

UNIVERSIDAD NACIONAL DE LA PLATA

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS

TESIS

.

HORACIO ANGEL LOPARDO

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DE

BACTERIOFAGOS DE RHIZOBIUM

AÑO 1980

El presente trabajo de tesis,
para optar al título de Doctor
en Ciencias Bioquímicas, fue
realizado en la Facultad de
Ciencias Exactas de la Univer-
sidad Nacional de La Plata,
bajo la dirección del Dr. Oscar
Grau.

- A la memoria del Ing.
Angel Marmonti

- A mi esposa e hijos.

Mi reconocimiento:

a la Comisión de Investigaciones Científicas de la Provincia de Buenos Aires por las becas oportunamente otorgadas.

a la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad Nacional de La Plata.

Mi agradecimiento:

al Dr. Oscar Grau por su dirección durante el desarrollo, discusión y corrección del trabajo.

a la Dra. Graciela L. De Antoni por su participación en la realización de este trabajo.

al Dr. G. Favelukes por haber sugerido el tema de Fijación Simbiótica de Nitrógeno como una línea multidisciplinaria de trabajo y por su aporte de laboratorio, materiales y equipo.

a los Dres. M.C.Añón y A.N.Sarachu por su desinteresada colaboración y su sincera amistad.

a los restantes compañeros y personal del Laboratorio de Química Biológica.

a las personas y organismos que proporcionaron las cepas utilizadas en este trabajo.

I N D I C E

Página

PRESENTACION

I.- INTRODUCCION

- 1.- La Fijación Simbiótica de Nitrógeno a través del Sistema Rhizobium-Raíz de Leguminosas.
 - A.- Establecimiento de la Simbiosis 1
 - B.- Características Generales del Proceso de Fijación Simbiótica de Nitrógeno 4
- 2.- Las Bacterias del Género Rhizobium
 - A.- Caracteres Generales 9
 - B.- Uso de Mutantes 11
 - C.- Intercambio de Material Genético en Rhizobium 14
- 3.- Los Bacteriofagos de Rhizobium
 - A.- Bacteriofagos y Fijación de Nitrógeno 17
 - B.- Caracteres Generales de los Bacteriofagos de Rhizobium 19
 - C.- Lisogenia en Rhizobium 20

II.- MATERIALES Y METODOS

- 1.- Cepas bacterianas 26
- 2.- Medios de Cultivo 29
- 3.- Soluciones 30
- 4.- Enzimas 31
- 5.- Acidos Nucleicos 31
- 6.- Antibióticos y colorantes 31
- 7.- Procedimientos
 - a.- Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas 32

	Página	
b	b.- Ensayos de nodulación sobre leguminosas	32
	c.- Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas	35
	d.- Aislamiento de bacteriofagos a partir de muestras de suelo	36
	e.- Ensayos de interferencia	37
	f.- Aislamiento de bacteriofagos a partir de cepas lisogénicas	37
	g.- Titulación de bacteriofagos	38
	h.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis en medio líquido	39
	i.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis en medio sólido	39
	j.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis confluyente sobre membranas de celofán.	40
	k.- Inducción de bacterias lisogénicas por acción de Mitomicina-C	41
	l.- Inducción de bacterias lisogénicas por irradiación con luz ultravioleta	42
	m.- Inducción térmica de bacterias lisogénicas	42
	n.- Conservación de bacteriofagos y bacterias	43
	o.- Purificación de bacteriofagos	43
	p.- Determinación del espectro de infectividad de los fagos sobre distintas bacterias huéspedes	44

	Página
q.- Inactivación de los bacteriofagos por irradiación con luz ultravioleta	44
r.- Inactivación de los bacteriofagos por choque térmico	45
s.- Determinación de la naturaleza del material genético de los bacteriofagos	45
t.- Lisogenización de bacterias del género <i>Rhizobium</i>	47

III.- RESULTADOS

1.- Ensayos preliminares	
a.- Aislamiento de bacterias del género <i>Rhizobium</i>	52
b.- Ensayos de nodulación sobre leguminosas	53
c.- Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas	54
d.- Verificación de la presencia de bacterias en el sobrenadante de una centrifugación	55
2.- Antagonismo microbiano	
a.- Ensayos de interferencia	56
b.- Aislamiento de bacteriofagos	63
3.- Crecimiento de los bacteriofagos aislados	
a.- Por inducción espontánea	65
b.- Por ciclo lítico en medio líquido	65

	Página
c.- Por ciclo lítico en medio sólido	68
d.- Por inducción con Mitomicina-C y choque térmico	69
e.- Por inducción con luz ultravioleta	72
4.- Caracterización de los bacteriofagos aislados	
a.- Morfología de las placas de lisis	76
b.- Espectro de infectividad de los bac- teriofagos con respecto a cepas de Rhizobium pertenecientes a distintas especies	77
c.- Inactivación de los bacteriofagos por acción de la radiación ultravio- leta y por choque térmico	80
d.- Identificación del material genético de los bacteriofagos FL 1 y FL 4(PC)	83
5.- Lisogenización de las cepas indicadoras	
a.- Lisogenización de la cepa B-19 con el bacteriofago FL 1	84
b.- Lisogenización de la cepa 39 con un bacteriofago liberado por DP-4	88
IV.- <u>DISCUSION</u>	134
V.- <u>CONCLUSIONES</u>	150
VI.- <u>BIBLIOGRAFIA</u>	152

L I S T A D E T A B L A S

	Página
I.1 Grupos de inoculación cruzada de Rhizobium	23
I.2 Transferencia de Material Genético (Transformación)	24
I.3 Intercambio de Material Genético por Transducción	25
II.1 Resultados esperables en los experimentos destinados a la determinación del material genético de los bacteriofagos	49
III.1 Características culturales de las bacterias aisladas en nuestro laboratorio	94
III.2 Ensayos de nodulación sobre leguminosas	95
III.3 Tiempo de duplicación de las bacterias crecidas en medio ELM líquido a 28°C	96
III.4 Interferencia entre las distintas cepas de Rhizobium meliloti	97
III.5 Interferencias producidas por rhizobios de varios grupos de inoculación sobre 14 cepas de Rhizobium meliloti	98
III.6 Interferencias producidas por 14 cepas de Rhizobium meliloti sobre rhizobios de otros grupos de inoculación	99
III.7 Resumen de los ensayos de interferencia	100
III.8 Bacteriofagos aislados a partir de bacterias lisogénicas	101
III.9 Bacteriofagos líticos aislados de la rizosfera de plantas de la familia Leguminosae	102
III.10 Infección en medio líquido	103

	Página
III.11 Crecimiento de bacteriofagos sobre membranas de celofán	104
III.12 Inducción de las cepa R-491 y B-111-1a por acción de Mitomicina-C y choque térmico	105
III.13 Inducción de B-111-1a y R-491 por irradiación con luz ultravioleta	106
III.14 Morfología de las placas de lisis originadas por los bacteriofagos aislados sobre sus bac- terias huéspedes	107
III.15 Espectro de infectividad de los bacteriofagos aislados sobre distintos huéspedes	108
III.16 Estabilidad de los bacteriofagos en solucio- nes concentradas de ClCs	109
III.17 Identificación del material genético de los bacteriofagos FL 1 y FL 4 (PC)	110
III.18 Ensayo de nodulación sobre plantas de alfalfa de las cepas lisogenizadas de B-19	111
III.19 Ensayos de interferencia efectuados con las bacterias de la cepa 39 lisogenizadas con un bacteriofago normalmente portado por DP-4	112
III.20 Ensayo de nodulación de 39-lis sobre plantas de alfalfa. Datos estadísticos	113
IV.1 Frecuencia de hallazgos de lisogenia en ex- perimentos de interferencia	148
IV.2 Espectro de infectividad de bacteriofagos aislados por otros investigadores	149

L I S T A D E F I G U R A S

	Página
II.1 Aislamiento de bacteriofagos a partir de bacterias lisogénicas	50
II.2 Concentración y purificación de una suspensión de fagos	51
III.1 Curva de crecimiento para <i>Rhizobium meliloti</i> (cepa B-19) (1)	115
III.2 Curva de crecimiento para <i>Rhizobium meliloti</i> (cepa B-19)(2)	116
III.3 Relación entre los valores de ufc/ml y absorbancia a 500nm para un cultivo de <i>Rhizobium meliloti</i>	117
III.4 Visualización de los antagonismos entre bacterias	118
III.5 Verificación de la adsorción de los bacteriofagos en un experimento de infección en medio líquido	119
III.6 Inducción de R-491 por acción de Mitomicina-C	120
III.7 Inducción de B-111-la por irradiación con luz ultravioleta utilizando diferentes tiempos de exposición	121
III.8 Inducción de B-111-la por irradiación con luz ultravioleta	122
III.9 Inducción de R-491 por irradiación con luz ultravioleta utilizando diferentes tiempos de exposición	123
III.10 Inducción de R-491 por irradiación con luz ultravioleta	124
III.11 Efecto ejercido por la irradiación ultravioleta sobre un cultivo de R-491 en un experimento de inducción	125

	Página
III.12 Morfología de las placas de lisis producidas por el fago FL 1 sobre bacterias de la cepa B-19	126
III.13 Inactivación térmica de los bacteriofagos liberados por R-491	127
III.14 Inactivación térmica de los bacteriofagos FL 4 (PC), FL 4 (PT) y FL 4 (ST)	128
III.15 Inactivación térmica del bacteriofago FL 1	129
III.16 Inactivación de los bacteriofagos liberados por R-491 por irradiación con luz ultravioleta	130
III.17 Inactivación del bacteriofago FL 1 por irradiación con luz ultravioleta	131
III.18 Lisogenización de la cepa B-19 con bacteriofagos normalmente portados por B-111-1a (FL 1)	132
III.19 Ensayo de nodulación de 39-lis sobre plantas de alfalfa	133

LISTA DE ABREVIATURAS

INTA : Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
m.d.i. : multiplicidad de infección
u.f.c. : unidades formadoras de colonias
u.f.p. : unidades formadoras de placas
Ade⁻ : requerimiento de Adenina
Ura⁻ : requerimiento de Uracilo
Vio^R : resistencia a Viomicina
Str^R : resistencia a Estreptomicina
Cys⁺ : independencia de Cisteina
H.S. : especificidad de huésped
Str^d : dependencia de Estreptomicina
Chl^R : resistencia a Cloramfenicol
TCV : tolerancia a cristal violeta
Eff⁺ : efectividad en la fijación de Nitrógeno.
Eff⁻ : ineffectividad en la fijación de Nitrógeno.
Ade⁺ : independencia de Adenina
Sulf^R : resistencia a sulfamidas
Ampi^R : resistencia a Ampicilina
Kana^R : resistencia a Kanamicina
Tetra^R : resistencia a Tetraciclinas
Lys⁺ : independencia de Lisina
Leu⁺ : independencia de Leucina
N.D. : dato no determinado.

PRESENTACIÓN

Este trabajo tuvo como principal objetivo el aislamiento de bacteriofagos a partir de muestras de suelo y a partir de cepas lisogénicas pertenecientes al género *Rhizobium*, y su posterior caracterización a través de una variada metodología.

A lo largo de su desarrollo se debieron efectuar los estudios colaterales necesarios para adquirir un conocimiento más acabado del sistema al cual estábamos enfrentados, como así también ensayos de interferencia entre cepas de *Rhizobium*, necesarios para el aislamiento de bacteriofagos temperados.

También se realizaron experimentos de integración de bacteriofagos en el genoma de sus bacterias indicadoras con el objeto de establecer las posibilidades que ofrecía el sistema para la realización de futuros trabajos de ingeniería genética.

Los estudios preliminares, ensayos de interferencia y aislamiento de bacteriofagos (capítulos III.1, y III.2) fueron efectuados conjuntamente con la Dra. Graciela L. De Antoni.

- I -

I N T R O D U C C I O N

1.- La Fijación Simbiótica de Nitrógeno a través del Sistema Rhizobium-Raíz de Leguminosas

A.-Establecimiento de la Simbiosis

Por intermedio de la asociación simbiótica entre las bacterias del género Rhizobium y plantas de la familia Leguminosae, se efectúa la fijación del nitrógeno atmosférico al ser transformado en compuestos asimilables por el vegetal.

Esta asociación se establece por medio de la infección radicular por parte de las bacterias, después de una activa proliferación de las mismas en la rizosfera de la planta, influenciada aparentemente por la exudación de sustancias por parte del vegetal. Como resultado de esta interacción, los pelos radiculares de la planta aumentan su longitud, se incurvan y ramifican (1). Esta modificación experimentada por los pelos radiculares, inducida por sustancias específicas producidas por los rhizobios (2)(3)(4), permitiría la penetración de las bacterias más pequeñas a través de los intersticios que quedarían entre las microfibrillas de la membrana celulósica (5), o bien lo harían aprovechando la invaginación de las membranas de las células que conforman los pelos radiculares(6). En leguminosas acuáticas, que carecen de tales pelos, la infección se produce a través de las células epidérmicas(1).

La formación de nódulos es un fenómeno específico, tal vez determinado por la presencia de lectinas o fitohemaglutininas en el vegetal y ciertos antígenos bacterianos (7)(8)(9)(10), aunque en algunas experiencias no se demostró ningún efecto atribuible a dichas sustancias(11).

No siempre la invasión bacteriana culmina en la producción de nódulos. Por el contrario, se ha observado que el porcentaje de nódulos formados en plantas de alfalfa resulta, en término medio, del 5% con respecto al número de puntos de infección (1). Estas infecciones abortivas tendrían su origen en las dificultades con que tropiezan los rhizobios para inducir la formación de los llamados "cordones de infección". Estos no son sino tubos limitados por una pared celulósica de origen vegetal, en cuyo interior se produce la proliferación de las bacterias a medida que penetran en la región cortical (12). Los inconvenientes que presenta su formación no sólo residen en la necesidad de lograr la invaginación de las paredes de las células del vegetal, sino también en que el extremo del cordón debe penetrar a través de las células vecinas, las que luego se incorporan a la estructura del mismo.

Hasta hace poco tiempo se pensaba que cada nódulo era formado por invasión de sólo una cepa bacteriana, de modo que se postulaba que sólo un cordón de infección era el responsable de la formación de un nódulo. Ante la evidencia de la existencia de varios cordones de infección producidos por la misma cepa en un mismo nódulo se dedujo que la infección múltiple estaba permitida solamente cuando los cordones de infección habían sido constituidos por la misma cepa (13). Sin embargo se comprobó la existencia de infección mixta en nódulos de soja, mediante el empleo de técnicas de inmunofluorescencia (14), lo cual deberá ser confirmado en nódulos de otras especies para poder extraer conclusiones más valederas.

El cordón de infección penetra a través de los tejidos de la raíz; su crecimiento hacia el interior de la misma es orientado por el núcleo de la célula vegetal invadida en primer término, el cual "viaja" hacia la base del pelo radicular junto con el cordón de infección (1).

El desarrollo del nódulo comienza con la división de las células corticales de la raíz que se encuentran a corta distancia del cordón de infección. Se piensa que son células tetraploides las que se dividen, induciendo la división de células diploides vecinas, pero el rol que desempeñan dichas células en la formación del nódulo aún está sujeto a una posterior verificación (15).

Las bacterias, por su parte, se encuentran en su forma bacilar normal dentro del cordón de infección, luego migran hacia la periferia del mismo, para ser más tarde liberadas, llevando consigo el plasmalema que las rodea (1). Varios autores coinciden en que el pasaje de las bacterias a la vida intracelular se produce por un proceso de endocitosis (12)(16)(17). Una vez en el citoplasma de la célula vegetal, las bacterias se rodean de una membrana envolvente y generalmente aumentan de tamaño. Este aumento varía según las distintas especies; así, en nódulos de soja resulta casi imperceptible, mientras que en nódulos de arveja, es de alrededor de 40 veces respecto del volumen de la bacteria libre (18).

En algunos casos las bacterias se dividen dentro de la membrana, dando lugar a la presencia de varias bacterias dentro de una misma membrana envolvente. De esta manera, el número de bacterias encerradas en cada membrana

resulta diferente para las distintas especies de *Rhizobium* y parece estar determinado por el vegetal invadido en lugar de depender de la naturaleza de la bacteria invasora (19).

Dentro de la célula ocurre la transformación de la bacteria en "bacteroide", lo cual involucra varios cambios, tanto bioquímicos como morfológicos. En ese aspecto, el aumento de tamaño, al cual ya nos referimos, el aumento del número de ribosomas y del contenido de DNA, el cambio de forma, la aparición de nuevas estructuras (particularmente algunas vesículas), la acumulación de sustancias de reserva, los cambios de actividad enzimática, el aumento de la sensibilidad osmótica, la biosíntesis de nuevas proteínas como la leghemoglobina, hacen semejar a este proceso al de una diferenciación celular, tal como ocurre en los Eucariotes (20)(21)(22).

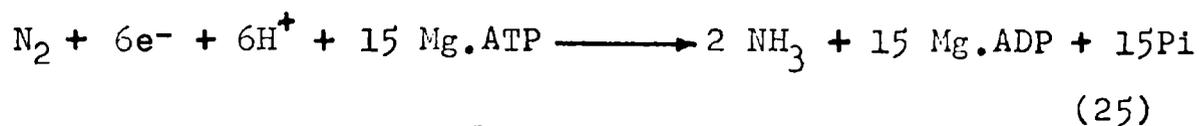
B.- Características Generales del Proceso de Fijación Simbiótica de Nitrógeno

El bacteroide es el asiento físico del sistema enzimático capaz de catalizar la reacción química que transforma el Nitrógeno atmosférico en compuestos nitrogenados asimilables (23). Este sistema es denominado "nitrogenasa". La presencia de dos proteínas es esencial para su funcionamiento. Una de ellas es una proteína que contiene Molibdeno e Hierro en proporción de 1-2 átomos del primero por alrededor de 20 del segundo. Está compuesta por subunidades, siendo aparentemente un sistema $a_2 b_2$ y tiene un peso molecular de 100.000-180.000D. La otra proteína contiene sólo Hierro y parecería ser un dímero de subunidades idénticas.

ticas, teniendo un peso molecular de 40.000-50.000 D. Ambas proteínas son bastante sensibles al oxígeno, siendo su vida media en solución buffer oxigenada del orden de minutos y segundos respectivamente(24).

Parecería ser que la secuencia de transferencia electrónica comienza con una fuente de electrones de la célula (ferredoxina, por ejemplo), la cual los cedería a la proteína que sólo contiene Hierro, y ésta a la que contiene Molibdeno. Durante esta transferencia se requiere la presencia de ATP, el cual es provisto por la planta (fotosíntesis), y es hidrolizado a ADP y fosfato inorgánico(Pi).

Este sistema enzimático cataliza la reacción:



y tiene además la propiedad de catalizar otras reacciones como la de reducción de acetileno a etileno (25), circunstancia que fue aprovechada por varios investigadores para desarrollar técnicas cromatográficas de detección cuantitativa de etileno con el objeto de contar con una prueba rápida y sencilla, "in vitro", que les permitiera la evaluación de la capacidad fijadora de Nitrógeno de los sistemas simbióticos en estudio (27)(28). Utilizando esta técnica se logró establecer la actividad de nitrogenasa en extractos libres de células obtenidos a partir de nódulos de leguminosas (29)(30).

Un pigmento, la leghemoglobina, ausente en los rizobios libres y en las leguminosas no noduladas, parecería jugar un rol de considerable importancia en la fijación simbiótica de Nitrógeno. La apo-leghemoglobina sería sintetizada en el citoplasma de las células del ve-

getal y se localizaría en la parte externa de la membrana que envuelve a los bacteroides (31)(32)(33), los cuales sintetizarían el grupo hemo (34)(35).

La leghemoglobina actuaría facilitando la difusión del oxígeno a través del tejido del nódulo (36)(37)(38). Alrededor de un 20% de este pigmento se encuentra como oxileghemoglobina en nódulos de plantas jóvenes (39) y, además, la adición de oxileghemoglobina a suspensiones de bacteroides, trae aparejado un incremento en el consumo de oxígeno y promueve la actividad de la nitrogenasa, la cual aumenta aproximadamente 10 veces (38).

Los bacteroides reciben oxígeno a través de la leghemoglobina. Las fuentes de carbono son aportadas por el sistema vascular de la planta y su oxidación provee la energía necesaria para la síntesis de ATP y el agente reductor necesario para la reacción catalizada por la nitrogenasa. El producto inicial de la fijación de nitrógeno es, como vimos, amoníaco, el cual se forma en los bacteroides y se excreta en el citosol, donde se lo utiliza como sustrato en la síntesis de glutamina, asparagina y aminoácidos, sustancias que son utilizadas por el vegetal.(25).

Durante la reacción catalizada por la nitrogenasa, en la mayoría de las leguminosas, el 30% del flujo electrónico se emplea en la reducción de protones a H_2 . Si este H_2 no es reciclado, el sistema simbiótico habrá gastado alrededor de 5 moléculas de ATP y un par de electrones por molécula de H_2 formada. Se han hallado cepas de *Rhizobium* que inducen la formación de nódulos que presentan la capacidad de oxidar el

H₂ y presumiblemente utilizar parte de la energía derivada de la oxidación. Estos resultados, si bien son alentadores, no son concluyentes, por cuanto las cepas utilizadas, además de presentar variaciones en su actividad enzimática (hidrogenasa), sin duda contenían otras diferencias genéticas que es necesario tener en cuenta.(25)

Hace pocos años se ha comprobado la existencia de actividad de nitrogenasa en rhizobios libres, crecidos en las adyacencias de cultivos de tejidos vegetales, los cuales no necesariamente debían contener células de leguminosas (40)(41). De igual forma, se observó la fijación de Nitrógeno atmosférico por parte de rhizobios libres crecidos en medios de cultivo de composición definida, tanto sólidos (42)(43)(44) como líquidos (45)(46). Esto reforzaría la idea que se tenía de hace tiempo de que los rhizobios, para efectuar la fijación de Nitrógeno, requieren establecer la simbiosis con su planta huésped sólo para satisfacer algunas necesidades tales como el aporte de ciertos sustratos, condiciones especiales de aerobiosis, etc (47)(48), las cuales, eventualmente, podrían ser provistas también por otros vegetales normalmente no invadidos por *Rhizobium*, o por medios de cultivo sintéticos como se demostró.

Esta idea surgió primariamente del hallazgo de simbiosis entre bacterias del género *Rhizobium* y una no leguminosa, *Trema canabina* (49). A éste hecho se le sumó más tarde la demostración de la presencia en la bacteria de los genes que codifican para la biosíntesis de nitrogenasa (50) y la evidencia de que los rhizobios pueden sintetizar por sí solos al menos una parte de un componente de dicha enzima(51).

No obstante, las cepas rhizobianas que poseen esta capacidad de fijar el Nitrógeno atmosférico *in vitro*, podrían no ser representativas del género, ya que, de las que fueron probadas, sólo algunas cepas de *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium sp* del grupo del cowpea, mostraron ese fenómeno (42)(43)(44). De todos modos, continúan efectuándose experimentos en otras condiciones, con los que tal vez se logre probar esta actividad fijadora de Nitrógeno en rhizobios libres pertenecientes a otras especies.

Las leguminosas, cuando logran establecer una simbiosis eficiente con una cepa rhizobiana, aún en suelos carentes de Nitrógeno asimilable, llegan a alcanzar, gracias al Nitrógeno fijado, un desarrollo comparable con el de aquéllas crecidas en medios provistos de abono nitrogenado. La importancia de la fijación simbiótica de Nitrógeno reside en que contribuye con la mayor parte del Nitrógeno fijado a través de sistemas biológicos (aproximadamente 10^8 toneladas anuales) (52). Se calcula que esta cantidad representa el 20% del Nitrógeno fijado biológicamente. Además, la escasez y el elevado costo de los fertilizantes nitrogenados, comparado con el de los inoculantes para leguminosas, determinó que el método de inoculación de las semillas de este tipo de vegetales con cultivos de *Rhizobium* pasara a ser una práctica corriente en casi todos los países del Mundo y que los investigadores se interesaran en la búsqueda de nueva tecnología para lograr aumentos en el rendimiento de la fijación simbiótica de Nitrógeno (53).

2.- Las Bacterias del Género Rhizobium

A.- Caracteres Generales

Las bacterias del género Rhizobium pertenecen a la clase Schizomycetes, orden Eubacteriales, familia Rhizobiaceae, la cual incluye también al género Agrobacterium (54). Son bacilos móviles, gram negativos, no esporulados. Presentan un flagelo polar o subpolar, o entre 2 y 6 flagelos peritricos. Su tamaño oscila entre 0,5 y 0,9 μ por 1,2 - 3,0 μ . Comúnmente son pleomórficos en condiciones adversas de crecimiento. Por lo general presentan gránulos de poli-beta-hidroxibutirato en los extremos, cuya abundancia parece ser función de la edad de las bacterias y de las condiciones culturales empleadas.

Forman nódulos morfológicamente organizados en plantas de la familia Leguminosae. Por lo general sus colonias son blancas o incoloras en los medios de cultivo corrientes; son capaces de utilizar una amplia variedad de carbohidratos sin producción de gas y requieren nitrógeno combinado, sales y una o más vitaminas para su desarrollo. No utilizan citrato, no producen 3-cetolactosa, no licúan la gelatina o lo hacen lentamente. Producen poco o nada de SH_2 en Agar-Sulfito de Bismuto.

Son microorganismos aerobios, pero pueden desarrollarse aún bajo tensiones de Oxígeno de 0,01 atmósferas. El pH óptimo varía según las cepas (5,0-8,5) y la temperatura óptima oscila entre 25°C y 30°C.

Liberan una considerable cantidad de sustancias gomosas cuando crecen en medios que contienen carbohidratos, hecho que depende de la cepa y el medio de cultivo en cuestión (55)(56).

Los rhizobios fueron agrupados en distintas especies, de acuerdo con su capacidad de inducir la producción de nódulos en diferentes especies vegetales (tabla I.1). Este criterio, a pesar de ser el más utilizado, adolece de varios inconvenientes. En primer lugar, se han detectado frecuentes transgresiones de un grupo de inoculación a otro. Además, los caracteres de especificidad no son tan estables y la receptividad de plantas pertenecientes a una misma especie es variable (hay variedades de trébol que son resistentes a *Rhizobium trifolii*). Por otra parte, algunas cepas pierden por mutación la capacidad de nodular a la planta huésped correspondiente.

Norris (57) sugirió efectuar una división en dos grupos, basándose en la velocidad de crecimiento y en la producción de ácidos o álcalis en un medio con extracto de levadura y manitol. El primer grupo, integrado por bacterias acidificantes, de crecimiento rápido, incluía a las especies: *Rhizobium phaseoli*, *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium leguminosarum* y *Rhizobium meliloti*. El segundo grupo, que comprendía a bacterias de crecimiento lento, productoras de álcalis, estaba representado por *Rhizobium japonicum*, *Rhizobium* sp. del grupo del cowpea y *Rhizobium lupini*.

