

Tesis de Posgrado

Interacción de los bacteriófagos de la serie T con la pared celular de esferoplastos de *Escherichia coli*, inducidos por acción de penicilina y lisozima

Lorek, Helga

1973

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas 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:

Lorek, Helga. (1973). Interacción de los bacteriófagos de la serie T con la pared celular de esferoplastos de *Escherichia coli*, inducidos por acción de penicilina y lisozima. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1421_Lorek.pdf

Cita tipo Chicago:

Lorek, Helga. "Interacción de los bacteriófagos de la serie T con la pared celular de esferoplastos de *Escherichia coli*, inducidos por acción de penicilina y lisozima". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1973.

http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_1421_Lorek.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

Interacción de los bacteriófagos de la serie T con la
pared celular de esferoplastos de Escherichia coli,
inducidos por acción de penicilina y lisozima.

Helga Lorek

Director de tesis: Prof. Dr. P.H. Hofschneider

Representante: Prof. Dr. J. de Carlo

Tesis presentada para optar al título de

Doctora en Biología

1973

1421 -

Este trabajo fue dirigido por el Prof. Dr. Peter-Hans Hofschneider. Se inició en el laboratorio de Biología Molecular del Instituto Max Planck de Bioquímica de la ciudad de Munich, Alemania y fue concluido en el laboratorio de Genética de la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales de la Universidad de Buenos Aires.

Se agradece al Prof. Dr. P.H. Hofschneider el continuo interés puesto en el trabajo y el constante apoyo con que facilitó todas sus etapas.

Se agradece además al Prof. Juan I. Valencia por el interés y apoyo prestados, al Dr. Carlos J. Tandler y al Prof. Dr. Jorge de Carlo por su colaboración como consejeros de estudios y a la Dra. Dora Anton sus útiles sugerencias y provechosas discusiones acerca del manuscrito.

INDICE

	Página
RESUMEN	1
INTRUDUCCION	
Características morfológicas y químicas de la pared celular	3
Estructura química de los mucopéptidos	6
Protoplastos, esferoplastos y formas L	7
Agentes destructores de la pared celular bacteriana. Lisozima. Penicilina	10
OBJETO DE ESTE TRABAJO	14
MATERIAL Y METODOS	
Cepas	15
Material	15
Medios y buffers	15
Obtención de bacteriófagos	17
" esferoplastos de penicilina	18
" " " " lisozima	19
Pruebas de sensibilidad al choque osmótico	19
Control de la conversión a esferoplastos por observación del cambio morfológico	20
Preparación del medio de adsorción	20
Medida de la adsorción de los fagos	21
Determinación de síntesis de proteínas	21
Microscopía electrónica	22
Abreviaturas usadas en el trabajo	25

///

RESULTADOS

Estudio de adsorción e inactivación de bacteriófagos en esferoplastos	26
Medio de adsorción. Su influencia	27
Adsorción medida por turbidimetría	28
Determinación de receptores intactos	30
Microscopía electrónica de esferoplastos con bacteriófagos	31
Reproducción de bacteriófagos en esferoplastos	38

DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Determinación del grado de integridad de la pared celular de los esferoplastos de penicilina y lisozima	42
Adsorción de los bacteriófagos T ₃ , T ₄ , T ₆ y T ₇	43
Análisis de las cinéticas de adsorción de los bacteriófagos de la serie T. Ubicación de receptores	43
Adsorción de bacteriófagos. Microscopía electrónica	47
Reproducción de bacteriófagos en esferoplastos de <u>Escherichia coli</u>	48
Conclusiones. Resumen	50

BIBLIOGRAFÍA

52

RESUMEN

En el presente trabajo se estudió sistemáticamente la interacción de los bacteriófagos de la serie T con esferoplastos de Escherichia coli, obtenidos por medio del tratamiento con penicilina (alteración de la pared celular por vía metabólica) y el tratamiento con lisozima-EDTA (alteración de la pared celular por vía enzimática).

Para ello se realizaron las experiencias que a continuación se detallan:

- 1) La capacidad de adsorción de cada tipo de células fue determinada con los bacteriófagos T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ y T₇ para obtener datos sobre el estado de la pared celular y el grado de destrucción de los receptores específicos incluidos en la pared celular tratada.
- 2) Se observó al microscopio electrónico la adsorción de los bacteriófagos en los esferoplastos.
- 3) Se trató de comprobar el estado metabólico en que se encuentran los esferoplastos por medio del estudio de la capacidad de reproducción de los bacteriófagos en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA.

Se obtuvieron los siguientes resultados:

- 1) La adsorción de T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ y T₇ se produce prácticamente con la misma intensidad en bacterias intactas y en los dos tipos

///

de esferoplastos.

- 2) La ausencia de adsorción observada en un principio en T₃, T₄, T₆ y T₇ fue causada por la acción inhibidora del agente estabilizante sacarosa.
- 3) El efecto de lisis de los esferoplastos, inducido por la adsorción de bacteriófagos, aumenta en relación directa con la multiplicidad de infección de bacteriófagos por célula, pudiéndose apreciar, por el método de fotocolorimetría aplicado, por lo menos 200 receptores no inhibidos en la pared celular de bacterias intactas y de esferoplastos. Por lo tanto, el tratamiento con penicilina y lisozima-EDTA no destruye receptores en gran escala.
- 4) Con ayuda del microscopio electrónico se observó la adsorción de los bacteriófagos y la inyección de ADN en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA de Escherichia coli.
- 5) A pesar de que los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA no presentan diferencias en la adsorción de los bacteriófagos, la maduración de partículas infectivas solamente tuvo lugar en esferoplastos de penicilina para los bacteriófagos T₂, T₃ y T₄.

Se supone que el hecho de que los esferoplastos de lisozima-EDTA no formaron partículas infecciosas es debido al efecto del EDTA sobre el metabolismo de la célula tratada.

INTRODUCCION

Características morfológicas y químicas de la pared celular.

La pared celular de la bacteria presenta características de gran interés para los estudios básicos de la bacteriología y la virología. Al mismo tiempo, la pared celular tiene gran importancia práctica en inmunología y quimioterapia. P.ej.: la interferencia de la penicilina con la síntesis normal de la pared celular de una bacteria en estado de desarrollo, es responsable de la acción terapéutica específica de este antibiótico.

En realidad, el interés por la superficie bacteriana, ya se inicia con los estudios de Leeuwenhoek, quien descubrió células bacterianas con tres diferentes formas: el bastón, el coco y la forma espiralada. Era evidente que para poder mantener estos tipos de formas, la célula tenía que poseer una estructura superficial con una rigidez mayor que la estructura del citoplasma.

Leeuwenhoek solamente pudo anticipar teóricamente la diferenciación de la estructura superficial del contenido citoplasmático, ya que sus medios no le permitieron descubrir que las células estaban envueltas en una estructura membranosa.

Hoy día existe una gran cantidad de datos sobre las propiedades químicas, físicas e inmunológicas de la pared celular bacteriana.

///

Una de las propiedades fundamentales de esta pared es su estructura protectora, cuya función esencial es prevenir la lisis de las células por efectos del fenómeno de ósmosis. La presión osmótica que puede actuar sobre el protoplasto es considerable y el primer requerimiento de toda pared celular, es tener una alta resistencia a la tensión. Este requerimiento físico se cumple en las paredes bacterianas por la formación de un entrecruzado de moléculas de gran longitud. La estructura primaria de cada pared celular puede ser considerada entonces como una malla macromolecular que incluye y retiene al protoplasto de manera que no se hinchó más allá de cierto límite.

Uno de los detalles en que las bacterias difieren de todos los otros organismos vivientes (excepto las algas azul verdosas) es en la composición química de la pared celular. Este hecho tiene consecuencias extremadamente importantes, ya que provee una base para el ataque quimioterapéutico a parásitos bacterianos, sin destruir al huésped. La habilidad de las bacterias de sobrevivir con paredes dañadas o sin pared celular, es por lo tanto de gran interés desde el punto de vista del estudio de la estructura de la misma pared.

Estudios químicos de la pared celular de diferentes bacterias dieron lugar al descubrimiento y caracterización de un número considerable de macromoléculas que forman parte de la envoltura exterior de la célula. Muchos de estos polímeros presentan rasgos químicos únicos y contienen monómeros que solamente se encontraron en paredes celulares de bacterias. (Martín 1963). La composición química

///

ca sigue principios generales, pero variaciones cuantitativas y cualitativas se encuentran en los diferentes grupos taxonómicos.

Las más importantes macromoléculas encontradas en la pared celular bacteriana son las siguientes:

- a) Mucopolímero (Primosigh, Pelzer, Haas y Weidel (1961) llamado también mucocomplejo (Salton 1960a), mucopéptido (Perkins y Rogers 1959 o mureína (Weidel 1964), se caracteriza por la presencia de un conjunto de amino ácidos y amino azúcares.
- b) Ácidos teichoicos (Martín 1963) restringidos a ciertas bacterias Gram-positivas.
- c) Lipopolisacáridos (Martín 1963) y
- d) Lipoproteínas (Martín 1963) en paredes celulares de bacterias Gram-negativas (Martín 1963).
- e) Polisacáridos en la pared celular de estreptococos.

Existen otros compuestos de alto peso molecular y continuamente se aíslan nuevos componentes en las paredes celulares y cápsulas de varias bacterias.

Se ha determinado que solamente una macromolécula está presente en las paredes celulares de todas las bacterias, Gram-positivas y Gram-negativas. Esta macromolécula llamada mureína por Weidel (1964), es responsable de la forma de la bacteria. Un entretrejido de los diferentes mureopéptidos interconectados por enlaces covalen

///

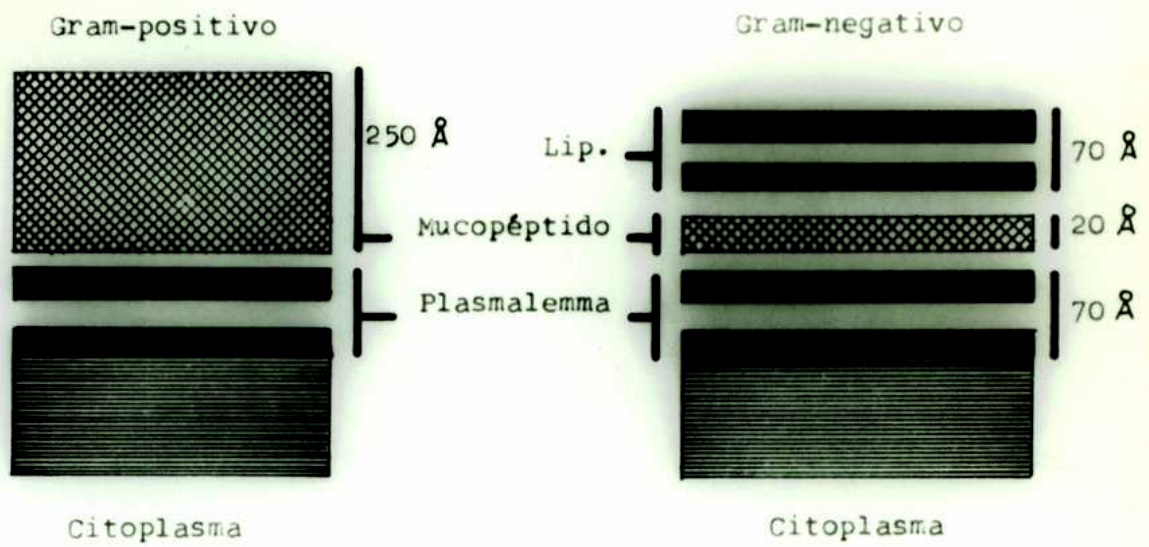


Fig. 1. Esquema generalizado de la pared celular de bacterias Gram-positivas y Gram-negativas.
 (Lip. = complejo lipoproteico-lipopolisacárido.)

tes da a la pared celular la forma geométrica, así como la rigidez y la resistencia mecánica. Weidel propone el nombre de saco de mucina (mucin sacculus) a esta estructura, que es posible aislar íntegramente y fue estudiada al microscopio electrónico por Weidel y sus colaboradores.

Estudiando la composición de diferentes bacterias se comprobó que las bacterias Gram-positivas presentan su pared celular formada total- o predominantemente por el mucopolímero (85 %). En cambio en la cepa Gram-negativa Escherichia coli B se demostró que la pared celular consistía en tres capas superpuestas. (Weidel, Frank y Martín 1960) (Ver Fig. 1). Si se extraen las paredes celulares de Escherichia coli con solventes como el fenol y las soluciones acuosas detergentes, de manera que no se destruyan las uniones covalentes, se desprenden dos capas plásticas, una superficial lipoprotéica y una intermedia lipopolisacárida, quedando a descubierto la capa rígida que está formada por el total de mucopolímero de la pared celular. Es éste el material que tiene que ser lesionado, atacado o removido para transformar una bacteria en esferoplasto, protoplasto o forma L.

Estructura química de los mucopéptidos.

En la última década, los conocimientos sobre la estructura de los mucopéptidos se fue ampliando rápidamente. Es sabido que en todas las bacterias que poseen pared celular, la rigidez de ésta se debe a los mucopéptidos que presentan una estructura básica similar.

///

Consisten en largas cadenas de moléculas alternadas de β -1-4-N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico (3-O-carboxietil-N-acetilglucosamina). Esta cadena está reticulada (cross-linking) por cadenas cortas de aminoácidos unidos al grupo carboxilo del ácido murámico. De esta manera el mucopéptido de una célula constituye una molécula gigante con forma de célula.

Las especies de aminoácidos que integran el mucopéptido son limitadas. Los más usuales son: alanina, ácido glutámico, glicina y un diaminoácido como lisina, ácido diaminopimélico, ácido diaminobutírico, ornitina o ácido diaminohidroxipimélico. Es interesante que el ácido glutámico y en parte la alanina (y ocasionalmente otros aminoácidos) se encuentren como D-isómeros. Esto es sorprendente ya que en los organismos vivientes generalmente se encuentran los isómeros L. La presencia de los isómeros D confiere a la cadena peptídica resistencia a enzimas proteolíticas.

Un diaminoácido en la cadena peptídica es esencial para el reticulado. Lisina y ácido diaminopimélico son los aminoácidos usuales que cumplen esta función y ambos se excluyen mutuamente. Ácido diaminopimélico se encuentra únicamente en paredes bacterianas.

Protoplastos, esferoplastos y formas L.

Debido a la considerable confusión existente en la literatura sobre los términos esferoplasto y protoplasto, consideramos conve

///

niente definir cada término.

Se define por protoplasto a la estructura derivada de una célula vegetativa por pérdida total de su pared celular.

El término esferoplasto se usa para la descripción de formas globulares en las cuales la estructura de la pared celular está modificada.

Las formas L son células del tipo esferoplasto o protoplasto capaces de reproducirse en ese estado.

Las tres formas son osmóticamente sensibles, es decir que su presión osmótica las hará estallar a menos que ésta esté balanceada por una presión externa.

Protoplastos.

Tomcsik y Guex-Holzer (1952) y separadamente Weibull (1958), estudiando la pared celular bacteriana y la acción lítica de la lisozima sobre la pared celular, observaron al microscopio que las bacterias, que inicialmente presentaban formas alargadas, se habían transformado en células esféricas. Estas células eran capaces de existir varias horas o días en un medio hipertónico estabilizado, pero se lisaban instantáneamente si se pasaban a agua destilada o buffers diluidos, o sea que resultaron ser osmóticamente sensibles. Investigaciones químicas y fisiológicas sugirieron que estas células

///

esféricas consistían en células desprovistas de sus paredes celulares por despolimerización de su mucopolímero rígido, pero esencialmente intactas desde otros puntos de vista.

Estas células fueron denominadas protoplastos. Atrajeron el interés de los microbiólogos, dado que su uso presentaba una valiosa herramienta para estudios de estructura, metabolismo y fisiología.

Esferoplastos.

Bacterias Gram-negativas tratadas con agentes capaces de degradar la pared celular, forman células con características muy parecidas a los protoplastos llamadas esferoplastos. Pero, debido a que las bacterias Gram-negativas presentan una pared celular más compleja, formada por capas múltiples, los agentes capaces de degradar la pared celular no destruyen todos los componentes de la pared. Es conocido que los esferoplastos de las bacterias Gram-negativas tienen un mucopéptido defectuoso. A consecuencia de ello las células pierden su rigidez, toman forma esférica y son osmóticamente sensibles. El citoplasma no sufre cambios importantes por la acción de los agentes esferoplastizantes. La fisiología de los esferoplastos es similar a la de las células intactas, como éstas respiran, se nutren y forman enzimas. Para la célula el efecto más importante es la pérdida de rigidez, y, ya que es atacado el mucopolímero, responsable de la misma, la célula se lisa fácilmente. Por tal motivo se requieren solutos externos para mantener intactos a los esferoplastos.

///

Los esferoplastos de las bacterias Gram-negativas pueden producirse por varios métodos, todos los cuales atacan al muco péptido. Los métodos más conocidos son la acción de la lisozima-EDTA y de los antibióticos, en especial la penicilina.

Agentes destructores de la pared celular bacteriana. Lisozima. Penicilina.

La rigidez de la pared celular bacteriana puede ser destruída por varios métodos físicos, químicos y biológicos. Los métodos biológicos desarrollados para atacar la pared celular de bacterias son los más importantes para el estudio de los esferoplastos, protoplastos y formas L.

Los procedimientos capaces de destruir la rigidez del mucopolímero de la pared celular atrayeron particularmente la atención:

- A) Lisis enzimática del mucopolímero provocada por la lisozima (Salton 1957), o por la enzima lítica extraída de bacteriófagos (Weidel y Primosigh 1957, 1958).
- B) Alteración metabólica (McQuillen 1958 a) de la síntesis normal del mucopolímero por exposición a penicilina (Park, Strominger 1957; Weidel y Primosigh 1957, 1958; Martín 1963; Strominger y Tipper 1965).

A) Acción de la lisozima.

///

La lisozima es una enzima específica para β -1, 4-N-acetilglucosaminidos (Martín 1963), que degrada al mucopolímero cuantitativamente en productos solubles, pudiendo considerarse la N-acetilglucosamina y el disacárido del ácido N-acetil-murámico como los fragmentos más degradados (Weidel y Pelzer 1964). Si se hace actuar lisozima sobre el saco murcico, o sea el mucopolímero en su estado tridimensional, solamente parte del mucopolímero se solubiliza, como es posible observar al microscopio electrónico. Parece que el ataque con lisozima de la estructura compleja de la pared celular de Escherichia coli nunca llega hasta la total destrucción de los componentes del mucopolímero, ya que parte de éste está ligado por uniones covalentes a los componentes no mucopolímeros, resistentes a la lisozima (Ver Fig. 2). Weidel y Pelzer (1964) en un trabajo exhaustivo demuestran que la lisozima destruye la figura tridimensional del saco murcico (mucopolímero) abriendo la configuración anular de los mucopéptidos en sus uniones 1-4-glicósido.

