago que están integrados y se reproducen como unidad. Las bacterias no llevan al fago en partículas sino en forma de unidades no infecciosas. A la forma latente, no infecciosa en que es llevado el fago temperado por la bacteria lisogénica, se la denominó profago. (Lwoff and Gutman, 1950) (3).

De un cultivo de bacterias lisogénicas, una pequeña fracción de la población se lisa liberando partículas infecciosas del fago que lleva como profago. Este evento ocurre con una frecuencia de 10^{-4} por generación celular. Sin embargo, si esas bacterias se exponen a la luz ultravioleta, a la mitomicina C o a la acción de agentes mutagénicos, la frecuencia con que se produce la liberación de fago puede aumentar y llegar a uno.

Este fenómeno se denomina inducción y fue descubierta por Lwoff A., Siminevitch and Kicjldgaard (1950) (4).

No todas las bacterias lisogénicas son inducibles; esta propiedad parece ser función de la constitución genética del fago y no de la bacteria.

Los trabajos de Jacob y Wollman (1953)(5), Appleyard (1954) (6) sobre cruzamientos genéticos entre *E. coli* K₁₂ lisogénica para λ y *E. coli* K₁₂ no lisogénica, llevaron a la conclusión que el determinante de la lisogenia en una bacteria es el profago por sí mismo y no un gen bacteriano que lo controle.

El profago ocupa un sitio específico sobre el cromosoma bacteriano y actúa como si fuera un gen bacteriano.

Se sabe que está ligado al locus "gal" (Lederberg and Lederberg, 1953)(7), en el cromosoma bacteriano (Wollman 1953)(8).

Las bacterias lisogénicas adquieren resistencia específica e inmunidad al fago que las lisogenizó. Esta propiedad no es debida a una incapacidad para adsorber el fago, sino a una inhabilitación para reproducirlo.

La bacteria puede adsorber el fago y se produce la infección por el DNA del mismo, pero la probabilidad de que dichos eventos lleguen a la síntesis del fago es cero.

No existe una copa lisogénica que no sea inmune a la sobreinfección con fago del tipo llevado como profago. La copa también es inmune a la mayoría de las mutantes del fago que la lisogenizó.

Bertani G. 1958 (9) sugirió como explicación de la inmunidad a la posible existencia de una sustancia represora del fago sobreinfectante, producida por la presencia del profago.

Posteriormente, F. Jacob y A. Campbell 1959 (10), estudiaron los ei-

gotos formados en los cruzamientos entre bacterias lisogénicas y no lisogénicas. Estos investigadores encontraron que la inmunidad está ligada a la formación de un represor citoplasmático específico, cuya síntesis está determinada genéticamente por el fago. Esta sustancia no solamente interfiere en la función vegetativa del fago sobreinfectante, sino que es responsable del mantenimiento del profago.

Jacob y Wollman en base a los trabajos de inducción cigótica (Jacob and Wollman 1956 a (11); Wollman and Jacob 1957 (12)), desarrollaron una hipótesis que explica el fenómeno de infección lítica, la lisogenia y la inmunidad. De acuerdo a sus deducciones éstas son expresiones de un solo proceso que sería la regulación de la actividad funcional del genoma del fago.

Según esta teoría, que se ha aplicado al control del metabolismo bacteriano, la actividad de ciertos genes está controlada por represores citoplasmáticos. La síntesis de dichos represores está determinada por un locus regulador que puede o no estar estrechamente ligado a los genes que controla el represor.

El sitio de acción del represor no son los genes en sí mismos, pero sí una región adyacente del cromosoma llamada operador, cuya función es modificar la actividad de los genes estructurales según el represor se encuentre presente o ausente.

Al nivel molecular se supone que el operador es el sitio donde el RNA mensajero comienza a transcribir la información llevada por la secuencia de genes. Si el operador está bloqueado por el represor, el RNA mensajero no podrá transcribir información, entonces cesa la síntesis de proteínas.

Respecto a la naturaleza química del represor, de acuerdo a los trabajos de Fisher (1963) (13) el represor estaría compuesto al menos parcialmente de RNA.

Fagos virulentos y temperados

El efecto más espectacular que un fago puede producir es el clareamiento de un cultivo turbio de bacterias por lisis de las células infectadas (Bertani 1958) (9). Si las bacterias no se lisan es que se han lisogenizado. Los fagos que tienen poca capacidad para lisogenizar se llaman virulentos. El estudio de este tipo de fago ha llevado al conocimiento del ciclo lítico reproductivo de un fago. El estudio del ciclo lítico de un fago es el resultado de la investigación de los fagos de la serie T, un grupo de siete cepas de fagos que pertenecen a cuatro grupos serológicos o especies.

De éstos el más estudiado es el T₂. El proceso de invasión de una bacteria por un fago comprende las siguientes etapas; una partícula de fago que está formada por un núcleo de ácido desoxiribonucleico (DNA) y una cubierta proteica, se adsorbe sobre la superficie de una bacteria.

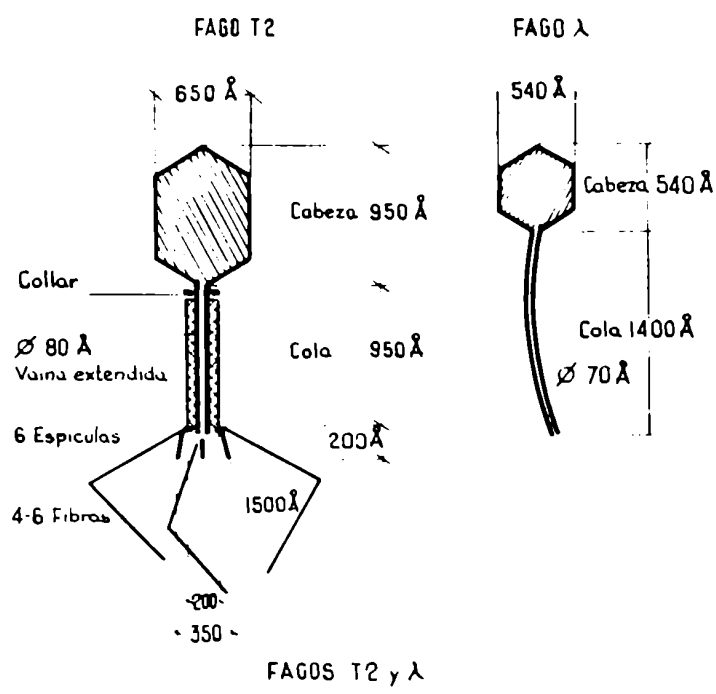
El DNA del fago entra a la célula, mientras la cubierta proteica permanece afuera, aparentemente sin cumplir otra función. El DNA es el que lleva la especificidad genética del fago. Inmediatamente después de la inyección comienza la multiplicación del DNA del fago dentro de la célula (estado vegetativo). En este momento puede ocurrir interacciones entre los elementos genéticos formados que llevan a la producción de combinantes genéticos. Comienza a formarse la proteína del fago y aparecen partículas completas de fago (maduras) dentro de la célula. Es el final del período de eclipse, luego (final de este período) la célula se lisa y aparece en el medio un gran número de partículas de fago.

De todas estas etapas del proceso de reproducción del fago, nos vamos a detener en el proceso de adsorción a la superficie celular.

Tomamos como ejemplo el fago T₂. Esta etapa comprende tres fases (Kellenberger E. 1961)(14)(1) adsorción (2) interacción química entre la cola y la pared celular y penetración del conducto interior central de la cola del fago a través de la membrana celular y (3) inyección del contenido de la cabeza dentro de la célula.

La membrana de la cabeza del fago T₂ es de naturaleza proteica. La proteína está presuntamente compuesta de subunidades de un solo tipo. (Levine et al. 1958, Brenner et al. 1959)(15)(16).

La cola del fago contiene un conducto interno vacío rodeado por una cubierta proteica contráctil (Kozloff and Luke 1959, Brenner et al. 1959)(17)(16). La punta de la cola está fija a una base plana con seis espículas y seis fibras. La cubierta contráctil está unida a la cabeza y en algunos casos presenta un collar intermedio (Anderson 1960)(18)(ver figura 1).



Parecería que esta envoltura se contrae de modo que el núcleo interno entra dentro de la bacteria; a continuación actúa una enzima de tipo lizosima sobre la pared bacteriana. No se conoce la energía requerida para efectuar la inyección y la posible polaridad del DNA transferido. Juntamente con el DNA entra una pequeña cantidad de proteína que se encuentra en la cabeza. Esta proteína ordenaría al RNA celular que se encuentra sobre la membrana de la bacteria, un reordenamiento de su molécula. Este RNA mensajero reordenado se compleja con el DNA celular para ordenar la síntesis del DNA del fago.

Fago temperado:

Como modelo de fago temperado tomaremos el fago aislado de E.coli K₁₂, cepa así bautizada por Lederberg y Tatum que crece en un medio sintético simple y que eligió Lederberg para sus experiencias de mutaciones bioquímicas. La cepa E.coli K₁₂ (λ) W 1895 fue utilizada en este trabajo y el fago inducido de la misma por luz ultravioleta.

Propiedades generales del fago λ (salvaje).

El bacteriófago λ es un fago altamente inducible, originariamente aislado por Lederberg y Lederberg 1953 (7) de una cepa K₁₂ de E.coli usada en estudios de recombinación genética.

Existen cepas derivadas de K₁₂ que son sensibles al fago λ y que se usan como indicadores del mismo. La adsorción del fago a las células huéspedes es pobre bajo condiciones usuales para otros fagos (células jóvenes, fisiológicamente activas), es mejor la adsorción en células en "ayuno" en presencia de Mg⁺⁺ (Kaiser A. 1955)(19). El período latente del fago λ es de 45 minutos y su "burst-size" de 80 a 130.

Es una partícula de peso molecular de alrededor de 1×10^8 que contiene partes iguales de DNA proteína (Kaiser and Hognes 1960)(20). Tiene

una cabeza aproximadamente esférica de 60 m μ de diámetro unida a una cola cilíndrica de 140 m μ de longitud y 13 m μ de diámetro (Arber and Kellenberger, 1958)(21). La resistencia de λ a la radiación ultravioleta (2537 Å) es extremadamente alta, 13 veces más que la del fago T₂ en ausencia de fotoactivación.