Sobre la base de un estudio de alrededor de cien caracteres, Graham (58) reordenó las especies rhizobianas y de *Agrobacterium* en dos géneros: *Phytomyxa*, que incluía a los rhizobios de crecimiento lento y *Rhizobium*, que además de comprender a las especies de crecimiento rápido, también abarcaba a *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium radiobacter*, agrupados por este investigador en una misma especie: *Rhizobium radiobacter*. De Ley y Rassel (59)

haciendo uso del contenido porcentual de Guanina + Citosina en el DNA de las bacterias, arribaron a las mismas conclusiones. Sin embargo, un análisis posterior acerca de los trabajos de Graham determinó que se continuara utilizando la clasificación que se observa en la tabla I.1. (60).

Otros criterios han sido también utilizados con sentido taxonómico: se hicieron estudios de aglutinación cruzada entre antígenos somáticos preparados a partir de cepas de diferentes especies de *Rhizobium* y algunos sueros anti-O (61). De esta manera pudieron distinguirse 5 grupos serológicos: (1) *Rhizobium trifolii* y algunas cepas de *Rhizobium leguminosarum*; (2) *Rhizobium lupini* (serradella); (3) *Rhizobium lupini* (lupines); (4) *Rhizobium meliloti*; (5) *Rhizobium japonicum*.

En base a su sensibilidad a distintos bacteriofagos, diferentes cepas utilizadas fueron divididas en tres grupos: (1) Algunas cepas de *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium leguminosarum*; (2) Otras cepas de *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium leguminosarum*; (3) *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium lupini* (62).

Actualmente se acepta la antigua clasificación que comprende los géneros *Agrobacterium* y *Rhizobium*. En este último, se incluyeron tanto las cepas de crecimiento lento como de crecimiento rápido con la subdivisión propuesta por Norris (57). Las especies de *Rhizobium* continúan designándose según lo expuesto en la tabla I.1 (54).

B.- Uso de Mutantes

Existen mutantes de cepas de *Rhizobium* incapaces de in-

ducir la formación de nódulos en leguminosas, entre los cuales se cuentan algunos mutantes resistentes a la Estreptomina (63) y otros auxotróficos(64). En estos casos se dice que estas bacterias "no son infectivas". Trabajos posteriores parecen demostrar la existencia de diferencias antigénicas entre cepas infectivas y sus mutantes incapaces de producir nódulos (9).

También se pueden aislar mutantes que si bien infectan normalmente a la planta huésped, producen sólo nódulos ineficientes, es decir incapaces de fijar el Nitrógeno atmosférico.

Los trabajos realizados por Schwinghamer (65)(66) con mutantes resistentes a antibióticos pusieron de manifiesto que la acción selectiva desarrollada por los diversos antibióticos podía ejercerse de tres formas distintas:

(1) Que los mutantes resistentes (en su mayoría) no pierdan actividad (Cloramfenicol, Puromicina, Oxacilina, Bacitracina, Espiramibina, Estreptomina).

(2) Que alrededor de un 50% de los mutantes pierdan total o parcialmente su capacidad de fijar el Nitrógeno atmosférico (Novobiocina, Penicilina, Vancomicina, Kanamicina, Polimixina B, D-Cicloserina)

(3) Que la mayoría de los mutantes pierdan completamente su efectividad (Neomicina y Viomicina).

La mitad de los 530 mutantes resistentes a antimetabolitos que fueron aislados, resultaron por su parte con deficiencias en la fijación simbiótica de Nitrógeno. Algunos eran inefectivos, otros lo eran parcialmente, y algunos otros se mostraron incapaces de producir nódulos

en plantas que se suponían receptivas (67). Del mismo modo, algo más del 50% de los mutantes resistentes a bacteriofagos que fueron estudiados en sus propiedades simbióticas mostraron ser deficientes en esos mismos aspectos (68)(69).

Las mutaciones Vio^r implican un cambio en la pared celular de la bacteria, junto con la pérdida de la actividad fijadora de Nitrógeno (70)(71). El mismo efecto pudo observarse en mutantes resistentes a bacteriofagos (72). Los antimetabolitos, por otra parte, dan lugar a la formación de esferoplastos cuando son agregados a cultivos de la cepa de tipo silvestre. Estas observaciones sugieren que la pérdida de efectividad estaría relacionada, en estos casos, con las alteraciones sufridas por la pared bacteriana.

Se han aislado también mutantes auxotróficos ineficientes, entre los cuales se destacan aquéllos que requieren Adenina (Ade^-) o Uracilo (Ura^-) para su crecimiento (73). Se estudió la ultraestructura de los nódulos formados en estos casos, observándose que para el caso de los mutantes Ura^- las deficiencias ocurren a nivel de la multiplicación de las bacterias dentro del citoplasma de la célula que invaden una vez que abandonan el cordón de infección.(74). En mutantes Ade^- el proceso está interrumpido en alguna de las dos etapas siguientes, o sea durante la transformación de las bacterias vegetativas en bacteroides o durante el establecimiento de la fijación de Nitrógeno (74).

También fueron estudiados los factores que impiden la inducción de la formación de nódulos eficientes a los mutantes que requieren Riboflavina para su desarrollo. En este caso el bloqueo del proceso de la formación de los nódulos ocurre en una etapa más temprana de la invasión

radicular, ya que se pudo apreciar que estos mutantes no alcanzaban a abandonar el cordón de infección (75).

La mayor parte de los mutantes auxotróficos presentan alteraciones en las propiedades simbióticas: (1) Algunos pierden efectividad; (2) Otros sufren una restricción en su espectro de infectividad y (3) La mayor parte de ellos probablemente son malos competidores para la formación de nódulos, tal es así que el único tipo de mutantes auxotróficos (Gly⁻) más efectivo que la cepa de tipo silvestre original (Gly⁺), demostró ser peor competidor que esta última en el proceso de nodulación (76).

Esto parecería indicar que para la preparación de inoculantes resultarían más adecuadas las cepas prototróficas, las cuales deberían ser cultivadas en medios mínimos para evitar una posible selección de mutantes auxotróficos.

C.- Intercambio de Material Genético en Rhizobium

Los trabajos realizados por R. Balassa en la década del '50, resumidos por G. Balassa (77), constituyeron un importante punto de partida para las posteriores investigaciones en este campo. Balassa transfirió por "transformación" el carácter prototrófico presente en el DNA de las bacterias de tipo silvestre a mutantes dependientes de Cistina y Valina para su crecimiento. La resistencia a Estreptomina fue un carácter muy utilizado en el estudio de "transformación" en las diferentes especies de Rhizobium. Balassa trabajó en este aspecto con cepas de Rhizobium japonicum, Rhizobium meliloti y Rhizobium lupini (tabla I.2), logrando elevadas frecuencias de transformación. Este tipo de mutantes también fue utilizado por Zelazna (78) quien observó una baja frecuencia en la transformación interespecífica en comparación con una mucho más elevada obtenida cuando utilizó DNA de la misma es-

pecie que la bacteria receptora. Además, este mismo marcador genético fue intercambiado en forma recíproca entre cepas de *Rhizobium leguminosarum* y *Agrobacterium tumefaciens* con frecuencias que oscilaron entre 4×10^{-6} y $1,6 \times 10^{-5}$ (79), con lo cual quedó demostrada la transformación intergenérica entre *Rhizobium* y *Agrobacterium*. Balassa (77), mediante el empleo de una mutante dependiente de Estreptomicina para su desarrollo, obtuvo, por transformación sobre bacterias de tipo silvestre, colonias con diverso grado de resistencia y dependencia, circunstancia que indicaría que la sensibilidad a Estreptomicina estaría controlada por lo menos por 2 regiones de un locus, una que confiere resistencia y la otra, dependencia.

Posteriormente, se logró intercambiar factores de resistencia a los antibióticos entre cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Rhizobium trifolii* (80)(81). Estos hechos poseen especial significación, ya que al lograrse la transformación con DNA de bacterias tan poco relacionadas con el género *Rhizobium*, quedó abierto el camino para la realización de trabajos de ingeniería genética capaces de introducir en cepas de *Rhizobium* los más diversos caracteres con el objeto de mejorar sus propiedades metabólicas, simbióticas, culturales, etc.

Lange y colaboradores (82) reportaron la transferencia de la capacidad fijadora de Nitrógeno entre cepas de *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium trifolii*. De igual modo, Zelazna-Kowalska y otros (83) transfirieron esta misma propiedad entre cepas de *Rhizobium japonicum*. En ese mismo sentido, Dunican y Tierney (50) realizaron el pasaje de genes que controlan la fijación de nitrógeno (*nif*) de una cepa de *Rhizobium trifolii* a otra de *Enterobacter aerogenes*, que se mostraba ineficiente. Esta última, así transformada, fue entonces capaz de fijar el Nitrógeno atmos-

férico, libremente, tal como lo hacen las bacterias eficientes del género *Klebsiella*.

La ampliación del rango de especificidad de una cepa rhizobiana en relación a su planta huésped habitual traería aparejadas grandes ventajas en la fabricación de inoculantes. De este modo se evitaría la mezcla de varias cepas para hacerlos polivalentes y se ahorraría parte del trabajo que se invierte actualmente en la preparación simultánea de inoculantes destinados a distintas variedades de leguminosas. Balassa (85), tal vez teniendo en cuenta estos conceptos cambió por transformación la especificidad de una cepa de *Rhizobium lupini* respecto de su planta huésped, la cual fue capaz de formar nódulos en plantas de alfalfa. Sin embargo no se especificó si esa bacteria transformada continuaba produciendo nódulos en plantas de lupines. Posteriormente Higashi (86) realizó esta misma transferencia entre cepas de *Rhizobium trifolii* y *Rhizobium phaseoli*, pero por conjugación y utilizando un factor episómico como intermediario.

Haciendo uso de mutantes auxotróficos para distintos aminoácidos y bases nitrogenadas, Heumann (87) pudo construir en parte el mapa genético de bacterias pertenecientes a la especie *Rhizobium lupini*, a través de numerosos experimentos de conjugación.

Más recientemente, se logró la movilización de genes cromosómicos a través de factores R del grupo P (de amplio rango de especificidad) de *Escherichia coli* en *Rhizobium meliloti* lo que permitió la construcción de un mapa genético circular para esa especie (24). El uso de este tipo de plásmidos ha permitido la transferencia de numerosos marcadores genéticos entre varias *Enterobacterias* y bac-

terias del género *Rhizobium* (89). Incluso, se llegó a introducir por este medio al bacteriofago Mu de *Escherichia coli* en cepas de *Rhizobium meliloti*(24), con lo que se abre un campo sumamente promisorio dentro de los estudios genéticos de *Rhizobium*, más aún si tenemos en cuenta que ahora se cuenta con la posibilidad de efectuar los ensayos de fijación de Nitrógeno con las bacterias libres (42)(43)(44)(45)(46).

En la sección siguiente se ampliará este tema en lo referente a intercambio de material genético por transducción.

3.- Los Bacterifagos de *Rhizobium*

A.- Bacterifagos y Fijación de Nitrógeno

Varios años antes que D'Herelle probara la existencia de los bacteriofagos (90), Loew y Aso (91) descubrieron la liberación de una "enzima bacteriolítica" por parte de una "bacteria formadora de nódulos" (*Rhizobium*). Gerretsen y colaboradores por primera vez aislaron bacteriofagos que lisaban a cepas de *Rhizobium* a partir de nódulos de trébol, lupines y serradella en 1923 (92), aislamiento que fue confirmado unos años más tarde al lograrse la producción de placas de lisis sobre cultivos de bacterias del género *Rhizobium* (93).

Trabajos posteriores referentes a bacteriofagos de *Rhizobium*, asignaban a su actividad lítica un papel negativo sobre el crecimiento de las bacterias en el suelo y sobre sus posibilidades de producir nódulos en la raíz de la planta huésped adecuada (94). Incluso, hasta se los llegó a considerar como responsables de la llamada "decadencia de los alfalfares" (95)(96) por encontrárselos en mayor propor-

ción en nódulos en vías de desintegración, pertenecientes a plantas de más de 3 años de vida. Este hecho también fue registrado más recientemente por Kowalski y colaboradores (97) en plantas de soja, quienes sugieren que no debe descartarse la posibilidad de que la aparición de un mayor número de bacteriofagos en nódulos decadentes sea una consecuencia en lugar de una causa de la degradación de los nódulos. Algunos autores, por el contrario, no observaron ningún efecto de los bacteriofagos sobre la nodulación, fijación de Nitrógeno o sobre el crecimiento normal de las leguminosas (93)(98)(99)(100), y aún otros que admitían el efecto negativo de los fagos, explicaban el fenómeno bajo la suposición de que éstos actuarían seleccionando mutantes de *Rhizobium* ineficientes en la fijación del Nitrógeno atmosférico (68)(101)(102).

Dos de los tres mecanismos postulados para explicar la resistencia a bacteriofagos por parte de las bacterias, implican cambios en la pared celular. En ese sentido, se demostró (103) que cuatro mutantes de *Rhizobium trifolii* resistentes a fagos tenían alterada la constitución u organización de los polímeros que forman parte de dicha pared. Se efectuaron trabajos con fagos de *Rhizobium japonicum* en los que se encontró que la sensibilidad a la acción de los bacteriofagos experimentada por distintas cepas bacterianas estaba ligada a sus características antigénicas. De 51 fagos probados, 45 lisaron solamente cepas pertenecientes al mismo grupo antigénico de la cepa a partir de la cual fueron aislados. Sin embargo, ninguno de los bacteriofagos fue capaz de lisar a más de la mitad de las cepas pertenecientes a un mismo grupo serológico. Teniendo en cuenta la importancia que algunos investigadores le asignaron a la estructura de la pared celular

con respecto a la efectividad en la fijación de Nitrógeno (66)(70), podemos pensar en la existencia de una cierta correlación entre la eficiencia y la resistencia a los bacteriofagos, tal como fuera mencionado por Kleczkowska (68) y más recientemente por Malek (72).

En definitiva, la importancia ecológica de la actividad lítica y del efecto mutagénico (selectivo) de los bacteriofagos estará dada por las características particulares de cada caso: relación concentración de bacteriofagos/ concentración de bacterias, número de bacterias viables totales, presencia de agentes inhibitorios para el crecimiento de las bacterias, rango de infectividad de los bacteriofagos, posibilidad de establecimiento de lisogenia, etc.

B.-Caracteres Generales de los Bacteriofagos de Rhizobium

La actividad lítica de los bacteriofagos fue aprovechada por Staniewski para realizar una exhaustiva tipificación de los rhizobios (62)(104) (106), e inclusive de algunos de sus mutantes (107)(108). Probó la receptividad de 230 cepas de Rhizobium respecto de 28 bacteriofagos(106), lo que le permitió distinguir tres grupos de bacterias (ver página 11). La tipificación de bacterias a través de bacteriofagos, utilizada con éxito en estudios epidemiológicos en Salmonella y Staphylococcus (109), ha probado ser más específica que la tipificación serológica en Rhizobium (97).

En distintos laboratorios se han estudiado los caracteres morfológicos y fisiológicos de bacteriofagos de Rhizobium de distinto origen. En ese sentido, pudieron apreciarse diferencias notables en las estructuras de las colas y cabezas de los distintos fagos observados al mi-

croscopio electrónico. Todos los bacteriofagos estudiados, tanto los de *Rhizobium leguminosarum* (110), como los de *Rhizobium lupini* (111), *Rhizobium meliloti* (112)(113) y *Rhizobium trifolii* (114)(115), pueden ser incluidos dentro de los tres primeros grupos morfológicos de la clasificación de Bradley (116). Su heterogeneidad también se ha manifestado en las diferentes formas que adoptan sus placas de lisis.

Un bacteriofago de *Rhizobium meliloti* denominado 16-3 fue estudiado en forma intensiva, aprovechando el aislamiento de una serie de mutantes termorresistentes, deficientes en lisozima, termoinducibles, de diferente morfología de placas de lisis, de distinto espectro de infectividad y con alteraciones en sus propiedades antigénicas(117). De esta manera ha podido construirse su mapa genético y correlacionarse con una serie de funciones inherentes a su ciclo lisogénico y a su ciclo lítico (118)(119). Un estudio similar, aunque no tan exhaustivo, fue realizado con el bacteriofago c de *Rhizobium trifolii* (120)

C.- Lisogenia en *Rhizobium*

El descubrimiento de lisogenia en este género bacteriano (121) abrió el camino para la realización de importantes estudios relacionados con las propiedades genéticas y simbióticas de estas bacterias. Szende y Ördögh (122) comprobaron que de 152 cepas de *Rhizobium meliloti*, 44 eran lisogénicas, utilizando pruebas de liberación espontánea de bacteriofagos y de autoinmunidad hacia el fago liberado. El porcentaje hallado por Kowalski (123) en cepas de la misma especie fue aún mayor (70%).

Las propiedades de las cepas lisogénicas de *Rhizobium*

en general no difieren de las que presentan las pertenecientes a otros géneros bacterianos.

Se ha comprobado que los bacteriofagos lisógenos pueden llegar a propagarse mediante la infección de bacterias "competentes" o esferoplastos por parte de su DNA desnudo (Transfección) (124)(125).

También se verificó la transferencia de marcadores genéticos entre cepas lisogénicas de *Rhizobium* mediante el mecanismo de transducción. Este proceso, aprovechado por primera vez en *Rhizobium* para convertir bacterias sensibles a la Estreptomina en resistentes a dicho antibiótico (126) permitió más tarde transferir la propiedad de efectividad en la fijación de Nitrógeno, que se manifestaba ligada al gen que controla el metabolismo de leucina en *Rhizobium meliloti* (127) (ver tabla I.3)

Un nuevo aporte del uso de bacteriofagos en la resolución de problemas genéticos fue, como ya lo indicáramos, el logrado con la inserción del fago Mu de *Escherichia coli* en plásmidos RP 4, de amplio rango de infectividad. De este modo, se lo pudo introducir en bacterias resistentes al fago, como las de las especies *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas solanacearum* y *Rhizobium meliloti*, aunque en este último caso con una baja producción de bacteriofagos por parte de la nueva bacteria huésped. (aproximadamente 10^2 ufp por cada 10^8 bacterias). (88)(128).

Al estudiar en nuestro laboratorio el comportamiento de distintas cepas de *Rhizobium* sembradas simultáneamente en medios de cultivo sintéticos, comprobamos que algunos de los casos de interferencia observados eran debidos a

la existencia de lisogenia. La caracterización de los bacteriófagos portados en forma atemperada por estas cepas y el estudio de algunos aspectos de sus relaciones con sus bacterias huéspedes constituyen el objetivo principal de este trabajo de Tesis y a su vez, representan el punto de partida para futuras investigaciones concernientes al empleo de bacteriófagos transductores como herramientas genéticas que permitan lograr un conocimiento más acabado del proceso de fijación simbiótica de Nitrógeno a nivel molecular.

T A B L A I.1

Grupos de Inoculación Cruzada de Rhizobium

<u>Especie</u>	<u>Leguminosa huésped</u>
Rhizobium leguminosarum	Pisum
	Vicia
	Lathyrus
	Lens
Rhizobium trifolii	Trifolium
Rhizobium phaseoli	Phaseolus
Rhizobium meliloti	Medicago
	Melilotus
	Trigonella
Rhizobium lupini	Lupinus
	Ornithopus
	Serradella
Rhizobium japonicum	Glycine
	Vigna
	Crotalaria
	Pueraria
	Arachis
	Lespedeza
	Phaseolus (1)

(1) Si bien no es el huésped habitual de Rhizobium japonicum, algunas cepas de esta especie pueden infectar a esta leguminosa

En esta tabla no se incluyen los rhizobios de Lotus y cowpea ya que inducen la producción de nódulos en una amplia gama de especies de leguminosas

T A B L A I.2

Transferencia de Material Genético (Transformación)

<u>Donor</u>	<u>Receptor</u>	<u>Carácter trans-ferido</u>	<u>Referencia bibliográfica</u>
Rh. japonicum	Rh. japonicum	Str ^r	(77)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	Str ^r	(77)
Rh. meliloti	Rh. meliloti	Str ^r	(77)
Rh. lupini	Rh. lupini	Cys ⁺	(85)
Rh. meliloti	Rh. lupini	H.S.	(85)
Rh. lupini	Rh. lupini	Str ^d	(77)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	Str ^r	(129)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	Chl ^r	(129)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	TCV	(129)
Rh. meliloti	Rh. trifolii	Eff ⁺	(82)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	Eff ⁻	(69)
Rh. japonicum	Rh. japonicum	Str ^r	(130)
Rh. sp. (cowpea)	Rh. sp. (cowpea)	Ade ⁺	(131)
Rh. leguminos.	Agr. tumefac.	Sulf ^r	(79)
Agr. tumefac.	Rh. leguminos.	Str ^r	(79)
E. coli	Rh. trifolii	Amp ^r	(80)
E. coli	Rh. trifolii	Kana ^r	(80)
E. coli	Rh. trifolii	Tetra ^r	(80)
Ps. aeruginosa	Rh. trifolii	Kana ^r	(81)
Ps. aeruginosa	Rh. trifolii	Amp ^r	(81)
Ps. aeruginosa	Rh. trifolii	Chl ^r	(81)
Rh. japonicum	Rh. japonicum	Eff ⁺	(83)
Rh. trifolii	Ent. aerogenes	Eff ⁺	(84)
Rh. trifolii	Rh. trifolii	Str ^r	(78)
Rh. leguminos.	Rh. leguminos.	Str ^r	(78)
Rh. leguminos.	Rh. meliloti	Str ^r	(78)
Rh. leguminos.	Rh. trifolii	Str ^r	(78)
Rh. japonicum	Rh. japonicum	Str ^r	(132)

T A B L A 1.3

Intercambio de Material Genético por Transducción

<u>Donor</u>	<u>Receptor</u>	<u>Carácter Transferido</u>	<u>Referencia bibliográfica</u>
Rh. meliloti	Rh. meliloti	Str ^r	(126)
Rh. meliloti	Rh. meliloti	Lys ⁺	(133)
Rh. meliloti	Rh. meliloti	Leu ⁺	(127)
Rh. meliloti	Rh. meliloti	Eff ⁺	(127)

II

M A T E R I A L E S

Y

M E T O D O S

1.- Cepas bacterianas

<u>Cena</u>	<u>Origen</u>	<u>Procedencia</u>
I.- Rhizobium meliloti		
B-19	Nódulos de Medicago sativa (Capital Fed.)	I.N.T.A. Castelar
B-111-1a	Nódulos de Medicago sativa	I.N.T.A. Castelar
B-172	Nódulos de Medicago sativa (Pcia de Bs.As)	I.N.T.A. Castelar
B-251	Nódulos de Medicago sativa. Km 20. Sta. Fe-Córdoba.	I.N.T.A. Castelar
B-310	C.S.I.R.O. AUstralia Denominación original CC 8.	I.N.T.A. Castelar
DP-4	Nódulos de Medicago sativa. América, Pcia. de Bs.As.	Cátedra de Microbiología, Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Buenos Aires
L4, L5, L5/-//16/, L8, L31, L38, 11, 13, 16a, 16b.	Nódulos de Medicago sativa.	M. Curie-Sklodowska University, Lublin, Polonia (Department of General Microbiol)
R-491, R-492, R-493, R-494, U-239, U-45	Nódulos de Medicago Uruguay	Facultad de Agronomía de Montevideo, Uruguay
U-10	C.S.I.R.O, Australia Denominación original SU-277	Facultad de Agronomía de Montevideo, Uruguay
SARC/RF-10 SARC/RF-22		Plant Protection Research Institute Pretoria, Sudáfrica.
Rh 41		Institute of Genetics Biological Research Center, Hungarian Acad. Sci., Hungría.
Y-3	Nódulos de Medicago sativa. Pergamino, Pcia. de Bs. As.	Aislada por nosotros

<u>Cepa</u>	<u>Origen</u>	<u>Procedencia</u>
II.-Rhizobium trifolii		
A-22	University of Wisconsin Denominación original Red Clover 210	I.N.T.A.Castelar
A-40	E.E.U.U. Denomina- ción original 220	I.N.T.A.Castelar
A-118	Australia. Denomina- ción original TA-1	I.N.T.A.Castelar
A-127	University of Sidney, Australia. Denominación original SU-659	I.N.T.A.Castelar
A-130	University of Sidney, Australia. Denominación original SU-432	I.N.T.A.Castelar
U-28	Nódulos de Trifolium subterraneum	Facultad de Agro- nomía de Monte- video, Uruguay
SARC/SR-2 SARC/SR-6		Plant Protection Research Insti- tute, Pretoria, Sudáfrica.
21		M. Curie-Sklodows- ka Univ. Lublin. Polonia (Dep. of Microbiology)
Z-3	Nódulos de Trifolium Pergamino (Pcia, de Buenos Aires)	Aislada por nosotros
III.-Rhizobium lupini		
16-2, 16-3, 16-7, 16-22, 16-35, H-13-3		Universität Er- langen, Nürnberg Alemania (Institut für Mikrobiologie)
39 (1)		M. Curie-Sklodowska Univ. Lublin, Po- lonia (Dep. of Gen. Microbiology)

(1) En nuestro Laboratorio la cepa 39 se comportó como perte-
neciente a la especie Rhizobium meliloti, por lo tanto será con-
siderada como tal en el curso de este trabajo.