B) Acción de la penicilina.

La especificidad de la acción antibacteriana de ciertos antibióticos se basa en su interferencia en la síntesis de la pared celular bacteriana. El ejemplo mejor estudiado es el de la acción de la penicilina y sus derivados. La penicilina solamente destruye células en crecimiento vegetativo activo (Ver Fig. 2). Las células inhibidas en su crecimiento acumulan nucleótidos de uridina, unidades precursoras de la pared bacteriana. En otras palabras, la penicilina

///

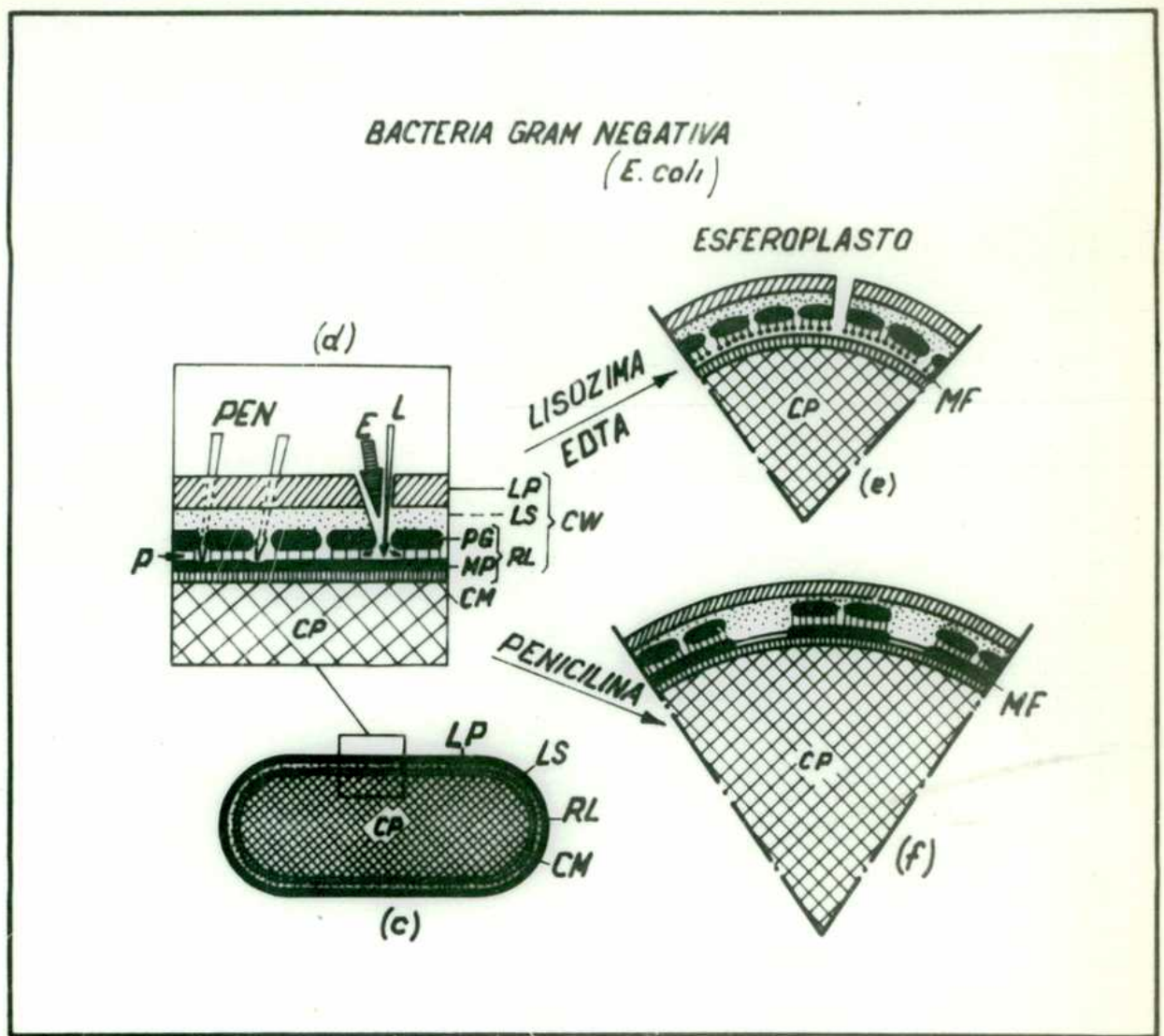


Figura 2: Esquema de la acción de la lisozima-EDTA y la penicilina sobre la pared celular de una bacteria Gram-negativa.

PEN: penicilina; E: EDTA; L: lisozima; LP: lipoproteína; LS: lipopolisacárido; RL: capa rígida; PG: gránulos de proteína; MP: mucopolímero; CM: membrana citoplasmática; CP: citoplasma; MF: fragmentos de mucopolímero; P: encima proteolítica.

inhibe la incorporación de formaciones precursoras de la pared celular en la estructura de la misma. Strominger y Tipper (1965) demostraron que la penicilina inhibe la transpeptidación (el reticulado (cross linking) de las cadenas del mucopéptido.)

Las consecuencias del tratamiento de las bacterias con penicilina dependen de las condiciones del medio ambiente. Si está asegurada una protección osmótica eficaz, las bacterias pueden llegar a sobrevivir y transformarse en esferoplastos o formas L. Estudios analíticos de esferoplastos de Escherichia coli (McQuillen 1958 a) indican que el antibiótico provoca destrucción selectiva de los constituyentes del mucopolímero, pero no induce degradación en la capa lipoprotéica o lipopolisacárida de la pared celular.

Hofschneider (1960 b) demostró por medio de cortes ultrafinos de esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA derivados de Escherichia coli B, observados al microscopio electrónico, que existen dos tegumentos superpuestos y múltiples, presumiblemente la pared celular y la membrana citoplasmática. Al comparar los esferoplastos con bacterias intactas, muy pocas diferencias se observan con la estructura fina descrita por Kellenberger y Ryter (1958). Estos autores publicaron fotografías excelentes de cortes ultrafinos de Escherichia coli donde se observa la separación nítida de las dos estructuras: la pared celular y la membrana citoplasmática.

De todas estas consideraciones expuestas puede deducirse que:

///

la inducción de esferoplastos por medio de la penicilina y la lisozima-EDTA produce reducciones drásticas en las uniones o despolimerizan al mucopolímero, pero aparentemente no destruye la capa rígida totalmente y su ordenamiento espacial con respecto a las capas no mucopolímeras de la pared celular (Martín 1963).

Sólo ocasionalmente las paredes celulares de los esferoplastos se abren dejando libres a protoplastos rodeados por la membrana citoplasmática, encontrándose las paredes celulares vacías siempre al lado de los protoplastos. (Hofschneider 1960 b).

OBJETO DE ESTE TRABAJO

El propósito del presente trabajo fue estudiar:

- 1) La interacción de los bacteriófagos de la serie T con la pared celular de esferoplastos de Escherichia coli, inducidos por acción de penicilina y lisozima-EDTA.
- 2) La presencia o ausencia de los receptores específicos para los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇ en esferoplastos.
- 3) La estimación aproximada del número de receptores intactos para T₂, T₄ y T₅ en esferoplastos de E. coli.
- 4) La adsorción de los bacteriófagos y la inyección del ADN en los esferoplastos de E. coli, por medio de la microscopía electrónica.
- 5) La capacidad de reproducción de bacteriófagos en esferoplastos de E. coli.

MATERIAL Y METODOS

Cepas:

La cepa de Escherichia coli B y los bacteriófagos T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 y T_7 fueron cedidas por el Dr. P.H. Hofschneider del Max Planck Institut fuer Biochemie, Munich, Alemania.

Material:

La penicilina utilizada en este trabajo provino de Farbwerke Hoechst, Frankfurt, bajo la denominación "Penicillin G" Hoechst. La lisozima (muramidasa) de grado I, obtenida a partir de clara de huevo, 3 veces cristalizada, dializada y liofilizada, fue adquirida en Sigma Chemical Company.

El antisuero T_3 fue cedido por el Dr. P.H. Hofschneider, y la C^{14} -D-L-leucina por el Dr. W. Zillig del Max Planck Institut fuer Biochemie, Munich, Alemania.

Medios y buffers:

Las bacterias fueron cultivadas en caldo nutritivo común: 2 g caldo nutritivo Difco, 1 g ClNa, 200 cc de agua destilada.

Todas las diluciones necesarias para el recuento de células y bacteriófagos y las pruebas de choque osmótico, se llevaron a cabo en un buffer fosfato compuesto por 1,75 g PO_4HNa_2 , 1 g ClNa y

///

0,75 g $PO_4^{H_2K}$ en 250 cc de agua destilada.

Para el plaqueo se usaron las técnicas descritas por Adams (1959), utilizándose como agar base : 10 g de triptona, 10 g de agar, 2,5 g $ClNa$ y 2,5 g ClK en 1000 cc de agua destilada, y como agar de superficie: 0,5 g $ClNa$, 0,8 de agar Difco y 1 g de triptona en 100 cc de agua destilada.

El buffer utilizado para preparar las soluciones de fijación, coloración y lavados, usadas para la preparación de muestras estudiadas al microscopio electrónico, fue el buffer de Michaelis, preparado de la siguiente manera:

Solución madre: 19,428 g de acetato de Na, 29,428 g de veronato de Na y 34 g $ClNa$ en 1000 cc de agua destilada. A 5 cc de la solución madre se añaden 7 cc de ClH 0,1 N, 13 cc de agua destilada y 0,25 cc de Cl_2Ca m.

El material biológico observado al microscopio electrónico por medio de cortes ultrafinos, fue deshidratado con acetona purísima Merck y posteriormente incluido en Vestopal W, resina poliéster proveniente de los Chemische Werke Hüls, Alemania.

La multiplicación de los bacteriófagos T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 y T_7 se realizó en un medio sintético denominado H9 que consta de: solución de sales: 70 g $PO_4^{H_2K}$; $ClNa$ 5 g; 10 g $ClNH_4$ y 1000 cc de agua destilada. A 100 ml de esta solución se agrega: 780 ml de agua

///

destilada, 100 ml de glucosa al 4 %; 100 ml Cl_2Ca 0,01 m, 10 ml de SO_4Mg 0,1 m.

La conversión de las bacterias a esferoplastos de penicilina tuvo lugar en un medio rico en sacarosa que a continuación se detalla:
Solución madre: 5 g de peptona; 2,5 g $ClNa$; 250 ml de agua destilada. A 40 ml de esta solución se adicionan 20 ml de sacarosa al 34 % y 10 ml de agua destilada, obteniéndose de esta manera un medio de concentración final en sacarosa al 28 %. La conversión de las bacterias a esferoplastos de lisozima se realizó en caldo nutritivo común.

La adsorción de los bacteriófagos a los esferoplastos se realizó en una solución formada por 9 partes de caldo nutritivo y 1 parte del medio de inducción.

El recuento de las células (bacterias y esferoplastos) se realizó en una cámara Thoma con ayuda de un microscopio de fase.

MÉTODOS:

a) Obtención de los bacteriófagos T_2 , T_3 , T_4 , T_5 , T_6 y T_7 .

Las bacterias Escherichia coli B se cultivaron en el medio M9 a 37° C con aireación intensa hasta alcanzar un título de 5×10^8 /ml. A continuación fueron infectadas con 3-5 fagos por bacteria, dejándose incubar a 37° C con aireación intensa de 1 a 2 horas los fagos T_3 y T_7 , y de 3 a 4 horas los fagos T_2 , T_4 , T_5 y T_6 . Antes de ha

///

ber alcanzado el tiempo de lisis, las bacterias, con los fagos intracelulares en estado maduro, se centrifugaron a bajo número de revoluciones en una centrífuga de flujo continuo (Beckman). Las bacterias centrifugadas se resuspendieron en un litro de agua destilada, se homogenizaron a 0° C durante cinco minutos y posteriormente se indujo la lisis agregando cloroformo. El objeto de este método era obtener de un modo sencillo y en pocos pasos, una alta concentración de bacteriófagos.

Después de separar los restos de bacterias por centrifugación a 5000 revoluciones por minuto, se concentraron los fagos liberados en una ultracentrífuga preparativa Beckman con 20-30.000 rev/min, según la copia de fago.

El título de la suspensión de bacteriófagos concentrados fue en promedio de 1×10^{12} /ml.

b) Obtención de esferoplastos de penicilina.

Bacterias Escherichia coli B que se cultivaron con aireación durante la noche en caldo nutritivo a 37° C, fueron resuspendidas en un medio hipertónico de una concentración final de 28 % en sacarosa (ver descripción del medio para la formación de los esferoplastos de penicilina). Después de llevar el cultivo a una concentración de 10 % de SO_4 , se le agregan 1000 U.I/ml de penicilina. Al cabo de 90 minutos de agitación suave de tipo circular a 30° C se forman células esféricas de tipo protoplástico que son

///

sensibles al choque osmótico y, en condiciones normales, incapaces de formar colonias.

La cuota de inducción fue determinada midiendo la sensibilidad de las células al choque osmótico. Se utilizaron únicamente cultivos, que después del ensayo de control de la sensibilidad al choque osmótico, presentaban una cuota de supervivencia de menos de 3 %. Las células sobrevivientes debían considerarse como bacterias no convertidas, por no presentar sensibilidad osmótica y ser capaces de formar colonias.

c) Obtención de esferoplastos de lisozima.

Un cultivo fresco de bacterias Escherichia coli B con título de 5×10^8 /ml, fue lavado con agua destilada, resuspendido y concentrado a 5×10^9 /ml. Los esferoplastos de lisozima se indujeron, incubando el concentrado de bacterias en una solución de Tris-sacarosa, 4 % de EDTA (0,03 ml/ml) y 0,1 % de lisozima (0,06 ml/ml) a temperatura ambiente durante 10 minutos. La conversión se controló cuantitativamente por medio de la sensibilidad osmótica. En los experimentos se utilizaron preparaciones con una cuota de supervivencia de menos de 3 %.

d) Pruebas de sensibilidad al choque osmótico.

La determinación cuantitativa de las conversiones logradas, se realizó gracias a la propiedad que presentan los esferoplastos

///

de ser osmóticamente sensibles.

El choque osmótico se llevó a cabo en buffer fosfato 0.1 M diluido 1:100, no habiéndose usado para estos ensayos agua destilada pura, dado que con esta última se eliminan también las bacterias capaces de formar colonias.

La conversión se consideraba lograda si se obtenía un 1 al 3 % de sobrevivientes capaces de formar colonias. Estas colonias representan bacterias no convertidas, debido a que los esferoplastos pierden la capacidad de formar colonias.

e) Control de la conversión a esferoplastos por observación del cambio morfológico.

Además del control de sensibilidad al choque osmótico y el recuento de células capaces de formar colonias, las bacterias en tratamiento fueron observadas por medio de un microscopio de contraste de fase. La observación al microscopio permitía controlar el cambio morfológico de la bacteria no tratada de forma alargada, a una esfera después del tratamiento con penicilina o lisozima.

f) Preparación del medio de adsorción.

El medio hipertónico en el cual se encontraban los esferoplastos fue diluido muy lentamente con caldo nutritivo simple.

///

Después de alcanzar la dilución apropiada del medio hipertónico, las células fueron centrifugadas a 3000 revoluciones por minuto a una temperatura de 5° C. En el caso de los esferoplastos de lisozima fue necesario agregar espermina, agente estabilizante de este tipo de células, que no influye en la adsorción.

Después de centrifugar, las células fueron resuspendidas en el medio isotónico (2,8 % de sacarosa). Aplicando este procedimiento de dilución continua, llegaron a recuperarse alrededor del 30 % de las células convertidas que fueron utilizadas para las experimentaciones.

g) Medida de la adsorción de los fagos.

La adsorción de los bacteriófagos a las bacterias y los esferoplastos se midió indirectamente por determinación fotométrica de la disminución de turbidez debida a la lisis inducida por los fagos. Antes y después de la infección con fagos (m.o.i. = 100 fagos/bacteria) se controló continuamente la turbidez del cultivo de bacterias o esferoplastos (5×10^8 /ml = n° de células iniciales) en un fotocolorímetro Beckman E 1009 en la longitud de onda 525 m μ .

h) Determinación de síntesis de proteínas.

El estudio de la síntesis de proteínas se realizó mediante la técnica de marcación con C¹⁴-D-L-leucina. Un ml de Escherichia

///

coli B o esferoplastos con un título de 5×10^7 /ml, se incubaron con aireación a 37°C durante 30 minutos en un medio formado por 9 partes de caldo nutritivo, 1 parte del medio hipertónico de conversión para esferoplastos de penicilina y $0,2 \mu\text{li/ml}$ de C^{14} -D-L-leucina ($5 \mu\text{C}/\mu\text{M}$).

A continuación la proteína se precipitó con ácido tricloroacético al 50 % y después de varios lavados con ácido tricloroacético al 5 %, el precipitado se llevó a 90°C durante quince minutos. Posteriormente se lavó el precipitado con etanol absoluto y éter y se secó.

Una vez perfectamente seco, el precipitado se disolvió en 0,2 ml de ácido fórmico, incubando a continuación durante 15-30 minutos a 45°C hasta disolver todo el precipitado. La solución se depositó luego sobre discos de aluminio y el residuo fue lavado con HONa concentrado y etanol. (Sickevitz 1952).

La medición de la actividad de C^{14} se realizó en un Tracerlab TGC-14.

1) Microscopía electrónica.

Los trabajos de microscopía electrónica se realizaron con un Siemens Elmiskop I (según Ruska) con una tensión de haz de 60 KV. Para la preparación y manipulación del material se siguieron las indicaciones generales que describen Reimer (1959) y Hall

///

(1953).

Se presentaron serias dificultades en la técnica de preparación de las muestras debido a que los esferoplastos son rápidamente lisados por el ácido ósmico usado en el método de fijación standard descrito por Ryter y Kellenberger (1958). Por este motivo los estudios de la superficie de las células se realizaron de acuerdo al método de filtración de agar según Kellenberger (1952). Este consiste en depositar una gota de muestra sobre una caja de Petri con agar soporte bien desecado (proceso de secado: en una estufa a 37° C se deja evaporar el agua hasta pérdida equivalente a 30 % de su peso), recubierto por una película de Parlodion al 0,2 % en acetato de amilo. Esta película, que actúa como membrana dializante, hace posible la filtración del medio líquido en el cual se encuentra la célula, y actúa por otra parte como soporte de la célula. Después de haber fijado la muestra durante 4 minutos sobre vapores de formol al 40 %, se recortan pequeños trozos de agar y se desliza la película sobre una superficie de agua. La muestra se recoge sobre una grilla y se obtiene así una preparación lista para ser metalizada.

La metalización se llevó a cabo en un metalizador de alto vacío Siemens. Para obtener los vapores de metal se utilizó alambre platino-iridio de 0,04 mm de espesor, eligiéndose un ángulo de metalización de 15°.