El ácido nucleico del fago utilizado en este trabajo ha sido analizado por Mackal R.F., R. Koppelman; R. Diamonds and E. Evans Jr.(1960) (22). Los stocks de λ usados en diferentes laboratorios aunque todos derivan de K₁₂ o sus derivados, a menudo difieren genéticamente. Esto es debido al hecho de que los stocks del fago se preparan por inducción de los cultivos lisogénicos con las ultravioleta, la que es mutagénica y además algunos derivados de K₁₂ fueron irradiados para producir mutaciones usadas en genética bacteriana (Bertani 1958)(9).

El fago actúa uniéndose la punta de su cola a la superficie celular y luego inyectando el DNA contenido dentro de la cubierta proteica de su cabeza, dentro de la célula. La cola de este fago es flexible y no tiene vaina contráctil. Tiene una espícula en la punta de la cola en lugar de fibra y no se conoce el mecanismo de penetración a la célula (Kellenberger 1961)(14).

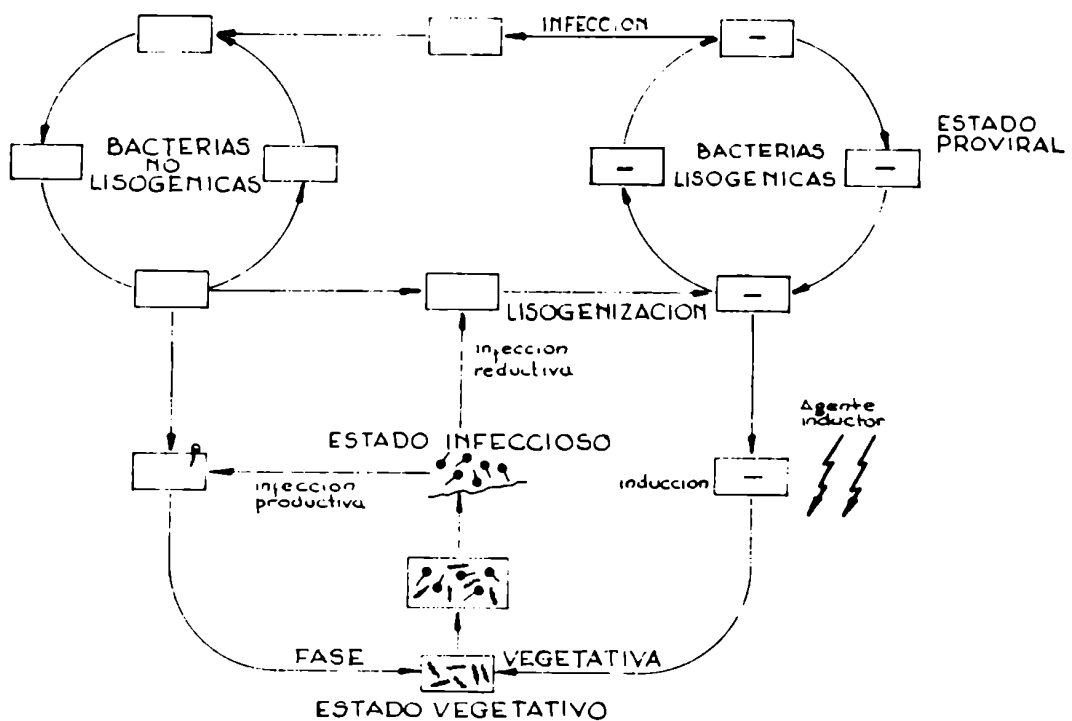
Se presume, aunque no con seguridad que entra todo el DNA del λ a la bacteria y parte de proteína aunque no hay duda que la especificidad genética reside en su DNA.

Después de la inyección del DNA pueden ocurrir uno de los dos procesos que siguen:

- 1) Con una probabilidad que es normalmente de 0.8 (pero que depende del genotipo del fago y las condiciones experimentales) la célula infectada puede comenzar la síntesis de la proteína y el DNA del fago para producir partículas maduras de fago.

Se produce un aumento concomitante en la actividad de lisosimas lo que resulta en la lisis de la célula huésped y la liberación de las partículas maduras de fago (Jacob and Fuerst 1958)(23).

2) Las bacterias infectadas que no siguen este esquema lítico sobreviven y se convierten en lisogénicas. Solamente los fagos temperados dan dos tipos de ciclos, los que pueden esquematizarse en la siguiente figura obtenida del libro de "La Sexualité des Bacteries", E. Wollman et F. Jacobs, 1959, (24)

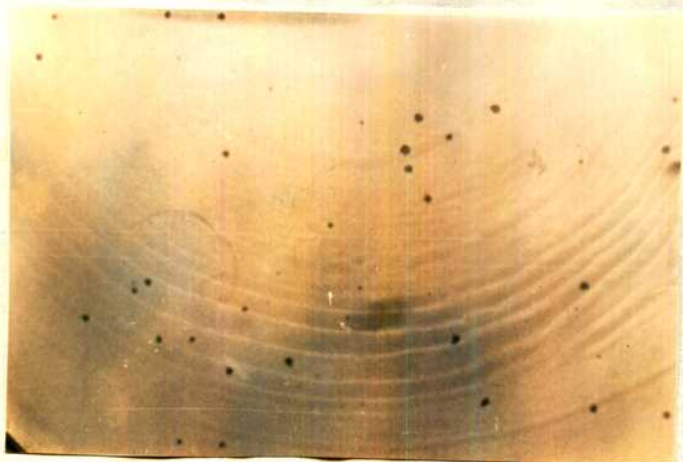


- 11
- Se conocen varias clases de mutantes del fago λ temperado:
- Mutantes que afectan la habilidad del fago para establecer lisogenia, se llaman m_1 -(minuta placas con halo) m_3 (por small:pequeña), m_5 y m_6 de tamaño mediano.
 - Mutantes que muestran varios grados de reducción en la habilidad para establecer la condición lisogénica, forman placas menos turbias que el tipo salvaje, o son completamente claras (mutantes virulentas). Las placas del fago temperado se caracterizan por tener un centro de crecimiento de bacterias que han sido lisogenizadas por el fago.

Las placas producidas por el fago λ temperado usado en este trabajo se ven en las fotografías N°1 y N°2. Como bacterias indicadoras se usaron las K_{12} W 1485.

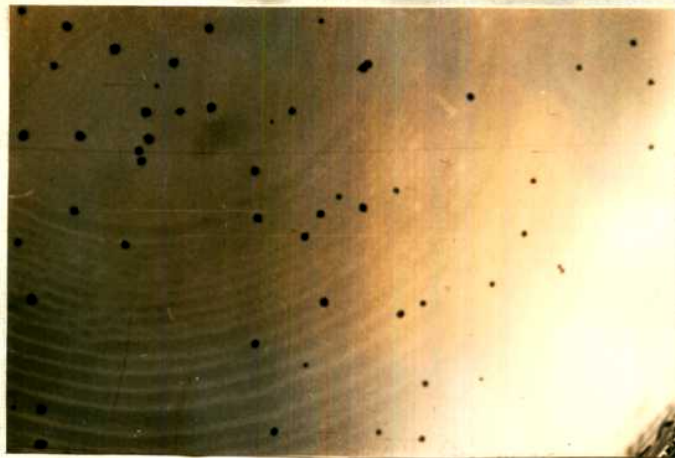


Fotografía N° 1



Fotografía N°2

La fotografía N°3 muestra el tipo de placas producidas por el fago virulento sobre K₁₂ W1485.



Fotografía N°3

Ligados bacterianos

Couch y Burnet (1934) (25) extrajeron de bacterias huéspedes, un agente inhibidor del fago (PIA) capaz de inactivar las partículas del fago en la misma forma que lo hace un suero antifago. Pensaron que se trataba de una solución de receptores bacterianos para la adsorción del fago.

Burnet y Freeman (1937)(26) investigaron el efecto del PIA sobre las preparaciones de fago inactivadas en un 90% con suero antifago, Los sobrevivientes de la inactivación del antisuero resultaron resistentes a la inactivación de PIA en tanto que la población no tratada se inactivó un 90% con el PIA. Esto sugirió que el PIA no era idéntico a la sustancia receptora de la superficie bacteriana puesto que los sobrevivientes del suero eran aún capaces de infectar la bacteria aunque son resistentes a la acción del PIA. La primera demostración de la inactivación de bacteriófagos por extractos bacterianos fue hecha por Levine y Frish (1934)(27) usaron extractos salinos de salmonella y shigella y encontraron que protegían a organismos homólogos del ataque del fago. La sustancia activa podía precipitarse con alcohol. El PIA era obtenido por Burnet autolizando bacterias dos días a 55°C. Después de lo cual se romían las membranas de gradocol de 1 de diámetro. La actividad se medía incubando diluciones apropiadas de PIA con fago diluido y determinando el fago sobreviviente por plaqueo.

En general, se encontró que los fagos que atacan una cepa bacteriana dada, eran inhibidos por extractos de dicha cepa, en tanto que esos extractos no tenían efectos sobre los fagos a la cual la bacteria era resistente. (Adams 1959)(28).

La acción del PIA se estudió cinéticamente y se encontró que la inactivación del fago por el extracto bacteriano es similar a la neutrali-

sación del fago. La inactivación es normalmente de primer orden y luego decrece.

La velocidad es proporcional a la concentración de PIA y tiene una temperatura óptima a 37°C.

Burnet concluyó que el PIA está íntimamente asociado con el antígeno somático y que dicha sustancia bloquea la infección del fago por combinación con sitios receptores del fago. Además otros experimentos hacen concluir que los anticuerpos contra el fago no reaccionan en el mismo sitio que el PIA en la superficie del fago pero adyacente al mismo.

El hecho que la reacción de un fago con un anticuerpo hace al fago resistente a la inactivación con PIA puede significar que los anticuerpos neutralizantes y el PIA reaccionan con receptores que están espacialmente contiguos y parte de un solo complejo.