<u>Cepa</u>	<u>Origen</u>	<u>Procedencia</u>
IV.- Rhizobium japonicum		
E-4	Instituto de Investigación y Fomento Agrícola Ganadero Santa Fe. Denominación original E-2	I.N.T.A. Castelar
E-10	Department of Bacteriology, Oregon E.E.U.U.	I.N.T.A. Castelar
E-45 , E-38	Nódulos de Glycine max (Pcia. del Chaco)	I.N.T.A. Castelar
E-90	University of Wisconsin, E.E.U.U. Denominación original 507	I.N.T.A. Castelar
D-216, D-344		Central Research for Plant Production, Praga, Checoslovaqui
V.- Rhizobium leguminosarum		
D-90	Checoslovaquia, denominación original D-47	I.N.T.A. Castelar
D-91	Checoslovaquia, denominación original D-85	I.N.T.A. Castelar
D-120	Nódulos de Vicia faba, Tucumán	I.N.T.A. Castelar
D-95	Facultad de Agronomía Universidad Nacional de Buenos Aires.	I.N.T.A. Castelar
D-134, D-138	Nódulos de Vicia faba Provincia de Buenos Aires.	I.N.T.A. Castelar

2.- Medios de Cultivo

a.- ELM sólido (134): Manitol 10, ClNa 0,1, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, PO_4HK_2 0,5, Extracto de levadura Difco 0,4, Agar Difco 15, Rojo Congo 0,025, en g/l.

b.- ELM líquido : tiene los mismos componentes que (a), con la diferencia que no lleva Agar ni Rojo Congo.

c.- MNA sólido (135): Manitol 10, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,45, $\text{SO}_4\text{Na}_2 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$ 0,06, NO_3K 0,6, Cl_3Fe 0,01, Cl_2Ca 0,06, $\text{Cl}_2\text{Mg} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,1, Agar Difco 15, en g/l. Tiamina (ClH) 1 mg/l, Biotina 0,5 μ g/l.

d.- MNA líquido : tiene los mismos componentes que (c), con la diferencia que no lleva Agar ni Cl_3Fe .

e.- Medio Bergersen + K^+ (136)(137): Manitol 10, Cl_2Ca 0,04, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1, L-Glutamato de Potasio 1,2, Cl_3Fe 0,02, $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0,45, en g/l. Tiamina (ClH) 1 mg/l,

f.- Medio MG-2-H (110): Manitol 10, L-Glutamato de Potasio 1,7, Cl_2Ca 0,04, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,12, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,12, PO_4HNa_2 0,9, ClNH_4 0,56, en g/l. Tiamina (ClH) 0,12 mg/l Biotina 0,144 mg/l. pH: 6,7.

g.- Medio MG-2-OH (110): Manitol 6,67, L-Glutamato de Potasio 1,12, PO_4HNa_2 9,6, ClNH_4 0,37, Cl_2Ca 0,03, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,08, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ 0,03, en g/l. Tiamina (ClH) 0,08 mg/l, Biotina 0,096 mg/l. pH: 7,0.

h.- Medio 106 con mezcla de micronutrientes (Medio de

cultivo para plantas) (138)(139): ClK 490, $\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 188, $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 188, $(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$ 188, PO_4Fe 188, $\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,170, $\text{ClMn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0,530, BO_3H_3 0,410, $\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0,170, $\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,590, $\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,050, $\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,050, en mg/l. Agar Difco 8 g/l. pH: 6,8.

i.- Agar Blando : ClNa 8, Agar Difco 7,5, en g/l.

3.- Soluciones

a.- Solución Rh : ClNa 0,1; PO_4HK_2 0,5; $\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2, en g/l, pH: 7.

b.- Solución ME : $\text{CO}_3(\text{NH}_4)_2$ 7,8 g/l, Acetato de amonio 7,7 g/l; Acido acético glacial 3,5 ml/l.

c.- Buffer Mc'Ilvaine pH 3,8 : Acido cítrico 0,1 M; PO_4HNa_2 0,15 M.

d.- Buffer pH 5,5 : $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0,15 M; Acido acético c.s.p. llevar a pH; Acetato de magnesio 0,003 M.

e.- Mezcla de macro y micronutrientes para el cultivo de plantas en forma hidropónica (140)

<u>Micronutrientes</u>		<u>Macronutrientes</u>	
$\text{Cl}_2\text{Co} \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	1,6 g	$(\text{PO}_4)_2\text{Ca}_3$	225 g
$\text{SO}_4\text{Zn} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	5,4 g	$\text{SO}_4\text{Ca} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	95 g
$\text{Cl}_2\text{Mn} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	16,2 g	$\text{SO}_4\text{K}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	155 g
BO_3H_3	12,6 g	$\text{SO}_4\text{Mg} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	125 g
$\text{SO}_4\text{Cu} \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	5,4 g		
$\text{SO}_4\text{Fe} \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	18,0 g		
$\text{MoO}_4\text{Na}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,6 g		

Para preparar la solución de riego, se disuelven los macronutrientes en agua destilada, mientras que los micronutrientes se agregan a partir de una solución empírica. El agua empleada en el riego lleva 2,8 g de componentes sólidos por litro de agua destilada en una proporción de 600g de macronutrientes por 472 mg de micronutrientes.

4.- Enzimas

a.- Lisozima : obtenida de Worthington Biochemical Corporation.

b.- Ribonucleasa: obtenida de Sigma. Libre de proteasa. Origen: páncreas bovino tipo IX A.

c.- Desoxirribonucleasa : obtenida de Worthington Biochemical Corporation. Libre de ribonucleasa. 2.200 unidades/mg.

5.- Acidos Nucleicos

a.- DNA y RNA de Bacillus Subtilis : obtenidos del Dr. A.N.Sarachu.

b.- DNA del bacteriofago SP01 : obtenido de la Dra M.C.Añón.

c.- Acido poliadenílico : obtenido del Dr. G.Favelukes.

6.- Antibióticos y colorantes

a.- Mitomicina-C : obtenida de Sigma. Se utilizó

una solución madre de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ en buffer de pH 7,4 (PO_4HNa_2 - Acido cítrico). Se conservó en la oscuridad a 4°C.

b.- Naranja de Acridina : obtenida de Medel de Haën
Disuelta en buffer Mc'Ilvaine pH 3,8. Se utilizó una solución madre al 1% p/v que se diluyó en el mismo buffer en el momento de usar.

7.- Procedimientos

a.- Aislamiento de bacterias a partir de nódulos de leguminosas (134)

Se separaron los nódulos de las raíces, se esterilizaron con Cl_2Hg 0,1% acidulado con ClH durante 5-10 minutos y luego se lavaron varias veces con agua destilada estéril. Los nódulos estériles se disgregaron en medio ELM líquido con instrumental apropiado y los extractos se sembraron en cajas de Petri que contenían medio ELM sólido. La incubación se realizó a 28°C durante 6-10 días. Transcurrido ese tiempo, se aislaron las colonias, previa coloración de Gram (134), para asegurarnos que se trataba de bacilos gram negativos. Las colonias aisladas se repicaron en medio ELM sólido y se conservaron en ese medio a 4°C.

b.- Ensayos de nodulación sobre leguminosas

(') En tubos :

Se efectuaron estos ensayos empleando semillas as

de alfalfa (*Medicago sativa* var. Fortín Pergamino), provistas por I.N.T.A. Castelar y semillas de *Melilotus madrid* y trébol blanco (*Trifolium repens*), de uso comercial. Estas semillas se seleccionaron por su color y tamaño. Se lavaron primero con agua corriente, luego con etanol de 95° durante 3 minutos y posteriormente con una solución de Cl_2Hg al 0,1% acidulado con ClH concentrado (5 ml/l). Más tarde se hicieron lavados en forma repetida con agua destilada estéril por espacio de 5, 10, 15 y 30 minutos. Se hicieron germinar las semillas en cajas de Petri con medio MNA sólido adicionado de agua estéril, permaneciendo en ese medio en la oscuridad hasta la aparición de las raicillas. Las semillas que no germinaron y las que originaron un halo de desarrollo bacteriano sobre el medio de cultivo, fueron desechadas.

Las semillas germinadas se sembraron en forma estéril en tubos de 2,5 cm de diámetro por 25 cm de longitud, conteniendo cada uno de ellos 20 ml de medio de cultivo 106. Cada uno de los tubos fue inoculado con 0,2 ml de un cultivo bacteriano en fase logarítmica de crecimiento; se dejaron durante 48 horas en la oscuridad, a 20-23°C y luego se instalaron en una cámara termostatzada entre 19 y 21°C y equipada con regulación automática de luminosidad (16 horas diarias de luz).

Para cada ensayo y para cada leguminosa se incluyeron controles sin inocular, algunos de ellos sin el agregado de sustancias nitrogenadas en el medio y los restantes con la adición de 0,2 ml de una

solución de NO_3K al 6%. Los resultados se leyeron luego de 30-45 días de incubación. Además de observarse la formación de nódulos, se midió el tamaño del tallo a partir de los cotiledones y se determinó el peso seco (peso constante luego de un calentamiento a 70°C) para cada una de las plantas.

(11) En macetas :

El cultivo se realizó en forma hidropónica, utilizando como soporte vermiculita dorada tipo VD 2, lavada, y como recipiente, macetas de barro cocido de 10 cm de altura, 7 cm de diámetro interno en el fondo y 10cm en la boca, presentando un orificio basal pequeño. Las macetas con vermiculita se esterilizaron a 120°C durante 15 minutos y luego se apoyaron sobre recipientes de vidrio individuales, de 10 cm de diámetro, adecuados al sistema de subirri-gación. El riego se efectuó en forma individual en cada maceta, con el objeto de evitar contaminaciones en los distintos tratamientos. Durante todo el ensayo se utilizó una solución de riego hidrosólico carente de Nitrógeno para las semillas inoculadas con cultivos de Rhizobium y algunas de las no inoculadas (controles sin nitrato) (ver sección II.3.e). El resto de las plantas no inoculadas se regó con la misma solución pero adicionada de NO_3K al 0,06% (controles con nitrato).

En este ensayo se utilizaron semillas de Lupi-nes de uso comercial (*Lupinus* sp.), seleccionadas, desinfectadas y pregerminadas como en el ensayo en

tubos.

c.- Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas

Para confeccionar las curvas de crecimiento de las cepas bacterianas en los distintos medios de cultivo, se partió de cultivos en medio líquido, los que fueron diluidos en medio fresco lo suficientemente como para no registrar valores apreciables de absorbancia a 500 nm en el espectrofotómetro (Beckmann DU). Estas diluciones se incubaron a 28°C, con agitación, y a tiempos regulares se efectuaron tomas de muestras. Las alícuotas así obtenidas se diluyeron apropiadamente en solución Rh para realizar la lectura de la absorbancia a 500 nm y para sembrar por el método de la doble capa de agar (141) sobre medio de cultivo ELM sólido en cajas de Petri. Luego de incubarse las placas de Petri durante 72 horas a 28°C se efectuó el recuento de colonias y se trazó la curva correspondiente al graficar la concentración de bacterias (ufp/ml o absorbancia a 500 nm) en función del tiempo de incubación. Finalmente se representaron los valores de ufp/ml en ordenadas y los de absorbancia en abscisas, de manera de poder conocer el primero de los parámetros en experimentos en que no podíamos esperar 72 horas para tener ese dato.

El método de estimar la concentración bacteriana de un cultivo a través del recuento de colonias presenta el error estadístico $e : 2/\sqrt{n}$, donde n es el número de colonias contadas. A ese error debe sumarse el introducido en la medida de los volúmenes, efectuada al realizar las diluciones. (84)

d.- Aislamiento de bacteriofagos a partir de muestras de suelo.

Se realizó a partir de muestras de raíces de leguminosas, utilizándose también la tierra cercana a las mismas.

Para obtener los fagos, se disgregó la tierra junto con la raíz en agua estéril y se dejó en estufa a 28°C durante 72 horas con solución Rh. Posteriormente se filtró por gasa y papel y se centrifugó a 8.000 rpm durante 10 minutos (Sorvall RC-2 rotor SS-34). El sobrenadante obtenido se filtró por Millipore de 0,45 μ de tamaño de poro.

Los filtrados se probaron sobre distintas cepas de Rhizobium colocando gotas de 5-10 microlitros de los mismos sobre una capa gelificada de Agar blando previamente inoculado con bacterias (aproximadamente 10^8 ufc/ml). Esta capa había sido formada previamente sobre la superficie del medio MNA sólido en cajas de Petri. Se incubó a 28°C durante 48 horas.

Para estos ensayos se utilizaron las cepas B-19, B-111-1a, B-172, B-310, B-251, DP-4, Y-3 de Rhizobium meliloti y Z-3 de Rhizobium trifolii. La presencia de fagos se manifestó como una zona de lisis en la capa de bacterias. Para confirmar si la lisis había sido efectivamente producida por fagos, se resuspendieron las zonas claras en 0,5 ml de solución Rh, se centrifugó a 10.000 rpm durante 20 minutos para eliminar las bacterias arrastradas en la resuspensión (Sorvall RC-2, rotor SS-34) y el sobrenadante diluído convenientemente, se tituló por el método de la doble capa de agar sobre la cepa bacteriana correspondiente en medio MNA sólido, en el que se observó la presencia de placas de lisis.

e.- Ensayos de interferencia

Se sembraron 10^8 bacterias de una de las cepas de Rhizobium sobre una caja de Petri con medio sólido MNA por el método de la doble capa de agar, de tal manera de obtener un desarrollo confluyente. Para los casos de cepas que crecen en forma deficiente en medios mínimos, se utilizó el medio ELM sólido.

Inmediatamente después de gelificada la capa de agar, se colocaron gotas de 5-10 microlitros de cultivos de bacterias pertenecientes a otras cepas de Rhizobium, sin previa dilución (aproximadamente 10^7 bacterias), y se incubaron las cajas de Petri a 28°C durante 48 horas. Al cabo de ese tiempo se leyeron los resultados: (1) interferencia positiva indicada por la presencia de un halo de inhibición o una zona de lisis en el punto en que se colocó la gota. (2) interferencia negativa: ausencia de estos fenómenos.

Las bacterias, tanto las colocadas en forma de gota como las sembradas previamente en la capa de agar blando, fueron utilizadas en estado estacionario en todos los ensayos; provenían de un cultivo de 32-48 horas a 28°C en medio líquido ELM.

f.- Aislamiento de bacteriofagos a partir de cepas lisogénicas

Las zonas claras producidas en la capa de bacterias en los ensayos de interferencia, fueron resuspendidas en 0,5-1 ml de solución Rh, luego se centrifugaron a 3.000 rpm durante 25 minutos (Christ) o 10.000 rpm durante 20 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34), y el sobrenadante, diluido en forma apropiada, se tituló por el método de

la doble capa de agar sobre bacterias de la cepa correspondiente (Fig II.1).

Los casos positivos produjeron lisis confluyente cuando se sembraron sin diluir y placas aisladas cuando se diluyeron. Estos fueron confirmados al ensayar las mismas suspensiones después de ser filtradas por Millipore de $0,45 \mu$. Al verificar que aún después de un doble pasaje por colonia aislada se mantenía la propiedad de liberar bacteriofagos, se descartó la posibilidad de que se tratara de bacteriofagos exógenos adheridos a las bacterias.

g.-Titulación de bacteriofagos

Se efectuó por el método de la doble capa de agar, es decir, se sembró 0,3 ml de un cultivo de bacterias pertenecientes a la cepa indicadora en fase logarítmica tardía, de manera de lograr un desarrollo confluyente de bacterias, junto con 3 ml de Agar blando fundido y enfriado a 45°C , de manera de formar una capa fina sobre la superficie del medio sólido empleado (MNA sólido en cajas de Petri). Antes de volcar la mezcla de bacterias y agar fundido, se agregó una alícuota de una dilución de la suspensión de bacteriofagos. Se utilizaron varias cajas de Petri, una para cada dilución y una sin inocular con bacteriofagos que sirvió como control del desarrollo bacteriano. Se incubaron a 28°C durante 48-72 horas y se efectuó el recuento del número de placas de lisis, seleccionando para ello la caja de Petri que presentaba una cantidad de placas no tan grande que no pudieran contarse, ni tan pequeña que introdujera un error estadístico demasiado grande (ver sección II.7.c). Luego este número fue multiplicado por la inversa de la dilución efectuada y se obtuvo el título original.

h.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis en medio líquido

Se partió de un cultivo bacteriano de la cepa indicadora en medio líquido y en fase logarítmica de crecimiento. Se lo centrifugó (10.000 rpm 10 minutos- Sorvall RC-2, rotor SS-34) y al precipitado de bacterias se le agregó con agitación una alícuota de una suspensión de bacteriofagos de título conocido, como para tener una multiplicidad de infección de 0,01 fagos por bacteria. Se mantuvo en incubación a 28°C con agitación durante 30-60 minutos. Transcurrido ese tiempo, se agregó medio de cultivo estéril hasta completar el volumen original del cultivo centrifugado. Se siguió incubando durante 24-72 horas a 28°C.

A los distintos tiempos se determinó la concentración de bacteriofagos totales (centros infectados + fagos libres), por el método de la doble capa de agar.

i.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis en medio sólido

Se utilizó el método de la doble capa de agar, pero empleando una suspensión de bacteriofagos lo suficientemente concentrada como para producir lisis confluyente sobre la capa de bacterias de la cepa indicadora.

Luego de 48 horas de incubación a 28°C se examinaron las cajas de Petri y se seleccionaron aquéllas que efectivamente presentaban lisis confluyente. Se les agregó en su superficie 1 ml de solución Rh estéril y se re-suspendió toda la capa de agar blando con ayuda de una

una espátula estéril.

Se homogeneizó la suspensión con la acción de un agitador mecánico y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34) para separar los restos de agar y las bacterias del sobrenadante donde quedaron los fagos. Esta suspensión así obtenida se tituló por el método de la doble capa de agar sobre un cultivo de bacterias de la cepa indicadora.

j.- Crecimiento de bacteriofagos por lisis confluyente sobre membranas de celofán

Se siguió la técnica descrita en la bibliografía para bacteriofagos de Escherichia coli (142), con ligeras modificaciones. Se esterilizaron trozos circulares de papel celofán comercial no plastificado por doble calentamiento en agua hirviente durante 20 minutos cada vez.

Con esos trozos de celofán así tratados se cubrieron las superficies de las placas de Petri que se iban a utilizar.

Se efectuó un cultivo en medio sólido por estrías de la cepa bacteriana sensible al bacteriofago que se pretendía crecer. Se resuspendieron estas bacterias con un volumen de 2ml de medio de cultivo líquido (LDM líquido, MG-2-H o MG-2-OH según el caso). Una variante también utilizada fue la de centrifugar un cultivo de la cepa indicadora en fase logarítmica de crecimiento (Sorvall RC-2, rotor SS-34, 10 minutos a 10.000 rpm) y desechar el sobrenadante. A cualquiera de estas suspensiones concentradas de bacterias se le agregó 0,25 ml de una suspensión de bacteriofagos de título cercano a las 10^6 ufp/ml. Se incubó la

mezcla a 28°C durante 30 minutos, con agitación, para facilitar la adsorción de los fagos a las paredes bacterianas. Luego se depositó todo el volumen de la suspensión sobre la membrana de celofán que recubría la superficie del medio de cultivo en las cajas de Petri. Se dejaron incubando estas placas durante 48 horas en una estufa regulada a 28°C. Al cabo de ese lapso, se resuspendió lo que quedaba por encima de las membranas en 2 ml de solución ME ó Rh por cada placa. Se agitó bien y se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34) para eliminar parte de las bacterias arrastradas. Más tarde se agregaron gotas de cloroformo y se dejó 30 minutos a temperatura ambiente para completar esta acción. Una vez transcurrido ese tiempo, se tituló la suspensión obtenida en cajas de Petri con MNA sólido por el método de la doble capa de agar, utilizando para ese fin un cultivo de bacterias de la cepa indicadora en fase logarítmica de crecimiento.

k.- Inducción de bacterias lisogénicas por acción de Mitomicina-C.

Se utilizó un cultivo bacteriano, crecido a 28°C en medio líquido, en fase logarítmica. Se lavó con igual medio de cultivo y se dividió en 2 partes. Una de ellas, se centrifugó y se volvió a resuspender en el medio de cultivo utilizado anteriormente con la adición de Mitomicina-C en la concentración apropiada para cada caso. La otra porción se centrifugó y se resuspendió en medio fresco pero sin el agregado del antibiótico. Ambas se incubaron a 28°C con

agitación y en la oscuridad. A diferentes tiempos se determinaron ufc/ml y ufp/ml (centros inducidos + fagos libres).

l.- Inducción de bacterias lisogénicas por irradiación con luz ultravioleta.

Se partió de un cultivo a 28°C, en medio líquido y en fase logarítmica de la cepa lisogénica, como en el caso anterior. Se lavó con el mismo medio de cultivo y se dividió en dos partes: 2 ml se irradiaron en caja de Petri abierta a una distancia de 40 - 90 cm de la fuente (tubo germicida Philips de 30w), según los casos. Se agitó permanentemente mientras duró la irradiación. La otra parte no recibió tratamiento alguno. Ambas alícuotas se incubaron a 28°C con agitación y en la oscuridad. A distintos tiempos se determinaron ufc/ml y ufp/ml (centros inducidos + fagos libres). En algunos experimentos se determinó también la concentración de fagos intracelulares + fagos libres, lisando porciones del cultivo con lisozima (1,4 mg/ml), incubando a 28°C durante 30 minutos, y con el posterior agregado de gotas de cloroformo, para luego titularlas (ufp/ml).

m.- Inducción térmica de bacterias lisogénicas

Como en los casos anteriores, se empleó un cultivo de la cepa lisogénica en medio líquido, a 28°C y en fase logarítmica de crecimiento. Se lavó con medio fresco, se separaron 2 partes, las que se volvieron a centrifugar a 10.000 rpm durante 10 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34). Una de ellas se resuspendió en medio de cultivo

calentado a 45°C, incubándose a esta temperatura durante 30 minutos, y luego volviéndose a incubar a 28°C. La otra, se resuspendió directamente en medio de cultivo mantenido a 28°C y continuó a esa temperatura de incubación. A distintos tiempos se determinó la concentración de bacterias (ufc/ml) y de bacteriofagos (centros inducidos + fagos libres)(ufp/ml).

n.- Conservación de bacteriofagos y bacterias

Las suspensiones de bacteriofagos se mantuvieron en solución Rh a 4°C y los cultivos bacterianos, en medio MNA sólido o ELM sólido, en forma de estría, a la misma temperatura. De estos últimos se efectuaron repiques cada 2-3 meses para asegurar su buena conservación.

o.- Purificación de bacteriofagos

Se partió de suspensiones de bacteriofagos de título superior a 10^{10} ufp/ml. Se centrifugó durante 15 minutos a 10.000 rpm (Sorvall RC-2, rotor SS-34), para eliminar bacterias y restos bacterianos. El sobrenadante fue nuevamente centrifugado, pero a 30.000 rpm durante 30 minutos (Spinco, rotor 50), para concentrar los bacteriofagos. Se desechó el sobrenadante de los tubos y los sedimentos visibles, se resuspendieron a razón de 0,2 ml por tubo. Luego fueron tratados durante 1 hora a 37°C con DNAsa y RNAsa crudas (50 µg/ml), para eliminar los ácidos nucleicos bacterianos contaminantes (ver fig. II.2). Más tarde se centrifugaron sobre 2 capas de Cloruro de Cesio de diferente concentración para eliminar el resto de impurezas, que incluía a las enzimas agregadas (Spinco, rotor SW 41, 20.000 rpm, 60-90 min). Se fraccionó este gradiente discontinuo en alícuotas de 0,5 ml, recogándose en la zona com-

prendida entre las soluciones de ClCs de 30% y 70% de saturación, un volumen de líquido de mayor densidad óptica. Estas suspensiones fueron dializadas 2 veces contra volúmenes 1.000 veces mayores de solución Rh, a 4°C y durante 24 horas cada vez, quedando así listas para ser utilizadas.

p.- Determinación del espectro de infectividad de los fagos sobre distintas bacterias huéspedes

Se realizó por el método de la doble capa de agar, sobre medio MNA sólido, utilizando cultivos bacterianos en fase logarítmica de crecimiento, en siembra conjunta con distintas diluciones de suspensiones de fagos obtenidas ya sea por inducción de las cepas lisogénicas como por lisis confluyente de la cepa indicadora en medio sólido. Luego de 48 horas de incubación a 28°C se efectuó el recuento de placas de lisis formadas.

También se efectuaron pruebas "por gotas", consistentes en realizar una siembra de bacterias por el método de la doble capa de agar, pero sin el agregado de la suspensión de fagos. Luego, una vez gelificada la capa de agar blando, con un ansa calibrada (5-10 μ l) se depositaron gotas de las distintas suspensiones de fagos. Se incubaron a 28°C durante 48 horas y se observó la presencia de zonas de lisis o placas de lisis en los puntos en que se colocaron las gotas.

q.- Inactivación de los bacteriofagos por irradiación con luz ultravioleta

Se irradiaron suspensiones de fagos obtenidos por inducción con Mitomicina-C en solución Rh en un volumen de

1 ml, en caja de Petri abierta (100 mm de diámetro), a 90 cm de la fuente (tubo germicida Philips de 30w), con permanente agitación. A diferentes tiempos de irradiación se determinó la concentración de unidades formadoras de placas sobre bacterias sensibles por el método de la doble capa de agar.

r.- Inactivación de los bacteriofagos por choque térmico

Se incubaron las mismas suspensiones de bacteriofagos que se utilizaron en II.7.q. en solución Rh calentada a 66°C (temperatura previamente determinada como óptima para este ensayo). Se realizó un control para cada fago, incubando una alícuota de cada suspensión en solución Rh pero a 0°C. A diferentes tiempos se determinó la concentración de unidades formadoras de placas para cada caso como en el experimento anterior.

s.- Determinación de la naturaleza del material genético de los bacteriofagos

Se utilizó la técnica de Mayor y Hill, modificada por Bradley (143), que permite la identificación de los ácidos nucleicos de los bacteriofagos sin tener la necesidad de efectuar su extracción, hecho que, debido a las dificultades encontradas en la purificación del material genético de nuestros fagos, se ajustaba a las posibilidades de nuestro sistema.(144).

Las suspensiones de bacteriofagos utilizadas fueron concentradas y purificadas en gradientes discontinuos de ClCs, previa eliminación de ácidos nucleicos de origen bacteriano (sección II.7.o).

Las muestras, tanto de ácidos nucleicos como de bac-

teriofagos, fueron depositadas en forma de gotas en la superficie limpia de un portaobjetos. Se secaron con una corriente de aire caliente y una vez secas, se volvieron a colocar gotas en los mismos puntos, hecho que se repitió hasta obtener una cantidad de material suficiente como para producir fluorescencia. Cabe destacar que con suspensiones de bacteriofagos de título inferior a 1×10^{11} ufp/ml no se observó fluorescencia, aún depositando un gran número de gotas.

Una vez colocadas las últimas gotas en cada punto del portaobjetos, se volvieron a secar y se introdujeron en una fuente con metanol enfriado a -80°C , donde permanecieron durante 20 minutos a una temperatura exterior de -2°C . Luego se sacaron de la fuente y se volvieron a secar con aire caliente. Una vez secos, se cubrieron con una solución de Naranja de Acridina (sección II.6) durante 5 minutos. Se lavaron 2 veces con buffer de Mc'Ilvaine pH 3,8, se cubrieron con una solución de PO_4HNa_2 0,15 M durante 15 minutos, se los dejó escurrir parcialmente y se expusieron aún húmedos a la acción de una lámpara de luz ultravioleta (luz de Wood : 2.537 \AA).

También se efectuó el mismo ensayo pero luego de un tratamiento de digestión enzimática:

(') Tratamiento con Ribonucleasa: Por cada muestra se colocaron 2 series de gotas, una en cada portaobjetos. Una vez fijadas con metanol en frío, se cubrieron con buffer Mc'Ilvaine pH 3,8. Uno de los portaobjetos permaneció así por espacio de 2 horas a 37°C . El otro fue tratado con ribonucleasa pancreática purificada electroforéticamente y calentada a 80°C durante 10 minutos, en solución al 0,1%

n/v en buffer Mc'Illvaine pH 3,8, y se incubó también a 37°C durante 2 horas. Luego, ambos portaobjetos, se tiñeron con Naranja de Acridina de la manera ya descrita.