///

Para la preparación de los cortes ultrafinos se siguió la siguiente técnica desarrollada por Hofsohneider (1960 b). 10 ml de la suspensión de esferoplastos se mezclan con 1 ml de acetona pura. Inmediatamente se le agrega como fijador 1 ml de bioromato de potasio al 10 % en buffer fosfato 0,1 N pH 7,2. Después de fijar la muestra durante 20 horas a temperatura ambiente se centrifuga la suspensión, resuspendiendo el sedimento en una solución de agar a 37°. Los bloquecitos de agar ya solidificado, que contienen a las células, se dejan durante dos horas en una solución de acetato de uranilo al 0,5 % en buffer Michaelis a pH 6. Luego se deshidrata la muestra en soluciones de acetona al 30 %, 50 %, 75 %, 90 % y 100 % y se sigue el método de embebido con Vestopal W de acuerdo a Rytter y Kellenberger (1958).

Los cortes ultrafinos se realizaron con ayuda de un ultramicrotomo Porter Blum usándose cuchillas de vidrio.

Finalmente los cortes fueron coloreados en solución de acetato de uranilo al 0,5 % durante 60 minutos con el fin de obtener mejor contraste.

Abreviaturas usadas en el trabajo:

EDTA:	ácido etilendiaminotetraacético
Tris:	trihidroxiaminometano
PS:	esferoplasto de penicilina
LS:	esferoplasto de lisozima
m.o.i.:	multiplicidad de infección
ADN:	ácido desoxiribonucleico
ARN:	ácido ribonucleico

RESULTADOS

Estudio sistemático del mecanismo de adsorción e inactivación de los bacteriófagos T₂, T₃, T₄, T₅, T₆ y T₇ en esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA.

Considerando que los esferoplastos son bacterias con paredes celulares deficientes, es razonable admitir que existan algunas diferencias de propiedades y de estructura al compararlas con bacterias normales. En este trabajo se consideró interesante estudiar exhaustivamente la interacción de los bacteriófagos con la pared tratada de los esferoplastos, debido a que en ella se encuentran los receptores para los mismos.

Para determinar la presencia de receptores intactos y por lo tanto comprobar la presencia de las capas lipopolisacárida y lipoprotéica, se realizaron los siguientes ensayos.

1. Se compararon las cinéticas de adsorción de bacterias normales intactas y de las formaciones esféricas inducidas por la acción de penicilina y lisozima-EDTA. Por medio del uso de los bacteriófagos de la serie T se obtuvo la posibilidad de rastrear seis veces la estructura de la pared celular debido a la existencia de los seis receptores específicos incluidos en ella.
2. Se estudiaron las cinéticas de adsorción en bacterias intactas y en esferoplastos a diferente multiplicidad de infección para de-

///

terminar el número aproximado de receptores disponibles después de la acción de los agentes de conversión.

3. Se realizaron observaciones al microscopio electrónico con el propósito de obtener fotografías de las células en estudio con los bacteriófagos adsorbidos.

Se obtuvieron los resultados a continuación enumerados.

A) Medio de adsorción. Su influencia.

Varias veces fue descrita en la literatura la adsorción de T₂ y T₅ en esferoplastos de Escherichia coli, hecho éste también confirmado en el trabajo presente. Al incorporar los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇ en la serie de experimentación, se obtuvieron resultados negativos en las medidas de adsorción en esferoplastos y también en bacterias intactas suspendidas en el medio usado para los esferoplastos.

Pruebas realizadas con bacterias intactas demostraron que la no-adsorción de los bacteriófagos se debía al medio hipertónico de sacarosa, en el que se encontraban los esferoplastos y las bacterias intactas usadas para control. Este medio hipertónico había resultado indispensable para contrarrestar la sensibilidad osmótica que presentan los esferoplastos.

De ahí, que fue necesaria una dilución extremadamente cuidadosa del medio de conversión de 28 % en sacarosa, hasta llegar a una

///

concentración en sacarosa isotónica, que resultó ser diez veces menor (2,3 % en sacarosa). A esta concentración fue posible la adsorción de los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇, sin que se destruyesen los esferoplastos por choque osmótico.

B) Adsorción medida por turbidimetría.

El objeto de estas experiencias fue demostrar indirectamente la existencia de las diferentes capas de la pared celular, el grado de integridad y el estado funcional de los receptores de los bacteriófagos. Fue medida por medio de un fotómetro la disminución de turbidez provocada por la lisis de las células infectadas con una multiplicidad de infección de 100 fagos/célula.

Los resultados representados en los gráficos No. 1 al 6 demuestran que todos los fagos de la serie T ensayados, adsorben en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA, a la misma velocidad y prácticamente con la misma intensidad que en las bacterias intactas. Estos resultados aseguran que los receptores específicos para los bacteriófagos de la serie T siguen intactos en la célula tratada. Interesante es el comportamiento del bacteriófago T₅ frente a los dos tipos de esferoplastos. En el gráfico No. 3 se advierte que el fago produce una lisis insignificante si adsorbe en las bacterias intactas, lo que hace pensar que el fago debe tener cierta dificultad para adsorber, o sea que relativamente pocos receptores se encuentran al alcance de los fagos. En cambio la lisis es mucho más

///

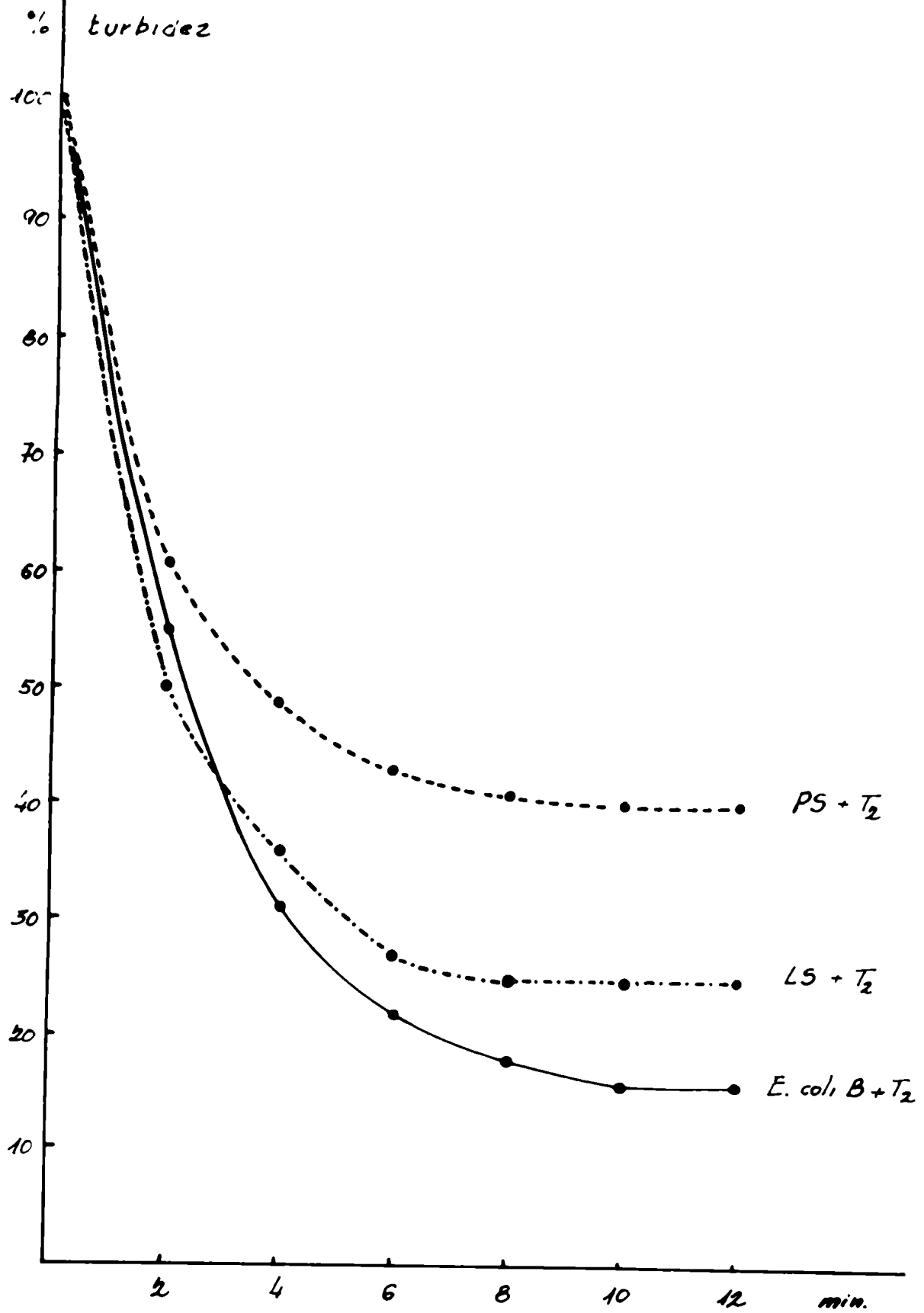


Gráfico 1. Turbidez provocada por la adsorción de bacteriófagos T₂ en Escherichia coli B y en esferoplastos de penicilina y lisozima, medida por turbidimetría.

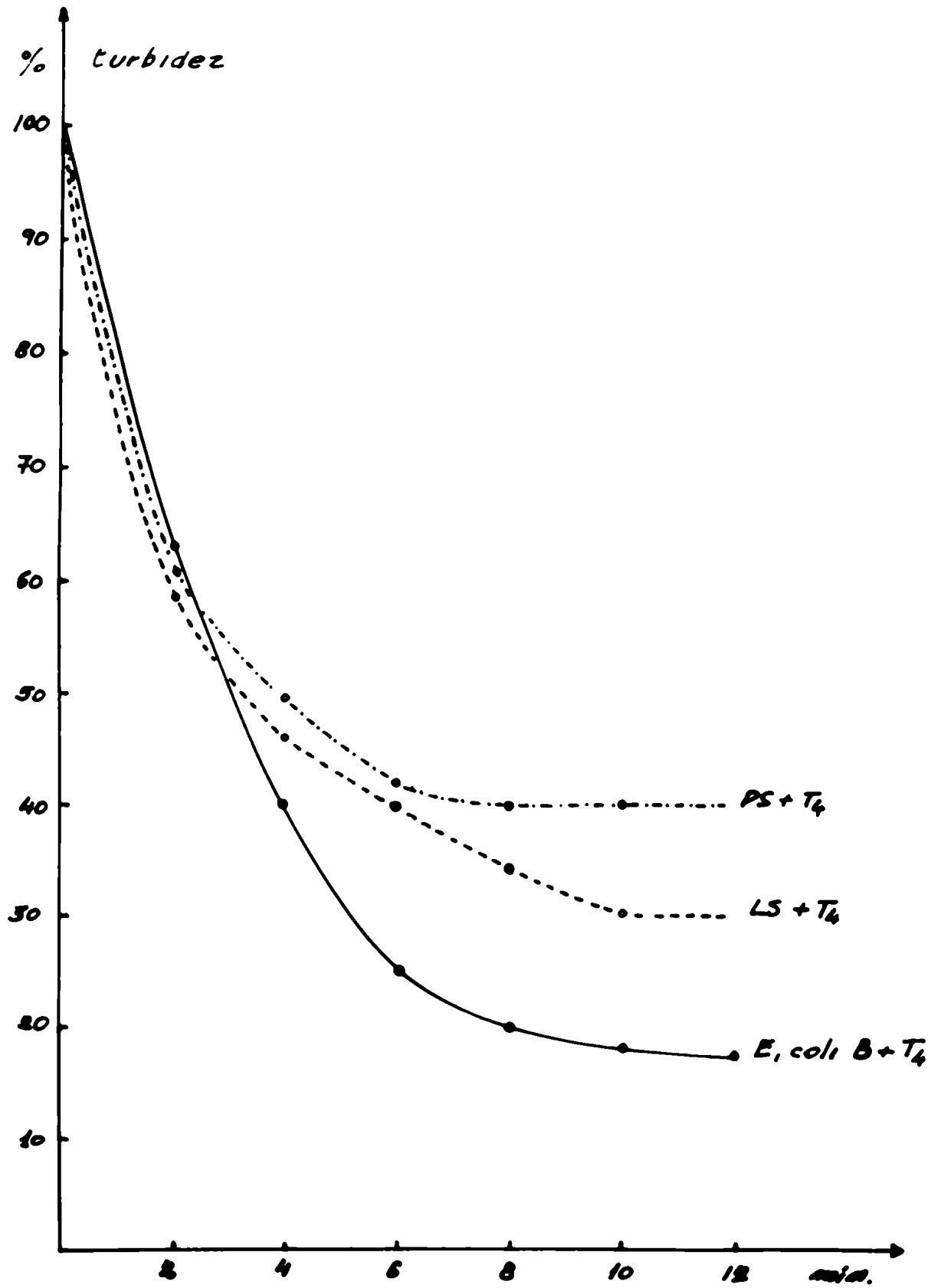


Gráfico 2. Lisis provocada por la adsorción de bacteriófagos T₄ en *Escherichia coli* B y en esferoplastos de penicilina y lisosina, medida por turbidimetría.

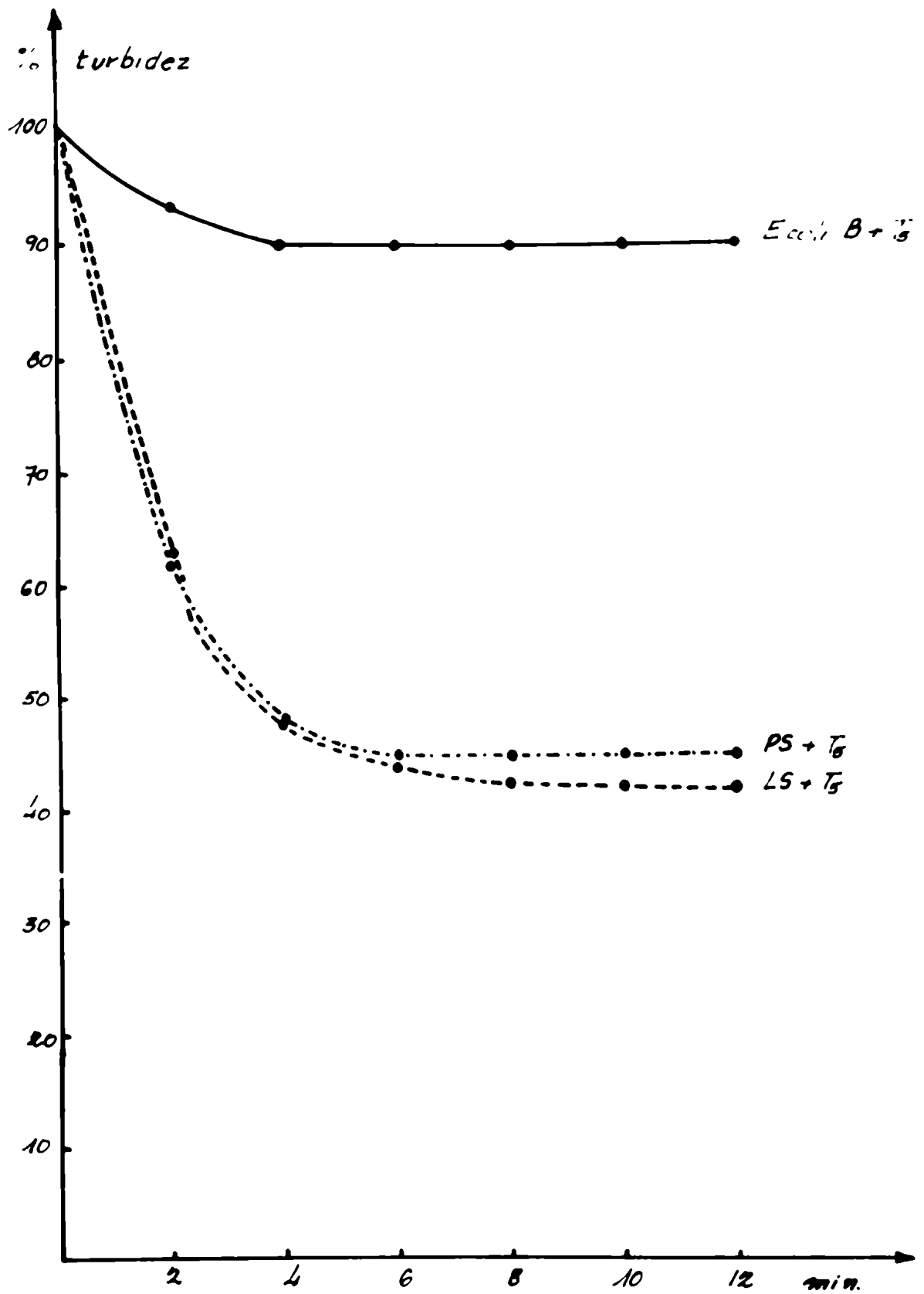


Gráfico 3. Lisis provocada por la adsorción de bacteriófagos T₅ en *Escherichia coli* B y en esferoplastos de penicilina y lisozima, medida en turbidimetría.