Existen muchas referencias a observaciones cualitativas de las actividades inhibitoras de fagos de los extractos bacterianos. (Beumer 1947, 1953)(29)(30)(Weidel 1953)(31)(Weidel an Kollenberger, 1955)(32).

El estudio más intensivo de la actividad inhibitora de antígenos bacterianos purificados fue hecho por Geebel y colaboradores usando *Sh. sonnei* y los fagos de la serie T. Aislaron antígeno de fase II que por tratamiento con calor pierden su actividad y por tratamiento con pancreatina seguido de diálisis y desproteinización por agitación con cloroforme obtuvieron lipopolisacárido que era activo para inhibir el fago T₄.

El mecanismo de la inactivación del PIA es en la mayoría de los casos desconocido. Jesaitis y Geebel (1955)(33) estudiaron la inactivación del fago T₄ por el lipopolisacárido específico aislado de *Sh. sonnei*. La adición de este polisacárido a una suspensión concentrada de T₄ produce un gran aumento en la viscosidad. La observación al microscopio electrónico revela fantasmas del fago y largos filamentos probablemente de DNA.

Materiales y Métodos

a) Cepas bacterianas:

$K_{12}(\lambda)$ W-1895 (M^+ , T^+ , L^+ , B_1^+ , V^+ , S^S , Lac^+ , Mal^+ , Ntl^+ , Xyl^+ , $Ar(\lambda)^+$
Hfr E coli $K_{12}(\lambda)$ (1) (lisogénica). Procedencia
Cold Spring Harbor

K_{12}^W-1485 (cepa indicadora (2) para λ , enviada por el Dr. Evans Jr.
de la Universidad de Chicago E.E.U.U.)

$K_{12}(\lambda)$ 3104 - cepa lisogénica (también enviada por el Dr. Evans)
E. coli B.

52 A cepa de estafilococos.

b) Fagos:

λ 1 (temperado obtenido por inducción de $K_{12}(\lambda)$ 1895 por acción de
la luz U.V.)

λ 2 (temperado obtenido por inducción de $K_{12}(\lambda)$ 3104 con luz U.V.)

λ 3 (mutante virulenta, también enviada por el Dr. Evans).

Fago 52 A de estafilococo. Fago f_2 virulento para E. coli B.

Medios de cultivo

a) Los medios de cultivo utilizados para el crecimiento de las bacterias
 $K_{12}(\lambda)$ W 1895, $K_{12}(\lambda)$ 3104 y K_{12}^W 1485 y la reproducción del fago
(Kaiser A.1955) (19) fueron:

- Medios líquidos:

Caldo triptona: 8 g de bactotriptona Difco; 5 g de cloruro de sodio.

Se lleva a un litro con agua destilada, pH 6.8.

- Solución de sulfato de magnesio $\frac{M}{100}$ en agua destilada.

- Buffer fosfato cloruro de sodio: 0.1 g de sulfato de magnesio, 5 g
de cloruro de sodio. Se lleva a un litro con Buffer fosfato. pH 6.8

(1) Abreviaturas: M(metionina); L(leucina); B(vitamina B_1); V(valina);
S(estreptomicina); Lac (lactosa); Mal(maltosa); Xyl(xilosa). En genética
bacteriana se simboliza el poder de realizar la síntesis de un metaboli-
to esencial dado por el signo más y la pérdida de ese poder por el signo
menos. Hfr(high frequency of recombinants)

(2) Se denota así a las bacterias sensibles a una clase específica de
fago.

Agar sólido para placas:

12 g de bacto agar, 10 g de bacto tryptona, 2.5 g de cloruro de sodio. Se lleva a 1 litro con agua destilada.

Agar blando: 6 g de bacto agar, 10 g de bacto triptona, 2.5 g de cloruro de sodio, se lleva a un litro con agua destilada.

b) Medios para cultivo de E.coli B y reproducción del fago T₂

Caldo: 8 g de caldo nutriente Difco, 5 g de cloruro de sodio. Se lleva a un litro con agua destilada.

Medio M₉-Cloruro de amonio 1g, sulfato de magnesio 0.13 g, fosfato monopotásico 5 g, fosfato disódico 6 g, glucosa 4 g, agua destilada 1 litro.

Medio sólido: 15 g de agar Difco, 8 g de caldo nutriente Difco, 5 g de cloruro de sodio. Se lleva a un litro con agua destilada. Según Adams M. 1959) (24)

Agar blando: Idem que el anterior pero 7 g de agar por litro.

c) Medios de cultivo para estafilococos:

Según Williams R. and Rippon J. 1952 (24)

1) Medio de aislamiento de estafilococos: Peptona 20 g; extracto de levadura 1.5 g; manitol 10 g; púrpura de bromocresol 25 mg; cloruro de sodio 5 g; agar 15 g. Se lleva a un litro con agua destilada.

2) Para cultivo en caldo: trypticase 15 g; fitona 5 g; cloruro de sodio 5 g; cloruro de calcio 5 g. Se lleva a un litro con agua destilada.

Para plaqurear se agregan 15 g de agar a este medio líquido.

4) Medios de cultivo para obtención de protoplastos de K₁₂ (λ) 1895 y K₁₂ W1485. Según Lederberg 1953 (35)

Caldo: Llamado Penassay.

Bacto beef extract 1.5 g; bacto yeast extract 1.5; bacto peptona 5.0 g; glucosa 1 g; cloruro de sodio 3.5 g; fosfato dipotásico 3.68 g; fosfato

monopotásico 1.32 g. Se lleva a un litro con agua destilada. Para la formación de protoplastos se le agrega el caldo anterior sulfatado de magnesio, sacarosa y penicilina. La concentración final de estos reactivos es 0.01 M, 0.5 M y 1000 u/ml. respectivamente.

Medio de mantenimiento:

Buffer tris 0.02 M; pH 7,3; sacarosa 0.25 M y sulfato de magnesio 0.02 M.

- Medio sólido para recuento de protoplastos en placa, según Ryan y Okada 1953 (36)

Se utiliza el medio líquido penassay con el agregado de sacarosa 20%, sulfato de magnesio 0.02 M con 7 moléculas de agua y agar 1%.

- Para recuento de los bastones de coli se utiliza agar nutriente. Para determinar el número de protoplastos presentes por ml. de cultivo, se resta el número de colonias que crecen en el agar nutriente (donde no pueden crecer los protoplastos) del número de colonias de protoplastos y bacterias que crecen en el medio agar - penassay.

Todos los medios de cultivo se esterilizaron en autoclave. 20 minutos a 1.5 atm. de precisión, salvo los medios conteniendo azúcares que se filtraron a través de filtros Seitz, por vacío.

Métodos

Las cepas de bacterias se mantuvieron en tubos de agar inclinados a 0°C. Los fagos en caldo también se conservaron a 0°C. Las cepas bacterianas perpetuaron por repiques semanales, de agar inclinado a agar inclinado.

Las placas de agar conteniendo de 25 a 30 mg de agar sólido se dejaron secar en estufa a 37°C una noche y una hora antes de plaquar se abrieron para completar el secado, pues de otro modo el agua de condensación al caer sobre las placas producidas por el fago, impiden su uso cuantitativo.

El agar blando antes de ser usado se reparte en tubos de hemólisis en cantidad de 2.5 ml de agar por tubo.

La técnica seguida para el recuento del número de placas producidas por el fago (Gratia 1936 n° (37)) es la siguiente: Se mezclan un inóculo de 0.01 mg de fago en la dilución adecuada con bacterias huéspedes (3 gotas de un cultivo visiblemente turbio) en un tubo de agar blando mantenido fundido a 46° C en un baño de agua y la mezcla se derrama sobre una placa de agar sólido, cuidando que cubra toda la superficie.

Cuando el agar blando se endurece, se incuban las placas a 37°C 18-20 horas con la tapa hacia arriba. Las placas producidas por los fagos aparecen como agujeros transparentes contra el fondo opaco del coque bacteriano.

Las placas producidas por un fago inducido por luz U.V. son variables en tamaño cuando se las placa, sobre un inóculo de bacterias obtenido por lavado de un agar estria de 18 horas con caldo. Por este motivo, siguiendo la técnica de A. Eaiser 1955 (1), las bacterias resuspendidas en caldo se dejaron burbujear con aire a 37°C de 1.30 a 2 hs. y luego se centrifugaron en una Servall modelo SS-1 20 min. a 10.000 rpm. El sedimento obtenido se resuspendió con sulfato de magnesio $\frac{M}{100}$ y se dejó burbujear a 37°C en baño de agua por una hora. Se utilizaron 3 gotas de esta suspensión como bacterias indicadoras.

El número de placas producidas por el fago se determinó con un contador de colonias provisto de un registrador eléctrico. Una vez conocido el número de placas de la dilución empleada, se puede saber el número de fagos presentes en el cultivo original.

Preparación de stock de fagos

Se utilizaron dos técnicas:

- 1) Lisis de un cultivo en caldo:

Se ~~hicieron~~ ^{hicieron} crecer las bacterias sensibles al fago en caldo durante 1 noche, con burbujeo de aire a 37°C. Con un ml. de este cultivo se

sembraron 50 ml. de caldo estéril; se dejaron 2.30 hs. en estufa a 37°C con burbujeo de aire y al cabo de ese tiempo se les agregó bacteriófagos en cantidad suficiente para infectar las bacterias presentes por lo menos en la razón de 0.5. Luego se dejaron en estufa por 2 a 2.30 hs. Se centrifugaron en un Servall 88-1 a 0°C 1 hora a 10.000 rpm. para sedimentar bacterias remanentes. El sobrenadante se trató con cloroformo que luego fue eliminado por burbujeo con aire a 37°C. El caldo con los fagos se distribuyó en tubos que se guardaron a 0°C y luego se determinó su título por plaqueo. Se hicieron determinaciones para conocer si el cloroformo no inactivaba el fago, pero si bien se observa una inactivación del 48% (no alcanza a una cantidad logarítmica), es la única forma en que se pudo asegurar la esterilidad de los cultivos.