(11) Tratamiento con Desoxirribonucleasa : Se depositaron dos series de gotas para cada muestra en sendos portaobjetos, se fijaron y secaron. Se cubrieron con buffer de pH 5,5 durante 5-10 minutos. Uno de los portaobjetos se cubrió con solución de desoxirribonucleasa al 0,02% p/v en solución buffer de pH 5,5, el otro permaneció sumergido en el citado buffer pero exento de enzimas. Ambos se incubaron a 37°C durante 2 horas y luego se cubrieron con buffer de Mc'Illvaine de pH 3,8 durante 5-10 minutos, al cabo de los cuales se tiñeron con Naranja de Acridina como ya se indicó anteriormente.

Los resultados esperables están descritos en la tabla II.1.

t.- Lisogenización de bacterias del género Rhizobium.

El procedimiento consistió en introducir como profago a un bacteriofago normalmente liberado por bacterias de una cepa lisogénica (donora) en el genoma de otra bacteria normalmente utilizada como indicadora (acceptora), ya que sobre ella el bacteriofago puede producir su ciclo lítico.

Para ello dispusimos de un lisado del fago en cuestión y lo filtramos por Millipore de 0,45 μ para liberarlo de las bacterias que pudieran haber quedado en el mismo. Efectuamos una siembra en medio sólido ELM para comprobar que efectivamente el lisado se hallaba libre de bacterias y al mismo tiempo, efectuamos una siembra conjunta de una dilu-

ción de esta suspensión y de una alícuota de un cultivo de bacterias de la cepa indicadora por el método de la doble capa de agar, como para obtener un número discreto de placas de lisis. Se dejó incubar a 28°C por espacio de 48 horas, y una vez formadas las placas de lisis, se punzó con ansa recta el centro turbio de las placas y se hicieron estrías en cajas de Petri con medio ELM sólido. De allí, se efectuó un crecimiento en medio líquido de las bacterias correspondientes a cada una de las estrías, hasta lograr una absorbancia a 500nm de aproximadamente 0,3. Se diluyó y se sembró en cajas de Petri con medio MNA. Se dejó incubando a 28°C durante 48 horas y con un "manguito" de terciopelo estéril se efectuaron réplicas de las colonias aparecidas (a) sobre cajas de Petri con MNA sólido y (b) sobre cajas de Petri con MNA sólido previamente sembradas por el método de la doble capa de agar con bacterias de la cepa indicadora. Se dejó incubar a 28°C durante otras 48 horas y se observó la aparición de colonias que en la caja de Petri (b) produjeron halos de inhibición sobre la capa de bacterias de la cepa indicadora. Por comparación, se tomaron las colonias equivalentes pero crecidas en la caja (a), no contaminada con bacterias de la cepa indicadora; se pasaron dos veces por colonia aislada, y con ellas se hicieron estrías en medio de cultivo sólido como para conservarlas como posibles cepas lisogenizadas. Este hecho se comprobó a través de distintos ensayos (descritos en el capítulo III), entre los cuales, por supuesto, se cuenta la aparición de placas de lisis al titular el sobrenadante de un cultivo en medio líquido de estas nuevas cepas sobre bacterias de la cepa aceptora no tratadas.

T A B L A I I . 1

Resultados esperables en los experimentos destinados a la determinación del material genético de los bacteriofagos.

Tipo de ácido nucleico	T R A T A M I E N T O				
	(-)	2 hs en buffer pH 3,8	RNAsa	2 hs en buffer pH 5,5	DNAsa
DNA biténico	verde	verde	verde	verde	(-)
DNA monoténico	rojo	rojo	rojo	rojo	(-)
RNA monoténico	rojo	rojo	(-)	rojo	rojo
RNA biténico	verde	verde	verde	verde	verde

F I G U R A I I . 1

Aislamiento de bacteriofagos a partir de bacterias lisogé-
nicas

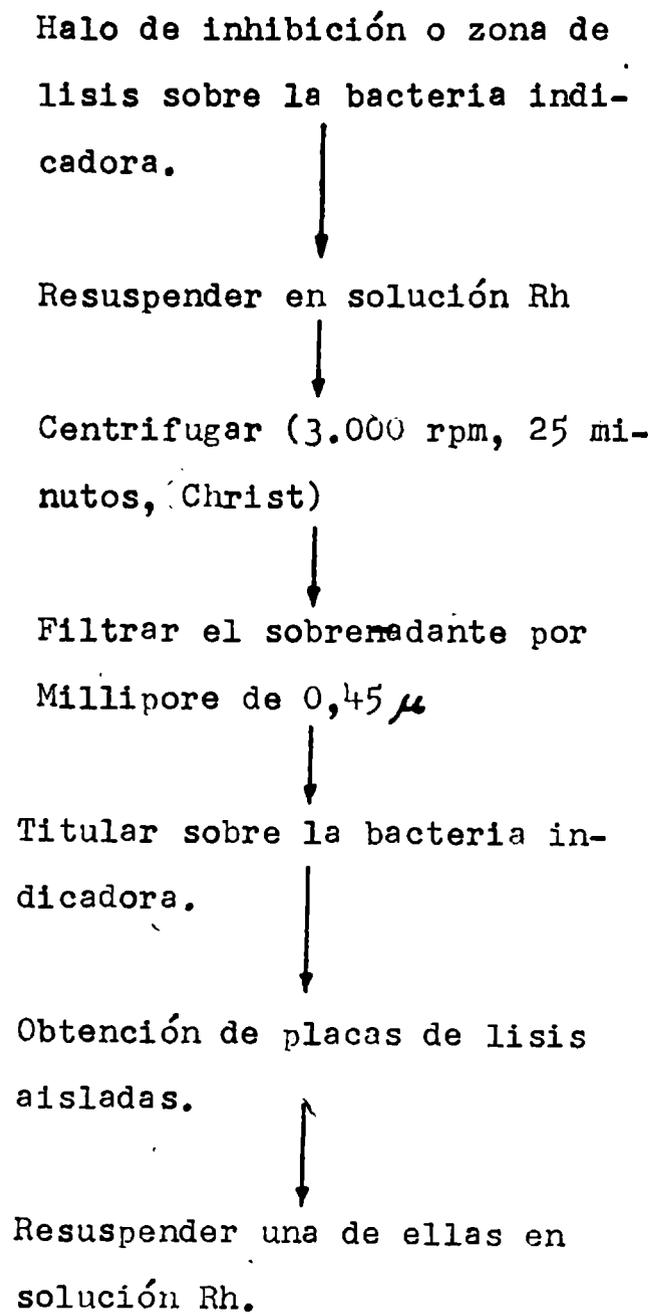
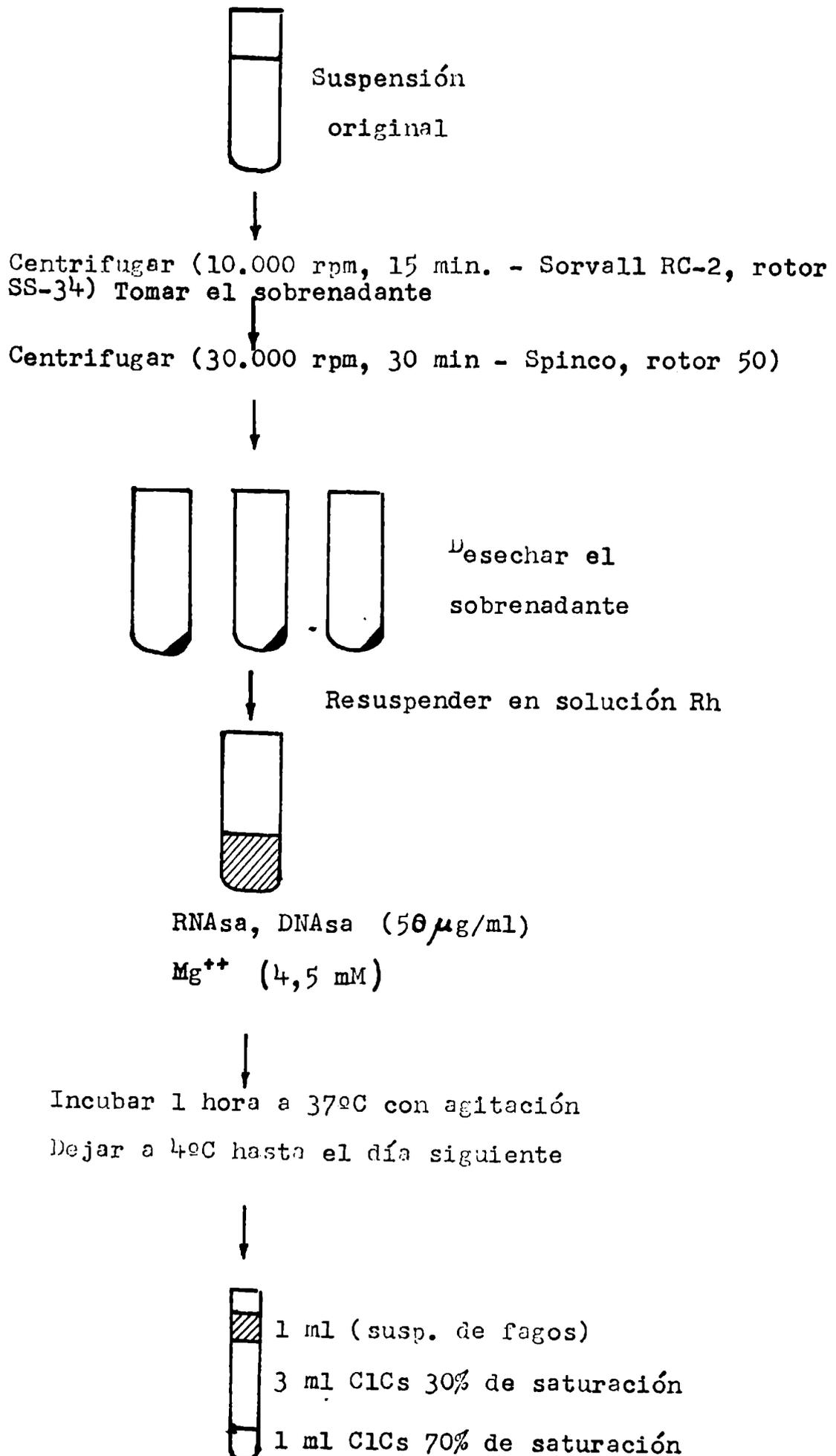


FIGURA II. 2

Concentración y purificación de una suspensión de fagos



- III -

R E S U L T A D O S

1.- Ensayos preliminares

Para comenzar este trabajo decidimos tomar conocimiento de las características particulares de este sistema, partiendo de la recuperación de bacterias del género *Rhizobium* de nódulos de leguminosas no inoculadas y solicitando a la vez el envío de otras cepas a los distintos grupos de investigación que estaban estudiando a estas bacterias.

Comprobamos su propiedad de establecer simbiosis con las plantas correspondientes y analizamos sus características culturales más importantes, enfatizando nuestro esfuerzo en aquellas cepas que, mediante otros ensayos que estábamos efectuando en paralelo, demostraban atraer nuestro interés.

a.- Aislamiento de bacterias del género *Rhizobium*

Según la metodología descrita en Materiales y métodos, pudieron aislarse dos cepas bacterianas pertenecientes al género *Rhizobium*. Una de ellas, Y-3, fue aislada de un nódulo de una planta de alfalfa (*Medicago sativa*, var. Fortín Pergamino), no inoculada. La otra, Z-3, se obtuvo a partir de nódulos de una planta de trébol rojo, también sin inocular. Sus caracteres tintoriales y culturales eran coincidentes con los de las bacterias del género *Rhizobium* (tabla III.1), confirmándose su especie en ensayos de nodulación sobre leguminosas (ver más adelante: III.1.b)

Para asegurarnos de la homogeneidad de los cultivos, todas las cepas de *Rhizobium*, tanto las recibidas de otros centros de investigación como las aisladas en nuestro laboratorio fueron pasadas 3 veces por colonia aislada antes de ser

utilizadas en los experimentos. Se verificó en cada caso la afinidad de estas bacterias por los colorantes de la tinción de Gram (gram negativas), con lo cual detectamos también algunas contaminaciones.

b.- Ensayos de nodulación sobre leguminosas

Dado que las cepas aisladas provenían una de nódulos de alfalfa y la otra de nódulos de trébol, sospechábamos que se trataba de bacterias de las especies *Rhizobium meliloti* y *Rhizobium trifolii* respectivamente. Para confirmar este hecho efectuamos ensayos de nodulación sobre las leguminosas adecuadas para cada caso.

Fue así que confirmamos la especie a la que pertenecían estas cepas aisladas en nuestro laboratorio, como así también la de aquéllas consideradas como las más importantes para nuestros fines (R-491, R-493, DP-4, B-111-1a, B-19, B-251). En todos estos casos obtuvimos los resultados esperados, mientras que, en cambio, la cepa 39, enviada por el Dr. Staniewski como perteneciente a la especie *Rhizobium lupini*, produjo nódulos en raíces de plantas de alfalfa pero no en las de lupines (tabla III.2).

Hemos tabulado el número de plantas que fueron noduladas por acción de las distintas cepas y el número de nódulos producidos, observando notables variaciones en este último aspecto. (tabla III.2)

De las bacterias aisladas en nuestro laboratorio pudimos deducir a través de dicha tabla que efectivamente Y-3 pertenecía a la especie *Rhizobium meliloti*, ya que fue capaz de inducir la formación de nódulos en plantas de Me-

dicago sativa y Melilotus pero no en plantas de Trifolium repens, sucediendo a la inversa con Z-3, que por lo tanto fue clasificada como Rhizobium trifolii (ver tabla I.1).

En los distintos ensayos se observó una notable diferencia en el crecimiento de las plantas sin inocular crecidas en ausencia y presencia de nitrato inorgánico en el medio de cultivo. El desarrollo de las plantas inoculadas y noduladas fue variable, pero siempre mayor que el de los controles desprovistos de nitrato. Además de observar el diferente aspecto que presentaban las plantas correspondientes a los distintos tratamientos, efectuamos determinaciones de peso seco que confirmaron nuestras estimaciones visuales.

c.- Curvas de crecimiento de las cepas bacterianas

Efectuamos el crecimiento en medio líquido de las cepas que más atraían nuestro interés, es decir de aquellas que utilizaríamos como indicadoras en la titulación de bacteriofagos (R-493, B-19, DP-4, B-251, U-45), aquéllas que resultaron ser lisogénicas (ver sección III.2.b) y aquéllas aisladas en nuestro laboratorio (Y-3, Z-3). El desarrollo se siguió por medidas de absorbancia a 500nm y por recuento de colonias en medio ELM sólido. Los datos correspondientes al tiempo de duplicación de las citadas cepas en las condiciones de crecimiento probadas se encuentran registrados en la tabla III.3. Estos oscilaron entre 150 y 180 minutos en medio ELM líquido y a 28°C para las distintas cepas de Rhizobium meliloti. Es notoria la diferencia respecto de la cepa Z-3 de Rhizobium trifolii, la cual creció muy lentamente en estas condiciones.

En las figuras III.1 y III.2 se representan curvas de crecimiento correspondientes a la cepa B-19 de *Rhizobium meliloti*, crecida a 28°C en medio ELM líquido, obtenidas por medida de la absorbancia a 500nm y ufc/ml respectivamente. De acuerdo a lo observado en dichas figuras, esta cepa posee un tiempo de duplicación de 3 horas en esas condiciones de crecimiento, y llega a su estado estacionario con una concentración cercana a las 10^9 ufc/ml (DO_{500nm} : alrededor de 1), semejante a la alcanzada por B-111-1a (145). En la figura III.3 se puede observar la relación lineal existente entre los valores de absorbancia a 500nm y ufc/ml. La pendiente de la recta resultó ser de $9,8 \times 10^8$ ufc/ml, cifra similar a la observada en otras de las cepas probadas, lo cual era de esperarse por tratarse de bacterias pertenecientes a la misma especie. (ver tabla III.3)

d.- Verificación de la presencia de bacterias en el sobrenadante de una centrifugación

Esta prueba estaba destinada a determinar las condiciones que debían lograrse con nuestros equipos para dejar menos del 0,1% de bacterias en el sobrenadante de un cultivo centrifugado.

Comprobamos que tanto para B-19 como para DP-4, B-111-1a, R-491 y R-493, sometiendo a un cultivo de 1×10^7 ufc/ml durante 25 minutos a 3.000 rpm en la centrífuga Christ (refrigerada), obteníamos un sobrenadante con menos de 5×10^3 ufc/ml. Lo mismo se daba utilizando la centrífuga Sorvall RC-2, rotor SS-34 durante 10 minutos a 10.000 rpm.

2.- Antagonismo microbiano

Estos ensayos fueron planeados con el objeto de verificar la existencia de antagonismo entre las distintas cepas de *Rhizobium*, evaluar la incidencia de la lisogenia en esas interacciones y fundamentalmente, aislar bacteriofagos portados por algunas de ellas.

a.- Ensayos de interferencia

Los ensayos de interferencia fueron realizados con 57 cepas bacterianas pertenecientes a distintas cepas de *Rhizobium*. En la mayoría de los casos el antagonismo entre bacterias se manifestó bajo la forma de un halo de inhibición sobre el desarrollo confluyente de las bacterias de la cepa indicadora formado alrededor del cultivo colocado en forma de gota; en otros casos, en cambio, se observó la aparición de una zona de lisis ocupando el lugar donde se depositó la gota. (ver Materiales y métodos).

Estos experimentos se llevaron a cabo de modo de poner en contacto un número 10 veces mayor de bacterias en la gota en relación a las indicadoras, localizadas en esa pequeña superficie de contacto. De esta manera, si una bacteria "A" liberaba un agente antibacteriano capaz de inhibir el crecimiento de otra bacteria "B", y "B" no hacía lo propio respecto de "A", detectábamos la interferencia cuando colocábamos a "A" en forma de gota y a "B" en la capa de agar blando, pero no la detectábamos cuando lo hacíamos a la inversa. En primer lugar, ésto es consecuencia de que el agente antibacteriano producido por la bacteria de la

gota puede difundir por fuera de la misma, observándose el crecimiento de estas bacterias, a veces abundante, rodeado de un halo de inhibición (gotas C-1 y C-3 de la figura III.4). Si no difundiera (caso de algunos bacteriofagos y bacteriocinas), se presentarían distintas alternativas que dependerían de la potencia del agente antibacteriano y de la concentración de bacterias en la gota: A mayor potencia del agente y menor concentración de bacterias en la gota, mejor se visualizará el fenómeno. Las interferencias B-2, C-4 y C-5 de la figura III.4 fueron producidas por fagos de gran actividad lítica, liberados por bacterias que se hallaban en una concentración relativamente baja. Los casos D-3, D-4, E-2 y E-3 también fueron originados por fagos de gran actividad lítica, pero las bacterias se hallaban más concentradas que en los casos anteriores. A-3 y B-4, por el contrario, corresponden a interferencias débiles producidas por agentes bactericidas poco o medianamente potentes, liberados por cultivos bacterianos de concentración moderadamente elevada. B-3, C-2 y D-2 son resultados negativos.

Si colocáramos a "B" (bacteria inhibida en su crecimiento por un agente liberado por "A") en forma de gota y a "A" en la capa de agar blando, el crecimiento de "B" sería inhibido sólo en un cierto grado, debido a su superioridad numérica respecto de "A" en la superficie de contacto. Además, de este modo no nos sería posible detectar la interferencia producida, ya que resulta muy difícil observar la inhibición del crecimiento de las bacterias de la gota a causa de la opacidad que presenta el desarrollo con-

fluente de las bacterias indicadoras por debajo de la misma.

Los resultados obtenidos fueron tabulados y agrupados de acuerdo a la especie a la que pertenecían las cepas agresoras y las cepas agredidas (tablas III.4, III.5, III.6). La notación utilizada para confeccionar las tablas obedeció a la necesidad de distinguir entre combinaciones que invariablemente producían interferencia (++), de aquéllas que mostraban ese fenómeno en forma no tan constante (+). Además, hubo otros casos que resultaron positivos en sólo una oportunidad a pesar de haber sido probados en forma reiterada (+-).

En la tabla III.4 se muestran los resultados de los antagonismos entre 29 cepas de *Rhizobium meliloti*, 14 de las cuales fueron utilizadas como indicadoras. La interferencia entre las cepas empleadas en la elaboración de inoculantes en nuestro medio (B-19, B-111-1a, B-251, B-310) y en el Uruguay (U-10, U-45) fue menor del 10% del total. Sin embargo, reviste una particular importancia, por cuanto al incluirse dos cepas antagónicas en inoculantes polivalentes ocurriría la pérdida de un número importante de bacterias de la cepa sensible. Por otra parte, una cepa nativa de la Provincia de Buenos Aires (DP-4) fue inhibida por 3 cepas utilizadas en inóculos: B-19, B-111-1a y B-310.

Dos de las cepas eficientes aisladas de suelos uruguayos (146) inhibieron el desarrollo de la mayor parte de las cepas utilizadas como indicadoras. Otra de las cepas aisladas en el Uruguay (R-491) se mostró sumamente sensible a agentes antibacterianos liberados por otros rizobios. Dos cepas no inhibieron el crecimiento de otras bac-

terias de la especie *Rhizobium meliloti* (B-172 y B-251) y sólo una se mostró resistente a la acción antibacteriana de todas las demás (R-492).

En la tabla III.5 se detallan los resultados de las interferencias entre cepas de varios grupos de inoculación y *Rhizobium meliloti*. Es notable el hecho de que la cepa 21 de *Rhizobium trifolii* y la D-120 de *Rhizobium leguminosarum* interfirieran con la mayoría de las cepas de *Rhizobium meliloti* sobre las cuales fueron probadas. Posiblemente estas interferencias hayan sido causadas por la liberación de un potente antibiótico por parte de las cepas citadas, a juzgar por la claridad de las zonas de lisis y por la gran difusión del agente inhibidor (0,5 - 1 cm por fuera de la colonia de bacterias pertenecientes a la gota). Cuando se utilizaron cepas de *Rhizobium lupini* en forma de gotas, el porcentaje de interferencias fue grande (ver tabla III.7), y se debió principalmente a las denominadas 16-7, 16-35, y H-13-3, dos de las cuales (16-7 y H-13-3) produjeron halos de inhibición similares a los originados por las cepas 21 (*Rhizobium trifolii*) y D-120 (*Rhizobium leguminosarum*).

La tabla III.6 muestra interferencias de cepas de *Rhizobium meliloti* (utilizadas en forma de gota) con cepas de *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium lupini*, y *Rhizobium japonicum*. Puede notarse en ella que el número de casos positivos fue muy bajo si se lo compara con las interferencias observadas en las tablas anteriores, hecho que nos hace suponer que los agentes bactericidas producidos por cepas de

Rhizobium meliloti son de menor espectro de acción que los liberados por otras especies.

En la tabla III.7 se presenta un resumen de los resultados obtenidos con las 5 especies de *Rhizobium* utilizadas. Puede notarse que las cepas de *Rhizobium japonicum* mostraron una baja frecuencia de interacción cuando se las sembró conjuntamente con cepas de *Rhizobium meliloti* (0,6%). Es posible que el crecimiento lento de las cepas de *Rhizobium japonicum* fuera un obstáculo para la visualización de este tipo de fenómenos. Por otra parte, se puede apreciar que en los demás casos el porcentaje de interferencias fue mayor (entre 29 y 31%), aunque, como ya lo hicimos notar, fue más escaso cuando utilizamos a las cepas de *Rhizobium meliloti* en forma de gotas frente a *Rhizobium lupini* y *Rhizobium trifolii* que cuando efectuamos las combinaciones inversas.

Diversos son los factores que pudieron haber influido sobre los resultados obtenidos: fase de crecimiento de ambas cepas, número de bacterias indicadoras puestas en la capa de agar blando, concentración de bacterias en la gota, medio de cultivo empleado, etc. Los resultados contradictorios observados (ver en las tablas III.4, III.5 y III.6 los casos anotados como + y +-) pudieron haber tenido entonces diferente origen, ya que no fueron controladas todas las variables que podían afectar al sistema, lo cual hubiera resultado sumamente engorroso y nos hubiera apartado de nuestro principal objetivo que era el aislamiento de bacteriofagos a partir de cepas lisogénicas. No obstante, las combina-

ciones fueron realizadas utilizando cultivos saturados. No efectuamos el ajuste de la concentración de bacterias para las 56 cepas usadas puesto que esta tediosa tarea no nos garantizaba que el estado de las bacterias puestas en contacto fuera el mismo en todos los casos. Además, había cepas que crecían mejor que otras en el medio de cultivo sólido utilizado para las pruebas. De este modo, al desarrollarse más rápidamente en ese medio, al cabo de un corto tiempo de incubación, aumentaría la relación entre la concentración de estas bacterias y la de las que crecen a menor velocidad.

Hubo también algunas cepas de *Rhizobium trifolii* que, por conveniencia práctica, debieron ser crecidas en algunos ensayos en un medio líquido (MG-2-H) diferente del utilizado en otros experimentos (ELM líquido), con lo que parece muy probable que al haber empleado cultivos crecidos en diferentes condiciones hayamos modificado el comportamiento de las bacterias en las distintas pruebas realizadas.

En el caso de que algunas bacterias de crecimiento lento inhibieran el desarrollo de otras de crecimiento rápido, podría no llegar a observarse interferencia por causa del excesivo crecimiento de las bacterias de fondo. Además, si hubiera bacterias que alcanzaran el estado de saturación con una concentración más baja que otras en el medio líquido en el que habían crecido previamente, hubieran quedado en desventaja numérica al efectuarse las pruebas.

Es importante también destacar que los ensayos realizados con las cepas de *Rhizobium japonicum* y algunas de *Rhizobium lupini* (16-2 y 16-3) debieron ser efectuados en medio ELM sólido puesto que no crecían bien en el medio míni-

mo habitualmente empleado para este tipo de experimentos (MNA sólido). Los medios de cultivo con extracto de levadura en su composición, como el ELM sólido, parecen tener la desventaja, para esta clase de ensayos, de interferir de alguna manera con la producción, liberación o acción de los antibióticos de bajo peso molecular (147).

Además, a todo esto se le suma el hecho de que un cultivo de bacterias lisogénicas no mantiene una concentración constante de fagos libres en el medio en el que se desarrolla, pudiendo de esta manera pasar desapercibida su acción lítica sobre otras cepas bacterianas en algunos ensayos. Tal es así que la interferencia entre DP-4 y B-251, que es debida a la liberación del bacteriofago FL 3 por parte de la primera (145), sólo se detectó en algunas de las oportunidades en que se pusieron en contacto ambas cepas. Un hecho similar fue comprobado por otros autores en una cepa de *Agrobacterium tumefaciens* (148), donde las fluctuaciones en la concentración de fagos libres eran aún mayores que en nuestros casos.