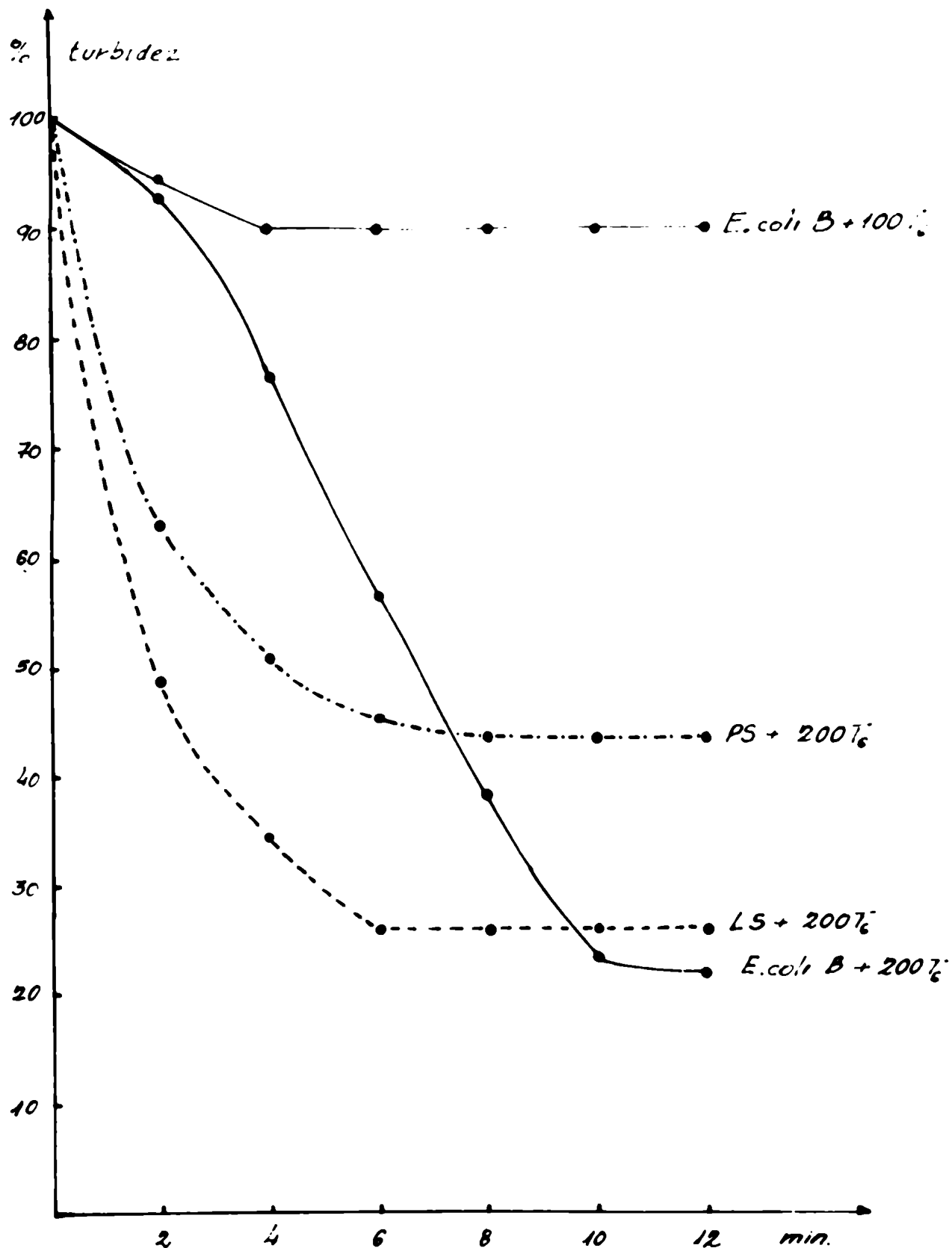


Gráfico 1. Lisis provocada por la adsorción de un antibiótico a *Escherichia coli* B y en esferoplastos de penicilina y lisozima, medida por turbidimetría.

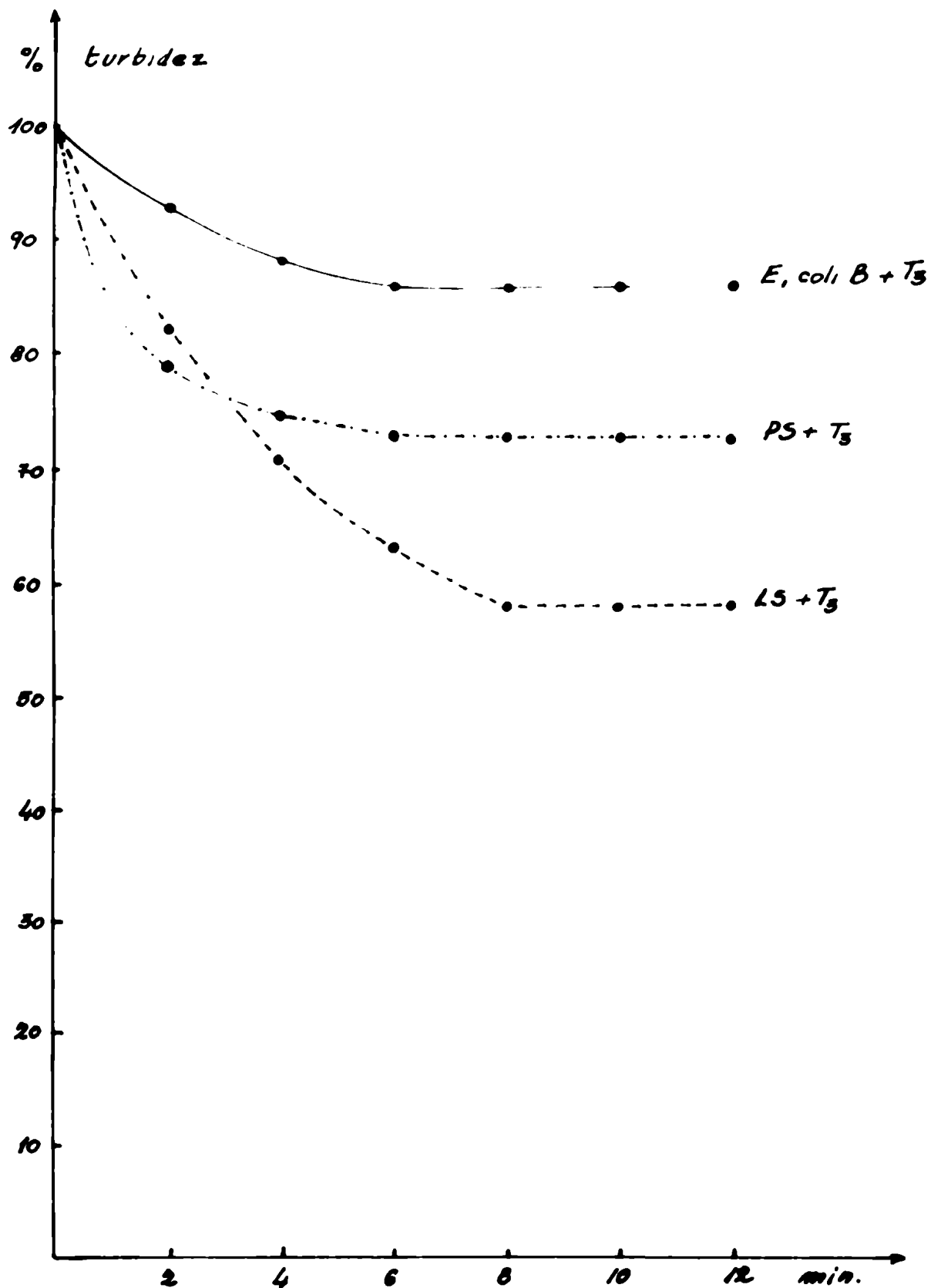


Gráfico 1. Lisis provocada por la adsorción de bacteriofagos T_5 en *Escherichia coli B* y en esferoplastos de penicilina y lisozima, medida por turbidimetría.

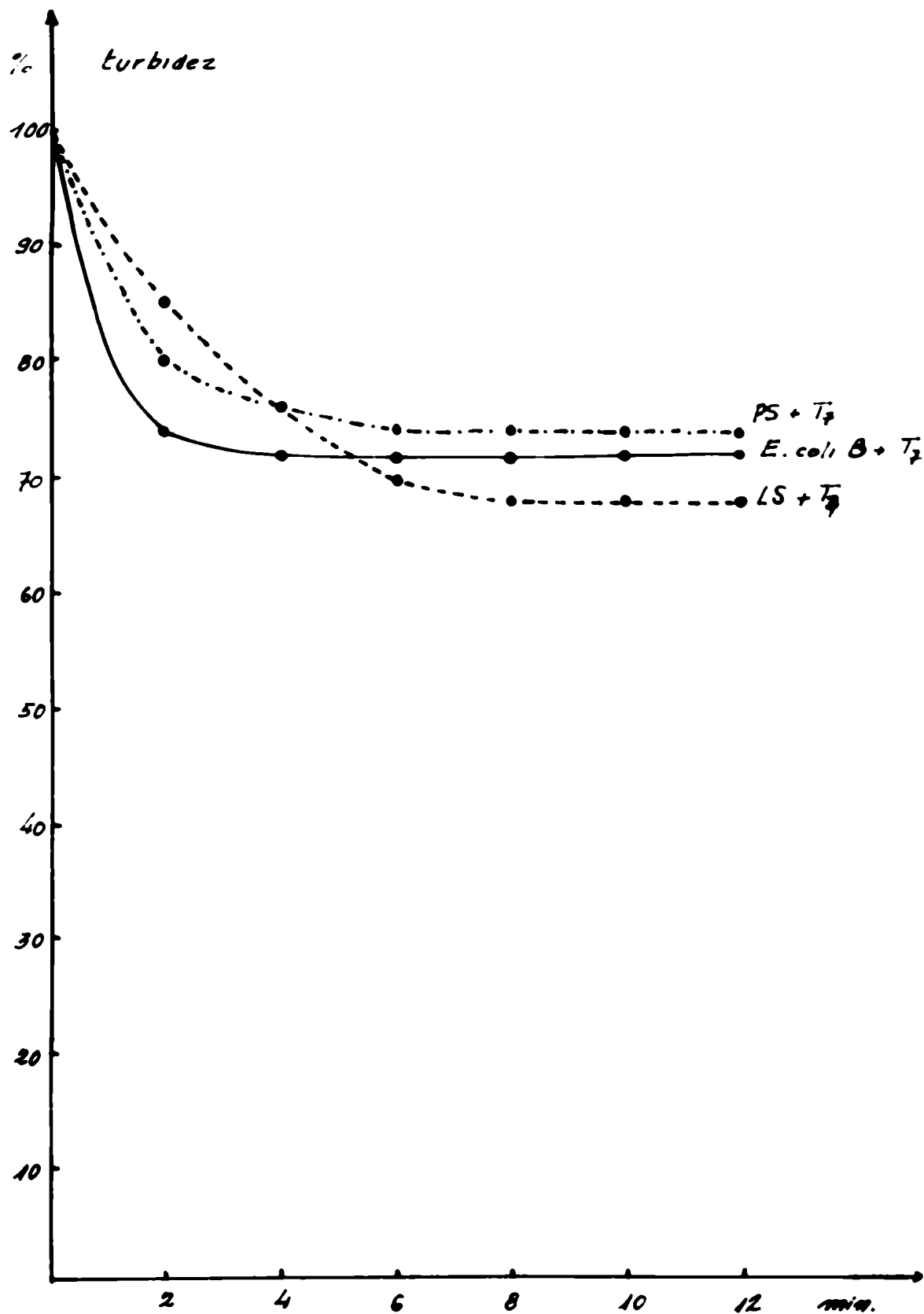


Gráfico 6. Lisis provocada por la adsorción de bacteriófagos T₇ en *Escherichia coli* B y en esferoplastos de penicilina y lisosina, medida por turbidimetría.

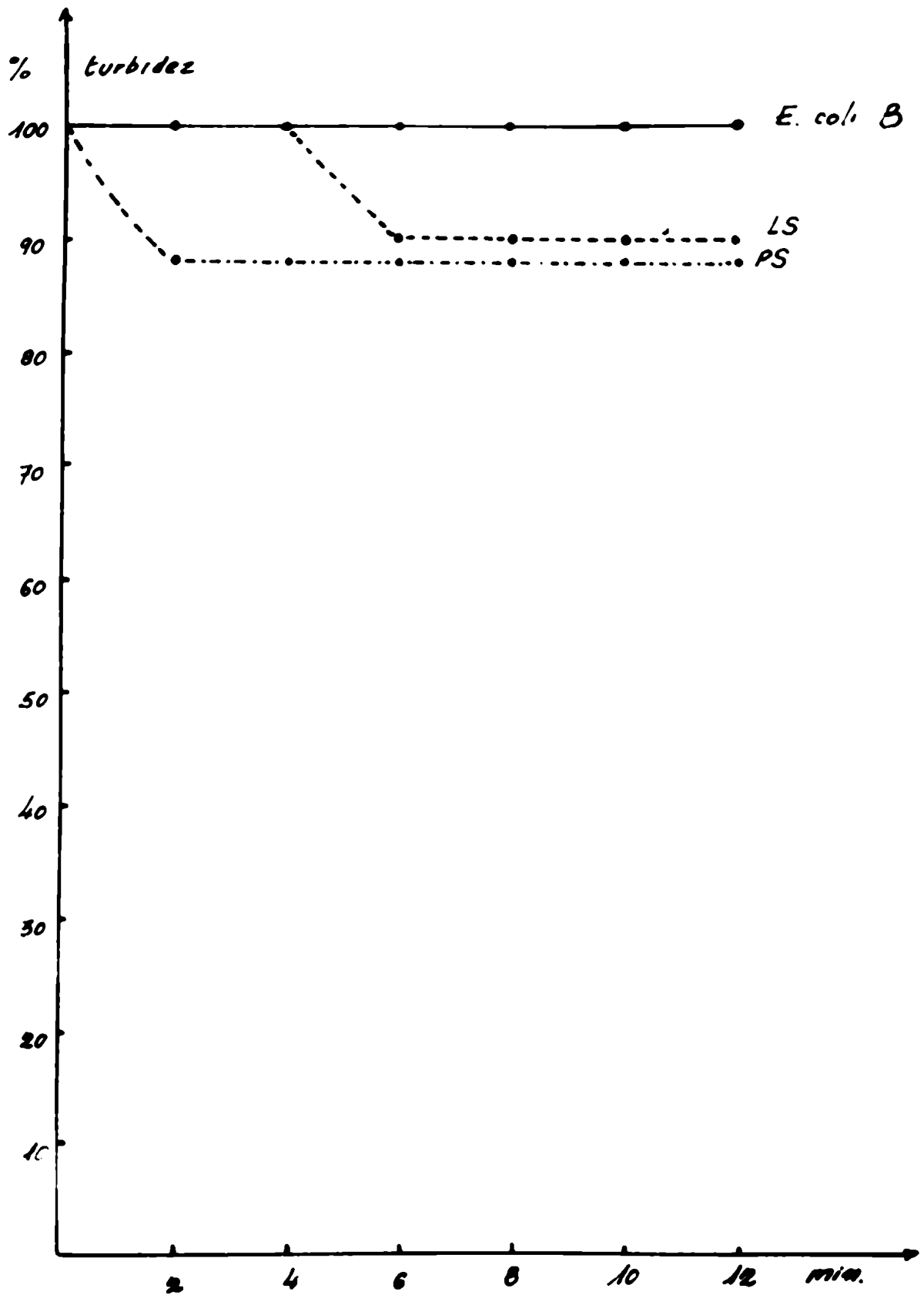


Gráfico 7. Acción de calor (37° C) sobre *Escherichia coli* B y esferoplastos de penicilina y lisozima.

efectiva en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA. Un fenómeno semejante aunque no tan pronunciado se observa con el fago T_3 . Ver gráfico No. 5.

Se advierte en el fago T_7 , al igual que en los fagos T_3 y T_5 , una adsorción reducida en las bacterias intactas que se extiende en este caso también a los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA. Ver gráfico No. 6. Todos estos fagos fueron probados con multiplicidad creciente de infección, ya que se suponía que la lisis deficiente en estos casos (T_3 , T_5 y T_7) podría ser causada por el tamaño pequeño de estos fagos. El aumento de la multiplicidad de infección no dio el resultado esperado.

Estudiando el bacteriófago T_6 se observó la misma lisis deficiente observada con T_3 , T_5 y T_7 . Pero al aumentar la multiplicidad de infección a 200 fagos/célula se obtuvo una eficiencia de lisis comparable con la de los fagos T_2 y T_4 . Ver gráfico No. 4.

Los resultados descritos fueron asegurados por los siguientes controles.

1. Se verificó la ausencia de toda sustancia capaz de inactivar a los bacteriófagos en el sobrenadante libre de células.
2. Se comprobó que el efecto de la temperatura no es un factor capaz de lisar a los esferoplastos. Ver gráfico No. 7.
3. Se realizaron pruebas rigurosas para asegurarse que se estaba

///

realmente en presencia de esferoplastos o sea que la conversión había sido realizada con éxito. Estas pruebas se efectuaban valiéndose de la sensibilidad osmótica típica de los esferoplastos. Se contaban los sobrevivientes de un choque osmótico realizado en buffer fosfato.

C) Determinación aproximada del número de receptores intactos en la pared celular de los esferoplastos.

La evaluación aproximada del número de receptores intactos en la pared celular de los esferoplastos de Escherichia coli inducidos por penicilina y lisozima-EDTA, da elementos de prueba para la apreciación de un daño eventual, producido por los agentes usados.

Se estudiaron en este caso la cinética de adsorción en función del número de bacteriófagos/célula para los bacteriófagos T_2 , T_5 y T_4 , infectando a las células con una multiplicidad de infección de 10, 50, 100 y 200 fagos/célula.

Se partió de la suposición que si los esferoplastos presentaran un número inferior de receptores intactos y disponibles que las bacterias intactas, la intensidad de lisis no debería aumentar si la célula es infectada con un número creciente de fagos por célula.

Los datos obtenidos se representan en los gráficos No. 8 - 16, pudiéndose advertir en todos los casos una lisis insignificante

///

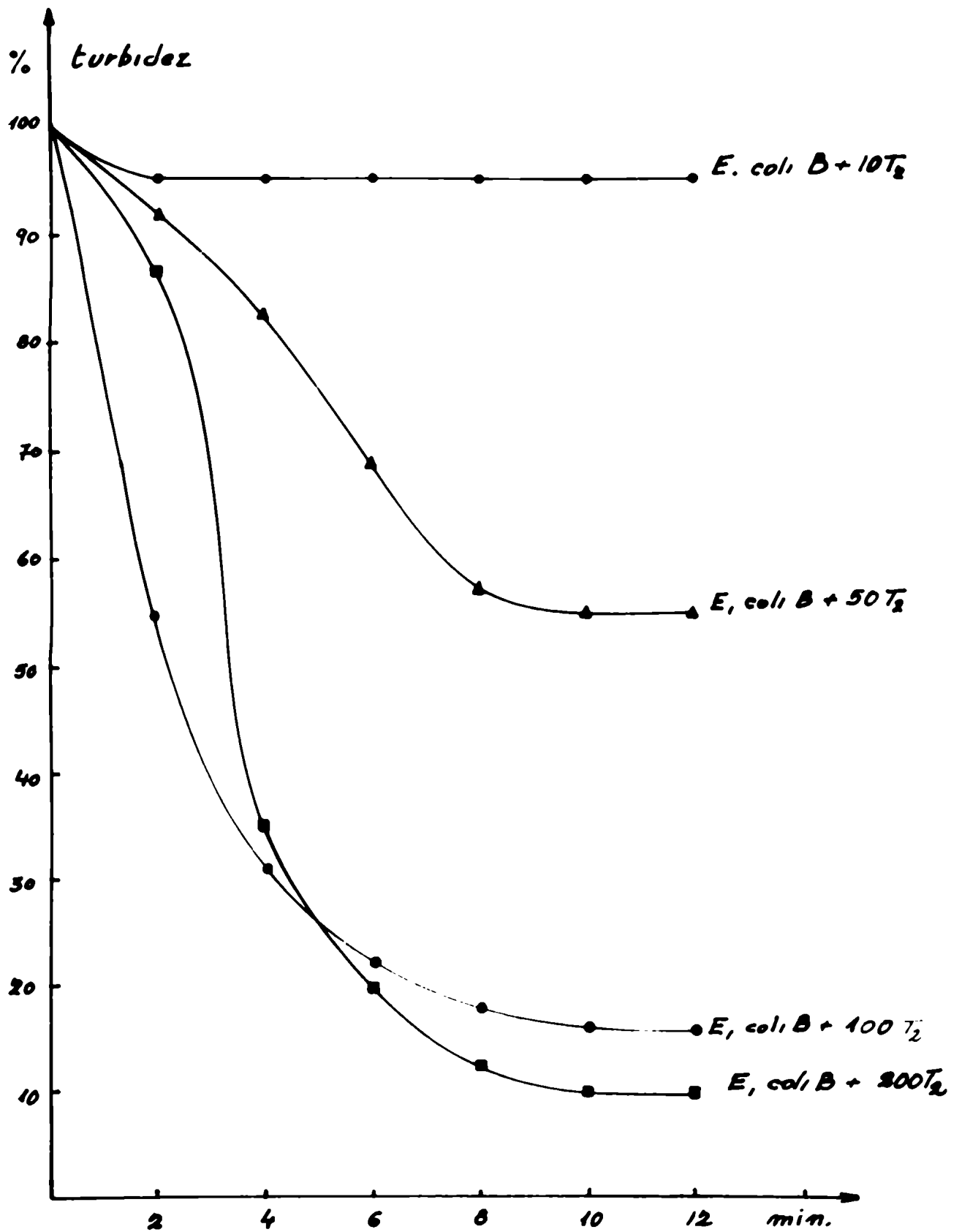


Gráfico a. Lisis provocada por la multiplicación de T_2 en suspensiones de coli B
 a diferentes multiplicidades de infección.