El título del fago así obtenido alcanza a 10^8 en el caso de γ virulento y 10^5 en el caso del fago temperado porque en este último caso para las bacterias que adsorben el fago se lisogenizan y nosse lisan.

2) Método de lisis confluyente según Swamstrom y Adams (1951) (36).

Se prepararon 30 placas de agar sólido y igual número de tubos conteniendo 3 ml de agar blando. Estos tubos se fundieron en baño de agua a ebullición y luego se pasaron a un baño a 46°C. Se agregó a cada tubo una cantidad de bacterias suficientes para producir un coágulo bacteriano y a 0.1 mg. de fago de una dilución capaz de producir un número de placas tan elevado como para provocar lisis confluyente. Se incubaron a 37°C una noche. Luego se agregó a cada placa 5-10 ml. de caldo, se dejaron en reposo 30 min. y con ayuda de una espátula de vidrio se raspó el agar para separar la capa superficial, pasándose todo a un frasco. El cultivo se agitó para deshacer los grumos de agar los que se separaron por centrifugación a 1000 rpm 20min. El sobrenadante se trató luego según el método 1. En esta forma se obtuvieron títulos de ϕ virulento de

10¹¹ part/ml. y del temperado de 10⁸ part/ml. usando como bacterias sensibles K₁₂ W 1895.

Inducción del fago temperado por la acción de la luz U.V.

Se utilizó una lámpara gemicida General Electric de 15 W con un 80% de emisión en la zona del ultravioleta de longitud de onda de 25 a 27Å . Para determinar la distancia y el tiempo de irradiación necesarios para producir inducción se calibró la lámpara por el método biológico.

a) Calibración de la lámpara.

Para los fagos de E.coli T₁ - T₇ la inactivación por la luz U.V. a 25-37Å es una función exponencial de la dosis de irradiación. (Luria SE. 1947)(39) lo cual indica que la inactivación se debe a que un cuanto será probablemente efectivo si es adsorbido en un sitio vulnerable. Bajo condiciones constantes de experimentación, la velocidad de inactivación del fago sigue la ecuación.

$$-\frac{dp}{dt} = Kp \quad \text{ó} \quad \lg_e \frac{p_0}{p} = Kt.$$

Se llega así a la unidad fisiológica de irradiación en la cual la dosis de ultravioleta es expresada en términos de la inactivación del fago en vez de expresarla en ergios. Esto permite la duplicación de los experimentos en distintos laboratorios, sin necesidad de calibrar la lámpara en ergios. Se utilizaron técnicas de acuerdo al trabajo de Luria Laterjet 1947 (40) para calibrar la lámpara usada. Se hicieron crecer bacterias E. coli B en medio de M₉ usado debido a su transparencia a la luz U.V. Se infectaron con fago T₂ y se dejó que éste se reprodujera. Luego se separaron las bacterias por centrifugación. La irradiación del fago T₂ se realizó en placas de Petri a 56 cm. de la lámpara, que tenían 5 ml. del cultivo del fago y agitando durante la irradiación. El espesor de la capa era de 3 mm. Antes de comenzar la irradiación se sacaron a 0.1 mg. para determinar el título original del fago. A inter-

valos de tiempo determinados, se extrajeron muestras de 0. 1 ml. y se plaquearon sobre E. Coli B.

Los resultados estan tabulados en el cuadro I y II

C U A D R O I

Inactivación del fago T₂ por efecto de la luz ultravioleta

Tiempo de Irrad.en seg.	Título	Supervivencia del fago	% de mortalidad
0	$3,4 \times 10^9$	1	0
5	6×10^8	$1,7 \times 10^{-1}$	82,4
10	1×10^8	$2,4 \times 10^{-2}$	97,06
15	1×10^7	$2,3 \times 10^{-3}$	99,7
20	3×10^6	$8,8 \times 10^{-4}$	99,92
25	$2,8 \times 10^5$	$8,2 \times 10^{-5}$	99,994
30	$1,4 \times 10^{-5}$	$4,0 \times 10^{-5}$	99,996

El título original del fago utilizado en el cuadro II, fue menor que en el caso anterior, era liofilizado del cultivo anterior, resuspendido en el medio B₉. Los resultados fueron concordantes, a partir de los 15 segundos; los valores se determinaron por duplicado.

C U A D R O II

Tiempo de Irrad.en seg.	Título	Supervivencia del fago	% de mortalidad
0	$2,2 \times 10^6$	1	0
3	$7,1 \times 10^5$	$3,2 \times 10^{-1}$	67,8
10	$1,2 \times 10^5$	$5,4 \times 10^{-2}$	94,6
15	$2,4 \times 10^4$	$1,1 \times 10^{-2}$	98,8
20	$3,5 \times 10^3$	$1,5 \times 10^{-3}$	99,8
25	$6,0 \times 10^2$	$2,6 \times 10^{-4}$	99,9

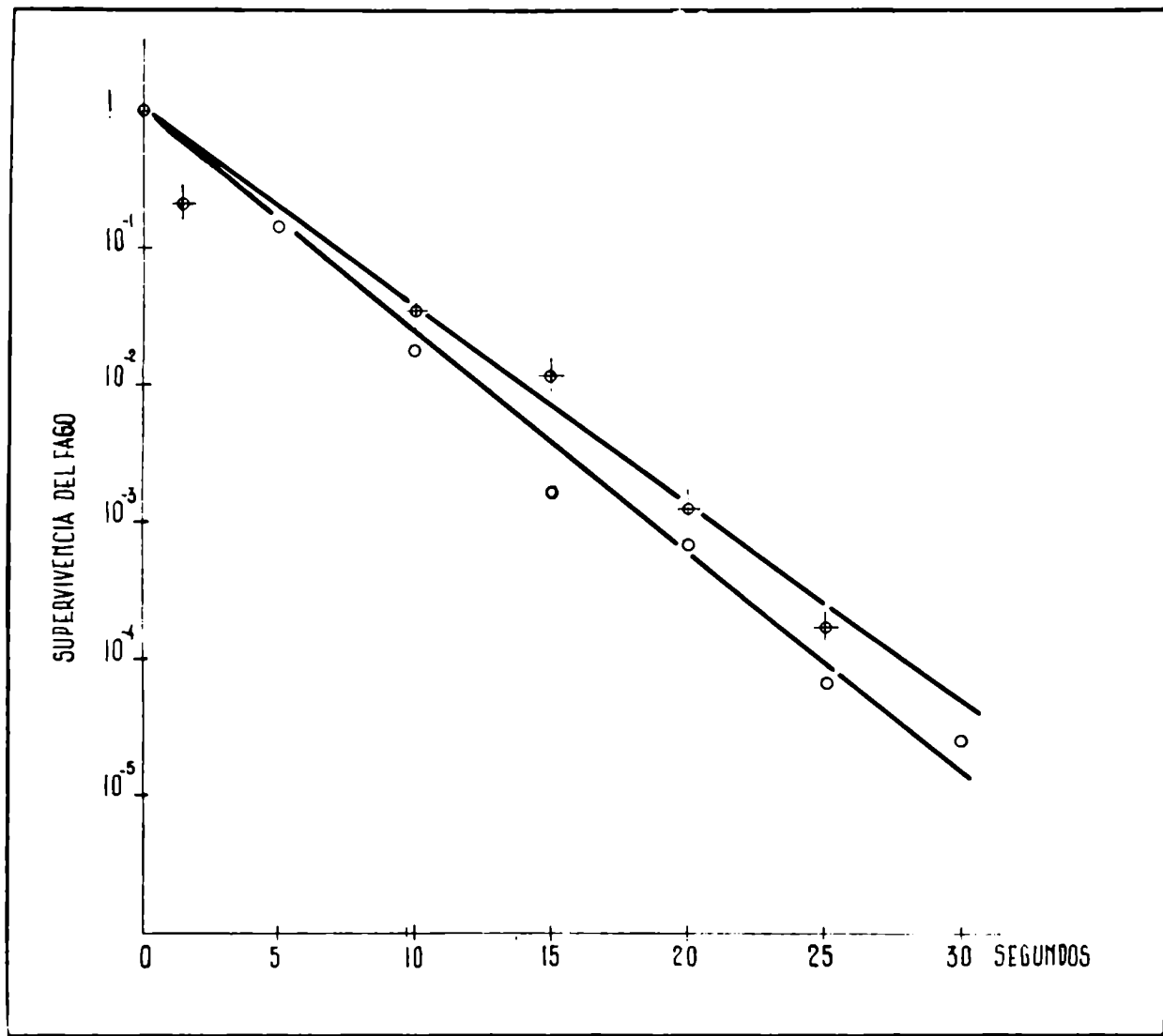


Figura 1,1'. Inactivación del fago T₂ por efecto de la irradiación con luz ultravioleta.
o.figural.♦.figura 1'.

Se debe trabajar en la oscuridad para evitar la fotoreactivación (m)

(m) Si se iluminan bacterias infectadas con fago irradiado con luz ultravioleta, se obtiene una progenie viable de fagos. Este fenómeno llamado fotoreactivación, no ocurre si las bacterias se mantienen en la oscuridad.

Entre los 15 y 20 segundos el 99% del fago presente ha sido inactivado, lo que corresponde según los datos de Luria y Latarjet a una energía de 100-250 erg/mm^2 . Como lo indican varios autores, la dosis óptima para inducir el fago es la que determina una mortalidad del 99% del fago T₂, por ello se eligió 15 segundos como dosis adecuada. Con los datos de los cuadros I y II se construyeron los gráficos 1 y 1'.

b) Inducción

Se preparó un cultivo de K₁₂^W 1895 en caldo con burbujeo a 37°C, durante 18-20 hs. que luego se centrifugó a 10.000 rpm. 20min. a 0°C. El sedimento se resuspendió en buffer fosfato cloruro de sodio con el agregado de sulfato de magnesio a 0.01 M y se dejó en la estufa a 37°C 30min. Luego se distribuyó en cajas de Petri colocando 5 ml. de este cultivo en cada caja, se irradió 15 segundos a 56 cm. de la lámpara, agitando el líquido por rotación de la caja de Petri. El líquido irradiado se recogió con pipeta. Se pasó a otro recipiente que contenía caldo para restituir materiales nutrientes al medio y se dejó en estufa 2.30 horas, se separaron las bacterias por centrifugación, el sobrenadante se trató con cloroformo y luego se tituló. El título del fago obtenido en esta forma, es del orden de 10⁵ fagos por ml.