Es probable que si hubiéramos utilizado cultivos en diferentes fases de crecimiento o relaciones más extremas entre las concentraciones de bacterias en la gota y bacterias en la capa de agar blando, hubiéramos detectado otros casos positivos de interferencia. Del mismo modo, el empleo de distintos medios de cultivo y el uso de agentes inductores de la liberación de fagos y bacteriocinas podrían haber constituido factores favorables para la visualización de estos fenómenos, pero todo esto hubiera aumentado enormemente el número de ensayos, y el uso de inductores nos hubiera apartado aún más de las condiciones

que se dan naturalmente en el suelo.

De todas maneras, utilizando la metodología de trabajo expuesta, podemos afirmar que los casos en que se detectó interferencia, aunque sólo fuera en una sola oportunidad, indicaron fehacientemente la presencia de agentes antibacterianos, mientras que aquéllos anotados como negativos, podrían no serlo en otras condiciones.

b.- Aislamiento de bacteriofagos

De todos los casos positivos de interferencia, sólo 12 registrados entre cepas de *Rhizobium meliloti* demostraron ser producidos por bacteriofagos. Obtuvimos así la evidencia de la existencia de lisogenia en 4 de las cepas utilizadas en la preparación de inoculantes en nuestro medio y en el Uruguay: B-111-1a, D-19, DP-4 y R-491. Las dos primeras son portadoras de los bacteriofagos denominados FL 1 y FL 2 respectivamente, mientras que las dos restantes resultaron ser polilisogénicas (ver tabla III.8). DP-4 es portadora del fago FL 3, pero cuando se la trató con Mitomicina-C fue capaz de liberar un nuevo tipo de bacteriofago (FL 3G)(145). R-491 es la cepa portadora de por lo menos tres tipos distintos de bacteriofagos, FL 4 (PT), FL 4 (PC) y FL 4 (ST). También las cepas originarias de Polonia denominadas 16b, 11, 39 y L-38 demostraron ser lisogénicas al liberar a los bacteriofagos ϕ 16b, ϕ 11, ϕ 39 y ϕ L-38. Desconocemos la relación existente entre estos 4 fagos y los mencionados por Staniewski y colaboradores (149) como portados por las cepas nombradas.

Por otra parte, según la técnica descrita en Materiales y métodos, fueron aislados dos bacteriofagos líticos a partir de muestras de suelo (ver tabla III.9). Ellos se denominaron F-1 (proveniente de la rizosfera de una planta de alfalfa sin nodular de Pehuajó, Provincia de Buenos Aires), y F-8 (proveniente de la rizosfera de una planta nodulada de trébol rojo, de INTA, Pergamino, Provincia de Buenos Aires). Ambos se recrecieron dos veces a partir de placas aisladas, obteniéndose títulos superiores a 10^5 ufp/ml sobre sus respectivas bacterias indicadoras, DP-4 y Z-3.

3.- Crecimiento de los bacteriofagos aislados

Una vez aislados los bacteriofagos, debimos intentar aumentar sus títulos con el objeto de poder efectuar experimentos tendientes a lograr un mejor conocimiento de sus principales características biológicas.

Para los bacteriofagos portados por cepas lisogénicas existen 2 formas de obtener incrementos en el título: por desarrollo a través de ciclo lítico y por inducción, ya sea espontáneamente o a través del uso de agentes especiales. Los bacteriofagos líticos, en cambio sólo pueden aprovechar el primero de los mecanismos nombrados para poder replicarse.

a.- Por inducción espontánea

El método de realizar un cultivo líquido de la cepa lisogénica y cosechar los bacteriofagos liberados en forma espontánea no nos proporcionó suspensiones de título superior a 10^6 ufp/ml, a excepción de las del bacteriofago FL 2 que llegaron hasta 3×10^8 ufp/ml (150), es decir que ni siquiera concentrando 1000 veces el sobrenadante de un cultivo efectuado en medio líquido hubiéramos obtenido una suspensión de 10^{10} ufp/ml, excepción hecha del caso citado.

b.- Por ciclo lítico en medio líquido

Efectuando la infección de un cultivo de la cepa B-19 en medio ELM líquido con una suspensión de bacteriofagos FL 1 no obtuvimos incrementos importantes en su título. Realizamos entonces distintos ensayos desti-

nados a tomar conocimiento de los factores que influían negativamente en esas circunstancias. Se decidió en primer término cambiar el medio de cultivo por MNA líquido o Bergersen + K⁺ ya que la bibliografía contraindicaba el uso de extracto de levadura en medios de cultivo destinados al crecimiento de bacteriofagos de Rhizobium (98).

Luego, se intentó efectuar diluciones después de 20-30 minutos de realizada la infección, para evitar el efecto de las sustancias gomosas que liberaban estas bacterias y el producido por las infecciones múltiples, pero no se logró mayor éxito. También se varió la multiplicidad de infección y se ensayó el método de efectuar la infección sobre el sedimento proveniente de centrifugar un cultivo de la cepa indicadora, para aumentar el número de colisiones entre bacterias y fagos, pero tampoco conseguimos resultados satisfactorios.

Verificamos entonces el porcentaje de bacterias sobrevivientes que quedaban a los 20 minutos después de la infección y registramos la disminución en la concentración de fagos libres al cabo de ese mismo período de tiempo, como datos indicadores de la capacidad de adsorción de los bacteriofagos a las paredes bacterianas (figura III.5).

En estos ensayos incluimos a uno de los bacteriofagos líticos (F-1) para comparar su comportamiento con el de los bacteriofagos liberados por bacterias lisogénicas. En la tabla III.10 podemos observar que FL 1 no se adsorbió a las bacterias indicadoras en medio ELM líquido, ya que a los 20 minutos de incubación no descendió la concentración bacteriana ni disminuyó el porcentaje de bacteriofagos libres. Utilizando medios desprovistos de extracto

de levadura (MNA líquido y Bergersen + K⁺) parecería disminuir en pequeño grado la concentración de unidades formadoras de colonias, pero el porcentaje de fagos libres constituyó igualmente el 100% de los bacteriofagos totales. Es decir que el número de bacteriofagos adsorbidos fue tan bajo que no hizo decrecer en forma apreciable el valor de la concentración de fagos libres. Con FL 1 en medio Bergersen + K⁺ logramos un aumento en el título de centros infectados + fagos libres a las 24 horas después de la infección. Este aumento resultó ser de 25 veces respecto del título original (a tiempo cero), pero sólo un 15% de estas unidades formadoras de placas correspondieron a fagos libres.

F-1 tuvo un comportamiento diferente, ya que en 2 experimentos realizados produjo una considerable disminución en la concentración bacteriana, mayor aún de lo que se esperaba de acuerdo a la ecuación: $S = B \times e^{-m}$ (176) donde S son las bacterias sobrevivientes de una población original, B , infectada con bacteriofagos con una multiplicidad de infección m . Este hecho puede explicarse suponiendo la presencia de bacteriofagos defectivos o partes de bacteriofagos (colas) en las suspensiones de F-1, los cuales podrían haberse adherido a las paredes bacterianas dando lugar a infecciones abortivas. De todas maneras, el hecho de que a los 20 minutos quedara un 40 - 50 % de bacteriofagos libres, es un índice de que hubo también adsorción de bacteriofagos completos, no defectivos.

El aumento de título a las 24 horas fue sin embargo de sólo 22 veces respecto del original (tiempo cero). Lo

notable es que un 80% estaba constituido por bacteriofagos libres, a diferencia de FL 1.

Suponemos que el alto grado de lisogenización (ver sección III.5) de la bacteria indicadora pudo ser la razón más importante de la baja producción de bacteriofagos libres en el caso de FL 1, aunque no podemos descartar otros factores, como por ejemplo la inhibición del poder infectivo de los fagos liberados o su desaparición del sobrenadante después de la centrifugación por causa de las sustancias gomosas extracelulares presentes en todos estos cultivos.

De todos modos, lo que se pretendía era obtener un buen título de bacteriofagos libres, y este método, que podría haber resultado útil para F-1, no nos resultaba práctico para hacer crecer a FL 1. Se decidió entonces buscar otra manera de hacerlo, ya que nos interesaba principalmente el estudio de los bacteriofagos portados por cepas lisogénicas.

c.- Por ciclo lítico en medio sólido

Realizando la infección en medio sólido los incrementos logrados en los títulos fueron mayores. Obtuvimos suspensiones con concentraciones de hasta $1,0 \times 10^{10}$ ufp/ml para FL 1 y de 5×10^{10} ufp/ml para FL 1(FC), partiendo de suspensiones de 1×10^5 ufp/ml y $2,5 \times 10^6$ ufp/ml respectivamente. El medio empleado fue MHA sólido, ya que en ELM sólido estos fagos mostraron una notable disminución en su capacidad de formar placas de lisis.

Como los títulos no nos resultaban satisfactorios para la realización de algunos futuros ensayos, utilizamos

el método de las membranas de celofán (ver Materiales y métodos), con el que elevamos los rendimientos hasta lograr títulos de $1,1 \times 10^{11}$ ufp/ml para FL 1, $1,5 \times 10^{11}$ ufp/ml para FL 4(PC) y $1,0 \times 10^{11}$ ufp/ml para Ø 11.(ver tabla III.11)

d.- Por inducción con Mitomicina-C y choque térmico.

Tanto estos métodos como el "a", no resultaban teóricamente adecuados para el desarrollo de FL 4 (PC), FL 4(PT) y FL 4 (ST), ya que al ser liberados por la misma bacteria (R-491), siempre obtendríamos una mezcla de los mismos. No obstante realizamos estos experimentos con R-491 con el objeto de obtener información acerca de las características del proceso de inducción en esta cepa y del desarrollo intracelular de los bacteriofagos.

Para el caso de FL 1 la situación era otra, y fue así que aprovechamos el uso de agentes inductores para aumentar la liberación de bacteriofagos por parte de bacterias de la cepa B-111-1a.

Puede observarse en la tabla III.12 que la inducción de estas bacterias con Mitomicina-C en medio Bergersen + K^+ resultó eficiente en su acción favorecedora de la liberación de bacteriofagos FL 1. Debe notarse que el agente inductor permaneció durante todo el tiempo de incubación en contacto con las bacterias, hecho que permitió el continuo aumento de centros inducidos, y en definitiva contribuyó al logro de mayores diferencias en el título de ufp/ml con respecto a los cultivos sin inducir.

La liberación espontánea de bacteriofagos por R-491 resultaba ser cuantitativamente similar a la observada en

el caso de B-111-1a, y de idéntica forma, R-491 pudo ser inducida con Mitomicina-C en medio Bergersen + K⁺ y en medio MG-2-OH, utilizándose distintas concentraciones del antibiótico. Se obtuvieron en ambos casos títulos superiores a 3×10^6 ufp/ml al cabo de 10 horas de incubación (tabla III.12). Mientras tanto, con el cultivo de bacterias que quedó sin inducir, se obtuvieron títulos de no más de 4×10^4 ufp/ml en el mismo período de tiempo.

Debe destacarse que no se discriminó en estos ensayos entre placas de lisis de diferente morfología, sino que las unidades formadoras de placas anotadas, corresponden tanto a placas claras como turbias y pequeñas muy turbias, algunas veces un tanto difíciles de identificar.

En la figura III.6 se muestra la acción de Mitomicina-C ($5 \mu\text{g/ml}$) sobre la liberación de fagos por parte de R-491, pudiéndose observar un aumento de título de 130 veces con respecto al registrado para el cultivo control (sin inducir). Puede apreciarse también, en la misma figura, la acción bactericida ejercida por el antibiótico sobre las bacterias de la cepa R-491.

Un aumento significativo en el título de unidades formadoras de placas ya puede observarse antes de la primera hora de incubación. Este dato proviene del recuento de placas de lisis obtenidas al sembrar conjuntamente diluciones de la suspensión tratada con Mitomicina-C y alícuotas de un cultivo en fase logarítmica de crecimiento de la cepa indicadora (R-493). Por lo tanto, cada placa pudo ser originada tanto por una bacteria inducida como por un bac-

teriofago libre. Como el agente inductor permaneció en contacto con las bacterias todo el tiempo que duró el experimento, el aumento de título observado podría haberse debido a dos factores: (1) Al aumento en el número de bacterias inducidas, que comenzaría a hacerse efectivo ya a tiempo cero. (2) A un aumento de fagos libres, provenientes de la liberación por parte de las bacterias previamente inducidas. Se podría pensar que, en las primeras horas de incubación, después de la inducción, este factor no habría contribuido significativamente al aumento de título, ya que en experimentos de inducción por acción de la luz ultravioleta (ver sección III.3.e) se estableció que el tiempo que demora R-491 en comenzar la liberación de los fagos es de aproximadamente 3 horas.

En la tabla III.12 también se registraron los datos correspondientes a un experimento de inducción térmica realizado con bacterias de la cepa B-111-1a. Al cabo de 8 horas 35 minutos de incubación después de la inducción (ver Materiales y métodos) se registró un incremento en la producción de unidades formadoras de placas de 88 veces en relación al cultivo control.

Los escasos títulos obtenidos en la inducción de B-111-1a por acción de ambos agentes indican que estos métodos no son aptos para lograr suspensiones de alto título para el bacteriofago FL 1, aunque, sin embargo, se debieron utilizar en aquellas oportunidades en que se debían obtener lisados de FL 1 libres de bacteriofagos portados por las bacterias de la cepa indicadora, B-19 (FL 2).

e.- Por inducción con luz ultravioleta

En la figura III.7 se grafica la concentración de fagos y bacterias luego de 3 horas de haber sometido a la acción de la radiación ultravioleta a un cultivo de la cepa B-111-1a, en fase logarítmica de crecimiento, por espacio de distintos períodos de tiempo. Se puede observar en ella que hubo una máxima inducción cuando se irradió por espacio de 10 segundos. Con esta dosis se redujo la concentración bacteriana a aproximadamente un 5-7% respecto de la correspondiente al cultivo original. Tiempos mayores de irradiación, lejos de producir mayores aumentos en el título de bacteriofagos, lo redujeron por debajo de los valores basales. Esto podría deberse a que la acción que las radiaciones ultravioleta ejercen sobre el material genético de las bacterias, podría extenderse al genoma de los fagos provocando su inactivación y/o a que disminuiría el número de bacterias capaces de liberar bacteriofagos por destrucción de estructuras esenciales para concretar el armado de los mismos.

Se realizaron varios experimentos de inducción por acción de la luz ultravioleta para la cepa B-111-1a (ver tabla III.13). En ellos se mantuvieron constantes algunas variables que podían influir en la liberación de los fagos (medio de cultivo, temperatura de incubación, condiciones en que se llevó a cabo la irradiación). El porcentaje de bacterias sobrevivientes luego de la inducción sufrió una pequeña variación en las distintas oportunidades en que fue determinado (osciló entre 5 y 13%), variación que puede atribuirse a los errores sistemáticos y estadísticos que afectan al método de determinación de la concentración de bacterias a través del recuento del número de colonias (ver Materiales y métodos).

La concentración bacteriana no fue siempre la misma, sino que presentó una serie de valores comprendidos entre $1,1 \times 10^8$ y $1,0 \times 10^9$ ufc/ml, pero su modificación parece no influir mayormente en los resultados alcanzados.

La figura III.8 representa la variación temporal en la concentración de fagos que sufre un cultivo de bacterias de la cepa B-111-la luego de ser inducido con luz ultravioleta en las condiciones previamente establecidas como óptimas. Al cabo de 6 horas de incubación después de la irradiación, se logró un aumento en el título de ufp/ml (fagos libres + centros inducidos) de 183 veces con respecto al cultivo control. En este caso, si bien la inducción se limitó a la exposición del cultivo bacteriano a las radiaciones ultravioleta durante un pequeño período de tiempo, es probable que el número de centros inducidos haya aumentado a lo largo del tiempo de incubación. Esto pudo suceder ya que a pesar de que la acción ejercida sobre el DNA bacteriano es inmediata, el posterior efecto de la inhibición de la replicación bacteriana sobre la inducción del profago demora un cierto tiempo (169). Por otra parte, se comprobó experimentalmente que antes de las 2 horas de incubación después de la inducción, el aumento de "fagos libres + fagos intracelulares" no alcanza a justificar el incremento registrado en el número de ufp/ml.

La liberación de los primeros bacteriofagos completos es posible que ocurriera poco antes de las 3 horas de efectuada la irradiación por cuanto en ese término comenzó a aumentar el número de fagos libres, sumado al de fagos intracelulares, por encima de los valores correspon-

dientes al control. Entre las 4 y 6 horas de incubación los fagos libres + fagos intracelulares presentaron concentraciones de valores dispersos, alcanzando a las 9 horas el título correspondiente al número de centros inducidos + fagos libres por unidad de volumen.

Cuando el cultivo control fue lisado con lisozima y cloroformo, se obtuvieron valores de ufp/ml mayores que los correspondientes al cultivo irradiado en las 3 primeras horas de incubación. Este efecto podría deberse a la acción inactivante de la radiación ultravioleta sobre las bacterias del cultivo irradiado que ya se habían inducido espontáneamente antes del momento de la irradiación.

La inducción por acción de la luz ultravioleta también se llevó a cabo con éxito utilizando cultivos de la cepa R-491 en medio MG-2-OH. En la figura III.9 puede verse la curva de liberación de bacteriofagos por inducción con este agente para la cepa previamente citada. A una distancia de 90 cm de la fuente se irradió a varias alícuotas de un cultivo de R-491 en fase logarítmica de crecimiento por espacio de distintos períodos de tiempo. El tiempo en que se obtuvo una mejor inducción resultó ser de 30 segundos, obteniéndose en este caso un aumento de título de 200 veces respecto del cultivo control (sin irradiar), luego de una incubación de 5 horas a 28°C y con agitación (ver tabla III.13). El porcentaje de bacterias sobrevivientes fue de 1,9%, resultando ser así algo inferior al registrado para la dosis óptima de inducción para la cepa B-111-1a.

La liberación de bacteriofagos inducida artificialmente en R-491 por la radiación ultravioleta, puede apreciarse en su secuencia temporal en la figura III,10. Luego

de 8 horas de incubación se obtuvo una inducción de 86 veces con respecto al control, con un porcentaje de bacterias sobrevivientes de 4,7% (figura III.11). De los datos correspondientes a la concentración de fagos libres, sumada a la de fagos intracelulares, podemos deducir que la aparición de los primeros bacteriofagos completos ocurre aproximadamente a las 3 horas después de la irradiación, y aumenta hasta llegar a un nivel de 5×10^4 ufp/ml a las 6 horas de incubación. Esta cifra es más baja que el valor correspondiente a la concentración de centros inducidos + fagos libres (2×10^5 - 1×10^6 ufp/ml entre las 5 y las 8 horas de incubación). Tal vez sea así porque algunas bacterias podrían necesitar un tiempo mayor (superior a 8 horas), para permitir que los bacteriofagos por ellas portados completen el armado de sus estructuras, o tal vez porque el tratamiento con lisozima y cloroformo inactivaría de algún modo a los bacteriofagos intracelulares.

4.- Caracterización de los bacteriofagos aislados

Una vez realizado el aislamiento de los bacteriofagos de Rhizobium y ensayadas las diferentes formas en que se los podía hacer crecer, procedimos a tratar de establecer sus propiedades más salientes, de modo de tomar conocimiento de la naturaleza del sistema al cual estábamos enfrentados y a la vez comparar entre sí a los bacteriofagos aislados.

a.- Morfología de las placas de lisis

La morfología de las placas de lisis originadas por los bacteriofagos es una característica macroscópica que puede servir para detectar la presencia de más de un tipo de bacteriofagos en una determinada suspensión, y hasta puede brindar algunas pautas referentes al ciclo biológico de los fagos que las producen. Así, placas turbias, generalmente revelan un bajo poder lítico, asociado o no a un cierto poder lisogénico respecto de la bacteria indicadora; placas claras en su periferia y turbias en el centro, casi inequívocamente indican la lisogenización de la cepa en cuestión; placas totalmente claras son índice de bacteriofagos que siempre se comportan como líticos respecto de la cepa indicadora.

Hemos estudiado estas características para los bacteriofagos aislados, y hemos comprobado que no diferían mayormente de las descritas por otros autores para bacteriofagos de Rhizobium (114)(115)(150). El hecho más saliente fue la aparición de tres tipos diferentes de

placas de lisis cuando sembramos el sobrenadante de un cultivo de R-491 centrifugado a 10.000 rpm durante 10 minutos (Sorvall RC-2, rotor SS-34) conjuntamente con un cultivo en fase logarítmica de crecimiento de R-493, por el método de la doble capa de agar. Pudimos apreciar que estos fagos, ahora llamados FL 4 (PC), FL 4 (PT) y FL 4(ST), eran capaces de formar sobre R-493 placas claras, turbias y pequeñas muy turbias respectivamente, propiedad que se mantenía a través de sucesivos pasajes por placa aislada (ver tabla III.14).

Las características morfológicas de las placas de lisis producidas por el resto de los fagos aislados, también están detalladas en la tabla III.14. Ø 16-b, Ø 39, y Ø 11 presentaban sobre DP-4 placas de igual morfología, mientras que F-1 originó sobre esta misma cepa placas de lisis similares a las observadas con FL 2 (145). FL 1, por su parte, produjo placas turbias sobre B-19 y otras mucho más turbias sobre DP-4.(figura III.12).

b.- Espectro de infectividad de los bacteriofagos con respecto a cepas de Rhizobium pertenecientes a distintas especies.

La capacidad de los fagos obtenidos de las cepas lisogénicas para infectar a diferentes rhizobios produciendo ciclos líticos puede observarse en la tabla III.15, donde se exponen los títulos obtenidos con suspensiones de los bacteriofagos, utilizando diferentes bacterias indicadoras.

De acuerdo con la amplitud de su espectro de infectividad se los puede agrupar en dos bloques: 1) integra-

do por F-1, FL 1, FL 4 (PC), y FL 4 (PT), que son capaces de formar placas de lisis sobre por lo menos 4 de las 8 cepas de *Rhizobium meliloti* que fueron utilizadas para este ensayo; 2) constituido por Ø 11, Ø 39, Ø 16-b y FL 4 (ST), que infectaron solamente a una de las cepas probadas con producción de placas de lisis.

La suspensión de bacteriofagos F-1 utilizada en este caso, debió ser obtenida previamente por lisis confluyente sobre un cultivo de bacterias de la cepa DP-4 en virtud de haber sido aislado como bacteriofago lítico. En consecuencia, es posible que los títulos obtenidos sobre U-45, B-251, R-491, Y-3 y 39 se deban a la inevitable contaminación del lisado con bacteriofagos liberados por DP-4. Esta consideración se basa en que los cultivos en medio líquido de esta última cepa, luego de ser centrifugados y liberados de bacterias, fueron capaces de producir placas de lisis sobre las cepas nombradas. Además, en uno de los ensayos en que se utilizaron suspensiones de otros fagos: Ø 11, Ø 39 y Ø 16-b, obtenidas por crecimiento a través de ciclo lítico sobre DP-4, se observaron placas de lisis sobre el desarrollo confluyente de bacterias de las cepas U-45, R-491, B-251, Y-3 y 39. Mientras tanto, suspensiones de estos mismos fagos obtenidas por liberación espontánea a partir de sus bacterias portadoras, sólo produjeron lisis sobre las bacterias de la cepa DP-4, no haciéndolo con las anteriormente citadas.

La presencia de fagos contaminantes también podría haber ocurrido en los lisados de FL 4 (PC) y FL 4 (PT), ya que también debieron ser obtenidos por lisis confluyen-

te sobre bacterias de su cepa indicadora (R-493) para poder aislarlos separadamente. Sin embargo, en este caso, los riesgos eran menores, primeramente porque no hemos detectado ningún fago que liberado por R-493 pudiera contaminar las suspensiones de FL 4 (PC) y FL 4 (PT), y en segundo lugar porque los lisados de FL 4 (ST), obtenidos de la misma forma que los de los fagos anteriormente nombrados, solo produjeron lisis sobre R-493. Además, R-493, la bacteria indicadora, interfirió con sólo dos de las treinta cepas con las que fue probada en forma de gotas: ellas fueron R-491 y DP-4 (ver tablas III.4 y III.6). Sobre R-491, las suspensiones de FL 4 (PC) y FL 4 (PT) no produjeron placas de lisis ni aún cuando fueron probadas en altas concentraciones; sobre DP-4 la eficiencia de ambos fagos fue bastante dispar, existiendo una relación entre ellas de $1/10^3$. Esta desigualdad de títulos se repitió en las diversas oportunidades en que fueron probadas suspensiones de estos fagos sobre DP-4. Por ésto consideramos que es poco probable que esta variación haya tenido origen en un diferente grado de contaminación de las suspensiones con un supuesto fago liberado por R-493. Por otra parte, de existir dicho bacteriofago, debió haber sido detectado en las pruebas de resuspensión y siembra de las zonas de lisis producidas entre R-493 y DP-4 en los ensayos de interferencia. Suponemos entonces que se trató de una diferencia en el modo de acción de estas 2 variedades de fagos sobre las bacterias de la cepa DP-4.

c.- Inactivación de los bacteriofagos por acción de la radiación ultravioleta y por choque térmico

Al ser el estado de polilisogenia un fenómeno frecuente en *Rhizobium meliloti* (112), decidimos utilizar otros criterios en la caracterización de los fagos. Las inactivaciones térmicas resultaron útiles para ese fin al señalar un comportamiento disímil entre los fagos probados. A 60°C sólo se inactivaron FL 3 (145) y una suspensión proveniente de la inducción de R-491 con Mitomicina-C, dejando poco más del 10% de bacteriofagos sobrevivientes a los 30 minutos de incubación. Las curvas de inactivación a 66°C confirmaron su mayor inestabilidad con la temperatura (145)(figura III.13). La curva bifásica que se obtuvo con el lisado obtenido de R-491, denominado FL 4, hizo pensar en la presencia de más de un tipo de bacteriofagos en el mismo, hecho que resultó coincidente con el aislamiento de bacteriofagos con placas de lisis de diferente morfología (tabla III.14).

Las constantes de inactivación térmica resultaron de $0,30 \text{ min}^{-1}$ para FL 4 (a) y $0,06 \text{ min}^{-1}$ para FL 4 (b), siendo (a) y (b) la primera y segunda partes de la curva de inactivación respectivamente.

En la figura III.14 puede apreciarse que la cinética de inactivación de FL 4 (ST) es equivalente a la primera parte de la curva correspondiente al lisado que contiene las tres variedades (FL 4). Su constante de inactivación fue de $0,36 \text{ min}^{-1}$, y se diferencia claramente de las obtenidas con FL 4 (PC) y FL 4 (PT), las cuales son prácticamente iguales entre sí ($0,06-0,07$ para FL 4 (PC) y $0,055-0,07$ para FL 4 (PT), en min^{-1}). Además son similares a las calculadas para la última porción de la cur-

va correspondiente a FL 4.