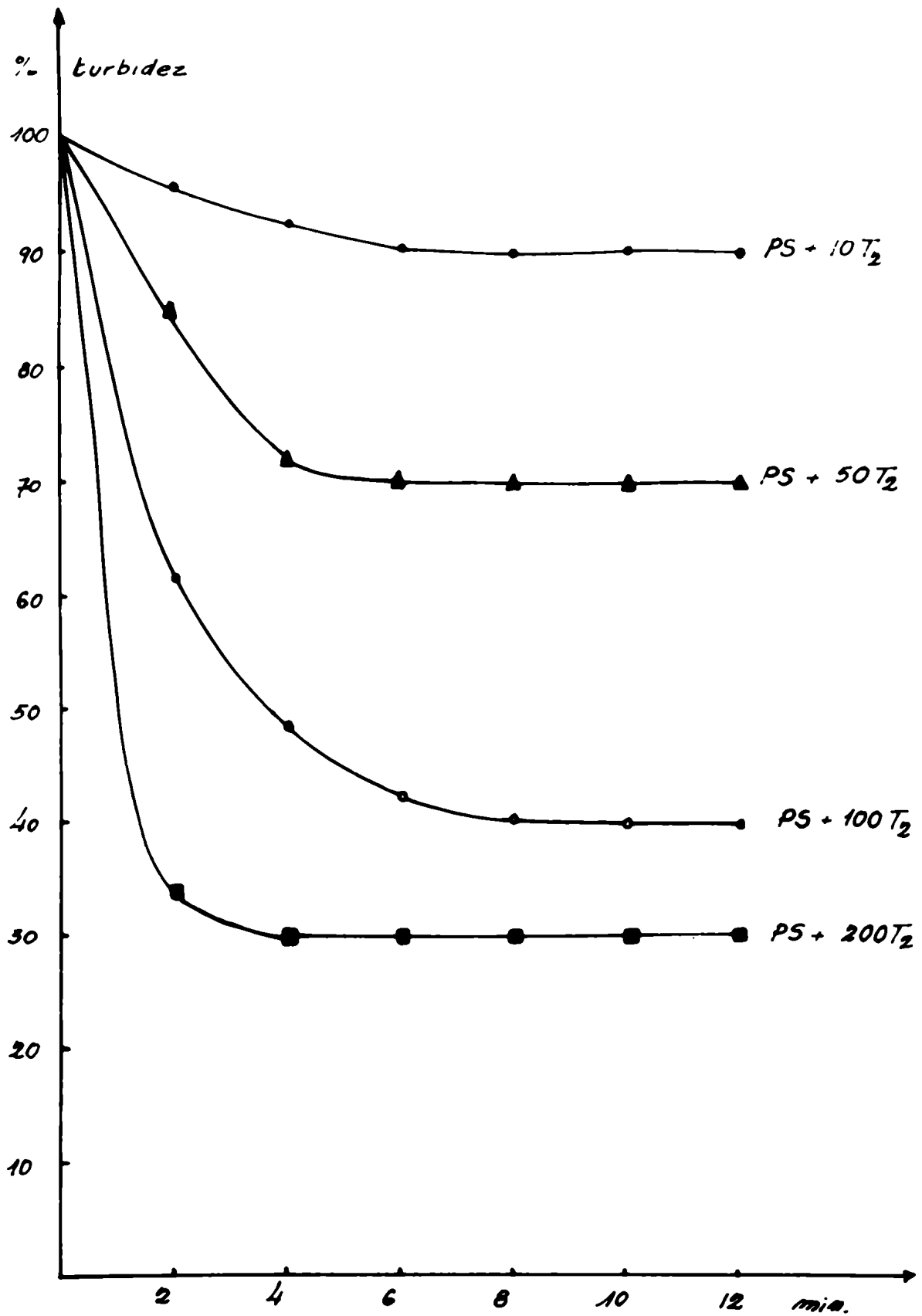


Gráfico 9. Lisis provocada por la adsorción de T_2 a ferropilanos de penicilina a diferente multiplicidad de infección.

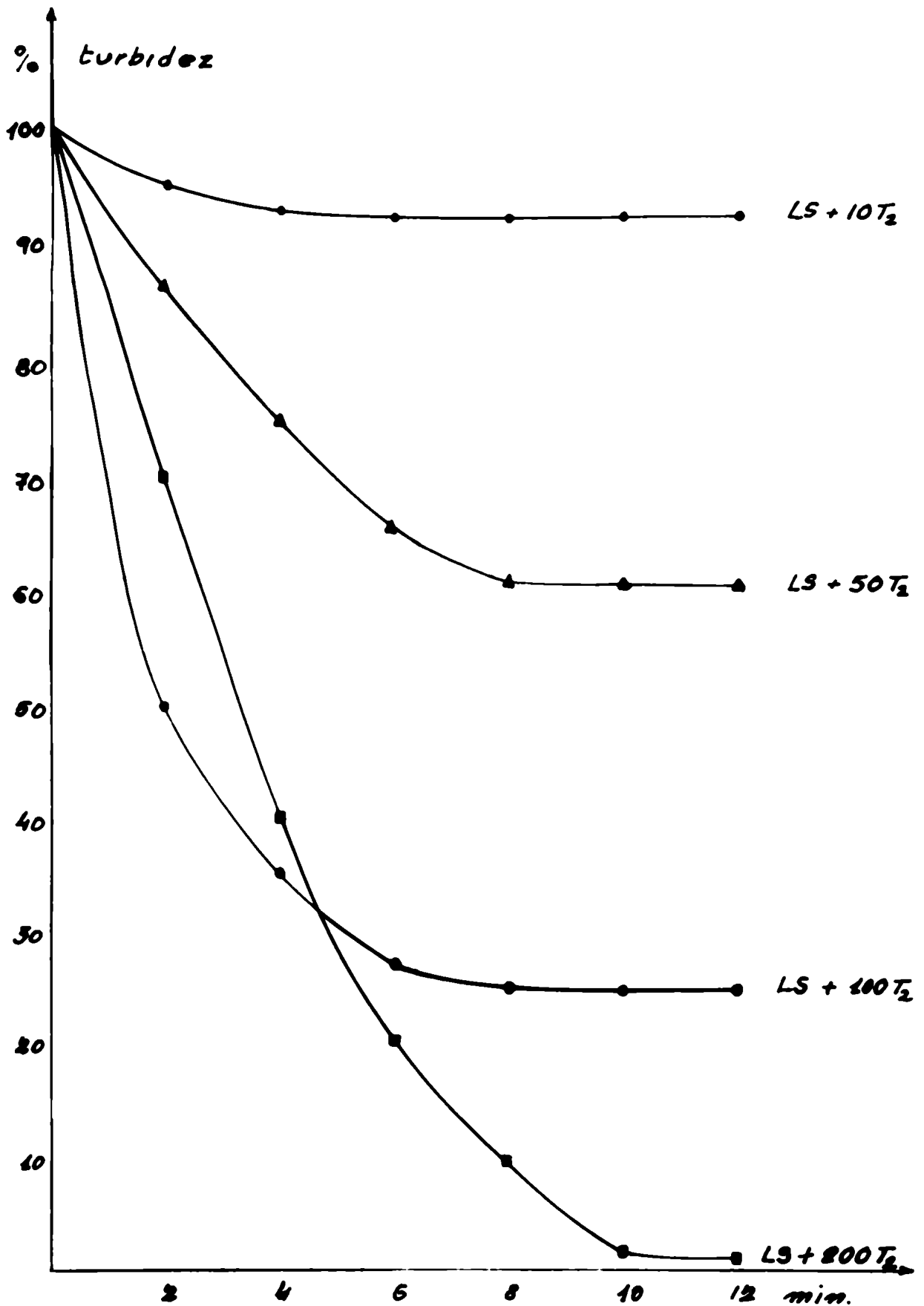


Gráfico 10. Lisis provocada por la adsorción de T₂ en esferoplastos de lisozima a diferente multiplicidad de infección.

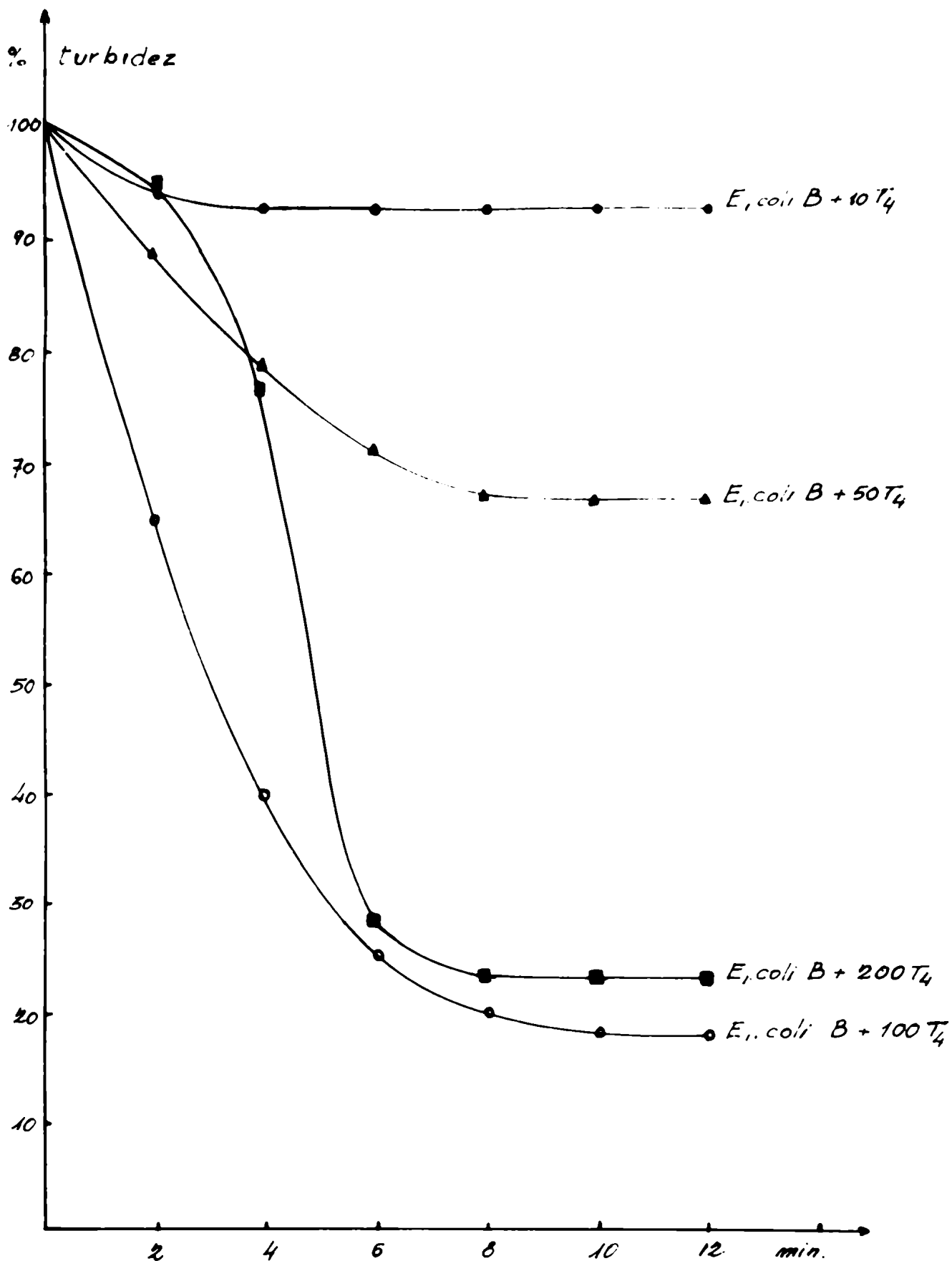


Gráfico 11. Lisis provocada por la adsorción de T₄ en *E. coli* B a diferente multiplicidad de infección.

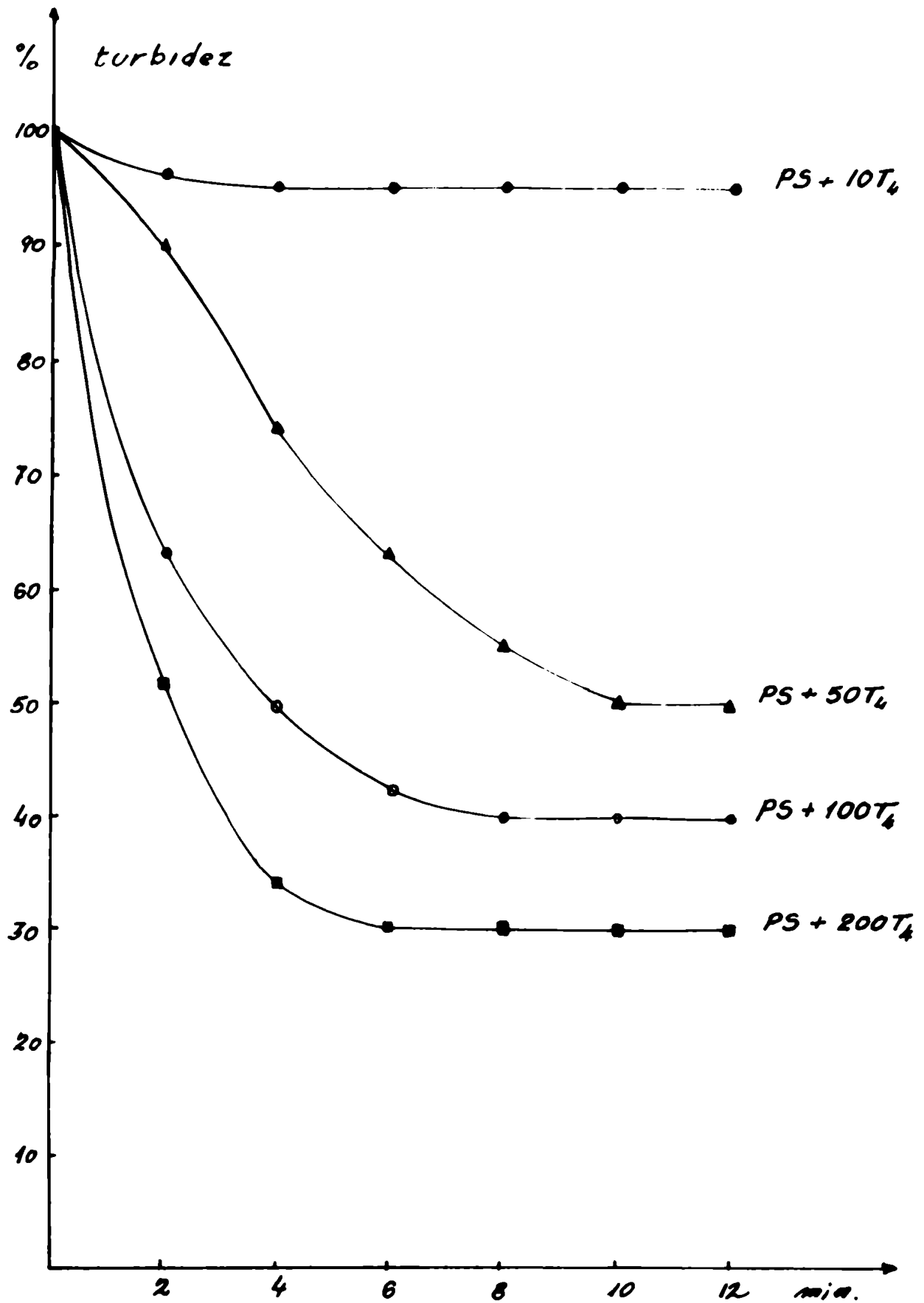


Gráfico 12. Lisis provocada por la adsorción de 10^{-4} en un cultivo de penicilina a diferente multiplicidad de infección.