Determinación del número de bacterias por ml. de cultivo

El número de bacterias presentes por ml. de cultivo se determinó por turbidimetría, utilizando un fotocolorímetro CRUDO CAAMAÑO con filtro rojo 67. Como blanco se usó buffer fosfato cloruro de sodio. antes de efectuar las lecturas, las bacterias se centrifugaron y luego se resuspendían en buffer. Con el porcentaje de transmisión leído se determinó

la concentración bacteriana por interpolación en una curva construida de acuerdo al método de Mc Farland (4).

El dato obtenido se multiplicó por un factor que se calculó comparando los valores de la escala de McFarland con el número de colonias producidas por el cultivo de bacterias K₁₂ (γ) en placas de agar.

Obtención de inmune suero

Se preparó inmune suero de conejo contra fago de acuerdo a la técnica de Adams M. (28) pág. 461.

Se inocularon tres conejos albinos con 5 ml. de un cultivo de fago en caldo de concentración de 10¹⁰ fagos/ml.-Las inoculaciones se efectuaron dos veces por semana durante tres semanas consecutivas. Los animales se dejaron descansar una semana y luego se sangraron por punción cardíaca. El suero se conservó a -20°C.

Determinación del período latente del fago

Se realizó con la técnica que cita Adams M. 1959 pág. 473 (28).

Para los medios de cultivo usados se encontró un período latente de 40-45 minutos.

Obtención de protoplastos (Método de Lederberg 1956)(35)

Se preparó un cultivo de bacterias K₁₂ (γ) 1895 ó K₁₂ W 1485 en caldo tenassay a 37°C y con burbujeo de aire, hasta alcanzar una concentración de 1 x 10⁹ bacterias por ml. Cada 3 ml. de este cultivo se diluyeron con 10 ml. del mismo caldo con el agregado de sacarosa, penicilina y sulfato de magnesio. El cultivo se colocó nuevamente a 37°C y al cabo de 2 horas se obtuvo una conversión casi completa de bacterias a protoplastos.

Estos fueron observados en el microscopio de contraste de fase. Del cultivo se extrajo una alícuota y se plaqueo para determinar el número de protoplastos presentes. Después se centrifugaron a 8.000 rpm. 15 min. a 0°C el sedimento se resuspendió en buffer Tris sacarosa.

Obtención de lisados bacterianos

a) A partir de un cultivo de bacterias.

Se sembraron cinco botellas de Roux, conteniendo 200 ml. de agar sólido con 10 ml. de un cultivo de bacterias en caldo (10^8 bacterias/ml.). Las botellas permanecieron 18 horas a 37°C y el césped bacteriano obtenido se recogió con caldo y con ayuda de una varilla de vidrio. La concentración de las bacterias resuspendidas en el caldo era de 10^{10} bacterias por ml. -

Este cultivo se colocó en una prensa (French Press) previamente enfriada y se sometió a una presión de 6-8 Ton/cm², regulando la salida del líquido gota a gota.

Se obtuvo un líquido viscoso observandose una disminución en la turbiedad respecto del cultivo original. Este lisado se centrifugó a 0°C a 16000 rpm. durante 40 minutos. Todos los lisados se conservaron a 0°C. Algunos lisados se obtuvieron lavando las bacterias y resuspendiendo en solución fisiológica en vez de caldo.

b) De un cultivo de protoplastos

La ruptura de los protoplastos se produce cuando hay un descenso en la tensión superficial del medio que los contiene. Según Wimmer (42) se produce la lisis por dilución del cultivo en cinco o seis veces su volumen en agua destilada y con agitación durante 30 a 40 minutos.

Para conocer la dilución adecuada para lisar los protoplastos y el líquido de resuspensión mas conveniente se realizó el siguiente experimento (modificación al trabajo de Rein and Argaman)(43).

Se determinó la densidad óptica del cultivo de protoplastos, resuspendidos en buffer Tris sacarosa a 500 m en un espectrofotómetro Zeiss. Se tomaron alícuotas de este cultivo de 0.1 ml. y se diluyeron en 4 ml. de agua destilada; 4 ml. de solución fisiológica, 4 ml. del buffer Tris

sacarosa, a 0.25 y 4 ml. de buffer Tris sacarosa 0.25 M, respectivamente. Se usó como blanco la solución de buffer luego se dejaron 30 min. a temperatura ambiente. La lectura de la δ óptica de la dilución 0.1 en 4 buffer tris sacarosa 0.25 M al tiempo cero, era 0.40.

Al cabo de 30 minutos se observaron los siguientes valores para cada solución:

C U A D R O III

Líquido de resuspensión		D.óptica a 500 m μ
Buffer-Tris sacarosa	0.25 M	0.40
Buffer-Tris sacarosa	0.125	0.40
Agua destilada		0.14
Cloruro de sodio	8.50 o/oo	0.14

En otra determinación: con una lectura de δ óptica 0.30 para buffer Tris sacarosa 0.25 M, a tiempo cero se obtuvo:

C U A D R O IV

Líquido de resuspensión		D.óptica a 500 m μ a los 30 min.
Buffer-Tris sacarosa	0.25 M	0.30
" " "	0.125 M	0.30
Agua destilada		0.10
Cloruro de sodio	8.50 o/oo	0.00

Se puede observar que tanto el agua destilada como la solución ClNa 8.50 o/oo son suficientes como para producir la lisis de los proto-

plastos. De acuerdo a los resultados anteriores para diluir los proteoplastos se usó agua destilada en la proporción 1 ml. de cultivo y 40 ml. de agua.

Los lisados de protoplastos producidos por dilución tienen el inconveniente que la sustancia o sustancias responsables de la acción inhibitoria sobre los fagos están muy diluidos. Esto se demostró en la contradicción de los resultados obtenidos con estos lisados.

Se ensayó entonces producir lisado utilizando la French Press. Los proteoplastos se concentraron por centrifugación, se reuspendieron en buffer-fris sacarosa y luego se prensaron.

Ensayos de inhibición del fago por efecto de los lisados.

Estos ensayos se realizaron diluyendo el fago a aproximadamente 5×10^6 partículas en 1,8 ml. del lisado en estudio. Como control se usó caldo en lugar de lisado.

El fago con el lisado y el control se colocaron luego en un baño de agua a 37°C y se dejaron 30 min. en contacto.

Inmediatamente se pasaron los tubos a un baño de hielo y se sacaron partes alícuotas que se diluyeron en caldo y se plaquesaron.

Todos los experimentos de inhibición se efectuaron siguiendo el esquema anterior.

Las modificaciones al mismo se explicaran en cada caso.

Resultados

La acción del lisado de bacterias lisogénicas K₁₂ (λ) W 1895 sobre el fago virulante se puede ver en el cuadro V. Se utilizaron como bacterias indicadoras las K₁₂ W 1485.

C U A D R O V

Efecto del lisado de bacterias lisogénicas sobre la infectividad del fago λ virulente.-

Nº de cajas usadas	Lisado - fago Nº de placas promedio	Caldo - fago (Control) Nº de placas promedio	% de inhibición
9	69	134	49
6	8	38	77
6	58	304	81
4	53	317	84
4	41	358	89
4	367	1400	75
3	23	180	87
4	52	193	75
4	175	613	72
4	53	610	91
6	81	309	93

Estos resultados se obtuvieron utilizando diferentes lisados frente a stocks de fagos.

El efecto del lisado de K_{12} (λ) W 1895 sobre el fago λ temperado obtenido por acción de la luz U.V. sobre la misma cepa se registró en el cuadro VI.

La cepa de bacterias indicadoras salvo especificaciones fue en todos los casos la K_{12} W-1485.

C U A D R O VI

Efecto del lisado de bacterias lisogénicas sobre el fago γ
temporado

Nº de cajas usadas	Lisado - fago (Nº de placas promedio)	Caldo - fago Control (Nº de placas promedio)	% de inhibición
3	74	68	0
3	374	258	0
3	161	150	0
4	112	91	0
3	375	94	0
4	155	41	0
3	245	198	0
X 3	173	120	0
3	246	96	0
XX 3	204	77	0

X 45 minutos de contacto a 37°C

XX 60 minutos de contacto a 37°C

Se observa que no solamente no hay inhibición, sino que en la mayoría de las determinaciones se produce un aumento en el número de placas cuando el lisado está presente.

En todo cultivo de bacterias lisogénicas existe fago libre.

Por este motivo se pensó que en el lisado podría existir fago libre, que fuera el responsable del aumento en el número de placas.

Para comprobar esta posibilidad se plaqueó lisado diluido en las mismas condiciones que el que se colocó en contacto con el fago.

El número de placas producidas osciló entre cero y cinco según los

stocks de lisados.

Se investigó el efecto del lisado sobre los fagos que infectan a la cepa de estafilococos 52A. Esta cepa se usó como indicadora.

Se pudo comprobar que no se produce inhibición del fago. El lisado de las bacterias lisogénicas también se probó frente al fago T_2 al cual ellas son sensibles. Se encontró una inhibición del 95% del lisado frente al fago T_2 como indicadora se usó E. coli B.

Los lisados de la otra cepa lisogénica K_{12} (λ) 3104 resultaron ser activos frente al fago λ virulento pero no frente al λ temperado. La acción inhibitoria del lisado de protoplastos sobre el fago virulento y el fago λ temperado se registran en los cuadros VII y VIII respectivamente.

C U A D R O VII

Efecto del lisado de protoplastos de K_{12} (λ) W 1895 sobre fago λ virulento

Nº de cajas	Lisado - fago (Nº de placas promedio)	Caldo - fago (Control) Nº de placas promedio	% de inhibición
6	59	98	40
3	372	568	35
6	488	622	22

El lisado se obtuvo por dilución.