Cabe destacar que en la figura III.14 se representó la cinética de inactivación de una suspensión de bacteriofagos obtenida por lisis confluyente de bacterias de la cepa R-493 con bacteriofagos liberados por R-491 (FL 4), reproduciendo el mismo resultado obtenido con la suspensión proveniente de inducción de R-491 con Mitomicina-C (figura III.13).

Estos resultados indicaron la presencia de dos clases de fagos en los lisados de FL 4, tanto en los obtenidos por inducción de R-491 como en los preparados por lisis confluyente en medio sólido sobre R-493. Una de ellas incluye a FL 4 (PT) y FL 4 (PC), que coinciden en su estabilidad frente a la temperatura y en su espectro de infectividad a pesar de diferir en la morfología de sus placas de lisis. La otra está formada exclusivamente por FL 4 (ST). FL 4 (PC) y FL 4 (PT) parecerían encontrarse en baja proporción en relación a FL 4 (ST); aproximadamente constituirían el 1% de los bacteriofagos presentes en una suspensión obtenida por inducción espontánea o artificial de bacterias de la cepa R-491. Esta relación fue estimada extrapolando a tiempo cero la recta que forma la última parte de la curva de inactivación térmica de la suspensión denominada FL 4 (ver figura III.13), y además, está más o menos de acuerdo con la frecuencia de aparición de placas claras (FL 4 (PC)) en los lisados de FL 4 (entre 1 y 0,1% de la población total), y con el aumento en la cantidad de placas gran-

des, menos turbias (FL 4 (PT)) a tiempos de incubación mayores en los experimentos de inactivación térmica de FL 4.

La primera parte de la curva de inactivación térmica de FL 4 presentó una constante similar a la observada para FL 3 y FL 2 (145). FL 1 fue el menos afectado por la acción de la temperatura; su constante de inactivación fue de $0,08 \text{ min}^{-1}$ y puede apreciarse en la figura III.15 que su título decae más lentamente en el tiempo que el de FL 4 (ST), pero su cinética es semejante a la correspondiente a FL 4 (PT) y FL 4 (PC). Este hecho puede deducirse además a través de la comparación de sus k (constantes de inactivación). Estas constantes fueron calculadas con la ecuación cinética de primer orden: $k = 1/t(-2,3 \log P/P_0)$ donde P_0 es el título original de los fagos, P el título de los fagos sobrevivientes a la inactivación y t , el tiempo de inactivación.

A 70°C durante 30 minutos la inactivación fue completa en todos los casos, al igual que a 60°C en un medio con EDTA en una concentración $0,1 \text{ M}$.

También se llevaron a cabo inactivaciones por acción de la luz ultravioleta, las cuales no fueron capaces de establecer diferencias notables en el comportamiento de los distintos bacteriofagos.

La suspensión denominada FL 4, obtenida por liberación espontánea a partir de bacterias de la cepa R-491, mostró una constante de inactivación por irradiación con luz ultravioleta de $1,6 \text{ min}^{-1}$ (ver figura III.16), apenas diferente de la obtenida para FL 1 ($1,2 \text{ min}^{-1}$) (ver figura III.17). La cinética de inactivación de este último fago

se asemeja aún más a la registrada para los bacteriofagos FL 2 y FL 3 (145). Las constantes fueron calculadas de igual forma que para el caso de las inactivaciones térmicas.

d.- Identificación del material genético de los bacteriofagos FL 1 y FL 4 (PC)

Los bacteriofagos utilizados en estos ensayos fueron purificados por el método indicado en Materiales y métodos, para lo cual comprobamos previamente su resistencia a las concentraciones de CLCs empleadas y al choque osmótico producido por la posterior dilución efectuada (ver tabla III.16).

Utilizando el método de Mayor y Hill modificado por Bradley (143) de la manera descrita en Materiales y métodos, en reiteradas ocasiones obtuvimos los resultados que se consignan en la tabla III.17. Como patrones utilizamos DNA y RNA de Bacillus subtilis, DNA del bacteriofago SP01 y ácido poliadenílico. FL 4 (PC) demostró poseer un ácido nucleico de doble cadena que por tratamiento enzimático fue identificado como DNA, mientras que FL 1 dio muestras de contener DNA monoténico. Se descartó la posibilidad de contaminación con DNA o RNA bacterianos ya que incluimos en los ensayos al sobrenadante de un cultivo de B-111-1a tratado con desoxirribonucleasa y ribonucleasa, no observándose la producción de fluorescencia.

5.- Lisogenización de las cepas indicadoras

Con el conocimiento que habíamos alcanzado acerca de nuestro sistema a través de experimentos de interferencia, inducción y caracterización de los bacteriofagos, decidimos verificar la factibilidad de la introducción de bacteriofagos atemperados en bacterias no portadoras de los mismos, con el objeto de sentar las bases para futuros trabajos de ingeniería genética.

a.- Lisogenización de la cepa B-19 con el bacteriofago FL 1

FL 1 es un bacteriofago normalmente portado en forma atemperada por bacterias de la cepa B-111-1a y capaz de realizar su ciclo lítico sobre bacterias de la cepa B-19. Nuestra intención fue la de introducir a FL 1 como profago en bacterias de la cepa indicadora (B-19).

La experiencia se realizó según la técnica detallada en Materiales y Métodos e ilustrada en la figura III.18. Se aislaron colonias provenientes de bacterias que se hallaban en el centro de 4 placas de lisis originadas por FL 1 sobre B-19. Se recrecieron en medio líquido, se diluyeron apropiadamente y se sembraron en 4 placas de Petri con medio MNA sólido para obtener colonias aisladas. Se realizaron las réplicas según se describió y se seleccionaron 20 colonias productoras de halos de inhibición sobre cultivos de B-19 y otras 7 que no inhibían su crecimiento. De las primeras, 19 fueron confirmadas como productoras.

ras de lisis sobre B-19 a través de ensayos de interferencia, y las otras 7 reafirmaron su condición de no ser inhibidoras del crecimiento de dicha cepa. B-111-1a, como era de esperar, al ser probada de idéntica forma, dio un resultado equivalente al de las 19 colonias productoras de lisis, mientras que B-19 tuvo el mismo comportamiento que las 7 colonias no inhibidoras.

De las 19 colonias que habían confirmado su capacidad de inhibir el crecimiento de B-19, fueron seleccionadas 4, de tal manera que cada una de ellas proviniera de una placa de lisis original distinta, evitando de este modo la realización del aislamiento de la misma bacteria por partida doble. Así, elegimos las que denominamos 19-1-4, 19-2-3, 19-3-4 y 19-4-4. Como prueba de que habían sido lisogenizadas, 0,3 ml de un cultivo de cada una de estas bacterias en medio líquido y en fase logarítmica fueron expuestos a la acción de bacteriofagos FL 1 (aproximadamente 10^4 fagos totales) en cajas de Petri con medio MNA sólido. Como control se utilizó una suspensión de bacterias de la cepa B-19 sembrada junto con los bacteriofagos en las mismas condiciones, es decir, por el método de la doble capa de agar.

Mientras que sobre B-19 la suspensión original de bacteriofagos mostraba un título de 1×10^5 ufp/ml, sobre 19-1-4, 19-2-3, 19-3-4 y 19-4-4 no aparecieron placas de lisis (título inferior a 10 ufp/ml), es decir que estas bacterias adquirieron inmunidad contra

FL 1. Esta es una propiedad que caracteriza a las bacterias lisogénicas.

También fueron sembrados los sobrenadantes de la centrifugación de una suspensión de estas bacterias que presumíamos eran portadoras del fago FL 1 sobre cultivos de las cepas B-19 y DP-4 por el método de la doble capa de agar. Sobre B-19 aparecieron placas de lisis turbias, como las que normalmente producía el fago FL 1. Los títulos oscilaron entre $2,8 \times 10^6$ y $9,2 \times 10^6$. Sobre DP-4 aparecieron placas pequeñas, "perforantes en el centro", como las que habitualmente formaba el bacteriofago FL 2, que es portado por B-19 (145). Más tarde se confirmó la presencia de bacteriofagos FL 2 por pruebas de determinación del espectro de infectividad. Este es un índice más de que las bacterias lisogenizadas con FL 1 pertenecían a la cepa B-19 y que no se trataba de bacterias de la cepa B-111-las arrastradas como impurezas. Además, este resultado nos demostró que ambos fagos (FL 1 y FL 2) podían ser albergados por la misma bacteria, en razón de que se partió de una colonia aislada.

A continuación se efectuó un ensayo de nodulación sobre plantas de alfalfa, con el objeto de probar que las cepas lisogenizadas eran capaces de inducir la formación de nódulos en este tipo de plantas al igual que las bacterias de la cepa que les dio origen. Cabe destacar que previamente se realizaron coloraciones de Gram de las cuatro nuevas cepas y fueron observadas

al microscopio, siendo de esta forma caracterizadas como bacilos Gram negativos libres de contaminantes.

El ensayo en plantas se llevó a cabo según se describió en Materiales y Métodos, utilizando 5 plantas por cepa y 4 para cada uno de los controles. Se emplearon las cepas lisogenizadas 19-2-3 y 19-1-4; B-19 se utilizó como control positivo en cuanto a nodulación.

De las plantas inoculadas, todas excepto una presentaban nódulos, mientras que ninguna de las no inoculadas había nodulado (tabla III.18). Los nódulos se presentaban con morfología variada y en número variable tanto en las plantas inoculadas con B-19 como en las inoculadas con las cepas lisogenizadas. Se observó el aspecto de las plantas, se determinó la longitud del tallo a partir de los cotiledones y el peso seco de la parte aérea como datos adicionales, que no mostraron correlación con el tamaño, la forma o el número de nódulos.

Se aislaron bacterias de los nódulos (ver Materiales y métodos), las cuales fueron denominadas: N-1 a N-12, correspondientes a plantas inoculadas con B-19; N-13 a N-20, provenientes de plantas inoculadas con 19-2-3, y N-21 a N-28, tomadas de plantas inoculadas con 19-1-4. Con estas bacterias se realizaron ensayos de interferencia por gotas sobre un cultivo confluyente en caja de Petri de B-19. Como control positivo de lisis se utilizó la cepa B-111-1a, que es la portadora

normal del fago FL 1. Esta suspensión originó una zona de lisis en el punto en que fue depositada. N-1 a N-12, como era de esperar, no produjeron halo de inhibición sobre B-19. N-13 a N-28, por el contrario, produjeron lisis en la zona donde se colocó la gota. Esto indicaba que estas bacterias mantenían su lisogenia respecto del fago FL 1 aún después de haber invadido las raíces de las leguminosas.

b.- Lisogenización de la cepa 39 con un bacteriofago liberado por DP-4

DP-4 libera espontáneamente bacteriofagos que realizan su ciclo lítico sobre bacterias de la cepa 39 de *Rhizobium*. Como los bacteriofagos liberados por DP-4 estudiados por De Antoni (145) no son capaces de formar placas de lisis sobre bacterias de la cepa 39, suponemos que se trata de un nuevo bacteriofago; no obstante, nos abstenemos de darle una denominación que lo identifique hasta que no estudiemos su relación con los mismos. Elegimos este sistema debido al tipo de placas de lisis formadas ("ojo de buey"), las cuales nos sugerían la posibilidad de la existencia de bacterias lisogenizadas.

Nuestra intención fue, como en el caso anteriormente descrito, introducir a este fago como profago en el genoma de bacterias de la cepa 39. Para ello sembramos el sobrenadante resultante de centrifugar una suspensión de la cepa DP-4 en fase logarítmica de crecimiento, sobre bacterias de la cepa 39, por el método de la doble

capa de agar. Se obtuvo al cabo de 48 horas de incubación a 28°C un número variable de placas de lisis, claras en los bordes y opacas en el centro. De esta parte central se aislaron bacterias con ansa recta, por estría en medio sólido (ELM sólido). Dos de ellas fueron crecidas en medio ELM líquido y luego sembradas en ELM sólido como para obtener colonias aisladas al cabo de 48 horas de incubación a 28°C. Cuando esas colonias fueron visibles se efectuaron las réplicas, sobre medio MNA sólido sin ningún agregado y sobre medio MNA sólido adicionado de 0,3 ml de un cultivo de bacterias de la cepa 39 sembrado por el método de la doble capa de agar. Se seleccionaron de esta forma 12 colonias productoras de halos de inhibición sobre el desarrollo confluyente de las bacterias de la cepa 39. Nueve de ellas confirmaron posteriormente su condición de lisar a las bacterias de la cepa 39 al ser probado su poder lítico depositando gotas de sus cultivos en medio líquido sobre el desarrollo confluyente de bacterias de la cepa 39 en cajas de Petri con medio MNA sólido. B-111-1a y DP-4 se comportaron de igual manera que estas 9 cepas, mientras que B-19 y 39 fueron incapaces de lisar a las bacterias indicadoras, constituyendo de esta manera los pares de controles positivo y negativo, respectivamente.

Luego, se realizó un ensayo de interferencia entre varias cepas de bacterias y fagos y 4 de las cepas lisogenizadas (tabla III.19) con el cual nos aseguramos que estas últimas no provenían de una contaminación con bacterias de la cepa DP-4 a lo largo de su aislamiento. Nótese su semejanza con 39 y su gran diferencia con DP-4 en cuanto a su susceptibilidad a los agentes antibacteria-

nos liberados por las cepas utilizadas. Además, de esta tabla se puede deducir que estas nuevas cepas deberían ser portadoras de por lo menos 2 fagos temperados (uno liberado por 39, lítico sobre DP-4 : Ø 39 ; otro liberado por DP-4 , lítico sobre 39: el que queríamos introducir). Esta deducción se basa en que estas cepas inhiben tanto el desarrollo de 39 como de DP-4, hecho que fue caracterizado como provocado por acción de bacteriofagos.

El hecho de provenir cada cultivo de una colonia aislada, descarta la posibilidad de que se haya producido una mezcla de ambas cepas en lugar de la lisogenización de una de ellas con el bacteriofago normalmente portado por la otra. Un hecho notable es que estas bacterias así modificadas no se mostraron inmunes a la acción de una suspensión de bacteriofagos liberados por un cultivo en medio líquido de bacterias de la cepa DP-4, circunstancia que nos hizo pensar en la presencia de más de un tipo de fagos en los lisados de esta última cepa. Confirmando esta suposición podemos agregar que cuando el lisado provenía de la resuspensión de una placa de lisis aislada sobre 39, se daba la situación inversa.

También en este caso se realizó un ensayo de nodulación con plantas de alfalfa (ver Materiales y Métodos). Se utilizaron 6 plantas para cada tratamiento y cada una de ellas se cultivó en un tubo distinto. Se emplearon como inoculantes las cepas DP-4, 39 (controles positivos de nodulación) y la resuspensión en solución Rh de una

lisis confluyente producida por la siembra conjunta del sobrenadante libre de bacterias de un cultivo de DP-4 y una suspensión de bacterias de la cepa 39 en fase logarítmica de crecimiento. Esta resuspensión fue denominada 39-lis, y suponíamos que debería contener una cierta proporción de bacterias de la cepa 39 lisogenizadas con el bacteriofago portado por DP-4 que normalmente realizaba su ciclo lítico sobre 39. Se incluyeron también 6 plantas sin inocular y sin el aporte de metabolitos nitrogenados en el medio de cultivo, y otras 6, también sin inocular, pero con el agregado de 0,06 g% de NO_3K al medio (controles negativos y positivos de efectividad en la fijación de nitrógeno respectivamente).

A los 10 días después de la siembra se comenzó a observar la aparición de nódulos, 35 días más tarde las plantas fueron cosechadas, observándose el número de nódulos presentes en cada una de ellas. Se tomaron fotografías para registrar su aspecto y tamaño (figura III.19), se determinó el peso seco de la parte aérea y se efectuó el reaislamiento de las bacterias presentes en los nódulos (ver Materiales y métodos). Se registró la presencia de nódulos en todas las plantas inoculadas, tanto con las cepas DP-4 y 39 como en las inoculadas con la resuspensión denominada 39-lis. Como era de esperar, las plantas no inoculadas, incluidas como controles de efectividad, no presentaban nódulos.

Los reaislamientos de bacterias a partir de nódulos demostraron que las plantas inoculadas con bacte-

rias de las cepas DP-4 y 39 fueron noduladas exclusivamente por las cepas nombradas en forma respectiva. Según ensayos de interferencia, en todas las plantas inoculadas con 39-lis excepto una, los nódulos habían sido originados por bacterias de la cepa 39 lisogenizadas con un bacteriofago liberado por DP-4.

En las fotografías (figura III.19) se pueden observar diferencias notables en el crecimiento de las plantas que recibieron distintos tratamientos, diferencias que también se pueden apreciar numéricamente en los correspondientes datos de peso seco de la tabla III.20. Sin embargo no efectuamos un tratamiento estadístico de los valores obtenidos por considerar pequeño el número de plantas utilizadas como para extraer conclusiones significativas. Por otra parte, la inclusión de un mayor número de plantas representaba un esfuerzo adicional no justificado dentro del ámbito de este trabajo.

T A B L A . . . I I I . 1

Características culturales de las bacterias aisladas en nuestro laboratorio

CEPA	PLANTA DE LA QUE SE AISLARON	CARACTERISTICAS DE LAS COLONIAS DESPUES DE 72 HORAS DE INCUBACION A 28°C EN ELM SOLIDO.	
		DIAMETRO	ASPECTO
Y-3	Medicago	0,5 - 1 mm	blancas rugosas
Z-3	Trifolium	2 - 5 mm	blancas gomosas

T A B L A III,4

Interferencia entre las distintas cepas de Rhizobium meliloti

Gotas	B-19	B-111-1a	B-172	B-251	B-310	R-491	R-492	R-493	R-494	U-10	U-45	U-239	DP-4	Y-3	L 5	15/-/16/	Rh 41	L 4	L 31	L 38	11	16 a	16 b	L 8	L 13	L 32	SARC/RH-10	SARC/RH-22	39										
Desarrollo Confluyente	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-									
B-19	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-									
B-111-1a	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-								
B-172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-							
B-251	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-						
B-310	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-					
R-491	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+			
R-492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
R-493	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
R-494	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
U-10	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-		
U-45	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
U-239	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
DP-4	+	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
Y-3	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los ensayos se realizaron según la técnica descrita en Materiales y Métodos. ++ : significa interferencia reiterada + : resultados contradictorios entre los cuales se cuentan por lo menos dos casos de interferencia y aquéllas combinaciones que habiéndose probado una sola vez dieron resultados positivos. +- : significa que sólo una vez se visualizó la interferencia, resultando negativas las otras pruebas. - : ausencia de interferencia.

T A B L A III.2

Ensayos de nodulación sobre leguminosas

CEPA	PLANTA UTILIZADA	Nº DE PLANTAS INOCULADAS	Nº DE PLANTAS NODULADAS	Nº DE NODULOS TOTALES
DP-4	Melilotus	3	3	7
DP-4	Medicago	8	8	46
B-111-1a	Medicago	3	3	16
B-19	Medicago	6	6	38
B-251	Medicago	4	4	31
Y-3	Medicago	9	7	7
Y-3	Melilotus	2	2	2
Y-3	Trifolium	8	-	-
Z-3	Medicago	9	-	-
Z-3	Melilotus	6	-	-
Z-3	Trifolium	9	9	86
R-491	Medicago	9	9	25
R-493	Medicago	9	9	42
39	Lupinus (')	9	-	-
39	Medicago	6	6	28

(') En este caso el cultivo se llevó a cabo en macetas (ver Materiales y métodos)

En ningún caso se observaron nódulos en los controles sin inocular.

T A B L A I I I . 3

Tiempo de duplicación de las bacterias crecidas en medio ELM líquido a 22°C

CEPA	ESPECIE	TIEMPO DE DUPLICACION	PENDIENTE DE LA RECTA OBTENIDA AL GRAFICAR ufc/ml EN FUNCION DE LA ABSORBANCIA A 500nm
B-251	Rh.meliloti	150 minutos	N.D.
B-310	Rh.meliloti	180 minutos	N.D.
U-45	Rh.meliloti	180 minutos	N.D.
B-111-1a	Rh.meliloti	160 minutos	$9,8 \times 10^8$
R-491	Rh.meliloti	180 minutos	N.D.
R-493	Rh.meliloti	180 minutos	N.D.
B-19	Rh.meliloti	180 minutos	$9,0 \times 10^8$
DP-4	Rh.meliloti	175 minutos	$8,5 \times 10^8$
Y-3	Rh.meliloti	180 minutos	N.D.
Z-3	Rh.trifolii	260 minutos	N.D.

T A B L A III.5

Interferencias producidas por rizobios de varios grupos de inoculación sobre 14 cepas de Rhizobium meliloti

	Gotas	Rhizobium trifolii	R. jap.	Rhizobium lupini	Rhizobium leguminosarum																		
Crecimiento Confluyente	A-22	A-40	A-118	A-127	SR-2	SR-6	U-28	Z-3	21	(-)	16-2	16-3	16-7	16-22	16-35	H-13-3	D-134	D-138	D-120	D-91	D-90	D-95	
B-19	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	+	-	-	-
B-1111-la	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-
B-172	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
B-251	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
B-310	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
R-491	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
R-492	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R-493	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
R-494	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U-10	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
U-45	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
U-239	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
DP-4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Y-3	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	-	NP

NP: Combinación no probada

Las experiencias fueron realizadas como se indica en Materiales y Métodos. El significado de los símbolos se indica al pie de la tabla III.4.

(+) Se probaron siete cepas de Rhizobium japonicum : E-4, E-10, E-38, E-45, E-90, D-216 y D-344.

T A B L A III.6

Interferencias producidas por 14 cepas de Rhizobium meliloti sobre rizobios de otros grupos de inoculación

Gotas		B-19	B-111-1a	B-172	B-251	B-310	R-491	R-492	R-493	R-494	U-10	U-45	U-239	DP-4	Y-3
Crecimiento Confluente	R. meliloti	-	-	+	-	-	-	-	-	++	++	-	-	+-	-
	A-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	A-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	A-118	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	A-127	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-
	SR-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	SR-6	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-
	U-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Z-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16-2	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	+-	++	-	-
	16-3	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E-38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
E-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
E-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
D-344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

El procedimiento experimental se describió en Materiales y Métodos. El significado de los símbolos, se indicó al pie de la tabla

III.4

Interferencias producidas por 14 cepas de Rhizobium meliloti sobre rhizobios de otros grupos de inoculación

Gotas		B-19	B-111-1a	B-172	B-251	B-310	R-491	R-492	R-493	R-494	U-10	U-45	U-239	DF-4	Y-3
Crecimiento Confluente	R. meliloti	-	-	+	-	-	-	-	-	++	++	-	-	+-	-
	A-22	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-
	A-40	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++	+	-	-	-
	A-118	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
A-127	-	-	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-	-	
SR-2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SR-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
U-28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+-	-	-	-	-	-
Z-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. lupini	16-2	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	+-	++	-	-	-
	16-3	-	-	+-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	16-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R. japonicum	E-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E-38	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E-45	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	E-90	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
D-344	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

El procedimiento experimental se describió en Materiales y Métodos. El significado de los símbolos, se indicó al pie de la tabla

T A B L A III.7

Resumen de los ensayos de interferencia

Desarrollo Confluente	Especie bacteriana Gota	Número de com- binaciones pro- badas	Número de interferencias registradas	Porcentaje de interferencias
R. meliloti	R. meliloti	392	106	31
R. meliloti	R. trifolii	126	59	47
R. trifolii	R. meliloti	112	10	9
R. meliloti	R. japonicum	98	0	0
R. japonicum	R. meliloti	70	1	1,4
R. meliloti	R. lupini	84	34	40
R. lupini	R. meliloti	42	4	9
R. meliloti	R. leguminosarum	83	26	31
Totales		1007	240	24

En estos ensayos se utilizaron 29 cepas de R. meliloti, 9 cepas de R. trifolii, 7 cepas de R. japonicum, 6 cepas de R. lupini y 6 cepas de R. leguminosarum. Los detalles de técnica se describen en materiales y métodos. Se tomaron como casos de interferencia aquellos de- signados como ++, +- y + en las tablas III.4, III.5 y III.6

T A B L A III.8

Bacteriofagos aislados a partir de bacterias lisogénicas

<u>Cepa portadora</u>	<u>Bacteriofago</u>	<u>Cepa indicadora</u>
B-111-1a	FL 1	B-19
B-19	FL 2	DP-4
DP-4	FL 3	B-251
DP-4 (')	FL 3G	B-251
B-251 (FL 3G)('')	FL 3G	B-251
R-491	FL 4 (PT)	R-493
R-491	FL 4 (PC)	R-493
R-491	FL 4 (ST)	R-493
16b	Ø 16b (''')	DP-4
11	Ø 11 (''')	DP-4
39	Ø 39 (''')	DP-4
L-38	Ø L-38 (''')	R-491

(') DP-4 tratada con Mitomicina-C (145)

('') B-251 lisogenizada con el bacteriofago FL 3G (145)

('''') Estos nombres están sujetos a una posterior comprobación de su diferencia o igualdad respecto de los fagos estudiados por Staniewski y colaboradores, denominados 16b, 11, 39 y L-38 (149).