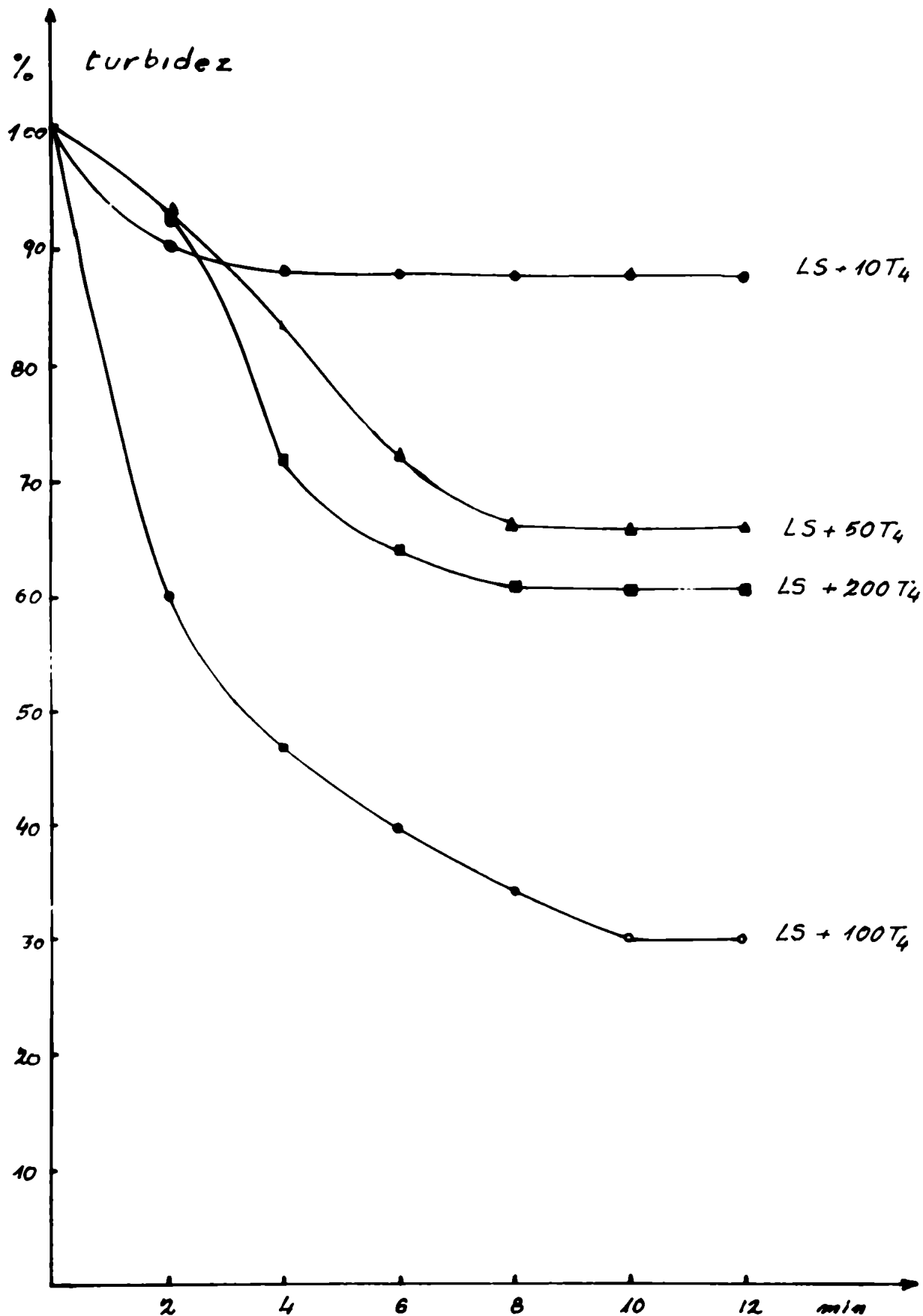


Gráfico 13. Lisis provocada por la adsorción de T₄ en esferoplastos de lisozima a diferente multiplicidad de infección.

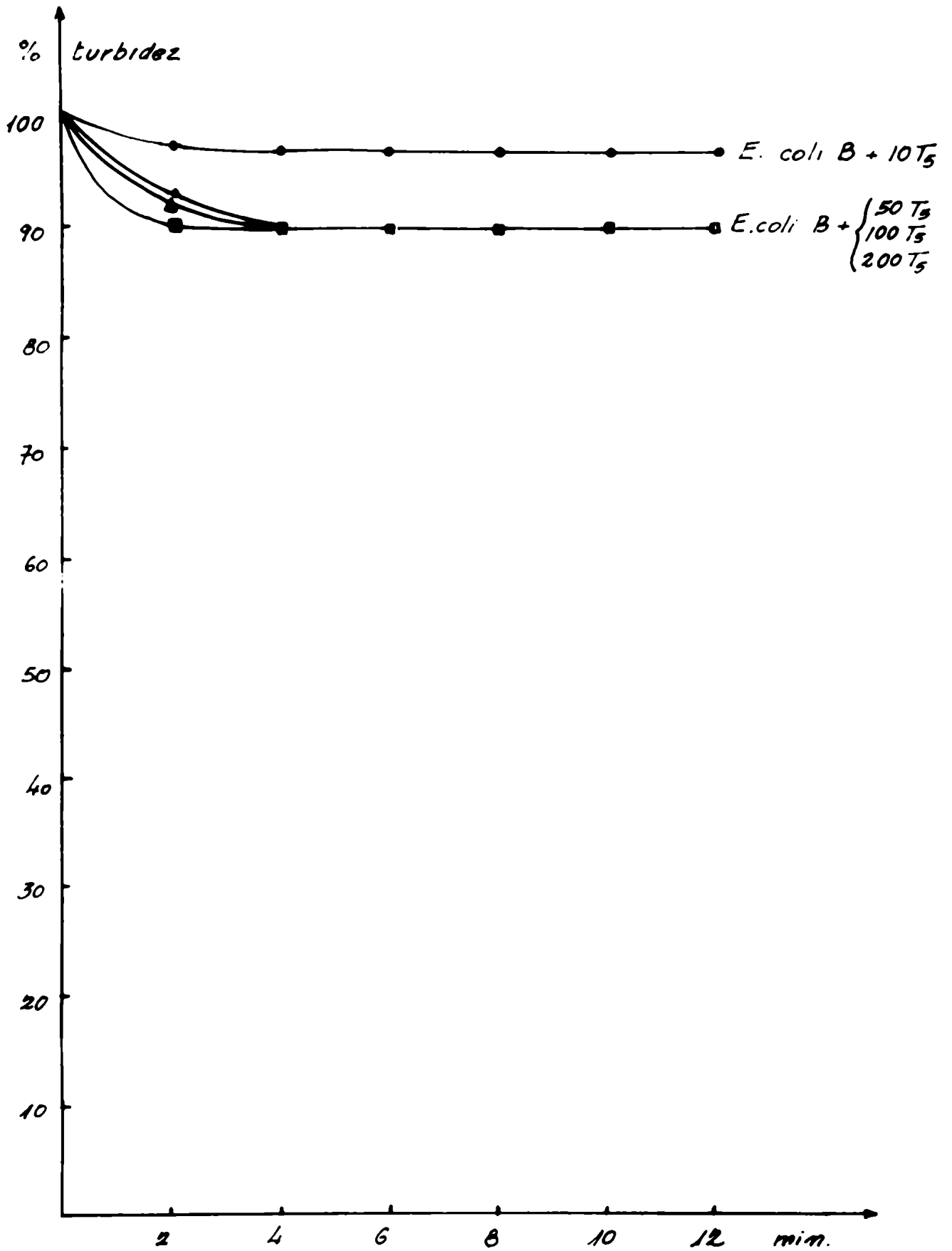


Gráfico 14. Lisis provocada por la adsorción de T₅ en E. coli B a diferente multiplicidad de infección.

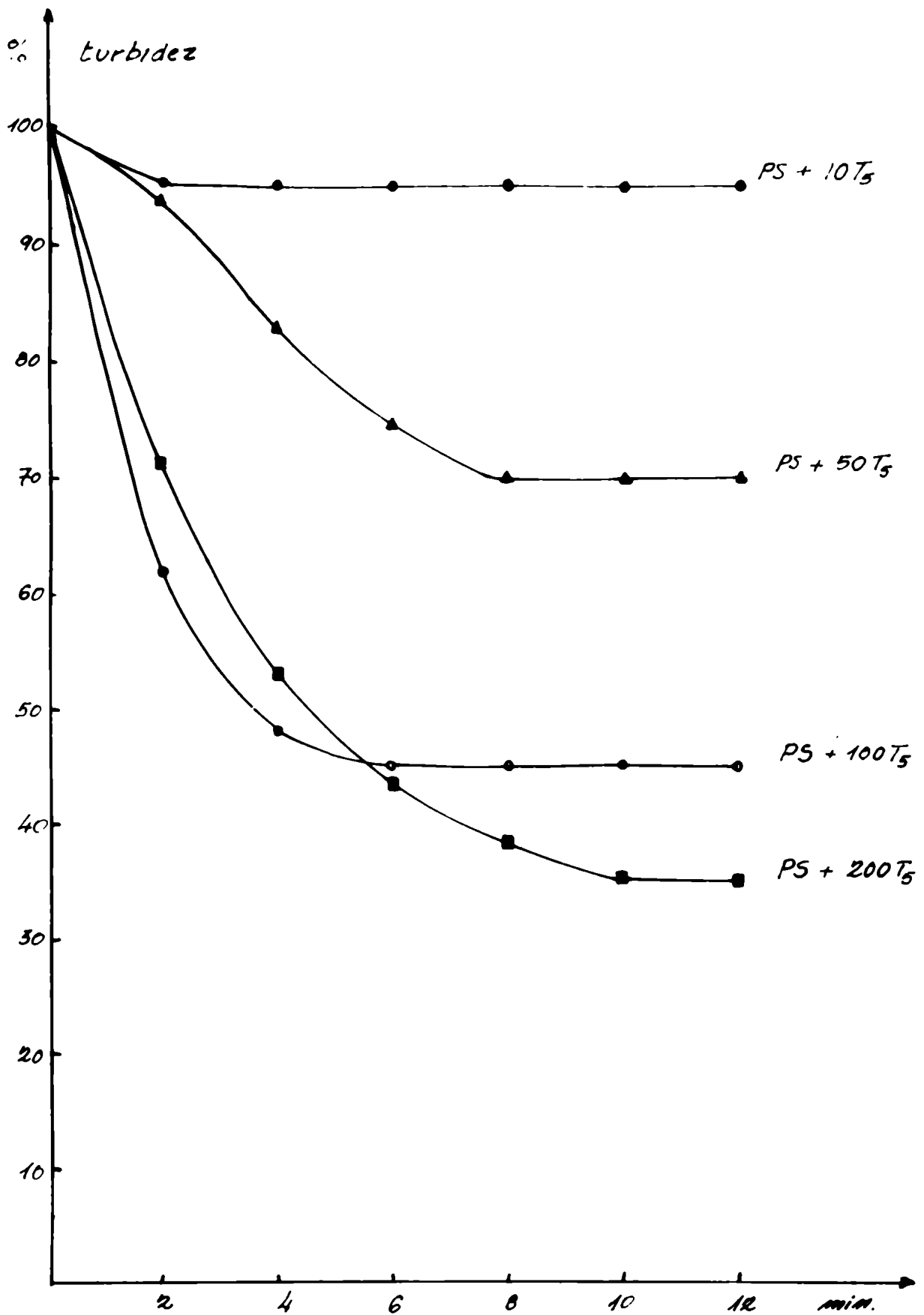


Gráfico 15. Lisis provocada por la adsorción de T₅ en esferoplastos de penicilina a diferente multiplicidad de infección.

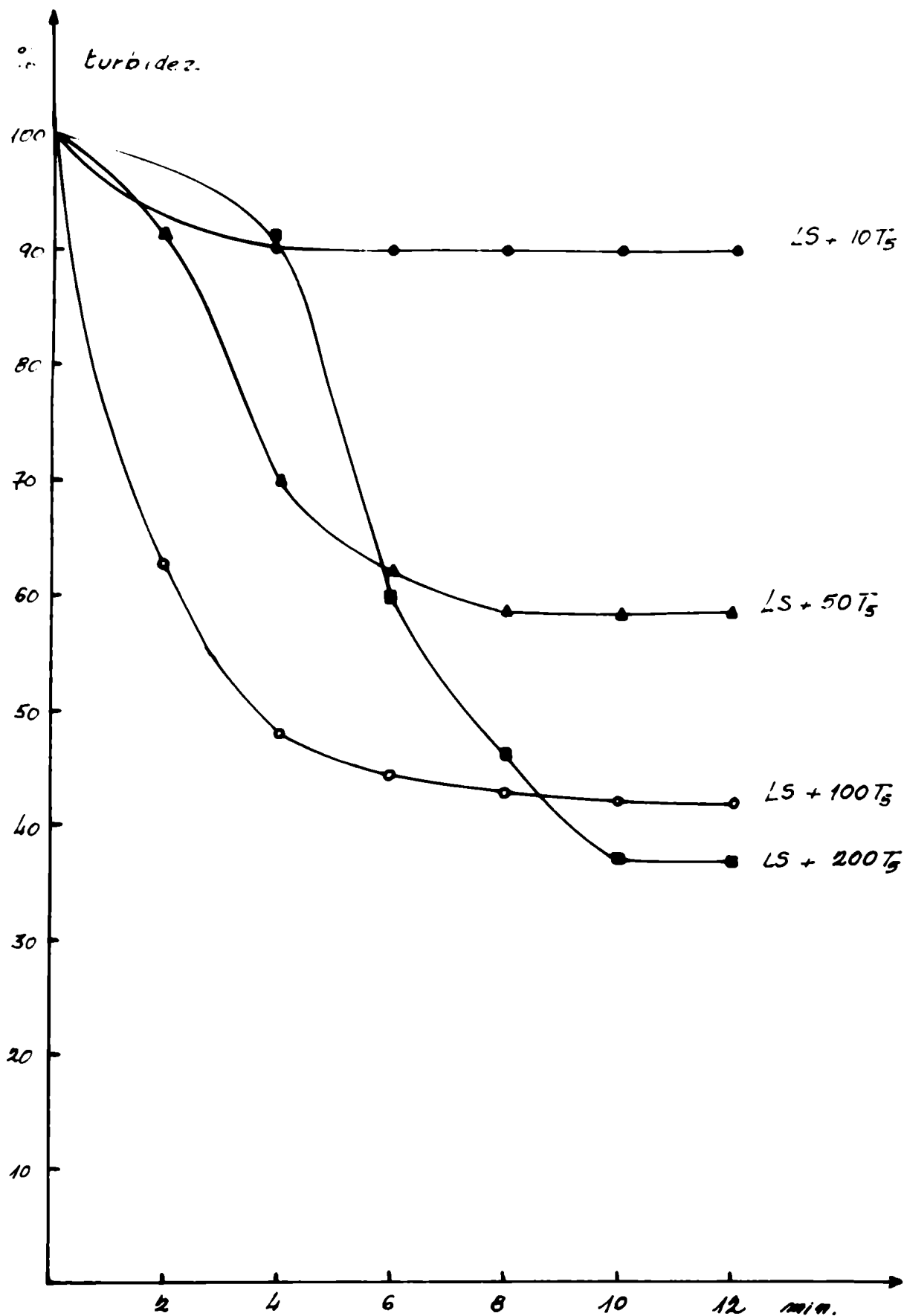


Gráfico 16. Lisis provocada per la adsorción de T₅ en esferoplastos de lisocima a diferente multiplicidad de infección.

al infectar con 10 fagos/célula, debido a que 10 fagos no son capaces de lisar a la célula mecánicamente (o por acción externa).

En cambio se demuestra claramente que al aumentar el número de partículas infectivas por célula, la velocidad de lisis aumenta en forma proporcional, al igual que en las bacterias intactas.

Llama la atención el comportamiento de T_5 con respecto a las bacterias intactas, donde puede concluirse que aparentemente en la pared celular no tratada, existen aproximadamente 50 receptores al alcance del bacteriófago. Ver gráfico No. 14. Al infectarse los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA con diferente multiplicidad de fagos/célula, se observa una marcada caída de turbidez. Ver los gráficos No. 15 y 16.

Es notable, pero inexplicable, que en prácticamente todos los casos en que se infectó con 200 fagos/célula, se provocó un retardo de la iniciación de la lisis de dos minutos. El fenómeno no tiene explicación ya que las partículas infectivas fueron agregadas todas en un único momento, y no se efectuó una sobreinfección de partículas infectivas adicional antes del término del período de latencia, que como es conocido, provoca retardo de lisis.

D) Microscopía electrónica de esferoplastos de Escherichia coli con bacteriófagos adsorbidos.

Es interesante poner en evidencia la adsorción de los bac-

///

teriófagos de la serie T en los esferoplastos de Escherichia coli inducidos por penicilina y lisozima-EDTA, por medio de observaciones al microscopio electrónico.

Como no es fácil obtener cortes en los cuales aparecen los bacteriófagos adsorbidos, y siendo además prácticamente imposible apreciar los fagos de tamaño más pequeño como el T₃ y T₇ junto a la pared celular, se optó por usar el método de filtración en agar y posterior metalización para reconocer en la célula intacta los bacteriófagos adsorbidos sobre la pared celular. Igual que en el caso de las preparaciones de cortes ultrafinos, se presentó el problema de la imposibilidad de fijar las células con ácido ósmico, obteniéndose resultados aceptables al exponer los esferoplastos a vapores de ferroceni al 40 %.

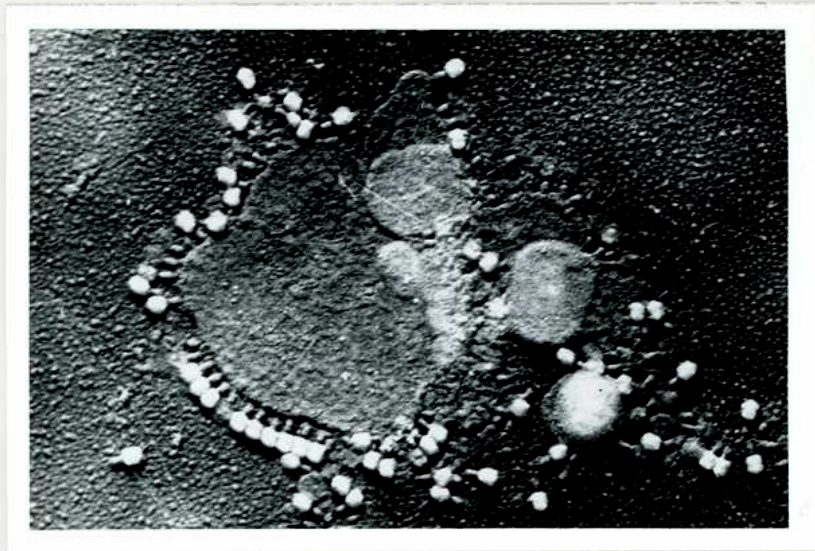
A pesar de extremar todos los cuidados, p.ej. de agregar espermina, agente estabilizante de los esferoplastos de lisozima (Bronn 1960), por lo general este tipo de esferoplastos lisaba, de manera que para el estudio de la superficie de la célula se optó por trabajar con los esferoplastos de penicilina.

En la fotografía No. 1, se observa un esferoplasto de penicilina, atacado por T₂. La muestra fue tomada a los cuatro minutos, pudiéndose apreciar ya, el efecto llamado lisis provocada por acción exterior o lisis mecánica (en contraposición de la lisis provocada por la desencadenación de los mecanismos celulares, o sea la lisis

///

provocada por acción interior). Las cabezas de los bacteriófagos, que aparecen marcadamente nítidas, pertenecen a bacteriófagos llenos de ADN, en cambio las cabezas oscuras representan los llamados "ghosts" o sea que son bacteriófagos que ya han inyectado su ADN dentro de la célula.

El bacteriófago T_6 no fue representado porque se lo clasifica en el mismo grupo que el T_2 .



Fotografía No. I. Esferoplasto de penicilina con T_2 . Aumento m.e.:
10.000 x. Aumento total: 40.000x.

La fotografía No. II representa un esferoplasto de penicili

///

na al cual han adsorbido bacteriófagos T_3 . El pequeño tamaño del fago dificulta su localización sobre la célula, pero es apreciable claramente en el borde de ésta. Debido a su reducido tamaño es imposible apreciar si existen cabezas vacías. La muestra fue tomada en los primeros dos minutos. Dado que los fagos T_3 y T_7 se clasifican en un mismo grupo y adsorben en la misma capa, se prescindió de obtener fotografías de esferoplastos con T_7 .