C U A D R O VIII

Efecto del lisado de protoplastos de K_{12} (λ) W 1895 sobre λ temperado

Nº de cajas	Lisado - fago (Nº de placas promedio)	Caldo - fago (control) Nº de placas promedio	% de inhibición
3	127	146	0
4	305	361	0

Se puede observar que el poder inhibitorio de estos lisados es inferior al del lisado de bacterias.

Paralelamente se estudió el efecto del lisado de bacterias indicadoras K_{12} W 1485 frente a λ virulento y al λ temperado.

Los resultados están tabulados en el cuadro IX

C U A D R O IX

Efecto del lisado de K_{12} W 1485 sobre el fago virulento y fago temperado

FAGO VIRULENTO			
N° de cajas	Lisado+fago (N° de placas promedio)	Caldo+fago (N° de placas promedio)	% de inhibición
3	75	180	59
3	204	800	75
4	46	193	77
FAGO TEMPERADO			
3	11	6	0
3	23	38	0
3	204	198	0
3	131	120	0

Propiedades del lisado de bacterias lisogénicas K_{12} (λ) W 1895

1) Estabilidad frente a la temperatura

Se estudió la acción de la temperatura sobre las propiedades inhibitorias del lisado. De acuerdo a los resultados antes descriptos, se utilizó en las pruebas fago λ virulento.

0°C

El lisado se mantiene estable durante un mes a 0°C. Los lisados se guardaron a 0°C durante todos los experimentos sin pérdida sensible de su actividad.

56°C

Se repartió el lisado en tubos de hemólisis que se colocaron en un baño de agua a 56°C. A los tiempos indicados en el cuadro IX se retiró un tubo del baño y se enfrió rápidamente en baño de hielo. Luego se probó su acción frente al fago incubando 30 min. a 37°C según lo explicado anteriormente. En todos los experimentos realizados con el lisado los datos obtenidos son promedio de 3 cajas como mínimo.

T C U A D R O X

Efecto de la temperatura (56°C) sobre el poder inhibitorio del lisado

Tiempo de calentamiento del lisado (minutos)	Nº de placas	% de inhibición
0	64	72 n
5	159	30
10	149	44
20	169	25
25	165	25
30	149	44

n El % de inhibición se calculó de acuerdo a un control de caldo más fago que dió un número de 224 placas.

100°C

El lisado se trató como se explicó a 56°C, solamente que se colocaron los tubos en un baño de agua hirviente. Los resultados se tabularon en el cuadro XI.

C U A D R O X I

Efecto del calentamiento a 100°C sobre el poder inhibitorio del lisado

Tiempo de calentamiento del lisado (minutos)	N° de placas	% de inhibición
0	53	87
5	232	42
10	222	44
30	311	22

El control del fago en caldo dió un número de 398 placas.

2) Efecto enzimático sobre el lisado

a) Ribonucleasa.

Se incubó el lisado a 37°C durante 45 minutos con una solución acuosa de ribonucleasa pura en concentración de 10 µg. de enzima por ml. Después del tiempo indicado se colocó este lisado en contacto con el fago y se determinó su poder inhibitorio. Simultáneamente se hicieron controles. Uno en caldo y el otro colocando fago en una solución con la misma concentración de ribonucleasa que el lisado.

b- Desoxirribonucleasa.

Se trabajó en las mismas condiciones que con ribonucleasa.

Los resultados de la acción de ambas enzimas se pueden ver en el cuadro XII.

C U A D R O X I I

Acción de la RNasa y la DNasa sobre el poder inhibitorio del lisado

	N° de cajas	N° de placas	% de inhibición
Lisado+fago	6	64	81
Lisado+RNasa+fago	6	53	83
Lisado+DNasa+fago	6	58	83
fago + RNasa	6	304	0
fago + DNasa	6	324	0
Control	6	330	-

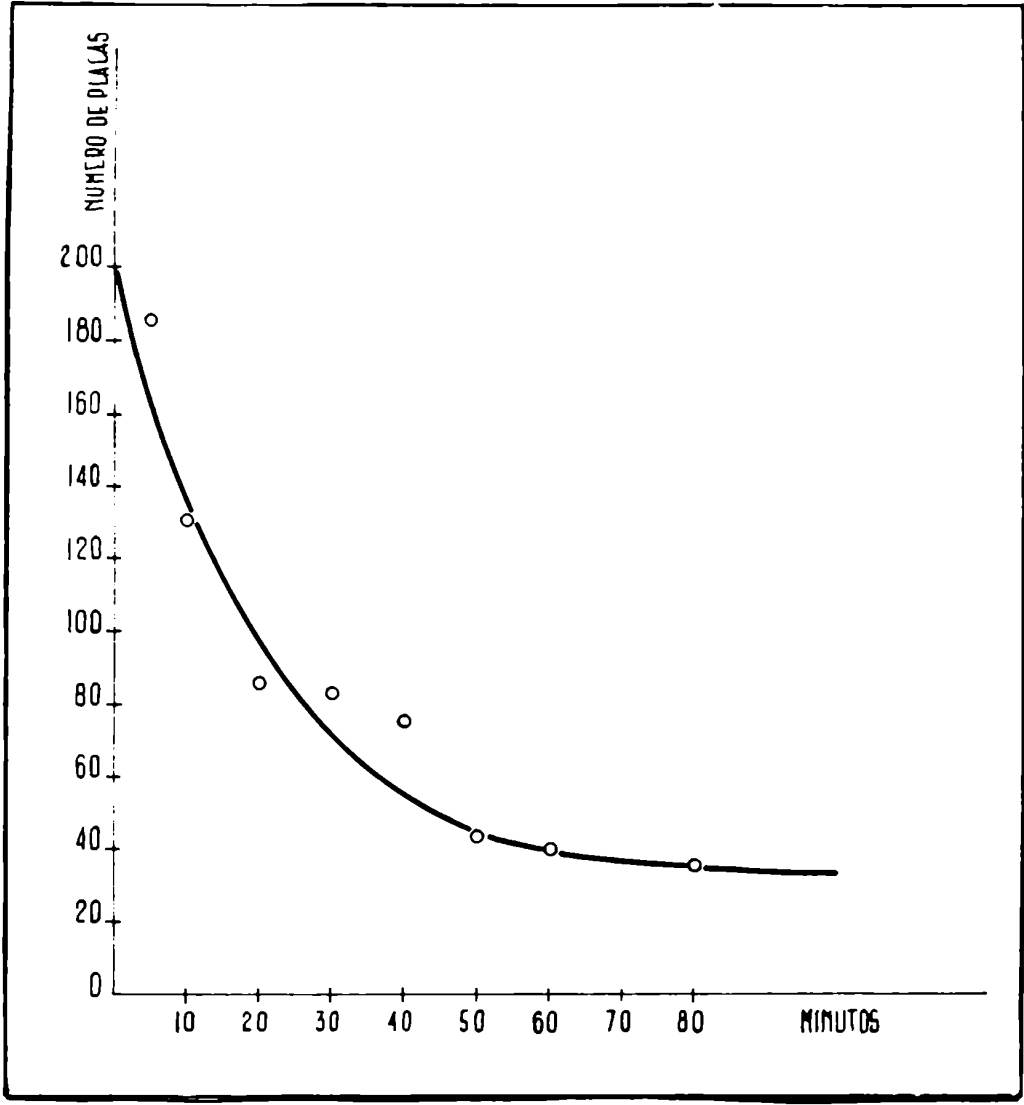


Figura 3: Cinética de la inactivación del fago λ virulento a 37°C, por efecto del lisado de bacterias lisogénicas.

e. Tripsina.

Se incubó el lisado con 250 /ml. de tripsina durante 30 minutos a 37°0. Luego se probó su acción inhibitoria. Previamente se incubó tripsina con fago. Los resultados figuran en el cuadro XIII.

C U A D R O XIII

Efecto de la tripsina sobre el lisado

	N° de cajas	N° de placas	% de inhibición
Lisado+fago	5	153	42
Lisado+tripsina+fago	5	260	0
Control	5	260	-

-Efecto de la dilución sobre la actividad del lisado.

Se hicieron diluciones crecientes del lisado en caldo comenzando por una dilución al medio. La concentración de fago se mantuvo constante. Los resultados en el cuadro XIV.

C U A D R O XIV

Variación del poder inhibitorio del lisado en función de la dilución

Diluciones en caldo	n° de placas	% de inhibición
1/2	41	88
1/4	55	85
1/8	75	80
1/16	158	56
1/32	207	45
Control	358	-

El control produjo 358 placas. Los resultados son promedios de cinco cajas.

- Precipitación con tricloroacético .

- El lisado se precipitó por agregado de ácido tricloroacético al 10% en frío. El precipitado formado se separó por centrifugación, al sobrenadante se le agregó nuevamente tricloroacético sin producirse nuevas precipitaciones.

El precipitado se dispersó en buffer-fosfato pH 7.0 hasta conseguir su solubilización. El sobrenadante se llevó a pH.7.0 por el agregado de hidróxido de sodio 0,1N.

El precipitado resuspendido llevado a volumen y el sobrenadante, se incubaron con el fago obteniéndose los siguientes resultados:

C U A D R O X V

Actividad inhibitoria del precipitado y sobrenadante del lisado tratado con ácido tricloroacético

	Número de placas	% de inhibición
Lisado	56	65
Sobrenadante	198	0
Precipitado	43	81
Control	220	-

- Diálisis

Se dializó el lisado crudo 18 hs. a 4°C contra agua destilada.

Luego se probó frente al fago. Los resultados indican que dializa parcialmente.

- Ultracentrifugación del lisado

El lisado se ultracentrifugó en una Spince Modelo L utilizando el rotor 40. Después de probar la sedimentación a diferentes velocidades, se estudió si sedimentaba a los g. que sedimenta el fago, o sea 150 minutos a 37.000 g. Se encontró que el sobrenadante carece de actividad inhibitoria. Toda la actividad permanece en el sedimento. El hecho que tanto el fago como el lisado puedan sedimentar con igual número de g.

impidió el estudio del comportamiento del lisado una vez saturado todo el fago presente.