T A B L A I I I . 9

Bacteriofagos líticos aislados de la rizosfera de plantas
de la familia Leguminosae

PLANTA	BACTERIOFAGO	BACTERIA INDICADORA
Alfalfa	F-1	Rhizobium meliloti DP-4
Trébol rojo	F-8	Rhizobium trifolii Z-3

T A B L A III.10

Infección en medio líquido

Bacteria indicadora	Bacteriofago	Medio de cultivo	Multiplicidad de infección	Bacterias sobrevivientes (20 minutos de incubación) %	Bacterias sobrevivientes espe- rables (1) %	Porcentaje de fagos li- bres respec- to de los fa- gos totales (20 minutos)	Título final alcanzado (48 hs)	Relación entre Títulos final e inicial
B-19	FL 1	ELM	10	100	0,004	100	$6,6 \times 10^7$	1,8
B-19	FL 1	MNA	7	100	13,5	100	$7,2 \times 10^8$	1
DP-4	F-1	MNA	0,5	25	60	50	$1,6 \times 10^9$	50
DP-4	F-1	Bergersen + K ⁺	0,3	23	60	40	$2,1 \times 10^{10}$	22

(1) Este valor se calcula en base a la fórmula $S = B \cdot e^{-m}$, donde S es la fracción de sobrevivientes esperable, B, la concentración inicial de bacterias, e, la base de los logaritmos naturales y m, la multiplicidad de infección (176)

T A B L A III.11

Crecimiento de bacteriófagos sobre membranas de celofán

<u>Bacteriofago</u>	<u>m.d.i</u>	<u>Título inicial</u> (ufp/ml)	<u>Título final</u> (ufp/ml)
FL 4 (PT)	0,0005	$5,0 \times 10^5$	$5,2 \times 10^{10}$
FL 4 (PT)	0,001	$8,8 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{10}$
FL 4 (PC)	0,1	$1,0 \times 10^8$	$1,1 \times 10^{11}$
FL 4 (PC)	0,04	$3,5 \times 10^7$	$1,3 \times 10^{11}$
FL 4 (PC)	0,05	$3,3 \times 10^7$	$1,0 \times 10^{11}$
FL 4 (PC)	0,002	$2,0 \times 10^6$	$1,5 \times 10^{11}$
FL 1	0,1	$1,0 \times 10^8$	$1,0 \times 10^{10}$
FL 1	0,1	$1,0 \times 10^8$	$3,8 \times 10^{10}$
FL 1	0,05	$1,0 \times 10^7$	$1,1 \times 10^{11}$
FL 1	0,002	$1,7 \times 10^6$	$2,0 \times 10^{10}$
Ø 11	0,0004	$3,8 \times 10^5$	$1,4 \times 10^9$
Ø 11	0,0005	$5,3 \times 10^5$	$1,0 \times 10^{11}$
Ø 16-b	0,0002	$2,0 \times 10^5$	$3,2 \times 10^9$
Ø 39	0,001	$1,1 \times 10^6$	$4,8 \times 10^9$

T A B L A III.12

Inducción de las cepas R-491 y B-1111-la por acción de Mitomicina-C y choque térmico

Cepa	Agente inductor	Tiempo en que se tomó la muestra final	Control inicial (a)	Control final (b)	Factor de incremento b/a = x	inicial (c)	Inducido final (d)	Factor de incremento d/c = y	Factor de incremento sobre el control y/x
B-1111-la	Mitomicina-C 2 µg/ml	24 hs.	$2,9 \times 10^4$	$9,0 \times 10^5$	31	$1,5 \times 10^5$	$3,1 \times 10^8$	2060	66
B-1111-la	Mitomicina-C 2 µg/ml	24 hs.	$1,1 \times 10^4$	$2,9 \times 10^5$	26	$5,8 \times 10^4$	$6,6 \times 10^7$	1137	43
R-491	Mitomicina-C 2 µg/ml	24 hs.	$1,8 \times 10^4$	$4,0 \times 10^4$	2,2	$1,8 \times 10^4$	$3,6 \times 10^6$	200	90
R-491	Mitomicina-C 5 µg/ml	10 hs.	$1,4 \times 10^4$	$2,6 \times 10^4$	1,8	$1,4 \times 10^4$	$3,4 \times 10^6$	242	130
B-1111-la	Choque térmico 45°C - 30 min.	8 hs.35 min.	$8,6 \times 10^5$	$8,2 \times 10^5$	0,9	$1,5 \times 10^5$	$1,2 \times 10^7$	80	88

Los experimentos se llevaron a cabo según se detalló en Materiales y Métodos, utilizando en todos los casos medio Bergersen + K⁺ excepto en la inducción de R-491 con 5 µg/ml de Mitomicina-C, en que se empleó el medio MG-2-OH.

T A B L A III.13

Inducción de B-1111-la y R-491 por irradiación con luz ultravioleta

Cepa	tiempo de incubación	Porcentaje de bacterias sobrevivientes	Concentración inicial de bacterias (ufc/ml)	Concentración de bacterias final (control)	Concentración de bacterias final (inducido)	Factor de incremento sobre el control (b/a)
B-1111-la	5 hs.	5,0	$6,0 \times 10^8$	$2,6 \times 10^5$	$5,1 \times 10^7$	119.
B-1111-la	4 hs.	5,7	$7,1 \times 10^8$	$1,7 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$	169.
B-1111-la	24 hs.	7,4	$1,0 \times 10^9$	$1,5 \times 10^5$	$5,6 \times 10^6$	37
B-1111-la	6 hs.	10,9	$1,1 \times 10^8$	$6,6 \times 10^4$	$1,1 \times 10^7$	110
B-1111-la	6 hs.	12,0	$1,8 \times 10^8$	$8,0 \times 10^5$	$2,4 \times 10^8$	160
B-1111-la	6 hs.	13,0	$3,6 \times 10^8$	$2,3 \times 10^4$	$1,3 \times 10^7$	183
R-491	5 hs.	1,9	$4,0 \times 10^7$	$1,0 \times 10^2$	$9,2 \times 10^4$	200
R-491	8 hs.	4,7	$2,1 \times 10^7$	$2,0 \times 10^3$	$1,2 \times 10^6$	86

Medio de cultivo empleado : M-G-2-H. Tiempo de irradiación: 10 segundos para B-1111-la y 30 segundos para R-491. Distancia de la fuente: 40 cm para B-1111-la, 90 cm para R-491.

T A B L A III.14

Morfología de las placas de lisis originadas por los bacteriofagos aislados sobre sus bacterias huéspedes

FAGO	BACTERIA INDICADORA	DIAMETRO DE LAS PLACAS (mm)	CARACTERISTICAS DE LAS PLACAS	
			Transparencia	Borde
FL 1	B-19	0,5-1,0	turbias	difuso
FL 1	DP-4	indeterminado	muy turbias	muy difuso
FL 4 (PC)	R-493	1,0-2,0	claras	neto
FL 4 (PT)	R-493	- 1,0-2,0	turbias	neto
FL 4 (ST)	R-493	0,5-1,0	muy turbias	difuso
F-1	DP-4	2,0	(')	neto
F-8	Z-3	3,0	claras	neto
Ø 16-b	DP-4	2,0	ojo de buey ('')	neto
Ø 39	DP-4	2,0	ojo de buey	neto
Ø 11	DP-4	2,0	ojo de buey	neto
Ø L-38	R-491	2,0	muy turbias	difuso

(') placas algo turbias con un pequeño punto en el centro, resultante de la perforación de la capa correspondiente al desarrollo bacteriano.

('') placas claras con centro turbio.

T A B L A III.15

Espectro de infectividad de los bacteriofagos aislados sobre distintos huéspedes

FAGOS	BACTERIAS										R. legu- gumino- sarum (*)	
	B-19	U-45	R-491	DP-4	R-493	B-251	Y-3	Rh 41	R. tri- folii (*)	R. lupini		R. japo- nicum (*)
F-1	-	$2,6 \times 10^2$	$4,6 \times 10^2$	$7,7 \times 10^5$	-	$1,4 \times 10^2$	$3,1 \times 10^3$	(-)	-	(-)	(-)	(-)
FL 1	$3,0 \times 10^7$	(-)	$8,0 \times 10^2$	(x)	$1,4 \times 10^5$	(-)	-	-	-	(-)	(-)	(-)
FL 4 (PT)	-	$5,8 \times 10^4$	-	$5,0 \times 10^6$	$7,4 \times 10^9$	$3,0 \times 10^4$	/-/	/-/	/-/	(-)	(-)	(-)
FL 4 (PC)	-	$1,4 \times 10^5$	-	$6,5 \times 10^3$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^5$	/-/	/-/	/-/	(-)	(-)	(-)
FL 4 (ST)	-	-	-	-	$9,4 \times 10^8$	-	-	-	-	-	-	-
Ø 11	-	-	-	$1,9 \times 10^6$	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ø 39	-	-	-	$7,5 \times 10^6$	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
Ø 16-b	-	-	-	$1,0 \times 10^6$	-	-	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

(*) Para estas especies se emplearon las siguientes cepas: A-130, A-22, A-40, A-127, R 611 y Z-3 de *Rhizobium trifolii*, E-4, E-38, E-45, y D-344 de *Rhizobium japonicum*; D-138, D-120, D-90 y D-91 de *Rhizobium leguminosarum*; H-13-3, 16-7 y 16-35 de *Rhizobium lupini*.

(x) placas muy turbidas (incontable). (-) inferior a 2×10^2 ufp/ml; /-/ inferior a 4×10^3 ufp/ml; - inferior a 10 ufp/ml

T A B L A III.16

Estabilidad de los bacteriofagos en soluciones
concentradas de ClCs

Bacteriofagos Solución en la que permanecieron
durante 24 horas (Título) (ufp/ml)

	Rh	ClCs Dilución final: 54% de saturación
FL 1	$1,6 \times 10^9$	$1,5 \times 10^9$
FL 4 (PC)	$8,0 \times 10^6$	$8,0 \times 10^6$
FL 4 (PT)	$3,8 \times 10^6$	$3,8 \times 10^6$

La suspensión original de bacteriofagos se diluyó 1/10 en dos tubos, uno conteniendo solución Rh y el otro conteniendo solución de ClCs (60% de saturación). Se incubaron ambos tubos durante 24 horas a 42C, luego se diluyeron sus contenidos en solución Rh de forma tal de poder ser titulados por el método de la doble capa de agar.

Identificación del material genético de los bacteriofagos FL 1 y FL 4 (PC)

Especimen	Concentración	Color después del tratamiento con PO ₄ HNa ₂	Nº de gotas colocadas sobre el portaobjetos	Sin tratamiento enzimático (1)	Tratamiento con RNasa	Tratamiento con DNasa	Naturaleza del material genético
DNA B. subtilis	1,6 mg/ml	VERDE	6	VERDE	VERDE	-	DNA bitémico
DNA SPOL	0,6mg/ml	VERDE	3				DNA bitémico
RNA B. subtilis	3,0 mg/ml	ROJO	12	ROJO	-	ROJO	RNA monotémico
Acido poliadenínico	5,0 mg/ml	ROJO	4	ROJO	ROJO	ROJO	polinucleótido de simple cadena
FL 1	1,5x10 ¹¹ ufp/ml	ROJO	15	ROJO	ROJO	-	DNA monotémico
FL 4 (PC)	1,0x10 ¹¹ ufp/ml	VERDE	12	VERDE	VERDE	-	DNA bitémico

(1) En esta columna se incluyen los resultados obtenidos con las muestras incubadas en las soluciones apropiadas para la acción de la DNasa y RNasa pero desprovistas de las enzimas.

T A B L A III, 18

Ensayo de nodulación sobre plantas de alfalfa de las cepas lisogenizadas de B-19

Bacteria inoculada	B-19					B-19 - 2 - 3					B-19 - 1 - 4				
Nº de planta	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
Color y aspecto de las plantas	s	vf	vg	vg	vg	vf	vf	vf	vg	vg	s	s	vf	vf	vg
Peso seco (mg)	2,5	6,5	9,0	14,5	17,5	8,5	11,0	10,0	12,0	18,0	1,5	4,5	6,0	6,5	23,0
Nº de nódulos	5	9	13	5	2	5	2	8	16	2	-	2	9	21	2
Bacterias aisladas	N ₁ N ₂ N ₅	N ₆ N ₈	N ₉ N ₁₀	N ₁₁ N ₁₂	N ₁₃ N ₁₄ N ₁₅	N ₁₆ N ₁₇	N ₁₈ N ₁₉	N ₂₀	N ₂₁ N ₂₂ N ₂₄	N ₂₅ N ₂₆	N ₂₇ N ₂₈				
Nº de planta	Controles con nitrato de potasio					Controles sin nitrato de potasio					Controles sin nitrato de potasio				
Color y aspecto de las plantas	1 2 3 4					1 2 3 4					1 2 3 4				
Peso seco (mg)	vg 27,5 38,5 46,5 26,5					s 6,5 6,5 6,5					s 3,5 6,0				

Referencias : s : amarilla y seca - vg : verde, con la parte aérea abultada - vf : verde, con la parte aérea poco desarrollada.

T A B L A III.19

Ensayos de interferencia efectuados con las bacterias de la cepa 39 lisogenizadas con un bacteriofago normalmente portado por DP-4

GOTAS	a ₁	a ₅	e ₂	e ₄	39	DP-4	B-111-1a	B-19	Ø 11	Ø 39	Ø 16b
Bacteria indicadora											
a ₁	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
a ₅	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
e ₂	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
e ₄	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
39	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-
DP-4	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+

+ significa interferencia; - significa ausencia de interferencia

En este experimento se incluyeron pruebas de sensibilidad a los bacteriofagos Ø 11, Ø 39, Ø 16b, las que por haberse realizado "por gotas" se informaron en esta tabla como + y - .

a₁, a₅, e₂ y e₄ son las bacterias lisogenizadas.

T A B L A III.20

Ensayo de nodulación de 39-lis sobre plantas de alfalfa

Datos estadísticos

	Controles con NO ₃ K	Controles sin NO ₃ K	Cepa 39	Cepa DP-4	39-lis
x ₁	25,0	3,5	17,0	10,5	13,0
x ₂	18,5	2,5	18,0	2,0	3,5
x ₃	19,0	1,0	18,0	13,5	11,7
x ₄	20,0	2,5	16,5	14,5	7,0
x ₅	17,0	2,0	17,5	2,5	10,5
x ₆	23,5	2,5	12,0	10,0	
<hr/>					
x ₁ ²	625,0	12,25	289,0	110,25	169,0
x ₂ ²	342,25	6,25	324,0	4,0	12,25
x ₃ ²	361,0	1,0	324,0	182,25	136,9
x ₄ ²	400,0	6,25	272,25	210,25	49,0
x ₅ ²	289,0	4,0	306,25	6,25	110,25
x ₆ ²	552,25	6,25	144,0	100,0	
<hr/>					
n _i	6	6	6	6	5
T _i	123	14	99	53	145,7
\bar{x}	20,5	2,3	16,5	8,8	9,1
S _i	2569,5	36,0	1659,5	613,0	477,4
T _i ² /n _i	2521,5	32,6	1633,5	468,2	417,7
S _i -(T _i ² /n _i)	48,0	3,3	26,0	144,8	59,7

n: 29 ; T: 334,7 ; S: 5355,4 ; $\sum T_i^2/n_i$: 5073,5 ; T²/n: 3862,9

Suma total de cuadrados : S - T²/n : 1492,5 (1)

Suma residual de cuadrados: S - $\sum T_i^2/n_i$: 281,9 (2)

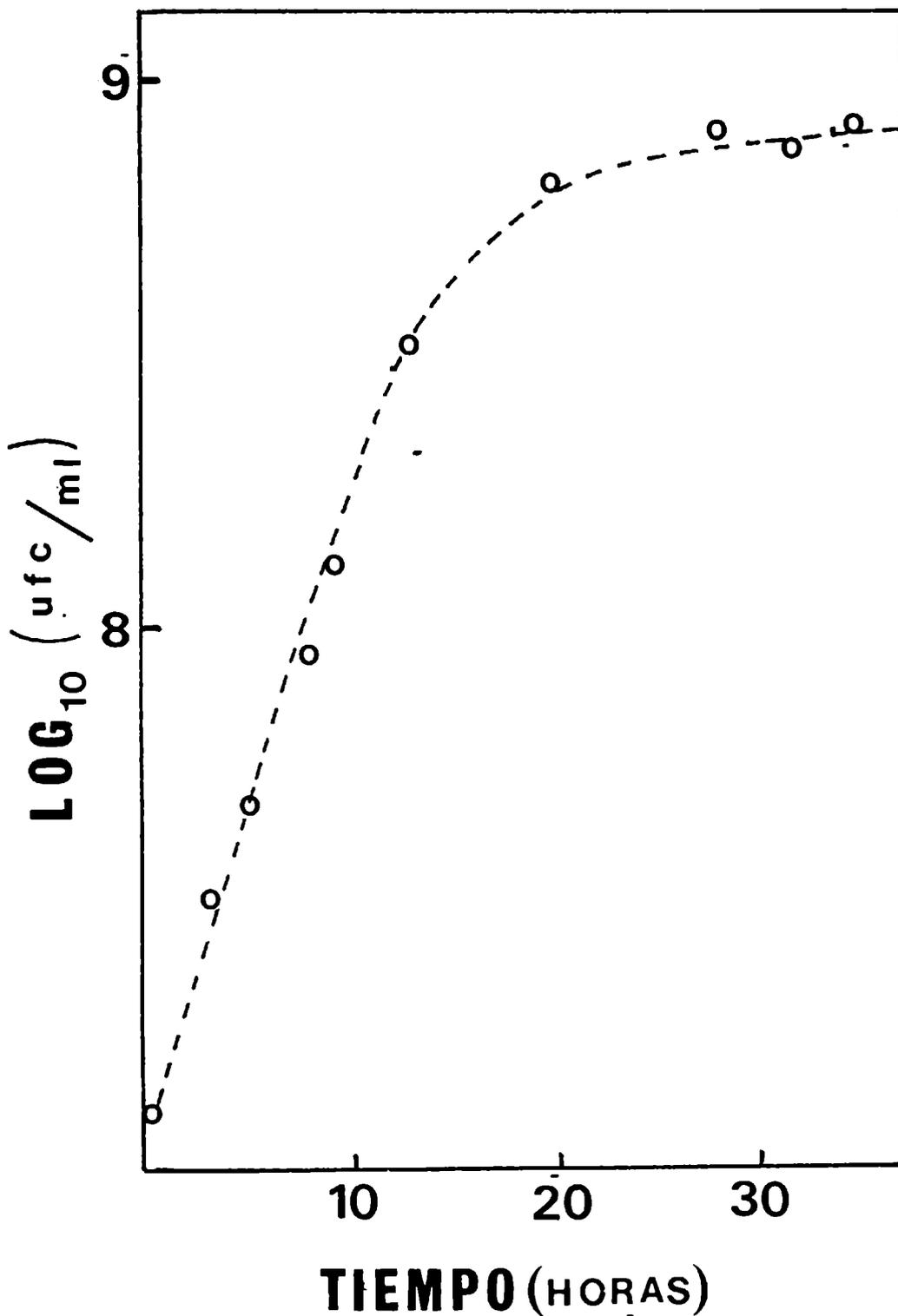
Suma de cuadrados que mide diferencias entre niveles : (1)-(2):1210,6

Los x_i son datos del peso seco de la parte aérea de las plantas expresado en miligramos. T_i : $\sum x_i$. S_i: $\sum x_i^2$

F I G U R A III.1

Curva de crecimiento para Rhizobium meliloti (cepa B-19)

(1)

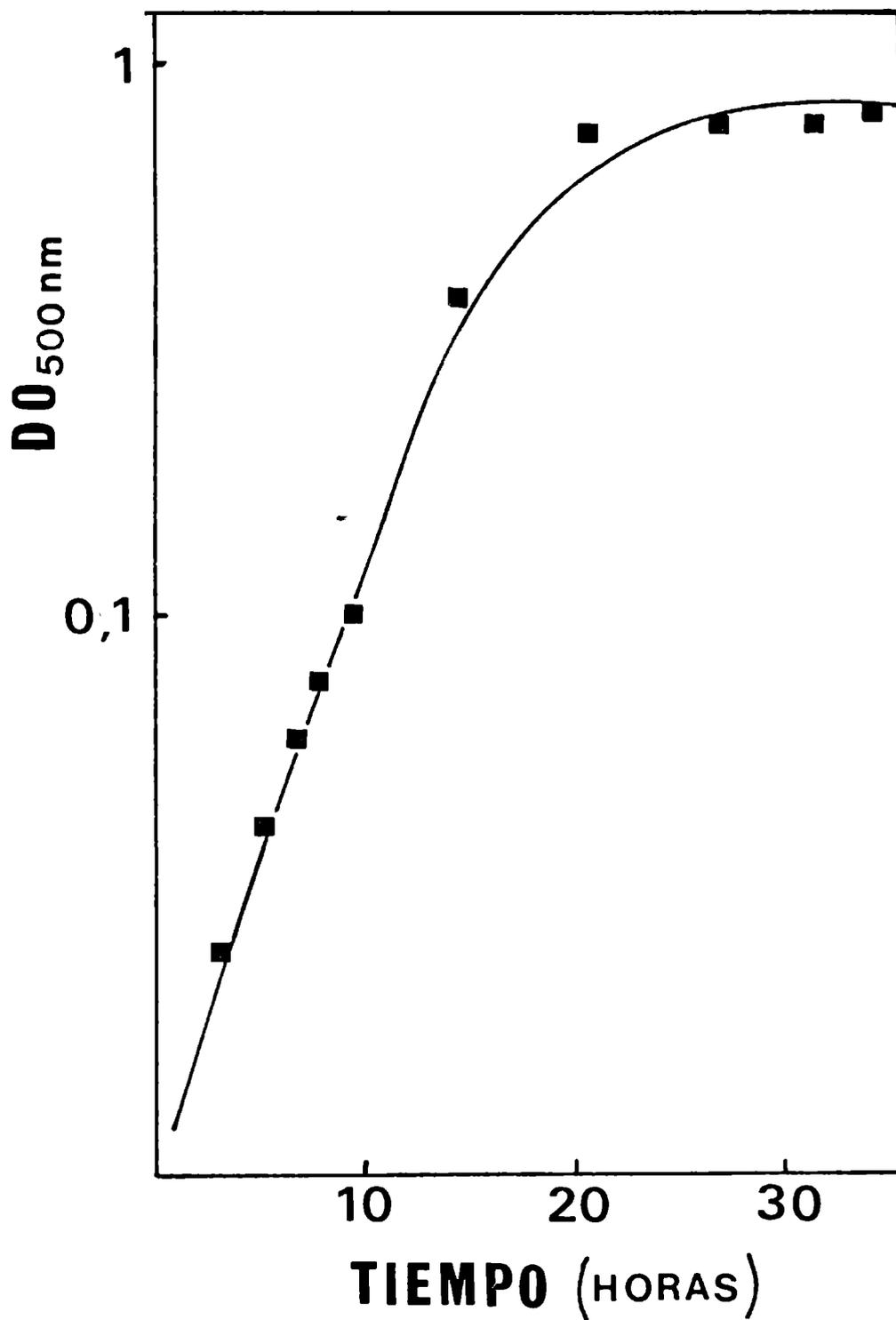


Esta curva de crecimiento se realizó a partir de un cultivo de bacterias de la cepa B-19 de Rhizobium meliloti en medio ELM líquido y a 28°C por medida de la concentración de unidades formadoras de colonias a distintos tiempos de incubación.

F I G U R A III.2

Curva de crecimiento para Rhizobium meliloti (cepa B-19)

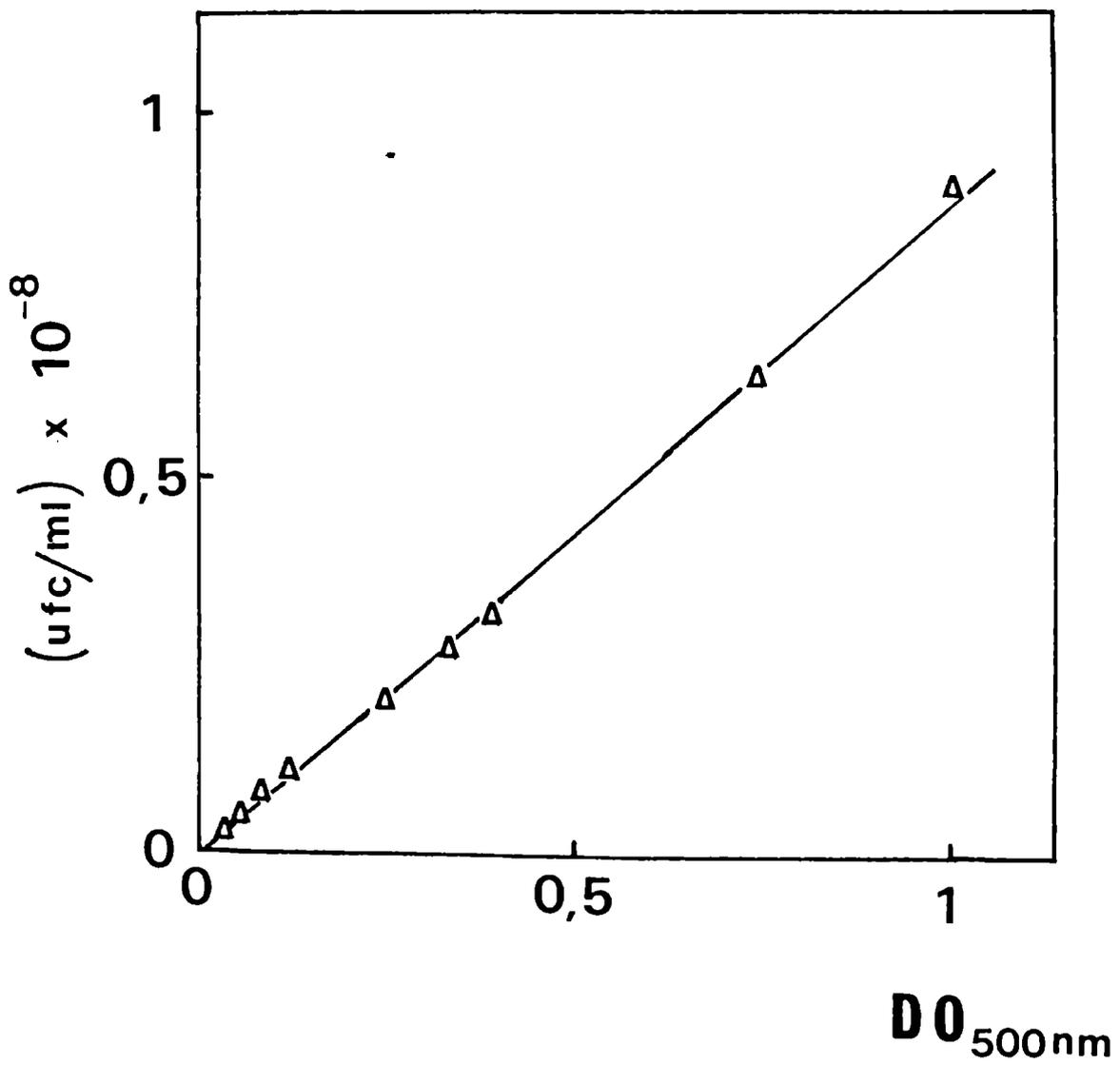
(2)



Esta curva de crecimiento se realizó a partir de un cultivo de bacterias de la cepa B-19 de Rhizobium meliloti en medio ELM líquido y a 28°C por medida de la absorbancia a 500nm (DO_{500nm}) a distintos tiempos de incubación.