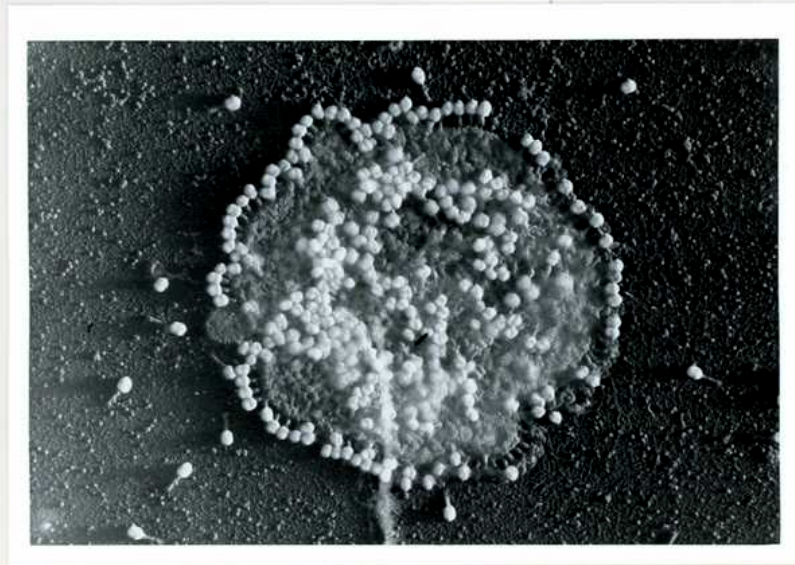


Fotografía No. II. Esferoplasto de penicilina con T_3 . Aumento m.e.:
8.000x. Aumento total: 28.000x.

La muestra del esferoplasto de penicilina con T_4 (fotogra-

///

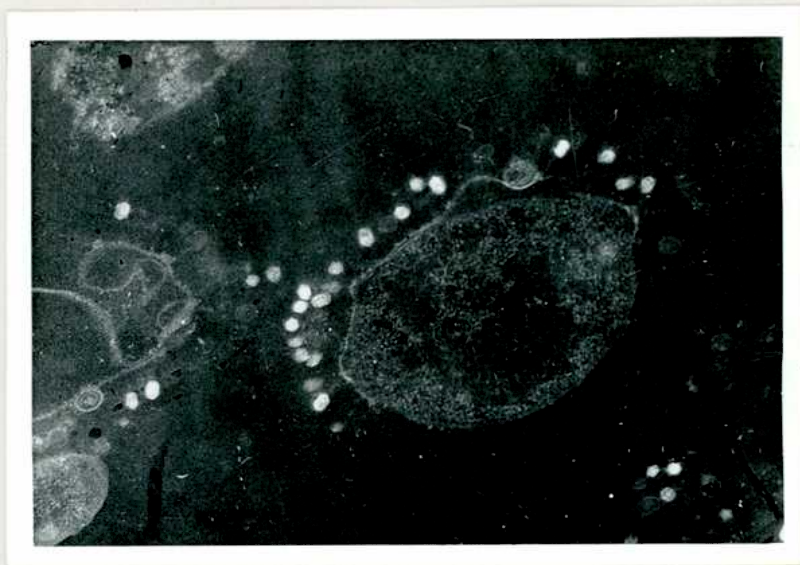
fía No. III) adsorbidos, fue tomada antes de los 2 minutos, contados a partir del momento de la infección, obteniéndose así una célula intacta. A pesar del poco tiempo transcurrido después de la infección con el bacteriófago ya aparecen algunas cabezas vacías.



Fotografía No. III. Esferoplasto de penicilina con T_4 . Aumento m.e.: 8.000x. Aumento total: 28.000x.

En la fotografía No. IV pueden advertirse los bacteriófagos T_5 adsorbidos a un esferoplasto de penicilina. La muestra fue extraída antes de los dos minutos después de la infección.

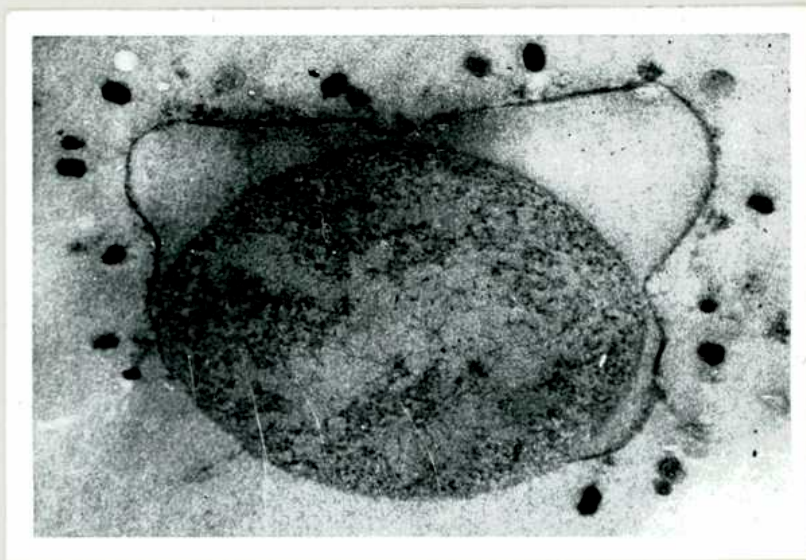
///



Fotografía No. V. Esferoplasto de lisozima-EDTA con T_2 . Corte ultrafino. Aumento m.e.: 10.000x. Aumento total: 40.000x.

La fotografía No. VI representa T_4 adsorbidos a un esferoplasto de lisozima-EDTA a los dos minutos de la infección. Se observan cabezas de fagos llenas de ADN contrastadas intensamente con acetato de uranilo y cabezas vacías (el ADN ya ha sido inyectado en la célula) menos nítidas. Al igual que en la fotografía No. V, se observan las dos membranas formadas por capas múltiples, definidas como la membrana citoplasmática y la pared celular propiamente dicha.

///



Fotografía No. VI. Corte ultrafino de esferoplasto de lisozima-EDTA, con T₄. Aumento m.e.: 10.000x. Aumento total: 50.000x.

E) Reproducción de bacteriófagos en esferoplastos de Escherichia coli.

Después de haber comprobado en los puntos B y C la presencia de las capas lipoproteica y lipopolisacárida de la pared celular en los esferoplastos por medio de la adsorción de bacteriófagos y haber observado la inyección del ADN de los mismos a las células tratadas, se consideró interesante seguir el estudio del ciclo de reproducción de los bacteriófagos para obtener una idea de la capacidad de síntesis y por ende del estado metabólico de los esferoplas

///

tos de Escherichia coli inducidos por penicilina y lisozima-EDTA.

A tal efecto se infectaron cultivos de esferoplastos con un título de 5×10^8 /ml con 5 bacteriófagos/célula. Después de inocular 60 a 100 minutos (según el bacteriófago) a 37°C , se tomaron muestras del sobrenadante que fueron plaqueados para su estudio.

Los resultados obtenidos con esferoplastos de penicilina están reunidos en la tabla I. Los bacteriófagos T_2 y T_4 presentan el ciclo de adsorción, eclipse y maduración idéntico al de la bacteria Escherichia coli intacta, si infectan a los esferoplastos de penicilina. Se obtienen 50 fagos por célula, lo que significa que cada fago llega a reproducirse 10 veces. Ver gráfico No. 17. Este valor está por debajo del obtenido con bacterias intactas. El resultado, en el caso de T_2 coincide con el trabajo publicado por Denes y Polgár (1959).

T_5 presenta en los esferoplastos de penicilina la adsorción esperada, pero no es posible detectar la reproducción del bacteriófago.

El fago T_3 presenta una cuota relativamente baja de adsorción, resultado que coincide con los valores obtenidos en los experimentos de adsorción, pero demuestra una buena reproducción del bacteriófago. Ver gráfico No. 17.

Los bacteriófagos T_6 y T_7 no fueron estudiados especialmen-

///

te ya que T_6 se clasifica con T_2 en un mismo grupo y T_7 presenta tantas homologías con T_3 que es clasificado junto con éste.

Las experiencias con los esferoplastos de lisozima-EDTA dieron resultados inesperados.

No fue posible reproducir T_2 , T_4 , T_5 o T_3 en este tipo de células. Ver tabla II y gráfico No. 17. El resultado era inesperado debido a que en las observaciones hechas al microscopio electrónico aparecen los bacteriófagos adsorbidos a los esferoplastos y además se advierten algunas cabezas vacías de bacteriófagos (ghosts) lo que significa que es posible la inyección de ADN.

Además Fraser y Mahler (1956) habían logrado con éxito el desarrollo de T_3 en esferoplastos de lisozima-EDTA. El método consistía en infectar a la bacteria intacta primero, para efectuar enseguida después la conversión a esferoplastos. Este método se aplicó también en el caso presente, pero no se obtuvieron resultados satisfactorios en la conversión de las células preinfectadas.

Los estabilizantes de los esferoplastos de lisozima como la sueroalbúmina y la espermina no lograron mejorar ningún tipo de resultados.

Los resultados negativos obtenidos en las experiencias de reproducción de nuevos fagos en esferoplastos de lisozima podrían atribuirse a dos causas diferentes:

///

1. Que después de adsorber la partícula del fago en la pared celular, la infección no tiene lugar, factor improbable, ya que en las preparaciones al microscopio electrónico aparecen cabezas de fagos vacías.
2. Que la reproducción de los fagos nuevos no es posible debido a una alteración del metabolismo general de la célula huésped.

En la suposición de que el metabolismo se habría alterado por la acción de la lisozima-EDTA sobre la bacteria, se realizaron una serie de experimentos incubando Escherichia coli, esferoplastos de penicilina y esferoplastos de lisozima con C^{14} -D-L-leucina. Las células empleadas al alcanzar un título de 5×10^7 /ml se encontraban en pleno desarrollo. Incubando las células con C^{14} -D-L-leucina a $37^\circ C$ durante treinta minutos, se comprobó que los esferoplastos de lisozima presentan una capacidad de síntesis de menos del 5 % y los esferoplastos de penicilina sintetizan 37 % con respecto a las bacterias Escherichia coli intactas. Los datos obtenidos se presentan en la tabla No. III.

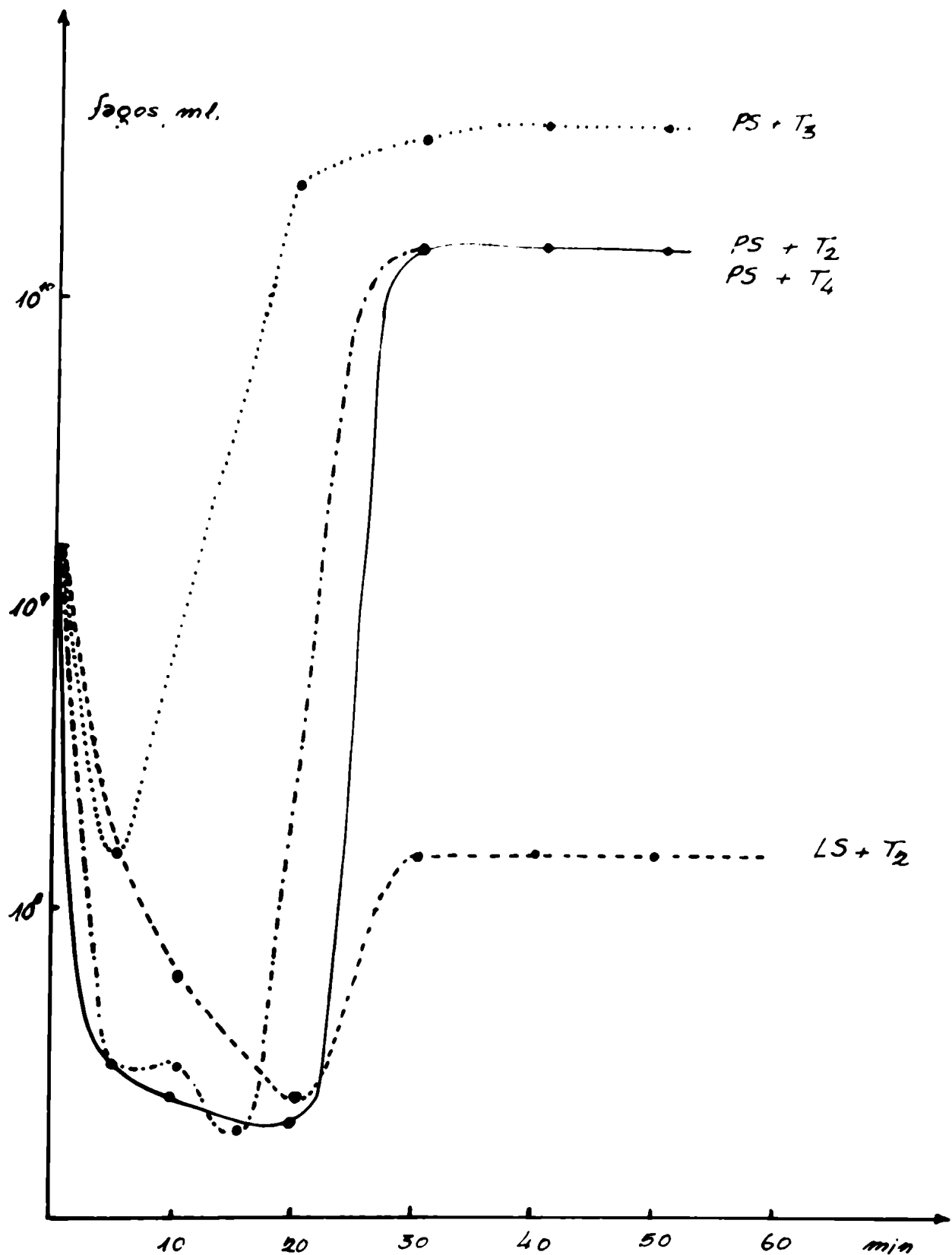


Gráfico 17. Adsorción, eclipse y maduración de los bacteriófagos T₂, T₃ y T₄ en esferoplastos de penicilina y lisosina.

TABLA I

Adsorción, eclipse y maduración de bacteriófagos de esferoplastos de penicilina

Tiempo	T ₂	T ₄	T ₅	T ₃	Control; E.coli B + T ₂
0	2×10^9	2×10^9	$2,5 \times 10^9$	$2,7 \times 10^9$	1×10^9
5	5×10^7	5×10^7	8×10^8	4×10^8	2×10^7
10	4×10^7	5×10^7	$4,8 \times 10^8$	2×10^7	3×10^7
15	$3,4 \times 10^7$	3×10^7	5×10^8	5×10^9	8×10^7
20	3×10^7	5×10^8	6×10^8	$3,7 \times 10^{10}$	$1,6 \times 10^8$
30	2×10^{10}	2×10^{10}	$6,1 \times 10^8$	$4,6 \times 10^{10}$	$2,4 \times 10^9$
40	2×10^{10}	2×10^{10}	$6,1 \times 10^8$	$5,2 \times 10^{10}$	$1,7 \times 10^{10}$
50	2×10^{10}	2×10^{10}	$6,5 \times 10^8$	$6,6 \times 10^{10}$	5×10^{10}
60	-----	-----	$7,1 \times 10^8$	$8,6 \times 10^{10}$	5×10^{10}
80	-----	-----	$8,9 \times 10^8$	$8,6 \times 10^{10}$	-----
100	-----	-----	$3,6 \times 10^9$	-----	-----

TABLA II

Adsorción eclipse y maduración de bacteriófagos en esferoplastos de lisozima.

Tiempo	T ₂	T ₄	T ₅	T ₃
0	2×10^9	2×10^9	3×10^9	3×10^9
5	2×10^8	3×10^8	1×10^9	2×10^8
10	8×10^7	7×10^7	4×10^8	4×10^8
15	6×10^7	5×10^7	6×10^8	6×10^8
20	4×10^7	5×10^7	8×10^8	8×10^8
30	2×10^8	2×10^8	$2,6 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
40	2×10^8	3×10^8	$2,6 \times 10^9$	$1,8 \times 10^9$
50	2×10^8	3×10^8	3×10^9	3×10^9
60	2×10^8	-----	3×10^9	3×10^9

TABLA III

Incorporación de proteínas en *E. coli* B, esferoplastos de penicilina y en esferoplastos de lisozima después de 30 minutos de incubación a 37°C en C¹⁴-D-L-leucina.

	Radioactividad inicial (Background)	<i>E. coli</i> B	Esferoplasto de penicilina	Esferoplastos de lisozima
Peso disco + sustancia		0.594	0.588	0.599
Peso disco		0.588	0.581	0.592
Peso sustancia		0.006	0.007	0.007
Min/1000 cuentas	86	2.81	6.35	77.60
Cuentas/min	11	355	160	13
Cuentas/min - radioactividad inicial		344	149	2
Factor autoabsorción		0.955	0.945	0.945
Cuentas/min/factor		365	160	2.14
Cuentas/min/mg peso		607	228	30.5
% de incorporación de proteínas		100	37	4,9

DISCUSION Y CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, surgen las siguientes conclusiones:

A. Determinación del grado de integridad de la pared celular de los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA.

Normalmente los bacteriófagos se prenden por la punta de sus colas a los receptores específicos situados en la superficie de la pared celular. Si por algún motivo los receptores han sido destruidos, el virus no puede penetrar en la célula bacteriana y ésta es por lo tanto resistente al bacteriófago. Los resultados obtenidos en este trabajo y discutidos a continuación demuestran que los esferoplastos de las bacterias Gram-negativas *Escherichia coli* retienen su sensibilidad a los bacteriófagos específicos y ponen en evidencia de esta manera que los receptores no fueron destruidos durante el proceso de esferoplastización. Como es sabido, los receptores están localizados en las capas lípidas exteriores de la pared celular.

Por medio del estudio sistemático de la adsorción de los bacteriófagos de la serie T, se investigó el grado de integridad de la pared celular en bacterias *Escherichia coli* tratadas con penicilina y lisozima-EDTA. Las cinéticas de adsorción estudiadas por medio de turbidimetría demuestran que las bacterias *Escherichia coli* tratadas con penicilina y lisozima-EDTA son capaces de

///

adsorber todos los bacteriófagos de la serie T.

Por lo tanto queda demostrado que el tratamiento de la pared celular por acción de la penicilina (alteración metabólica) y de la lisozima (rotura de la pared celular por vía enzimática) no afecta a los receptores para bacteriófagos de la serie T que están incluidos en las capas lipopolisacárida y lipoproteica. Estos resultados confirman nuevamente que las bacterias Gram-negativas Escherichia coli mantienen después del tratamiento con penicilina y lisozima-EDTA las capas lipopolisacárida y lipoproteica y pueden ser clasificadas en el grupo de esferoplastos (a diferencia de las Gram-positivas que pierden completamente su pared celular, formando de esta manera protoplastos).