- Actividad de un lisado purificado por gradiente de sacarosa

Un cultivo de bacterias de 10^{10} bacterias /ml. se centrifugó 30 minutos a 10.000 rpm. El sobrenadante (3 ml) se colocó cuidadosamente en la capa superior de un gradiente de sacarosa.

El gradiente se preparó con soluciones de sacarosa de densidades decrecientes desde 1.30 a 1.025 variando en 0.25. Luego se dejó 18 hs. a 4°C. Después de agregar el lisado al gradiente se centrifugó a 2.700 rpm. en una centrifuga Internacional (rotor 269) 1,75 hs.

Al extraer el tubo se pudieron observar tres capas, de acuerdo a los autores del método Roberson y Schwab 1960 (44) en la capa superior se tienen los contenidos citoplasmáticos de la bacteria rota. En la capa media se pueden recoger las membranas bacterianas y en el fondo sedimentan bacterias enteras y parte de las membranas. Este método diseñado por los autores antes nombrados tiene por objeto purificar membranas; para ello trabajan con el sedimento de la primera centrifugación.

En nuestro caso el objeto era purificar el lisado y separarlo de las membranas.

Cada cepa obtenida (superior y media), se estudiaron en el microscopio con contraste de fase.

No se observaron restos de membranas o bacterias enteras en ninguna de las dos fracciones.

Cada fracción se probó frente al fago λ virulento para conocer su poder inhibitorio, encontrándose actividad en ambas.

Cinética de la inhibición del fago λ virulento

El fago diluido se colocó en un tubo con lisado a 37°C. a intervalos de tiempo indicados en el cuadro XVI. Se extrajeron muestras de 0.2 ml. y se plaquearon. Simultáneamente se plaquearon controles con caldo en lugar del lisado, al tiempo inicial, a los 30 y 80 minutos mantenidos a 37°C.

C U A D R O XVI

Disminución del número de placas producidas por el fago en función del tiempo de contacto con el lisado

Tiempo de contacto (minutos)	N° de placas
5	186
10	131
20	86
30	83
40	76
50	43
60	40
80	36
30 control	201
80 control	170

La cinética de la inhibición se puede ver en la figura 3.

Temperatura óptima para el contacto del fago y del lisado

Se trabajó con un lisado diluido 1/8 en caldo.

Se colocaron los tubos con lisado a las temperaturas de 0°C, 37°C y 56°C. Cuando cada líquido alcanzó la temperatura requerida se agregó a cada tubo 0.2 ml. de fago diluido, se dejaron 30 minutos en contacto. Pasados los 30 minutos se enfrió rápidamente, se diluyó y se plaquéó. Los resultados del cuadro XVII indican que la temperatura óptima de unión de fago con lisado pierde actividad a partir de los cinco minutos de calentamiento.

C U A D R O XVII

Temperatura °C	% de inhibición
0	41
37	71
56	0

■ Se produjo un mayor número de placas que el control.

Los % de inhibición se calcularon respecto a los controles que también se sometieron a las mismas temperatura.

- Efecto del caldo de cultivo sobre el fago

Se preparó un cultivo de bacterias según se explicó antes.

Luego se centrifugó para separar las bacterias. El sobrenadante se colocó en contacto con fago. No se encontró que el caldo del cultivo tuviera actividad inhibitoria.

Para dilucidar si el lisado actuaba protegiendo a la bacteria formando una capa protectora que la rodeara se diseñó el siguiente experimento: Un cultivo de bacterias indicadoras en agar inclinado se resuspendió con lisado puro. Otro tubo en iguales condiciones se resuspendió con caldo. Se igualaron las concentraciones de bacterias por ml. en ambos tubos. Las bacterias se incubaron 30 min. a 37°C, del tubo de bacterias con lisado se sacó una alícuota que se centrifugó para sedimentar las bacterias. Estas fueron lavadas con solución fisiológica y resuspendidas en caldo.

Cada una de estas tres suspensiones se utilizaron como bacterias indicadoras, para ello se agregaron a tubos con agar blando junto con una dilución adecuada de fago.

Los resultados indican que no hay inhibición del fago ni usando las bacterias lavadas, ni las incubadas con lisado sin lavar.

De acuerdo a los resultados ya expuestos se ha visto que el lisado no tiene acción sobre el fago λ temperado. Se investigó si el lisado se unía al fago temperado aunque no le modificara,

Para ello se utilizó el hecho que la bacteria lisogénica es inmune a su propio fago.

Se incubó un lisado de bacterias lisogénicas con λ temperado 30 min. a 37°C. Cumplido dicho tiempo se agregó a la mezcla anterior fago virulento y se incubó nuevamente 30 min. a 37°C. Después se diluyó

y se plaqueó utilizando la $K_{12}(\lambda)$ W 1895 como cepa indicadora. Simultáneamente se plaquearon tres controles que se detallan en el cuadro XVIII juntamente con los resultados.

C U A D R O XVIII

Efecto del lisado sobre el fago virulento después de haber estado en contacto con el fago temperado

	N° de placas	% de inhibición
fago temperado en caldo (control)	0	-
fago virulento con lisado	59	80
fago virulento en caldo (control)	300	-
fago temperado con lisado (control)	0	-
fago virulento + fago temperado + lisado	84	72

De acuerdo a los resultados antes expuestos en los cuadros V y IX, podemos afirmar que los lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas inhiben el fago λ virulento, al cual son sensibles. En cambio estos lisados no inhiben la acción del fago λ temperado (cuadros VI y IX) sobre las bacterias sensibles.

Los lisados de protoplastes se comportan en la misma forma que los lisados bacterianos (cuadros VII y VIII), aunque su poder inhibitorio es cuantitativamente menor al de éstos últimos.

El lisado de bacterias lisogénicas es estable a 0°C por más de 30 días. A 56°C se puede concluir según el cuadro X, que existe en el

lisado un factor lábil. Este se destruye rápidamente a los 5 minutos de calentamiento; la actividad del resto permanece inalterada a partir de los 10 minutos.

El calentamiento a 100°C destruye casi por completo la actividad del lisado a los 10 minutos (cuadro XI).

El hecho que la RNasa y DNasa no actúen sobre la actividad del lisado (cuadro XII) descartan la posibilidad de que el efecto de inhibición se deba a la presencia de ácido nucléico.

La sensibilidad del lisado a la temperatura y la acción de la tripsina (cuadro XIII) está indicando la presencia de una sustancia de naturaleza proteica, que puede ser precipitada por el agregado de ácido tricloroacético. De acuerdo a los resultados del cuadro XVII, la temperatura óptima de contacto entre el fago y el lisado es de 37°C.

La cinética de la inhibición del fago a 37°C (figura 3) corresponde a una reacción de primer orden. Hasta los 20 minutos la reacción procede rápidamente, luego se hace más lenta hasta que a partir de los 50 minutos la reacción se detiene.

El efecto inhibitorio del lisado se debe probablemente a una interacción directa con la partícula del fago. Esta conclusión se deduce de los resultados obtenidos incubando bacterias con lisado y luego infectándolas con fago. Por otra parte, cuando se plaquea, se efectúa una dilución del lisado del orden 1/10.000 de modo que es imposible que tenga actividad sobre las bacterias puesto que se encuentra en concentración muy baja.

El fago temperado, en cambio, parece que no reacciona con el lisado de acuerdo a lo expuesto en el cuadro XVII.

Discusión:

De los resultados obtenidos son destacables dos hechos: el primero, la reducción de la capacidad infecciosa del fago γ virulento, por efecto de los lisados de las bacterias lisogénicas. El segundo, que esos mismos lisados no alteran en ningún grado la capacidad infecciosa del fago γ temperado y por el contrario parecen exacerbarla.

Respecto del primer punto los resultados que aquí se presentan concuerdan con los de investigadores que trabajaron con otros sistemas de extractos de bacterias - fago.

Según Beumer y Dirks (1960) (45), los bacteriófagos se fijan e inactivan en forma específica por las sustancias extraídas de las bacterias sensibles. Estas sustancias no serían otras que los receptores de la superficie bacteriana sobre la que los fagos se fijan en el momento de la infección y que son los que condicionan la sensibilidad de la bacteria a un bacteriófago dado.

Una confirmación de esta afirmación la hallamos en los trabajos de Goebel y colaboradores. W. Goebel en 1950 (46) encontró que los antígenos extraídos de *Shigella sonnei* fase II inactivaban a los fagos T_3 , T_4 y T_7 a los que la bacteria es sensible. Pero no inactivaban a los fagos T_2 y T_6 a los que también es sensible.

Sin embargo, en un trabajo posterior Jessitis y Goebel (1952) (47) lograron mejorar la técnica de extracción del antígeno y consiguieron inactivar a T_2 y T_6 .

Estos mismos autores en 1952 (48) hallaron que los antígenos extraídos de una bacteria resistente a los fagos T_3 , T_4 y T_7 eran incapaces de inhibir a estos fagos in vitro.

No existen en la literatura estudios detallados del comportamiento de los lisados de las bacterias lisogénicas. Solamente se hace referencia en el trabajo de Beumer y Dirks, ya citado, a los antígenos

extraídos de un bacilo de Lisbonne lisogénico, sin mayores detalles.

De lo observado en este trabajo, no hay diferencias entre el comportamiento de un lisado de bacterias lisogénicas y uno de no, lisogénicas. La presencia del profago no parece influir en el mismo.

Para interpretar la causa del efecto inhibitorio de los lisados, frente al fago virulento, no se pueden interpolar los resultados de los trabajos anteriores al aquí presentado, por la diferencia en las técnicas usadas para obtener los extractos bacterianos.

El estallido de una bacteria por efecto de la diferencia de presión a la que está sometida, no puede producir alteraciones drásticas de los componentes celulares liberados; pero no se puede descartar la posibilidad de que se halla alterado la conformación estérica de los receptores de la bacteria, ni que pasen a solución antígenos solubles.

La centrifugación del lisado elimina la totalidad de las paredes bacterianas (fragmentos grandes) y bacterias remanentes.

Esto fue confirmado mediante tres experimentos:

1°) El lisado se sometió a ultracentrifugación; el sedimento se trató con ácido fosfotúngstico y se observó en el microscopio electrónico. No se encontraron restos visibles de membranas.

2°) Los lisados de los protoplastos inhiben al fago, a pesar de carecer de pared.

Se discute si los protoplastos de las bacterias Gram negativas carecen por completo de pared celular (49) Weibull (1958), pero no se puede discutir el hecho de que la penicilina había inhibido la síntesis de la pared rígida que condiciona la forma de la bacteria.

3°) La purificación del lisado con el gradiente de sacarosa.

El gradiente de sacarosa se utiliza para separar las membranas bacterianas, del resto celular soluble. En este caso se utilizó para liberar del lisado, las membranas que eventualmente pudieran haber quedado, a pesar de la centrifugación. Las observaciones en el microscopio con contraste de fase indicaron que no había restos de membranas en las fracciones superior y media, encontrándose que ambas tenían acción inhibitoria sobre el fago.

Por las razones anteriores se puede pensar que no son los fragmentos celulares los responsables de la inhibición.

B. Sagik (1954)(49) (50) utilizó lisados de bacterias E.coli B. producidas por ultrasonido, que inhibían al fago T_2 , estos lisados podríamos compararlos con los usados en este trabajo que el autor no estudia la causa de la inhibición ni la naturaleza de la sustancia responsable.

Weidel y col.(1960 (1962) (51) (52) analizaron la constitución de las paredes de E. coli llegando a la conclusión que está formada por una pared externa rígida y una membrana interna semipermeable.

Estos dos componentes se diferencian entre sí por su constitución química.

Los mismos autores estudiaron la interacción entre las dos membranas y la serie de los fagos T, encontrando que los receptores de T_3 , T_4 y T_7 están en la capa interna.

Es probable que la centrifugación de los lisados elimine una de las membranas, la de mayor peso, pero no la otra y que ella sea la responsable de la inhibición.

Respecto al segundo punto, el hecho que los lisados no tengan acción sobre el γ temperado no se ha registrado en la literatura.

La falta de inhibición no es fácil de explicar. El fago temperado actúa infectando a las bacterias K_{12} W 1485 como si se tratara de un fago virulento, por lo que sería de esperar que los lisados de esa bacteria lo inactivaran. Lo mismo respecto a los lisados de lisogénicas, porque si bien estas bacterias son inmunes al fago está comprobado que lo adsorben.

Las propiedades de la superficie bacteriana no están alteradas en las bacterias lisogénicas (Bertani, 1958) (9), aunque pueden encontrarse mutantes que han perdido los receptores para el fago, pero este acontecimiento es poco probable.

Se puede entonces aventurar tres hipótesis como explicación de la no inhibición .

- 1°) La ruptura de las células destruye los receptores para el fago temperado.
- 2°) Todos los receptores del fago se eliminaron con la centrifugación.
- 3°) La forma en que el fago temperado se adsorbe a las células es diferente a la del fago virulento.

No se puede confirmar ninguna de las tres hipótesis mediante los resultados obtenidos, pero es posible afirmar que el fago temperado se une a receptores diferentes que el fago virulento.

El aumento de la capacidad infecciosa del fago temperado en presencia de los lisados, indicaría que hay algún proceso que activa la adsorción o restituye a partículas que de otro modo no son virulentos.

Los ensayos con enzimas realizados con el lisado están indicando que una sustancia de naturaleza proteica interviene en la inhibición.

El aumento de la capacidad infecciosa del fago temperado en presencia de los lisados, indicaría que el lisado actúa por algún proceso enzimático liberando partículas agrupadas, o restituyendo las partículas fagos que de otro modo no serían infecciosas.

Conclusiones

1. Se investigó el comportamiento de los fagos λ temperado y una mutante virulenta incubándolos con lisados de bacterias lisogénicas y no lisogénicas.
2. Se encontró que ambos lisados inhiben la capacidad infecciosa del fago virulente pero no afectan al fago λ temperado.
3. Los lisados de protoplastos de esas bacterias se comportan en idéntica forma.
4. Se estudiaron las propiedades del lisado de bacterias lisogénicas.
5. Se encontró que éste es sensible a la temperatura, que se inactiva por acción de la tripsina, no se inactiva por DNasa o RNasa, se puede precipitar por ácido tricloroacético y dialisa parcialmente.
6. La reacción entre el fago y el lisado es una reacción de primer orden y tiene su temperatura óptima a 37°C.
7. Se establecieron hipótesis para la interpretación de los resultados.

Alan

Plotz

BIBLIOGRAFIA

- 1).- Jacob F., Lwoff, L. Siminovitch and E.L. Wollman.
Ann. Inst. Pasteur, 84, 222, 1953.
- 2).- Hayes William.- The genetics of bacteria and their viruses
Blackwell Scientific Publications Oxford. 1964.-
- 3).- Lwoff A. and A. Gutman.
Ann. Inst. Pasteur, 78, 711, 1950.-
- 4).- Lwoff A., L. Siminovitch and W. Kjeldgaard
Ann. Inst. Pasteur 79, 815, 1950.-
- 5).- Jacob F. and E.L. Wollman
Cold Spring Harbor Symposia Quant. Biol. 18, 101, 1953.-
- 6).- Appleyard R.K.
Genetics 39, 429, 1954a.-
- 7).- Lederberg and Lederberg
Genetics 38, 51, 1953.-
- 8).- Wollman E.L.
Ann. Inst. Pasteur 84, 281, 1953.-
- 9).- Bertani G.
Adv. in Virus Research 5, 151, 1958.-
- 10).- Jacob F. and A. Campbell
Compt. Rend. Acad. Sci. Paris 248, 3219, 1959.-
- 11).- Jacob F. and Wollman E.
Ann. Inst. Pasteur 91, 486, 1956a.-
- 12).- Wollman E. and Jacob F.
Ann. Inst. Pasteur 93, 323, 1957.-
- 13).- Fisher 1963;
citado en el libro de Wollman.-
Hayes; comunicaci3n personal.-
- 14.- Kellenberger E.
Adv. in Virus Research 8, 2 1961.-
- 15).- Levine et al.
Virology 6, 702, 1958.-

BIBLIOGRAFIA (cont.)

- 16).- Brenner et al
J. Mol.Biol. 1, 281, 1959.-
- 17).- Kozloff L.M.
J.Biol.Chem. 234, 539, 1959.-
- 18).- Anderson T. F.
Proc. Regional European Conf. on Electron Microscopy Delft.
Vol.2, pág. 100, 1960.- (citado per Kellenberger (10))
- 19).- Kaiser And
Virology 1 ,424,1955.-
- 20).- Kaiser and Hogues
J.Mol. Biol. 2 , 392,1960.-
- 21).- Arber Wand Kellenberger E.
Virology 5 ,458,1958.-
- 22).- Mackal R.P., R.Koppelman, R.Timmende and E. Evans
J.Biol. Chem. 235, 175, 1960.-
- 23).- Jacob and Fuerst
J.Gen. Microb.18 , 518,1958.-
- 24).- Wellman E. et F.Jacob
La sexualité des Bactéries. Masson et Cie. editeurs. 1959.-
- 25).- Gough G. and F.M. Burnet
J.Pathol. Bacteriol. 38 ,301, 1934.-
- 26).- Burnet and Freeman
Australian J. Exptl. Biol. Med. Sci. 15, 49, 1937.-
- 27).- Levine P. and W.Frisch
J. Exptl. Med. 59,213, 1934.-
- 28).- Adams M.
" Bacteriophages" Interscience Publishers London 1959.-
- 29).- Beumer J. and L. Quersin
Compt. Rend.Sec. Biol.141 , 1280, 1947.-
- 30).- Beumer J.
Ann.Inst. Pasteur 84 , 15, 1953.-
- 31).- Weidel, W.
Cold Spring Harbor Symposia Quant.Biol. 18, 155, 1953.-

BIBLIOGRAFIA (cont.)

- 32).-- Weidel W. and Kellenberger
Bio. Bio. Acta 17, 1, 1955.--
- 33).-- Jessitis and Goebel
J. Exptl. Med. 102, 733, 1955.--
- 34).-- Williams R. and Rippon J.E.
J. Hyg. 50, 320, 1952.--
- 35).-- Lederberg J.
Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 42, 574 , 1956.--
- 36).-- Ryan and Okada
J. Gen. Microb. 30, 193, 1963.--
- 37).-- Gratia, 1936a.
Compt. Rend Soc. Biol. 122 , 812, 1936.--
- 38).-- Swanstrom and Adams
Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78 , 372 , 1951.--
- 39).-- Luria S.E.
Proc. Nat. Acad. Sci. 33 253, 1947.--
- 40).-- Luria S.E. and Matarjet R.
J. of Bact. 53 , 149, 1947.--
- 41).-- Mc Farland
- 42).-- Nisman B.
Bio. Bio. Acta 32 , 18, 1959.--
- 43).-- Razin and Arganan
J. Gen. Microb. 30, 155, 1963
- 44).-- Roberson and Schwab
Bio. Bio. Acta 44, 436, 1960.--
- 45).-- Beumer J. et J. Dirakx
Ann. Inst. Pasteur 98, 910, 1960.--
- 46).-- Goebel W.
J. Exptl. Med. 98 , 409, 1952.--
- 47).-- Jessaitis M. and W. Goebel
J. Exptl. Med. 96, 409, 1952
- 48).-- Goebel W. and M. Jessaitis
J. Exptl. Med. 96 , 425, 1952.--

BIBLIOGRAFIA (cont.)

49.-) Weibull G.

Ann.Rev. Microb. T 12, p 1 - 26, 1958

50.-) Sagik Bernard

J. of Bact. 68, 430 , 1954.-

51.-) Weidel W.,H.Frank and H.Martin

J. Gen. Microb. 22, 158,1960.-

52.-) Weidel W. et al. (citade per Hayes)

_____ooOoo_____

NOVA

Parte de este trabajo fue realizada siendo becaria
del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas
y Técnicas.