B. Adsorción de los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇.

La adsorción de los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇ no se produjo en los primeros ensayos. Se pudo comprobar que este fenómeno se debía al hecho de que los esferoplastos son inducidos y mantenidos en medios hipertónicos que contienen sacarosa, que inhibe la adsorción de los bacteriófagos arriba citados. Eliminado este inconveniente reduciendo la concentración de sacarosa, se obtuvieron cinéticas de adsorción como las conocidas para T₂ y T₅.

C. Análisis de las cinéticas de adsorción de los bacteriófagos de la

///

serie T en los diferentes tipos de células estudiadas. Ubicación de los receptores.

Los fagos T_2 y T_4 adsorben en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA con la misma intensidad que en las bacterias intactas. Este resultado es interesante si consideramos el esquema de distribución de los receptores específicos para los bacteriófagos de la serie T realizado por Weidel (1958) y Weidel, Frank y Martín (1960). Según los trabajos realizados por estos autores, el mucopolímero no tiene receptores. La adsorción observada para T_3 , T_4 y T_7 descrita hasta 1960, como teniendo lugar en la capa rígida (mucopolímero) se producía en realidad sobre restos de lipopolisacárido adheridos al mucopolímero. Los autores citados comprobaron que los receptores específicos para T_3 , T_4 y T_7 se encuentran en el lipopolisacárido.

Se supone por otro lado que en la capa lipoproteica se encuentran los receptores específicos para T_2 y T_6 . No fue posible hasta el momento, demostrar experimentalmente que los receptores para T_2 y T_6 se encuentren en la capa lipoproteica, dado que los procedimientos necesarios para aislar la lipoproteína, inactivan a los receptores. (Quigley y colab. en 1969 demuestran únicamente que los receptores del T_6 no se encuentran en el mucopolímero. Debido a que no se detectan los receptores específicos para T_2 y T_6 en el mucopolímero ni en el lipopolisacárido, se llega a la conclusión de que deben estar situados en la lipo-

///

proteína. (Weidel 1958).

Finalmente Weidel y colaboradores (1954) y Weidel (1958) dedujeron de que el receptor específico par T_5 debería estar ubicado al azar o discontinuamente en las capas lipopolisacárida y lipoproteica. El receptor es sumamente lábil frente a tratamientos químicos.

Ahora bien, comparando los resultados de este trabajo con el esquema de distribución de los receptores específicos de Weidel, el hecho de que T_3 , T_4 y T_7 adsorban en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA indica la presencia de sus receptores intactos en la capa lipopolisacárida. Por otra parte la adsorción de T_2 y T_6 prueba la presencia de sus receptores intactos probablemente en la capa lipoproteica.

El hecho de que la lisis de Escherichia coli intacta es pobre en el caso de la infección con T_3 y T_7 , concuerda con los resultados descritos por Weidel, Koch y Lohss (1954) quienes habían observado poca actividad de adsorción de T_3 y T_7 frente a membranas bacterianas aisladas. Comprobaron además la desaparición fácil y rápida de la actividad receptora de Escherichia coli frente a T_3 y T_7 al tratar la bacteria con agentes nocivos para la célula.

En el caso de T_3 se observa una mejor adsorción en los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA que en la bacteria in-

///

taote. Este resultado hace pensar que los agentes de conversión atacan de alguna forma la capa lipoproteica, de manera que los receptores para T_3 existentes en el lipopolisacárido, pero cubiertos por la lipoproteína, capa muy plástica, quedan descubiertos, libres a la adsorción.

Interesante resultó ser el estudio de la adsorción del bacteriófago T_5 . La lisis es mínima al adsorber T_5 en *Escherichia coli* intacta. En cambio se obtiene una buena lisis infectando los esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA con el bacteriófago citado. Podría deducirse de este modo que, al igual que en el caso de T_3 (localizado en la capa lipopolisacárida), los receptores para T_5 se encuentran cubiertos por la capa lipoproteica en la capa lipopolisacárida. Los datos obtenidos inducen a pensar que la acción de la penicilina y la lisozima-EDTA descubre áreas de receptores.

La necesidad de tener que infectar las bacterias y los esferoplastos con 200 bacteriófagos T_6 por célula no ha tenido explicación hasta el momento, dado que debe descartarse la hipótesis de que se trate de una reacción impedida entre los receptores y los fagos, ya que se considera que los receptores específicos para T_6 se encuentran en la capa lipoproteica o sea en la exterior. El hecho de que la lisis es más eficiente a mayor multiplicidad de infección, permite deducir que en los casos estudiados, los receptores no son destruidos en gran escala por la acción de

///

la penicilina y la lisozima-EDTA.

D. Adsorción de los bacteriófagos observada al microscopio electrónico.

A pesar del método de fijación utilizado, que es diferente a la fijación standard con ácido ósmico, el citoplasma y el nucleoplasma de los esferoplastos presentan el aspecto descrito por Ryter y Kellenberger (1958) en cortes ultrafinos de bacterias.

Dos tegumentos rodean al citoplasma y generalmente a una vacuola de tamaño grande. Un tegumento, el interior, se adhiere estrechamente al citoplasma, mientras que el tegumento exterior se desprende en largos trochos. Las dos membranas de unos 60 - 80 Å cada una, presentan una estructura doble.

Es interesante apreciar la forma esférica de los esferoplastos, diferente a la forma alargada de las bacterias *Escherichia coli* intactas, que se observa en las preparaciones metalizadas. Se debe este cambio de forma a la pérdida de rigidez de la pared bacteriana, producida por la acción de la penicilina y la lisozima.

La metalización de las células proporciona vistas nítidas de la interacción entre los esferoplastos y los diferentes bacteriófagos. No solamente puede ser probada de esta manera la adsorción de los fagos a las capas específicas de las bacterias trata

///

das, sino también la inyección del ADN del bacteriófago dentro del esferoplasto. En los cortes de esferoplastos también se pone en evidencia el fenómeno de adsorción del bacteriófago al esferoplasto y la inyección del ADN.

B. Reproducción de bacteriófagos en esferoplastos de Escherichia coli.

Los resultados obtenidos en las pruebas de multiplicación de bacteriófagos en esferoplastos de *Escherichia coli*, muestran que los esferoplastos de penicilina están capacitados para formar aproximadamente un 40 % de partículas infectivas de T_2 , T_3 y T_4 comparado con las producciones en bacterias intactas. En cambio T_5 no se reproduce.

No fue posible demostrar la multiplicación de bacteriófagos en esferoplastos de lisozima-EDTA. Kozloff y Henderson (1955) también obtuvieron resultados negativos al tratar de reproducir T_2 en esferoplastos de lisozima-EDTA. Estos autores atribuyen la no formación del bacteriófago a una interferencia del EDTA en la inyección del ADN de manera análoga a la acción del cianuro de cadmio.

La incapacidad que presentan los esferoplastos de lisozima-EDTA de formar partículas infecciosas de cualquier bacteriófago ensayado, fue un resultado completamente inesperado, ya que Fraser y Mahler (1956) habían logrado reproducir T_3 en este tipo de esferoplastos.

///

Teniendo en cuenta que la adsorción de los bacteriófagos tiene lugar en los esferoplastos y con el microscopio electrónico pueden observarse numerosos "ghosts" (cabezas vacías de bacteriófagos), lo que significa que el ADN ha sido inyectado en la célula, se decidió estudiar el metabolismo de las células en disolución, y su capacidad de reproducir bacteriófagos, por medio de marcación de C^{14} -D-L-leucina.

Estos experimentos demuestran que el metabolismo de los esferoplastos de lisozima está fuertemente alterado o sea que existen alteraciones metabólicas aún antes que la célula esté en contacto con los bacteriófagos.

Estos hechos pueden explicarse con los resultados obtenidos por Neu y colaboradores (1967). Los autores describen los efectos destructivos del EDTA-Tris sobre nucleótidos solubles en ácido y sobre ARN ribosómico. Es posible observar la descomposición del ARN soluble hasta obtener las bases. El mecanismo de esta descomposición no es conocido. Es notable que las células sobrevivan, aún habiendo perdido sus nucleótidos solubles y el ARN ribosómico. Según Kretsolmer y colaboradores (1969) el EDTA influye también sobre la reproducción de bacteriófagos. Los autores demuestran que cantidades muy reducidas de EDTA influyan sobre la inducción de los fagos, en cambio concentraciones más elevadas inhiben la reproducción de los mismos.

///

En resumen, las conclusiones que surgen de esta serie de experiencias son las siguientes:

El estudio sistemático de la adsorción e inactivación de los bacteriófagos de la serie T, específicos para *Escherichia coli*, en los esferoplastos, obtenidos por medio de la acción de penicilina y lisozina-EDTA respectivamente, demuestra que los resultados de adsorción obtenidos para T₂ y T₅ son semejantes en esferoplastos y en bacterias intactas. Durante la formación de esferoplastos no hay pérdida o inhibición de receptores específicos.

La imposibilidad de los bacteriófagos T₃, T₄, T₆ y T₇ de interactuar normalmente con los esferoplastos se debe a la acción inhibitoria del estabilizador sacarosa en este sistema. Después de reducir la concentración de sacarosa al 10 %, la adsorción de los fagos citados se cumple normalmente y es acompañada por la lisis inmediata de la célula huésped.

La lisis de los esferoplastos mejora aumentando el número de partículas infectivas hasta 200 partículas/célula, lo cual deja deducir la presencia de gran cantidad de receptores intactos en paredes de esferoplastos.

Mediante el uso del microscopio electrónico se confirmaron los resultados mencionados. La infección del ADI fue verificada por la observación de cabezas vacías de bacteriófagos adheridos a las

///

células.

Aunque la adsorción de bacteriófagos a esferoplastos de penicilina y lisozima-EDTA no presenta diferencias, solamente es posible observar la multiplicación de T_2 y T_4 en esferoplastos de penicilina. La acción del EDTA sobre la permeabilidad celular y la disociación del ARN ribosomal puede explicar la incapacidad de los esferoplastos de lisozima-EDTA de reproducir bacteriófagos específicos, a pesar de que el mecanismo para la adsorción e inyección del ADN de los bacteriófagos esté intacto.

Amulraj

H. Horok.

P. S. Hoff.

BIBLIOGRAFIA

- Adams, H. (1959): Bacteriophages, Interscience Publisher Inc. New York.
- Döhme, H. & Taubeneck, U. (1958): Naturwissenschaften 12, 296.
- Bronn, A.D. (1960): Inhibition by spermine of the action of a lytic enzyme. BBA, 44, 170.
- Denes, G. & Polgár, L. (1959): Reproduction of T₂ in *Escherichia coli* spheroplasts. Nature 183, 696.
- Fedorova, G.I. (1969): Properties of bacterial protoplasts and spheroplasts. Byull Eksp. Biol. Med. 68, 66-9.
- Fraser, D. & Mahler, H. (1956): Reproduction of T₃ in lisozym induced *Escherichia coli* spheroplasts. BBA 22, 197.
- Fraser, D. & Mahler, H. (1957): Nucleases effect on the reproduction of T₃. BBA, 69, 166.
- Cuze, L.B. (1967): Microbial protoplasts, spheroplasts and L-forms. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Hancock, . (1960): Streptomycin-induced lysis of penicillin treated staphylococci. Nature 185, 658.
- Hall, C. (1953): Introduction to electron microscopy. McGraw Hill New York.
- Hofschneider, P.H. (1960a): T₂ and λ phage adsorption on protoplasts-like bodies of *Escherichia coli*. Nature, 186, 568.
- Hofschneider, P.H. (1960b): Zur Wandstruktur von *Escherichia coli* B Sphaeroplasten. Proc. Eur.Reg.Conf. on Electron

///

- Microscopy: 1028-1032. Vol II: Delft.
- Hofschneider, P.H. and Lorck, H. (1960): Studies on the residual cell wall of *E. coli* and *B. megaterium* spheroplasts and of L-forms of *Proteus mirabilis*. Fifth International Congress for Electron Microscopy. Philadelphia.
- Karlson, P. (1961): Kurzes Lehrbuch der Biochemie fuer Mediziner und Naturwissenschaftler . 2.Auflage. Georg Thieme Verlag. Stuttgart.
- Kellenberger, E. (1952): Les nucléoides de *Escherichia coli* étudiés a l'aide du microscope électronique. *Experientia* Vol VII 99.
- Kozloff, L.H. and Henderson, K. (1957): Action of complexes of the zinc group metals on the tail protein of bacteriophage T_2^+ . *Nature*, 176, 1169.
- Kretschmer, S.H. et al. (1969): Hemmung der Vermehrung von *Bac. Subtilis*-Phagen durch EDTA Spuren. *Z. allg. Mikrobiol.* 9, 31.
- Lederberg, J. (1956): Bacterial protoplasts induced by penicillin. *Proc.nat.Acad.Sci.Wash.*, 42, 574.
- Leive, L. (1965): Nonspecific increase in permeability in *E. coli* produced by EDTA. *Proc. F.A.S.* 53, 745.
- Leive, L. (1965): Release of lipopolisacharide by EDTA treatment of *E. coli*. *Biochem Biophys. Res. Commun.* 21, 290.
- Leive, L. (1968): Studies on the permeability change produced in

///

- Coliform bacteria by EDTA. J. Biol. Chem. 243, 2373.
- Martin, H.H., Frank, H. (1962): Quantitative Bausteinanalyse der Stützmembran von *Escherichia coli* B. Z. f. Naturforschung 17, 1960.
- Martin, H.H. (1963): Bacterial Protoplasts - A Review. J.Theoret. Biol. 5, 1-34.
- Martin, H.H. (1964): Composition of the mucopolymer in cell walls of the unstable and stable L-forms of *Proteus mirabilis*. J. gen. Microbiol, 36, 441.
- Martin, H.H. (1966): Biochemistry of bacterial cell walls. Annual Review of Biochemistry Vol35. Part II. 457.
- McQuillen, K. (1958): The comparative biochemistry of bacterial cell walls, protoplasts and spheroplasts. Colloquia of the 4th International Congress of Biochemistry (Vienna).
- McQuillen, K. (1960): Bacterial protoplasts in "The Bacteria" Vol. I. (I.C. Gunsalus & R.V.Stanier eds.) Academic Press. New York & London.
- McQuillen, K. (1958b): Lysis resulting from metabolic disturbance. J.Gen. Microbiol. 18, 490.
- Neu, H.C. et al. (1967): Effect of EDTA-Tris on release of the acid soluble nucleotide pool and on breakdown of ribosomal RNA in *E.coli*. J.Bac. 93, 1360.
- Nezwal, J. y Ritzerfeld, W. (1969): Significance of ethylene diamine.

///

- notetra-acetic acid (EDTA) in microbiological research. Arch. Hyg. Bakteriolog. 153 (5) 4 38-46.
- Ogura, Mituo (1963): High resolution electron microscopy on the surface structure of *Escherichia coli*. Journal of Ultrastructure Research, 8, 251-263.
- Park, J.T. & Strominger, J.L. (1957): Mode of action of penicillin. Science, 125, 99.
- Primovich, Pelzer, Haas & Weidel, W. (1961): Biochem.biophys. Acta 45, 68.
- Quigley, J. & Cohen (1969): Isolation of envelopes of *E.coli* spheroplasts in the zonal ultracentrifuge. J.Biol.Chem. 244 (9) 2450-3.
- Reimer, L. (1959): Elektronenmikroskopische Untersuchungs- und Präparationsmethoden. Springer-Verlag. Berlin-Göttingen-Heidelberg.
- Repaske, R. (1956): Lysis of Gram-negative bacteria by lysozyme. Biochem.biophys. Acta 22, 189.
- Rogers, H.J. & Perkins, E. (1968): Cell walls and membranes. Spon's Biochemical Monographs. London.
- Ryter, A. & Kellenberger, M. (1958): Etude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide desoxyribonucléique. Zeitschrift fuer Naturforschung 13b, 597.
- Salton, H.R. (1957): Bact. Rev. 21, 82.
- Salton, H.R. (1960a): Microbial cell walls. John Wiley & Sons. Inc. New York, London.

///

- Salton, M.R. (1960b): Surface layers of the bacterial cell in "The Bacteria" Vol I. (I.C.Gunsalus & R. Stanier eds.) Academic Press, New York, London.
- Siekevitz (1952): Journal Biological Chemistry 195, 449.
- Smith, D.G. (1969): Bacterial with their coats off: spheroplasts, protoplasts and L-forms. Sci.Prog.Oxf. 169-192.
- Stent, G. (1963): Molecular Biology of Bacterial Viruses. Freeman & Co. San Francisco, London.
- Strominger, J.L. y Tipper, D.T. (1965): Am. J. Med. 39, 703.
- Taubeneck, U. & Böhme, H. (1958): Zeitschrift fuer Naturforschung, 13b, 471.
- Tomsik, J. & Guex-Holzer (1952): Schweiz.Z.allg.Path.und Bakteriolog. 15, 517.
- Weibull, C. (1958): Bacterial Protoplasts. Ann. Review of Microbiol. 1-26.
- Weidel, W., Koch, G. & Bobosch, K. (1954): Ueber die Rezeptorensubstanz fuer den Phagen T₅. I. Extraktion und Reindarstellung aus Escherichia coli B. Zeitschrift f. Naturforschung, 9b, 573. 579.
- Weidel, W., Koch, G. & Lohse (1954): Ueber die Zellmembran von Escherichia coli B. II. Der Rezeptorkomplex fuer die Bakteriophagen T₃, T₄ und T₇. Zeitschrift f. Naturforschung 9b, 398.
- Weidel, W. & Kellenberger, B. (1955): The B.coli receptor for the phage T₅. BBA 17, 1-9.
- Weidel, W. & Primosigh, J. (1957): Die gemeinsame Wurzel der Lyse

///

von Escherichia coli B durch Penicillin oder durch Phagen. Zeitschrift f. Naturforschung, 12b, 421.

- Weidel, W. (1958): Bacterial Viruses. (With particular reference to adsorption/penetration). Ann.Rev. of Microbiology, pag 27.
- Weidel, W. & Primosigh, J. (1958): Biochemical parallels between lysis by virulent phage and lysis by penicillin. J.Gen.Microbiol. 18, 513.
- Weidel, W., Frank, H. & Martín, H.H. (1960): The rigid layer of the cell wall of Escherichia coli strain B.J.gen. Microbiol. 22, 158-166.
- Weidel, W., Frank, H. & Leutgeb, W. (1963): Autolytic enzymes as a source of error in the preparation and study of Gram-negative cell walls. J.gen.Microbiol. 30, 127.
- Weidel, W. & Pelzer, H. (1964): Bagshaped macromolecules - a new outlook on the bacterial cell walls. Advances in Enzymology Vol XXVI, 193-232.