FIGURA III.3

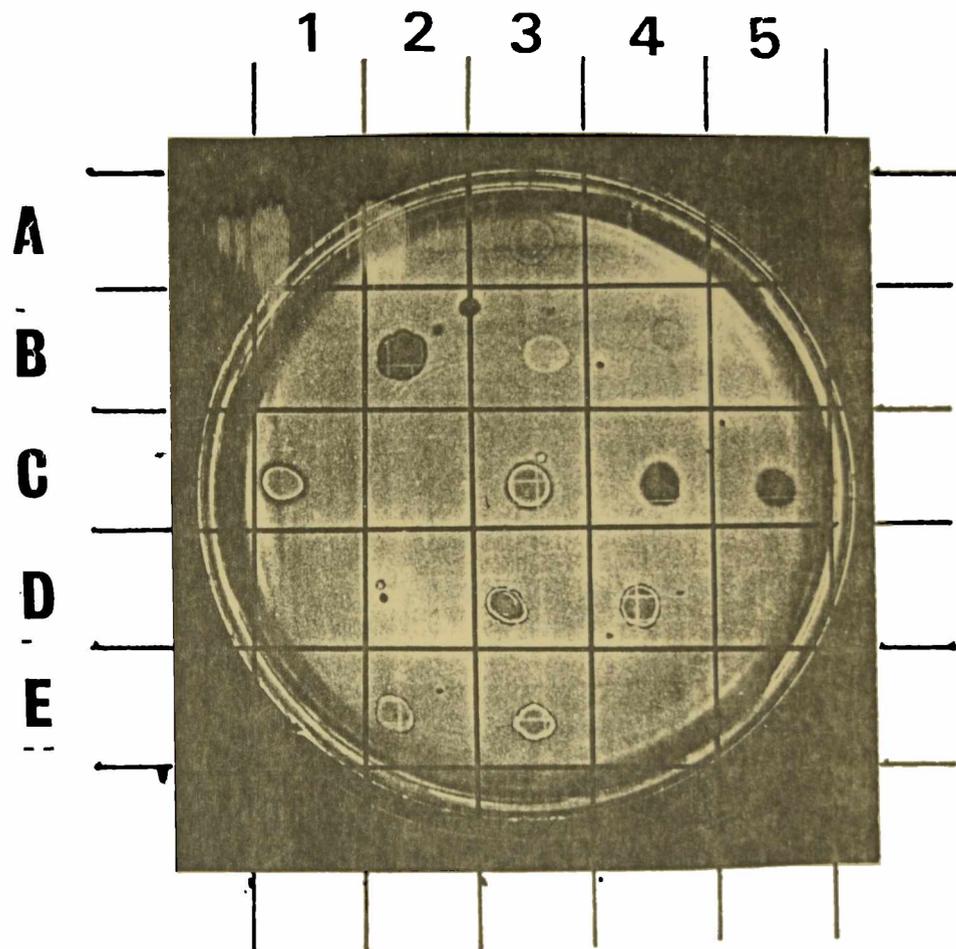
Relación entre los valores de ufc/ml y absorbancia a 500nm para un cultivo de Rhizobium meliloti



Este gráfico se confeccionó con los valores de ufc/ml y DO_{500nm} extraídos de los experimentos representados en las figuras III.1 y III.2.

FIGURA III.4

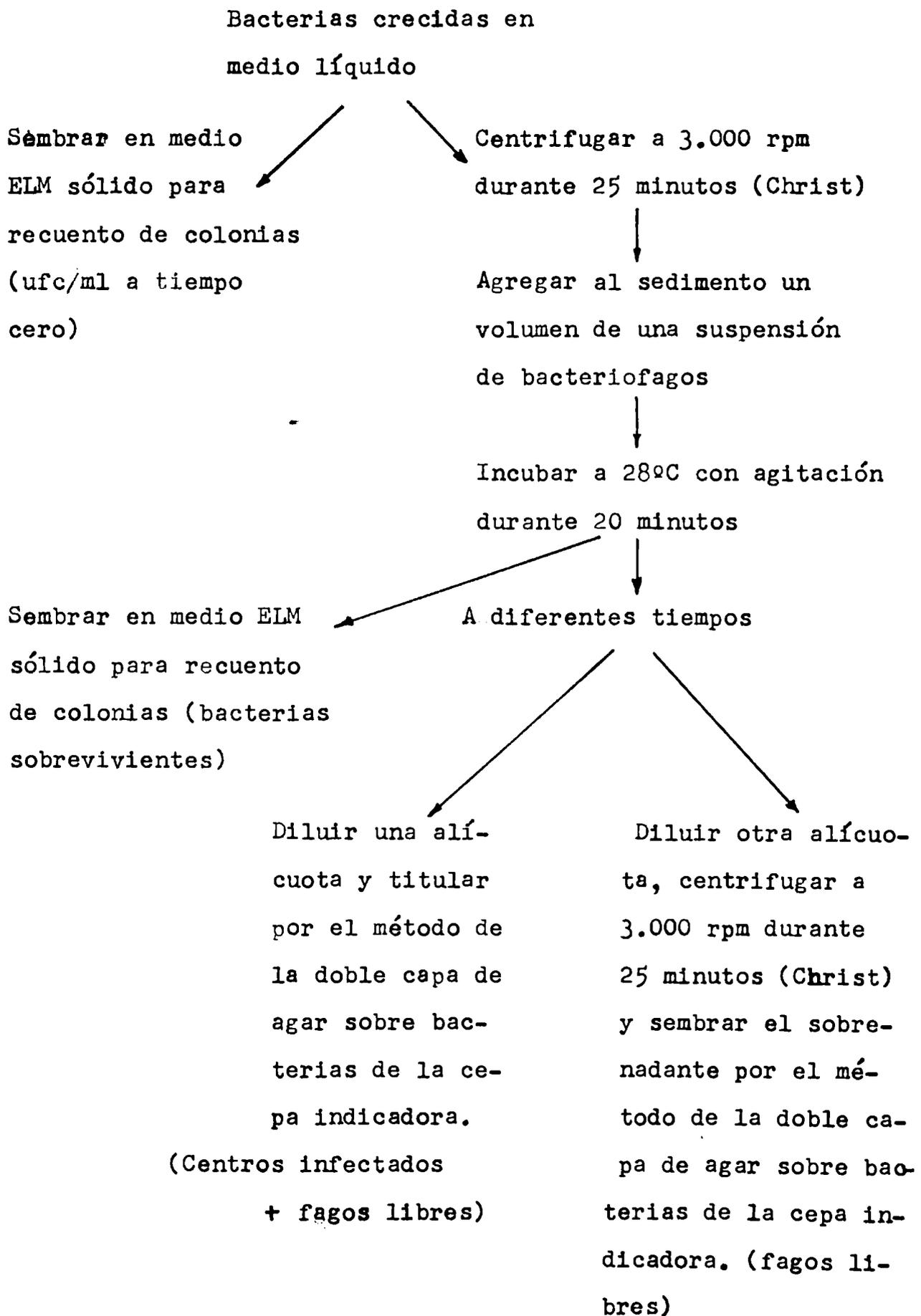
Visualización de los antagonismos entre bacterias



Posición de la gota	Características del agente bactericida	Concentración de bacterias en la gota
A ₃ y B ₄	poco potente	moderadamente elevada
B ₂ , C ₄ y C ₅	fagos de gran actividad lítica	baja
D ₃ , D ₄ , E ₂ y E ₃	fagos de gran actividad lítica	Moderadamente elevada
B ₃ , C ₂ y D ₂	-	B ₃ : moderadamente elevada. C ₂ y D ₂ : baja.
C ₁ y C ₃	potente; difusible	elevada

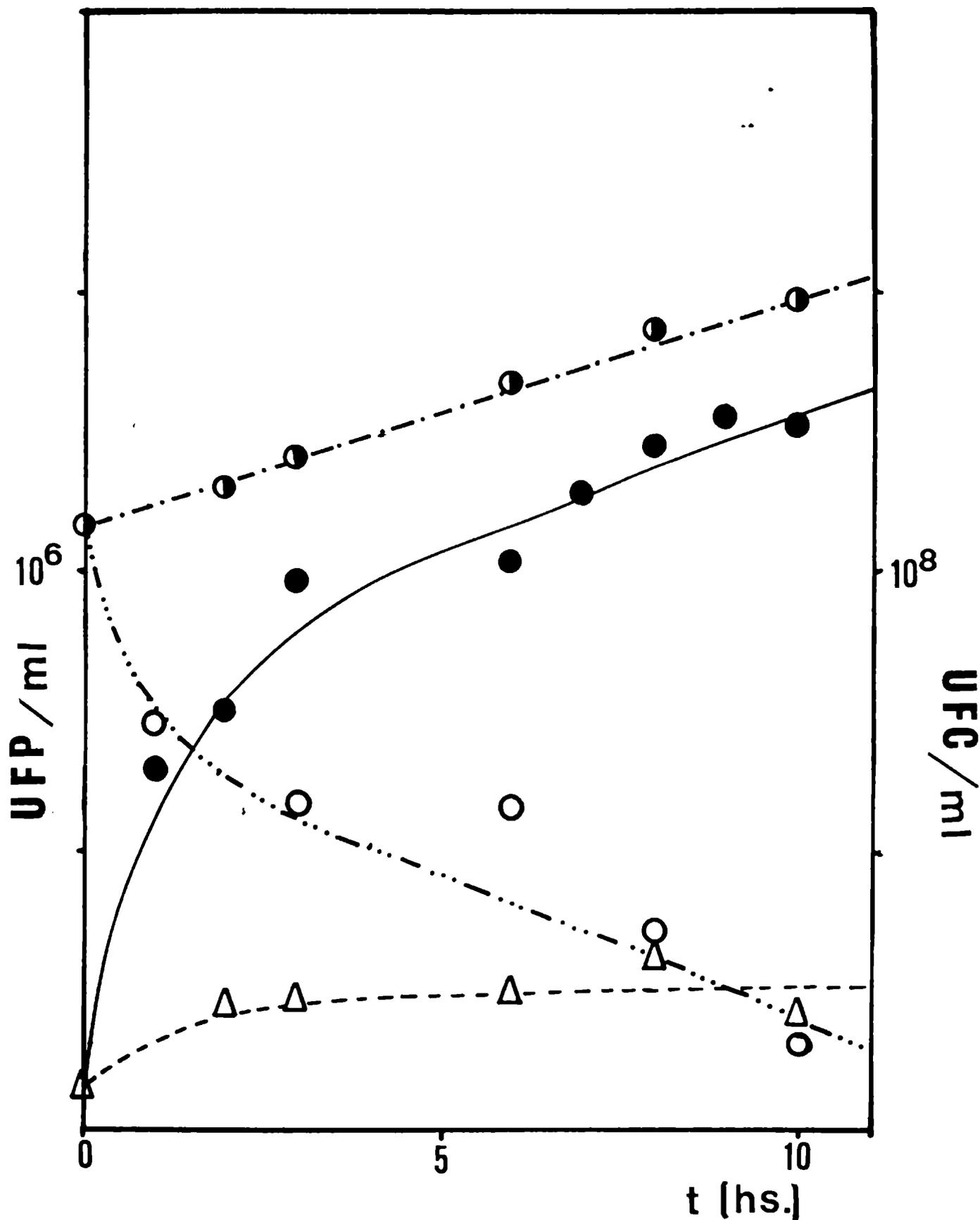
F I G U R A III.5

Verificación de la adsorción de los bacteriofagos en un experimento de infección en medio líquido



F I G U R A III.6

Inducción de R-491 por acción de Mitomicina-C



Cultivo inducido

● ufp/ml

○ ufc/ml

Cultivo control

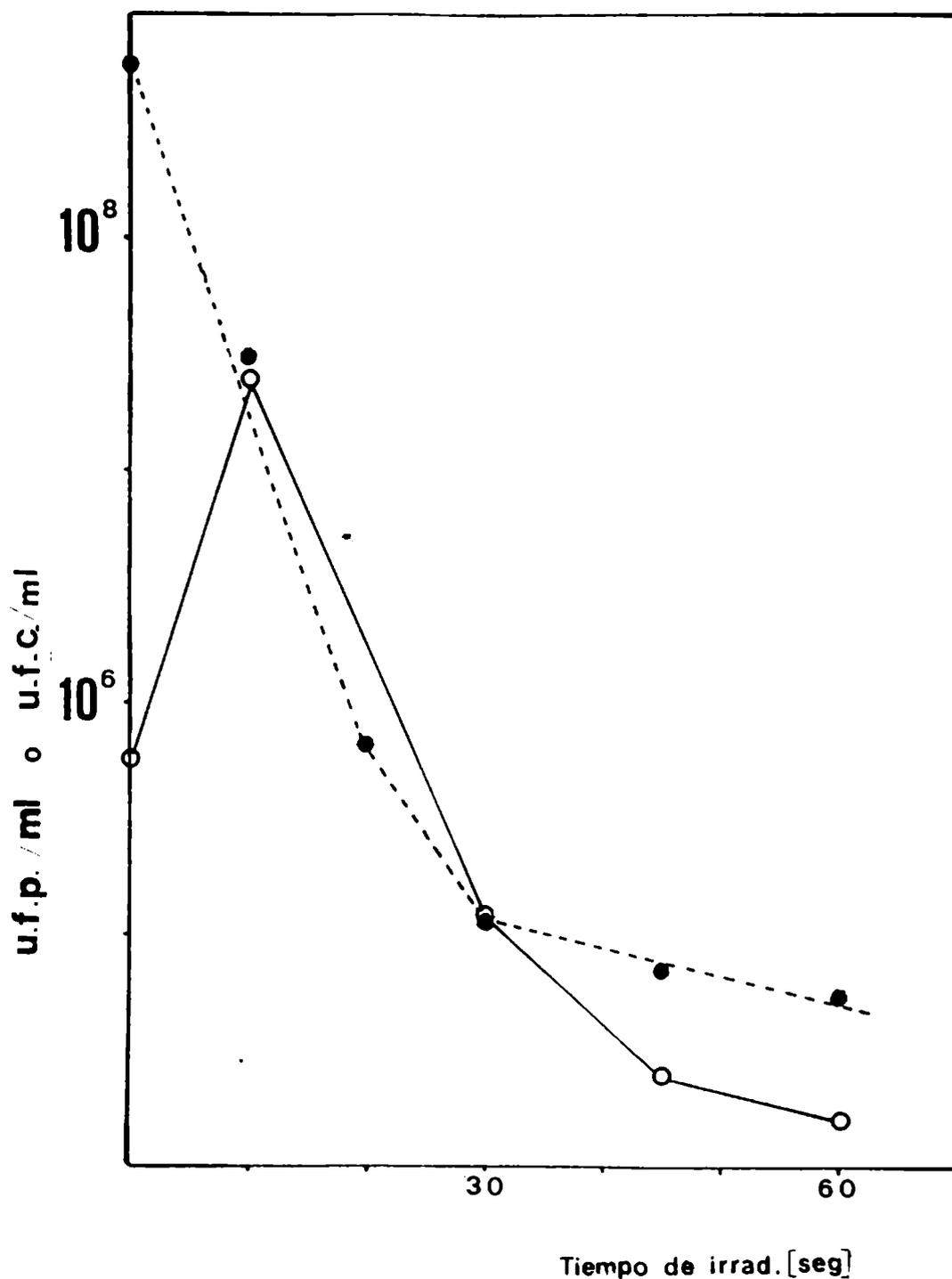
△ ufp/ml

● ufc/ml

Concentración del agente inductor: 5 microgramos/ml

F I G U R A III.7

Inducción de B-111-la por irradiación con luz ultravioleta
utilizando diferentes tiempos de exposición

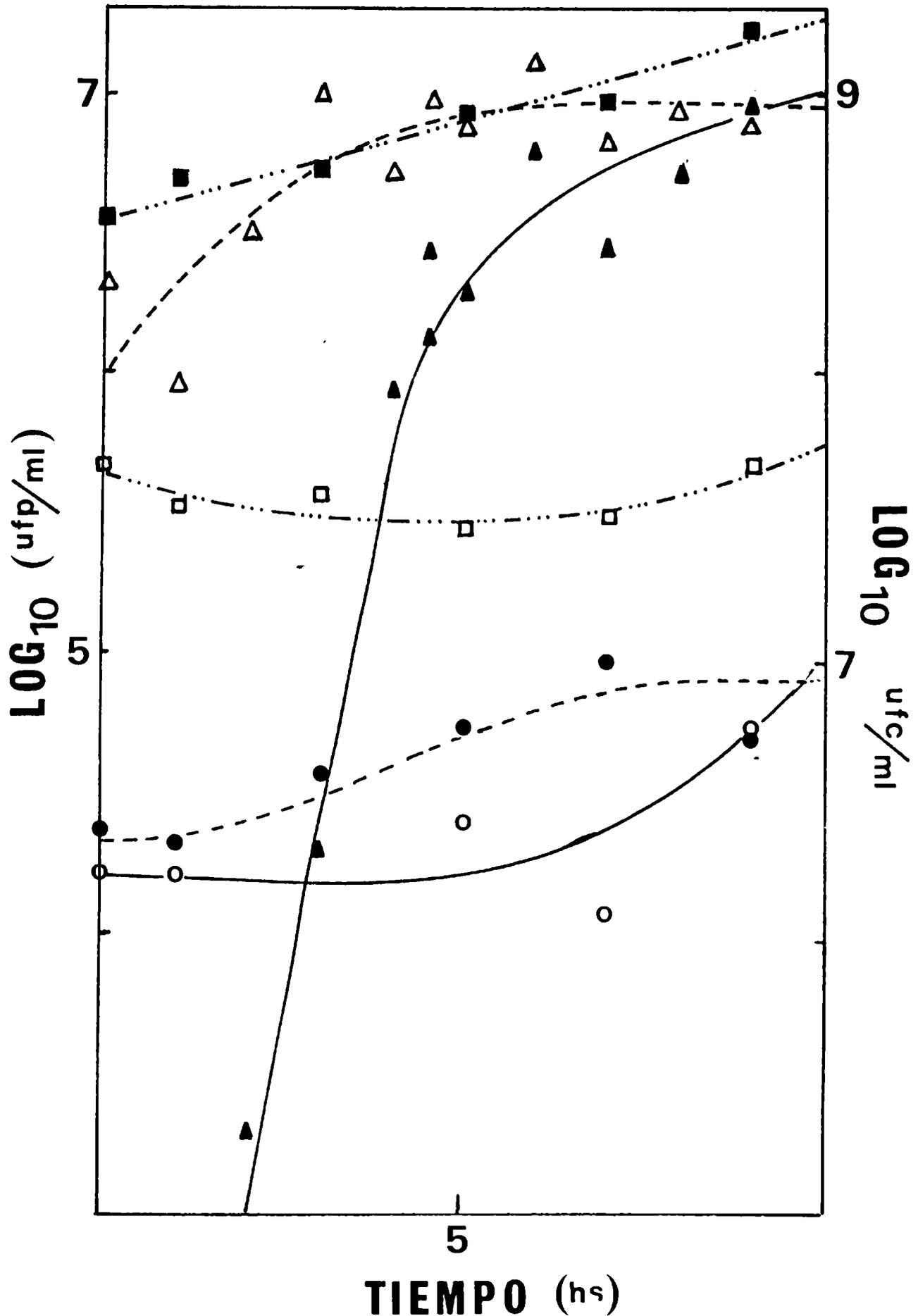


○ ufp/ml

● ufc/ml

FIGURA III.8

Inducción de B-111-la por irradiación con luz ultravioleta

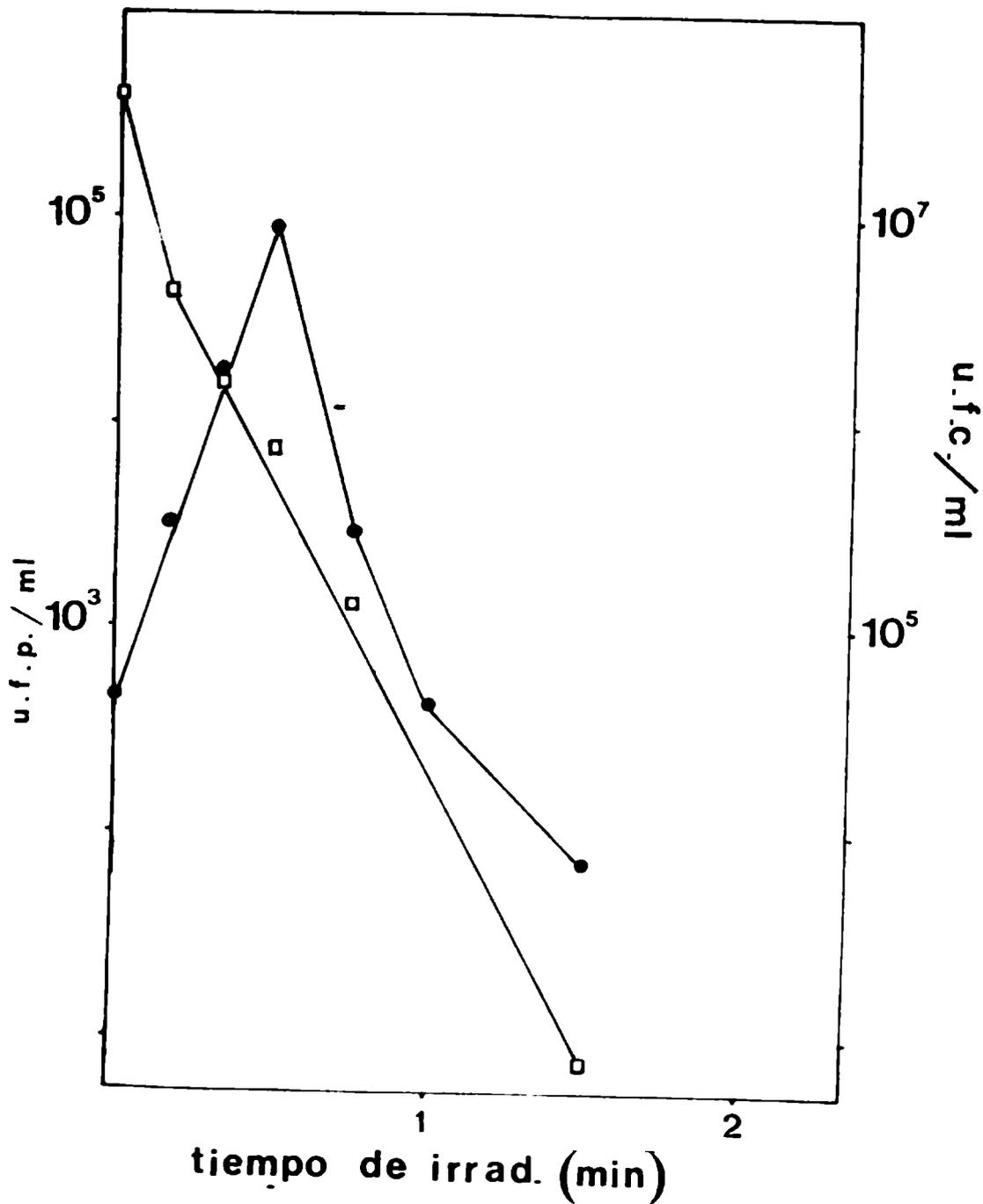


La irradiación se llevó a cabo durante 10seg en las condiciones ya mencionadas en el texto.

<u>Cultivo inducido</u>	<u>Cultivo control</u>
□ ufc/ml	ufc/ml ■
△ centros inducidos + fagos libres	○
▲ fagos libres + fagos intracelulares	●

F I G U R A III.9

Inducción de "R-491" por irradiación con luz ultravioleta utilizando diferentes tiempos de exposición.



● ufp/ml

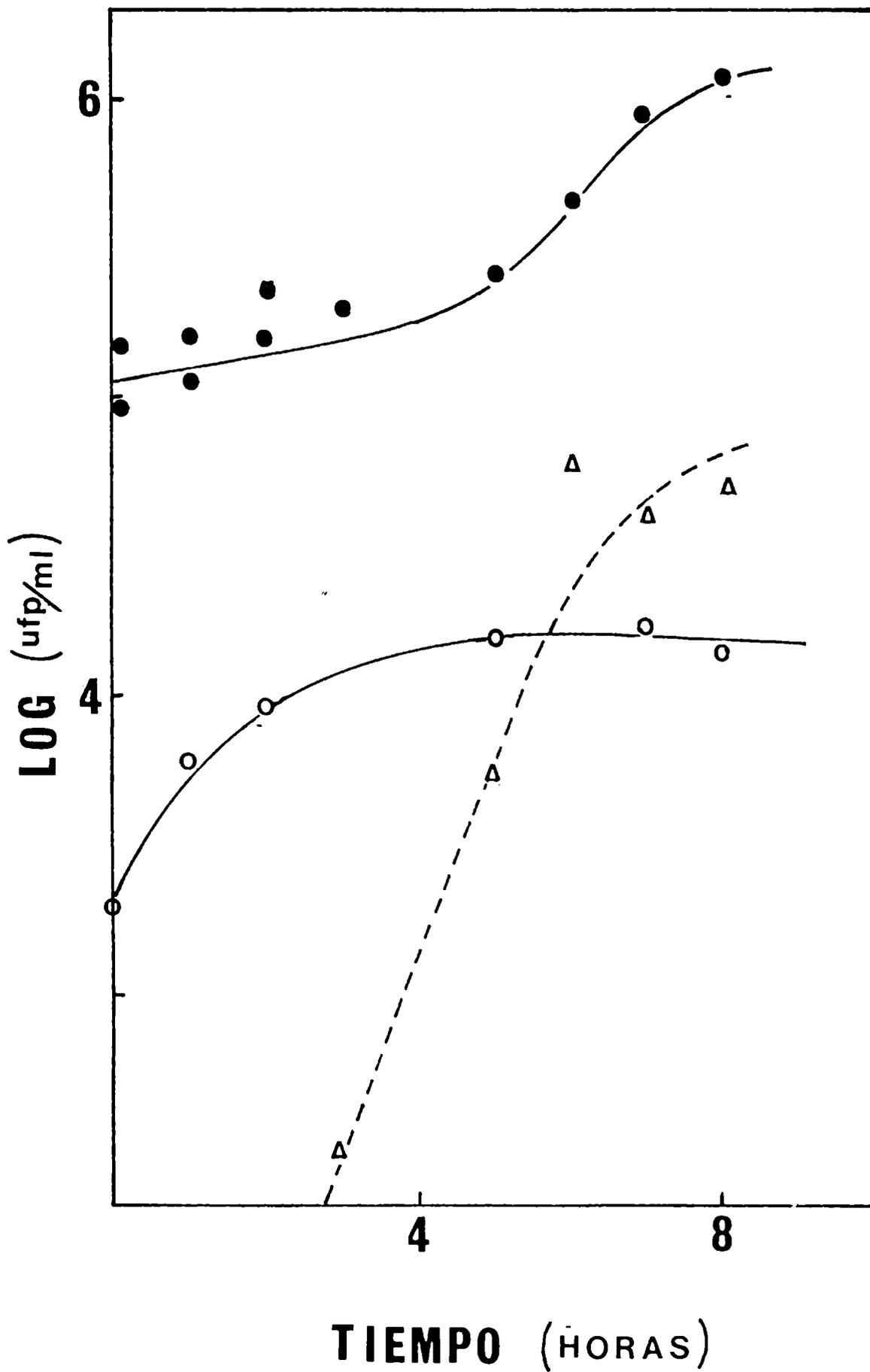
□ ufc/ml

Distancia de la fuente (tubo germicida Philips de 30w):
90 cm.

Los puntos del gráfico indican la concentración de ufp y ufc presentes en el medio luego de una incubación de 5 horas a 28°C con agitación.

FIGURA III.10

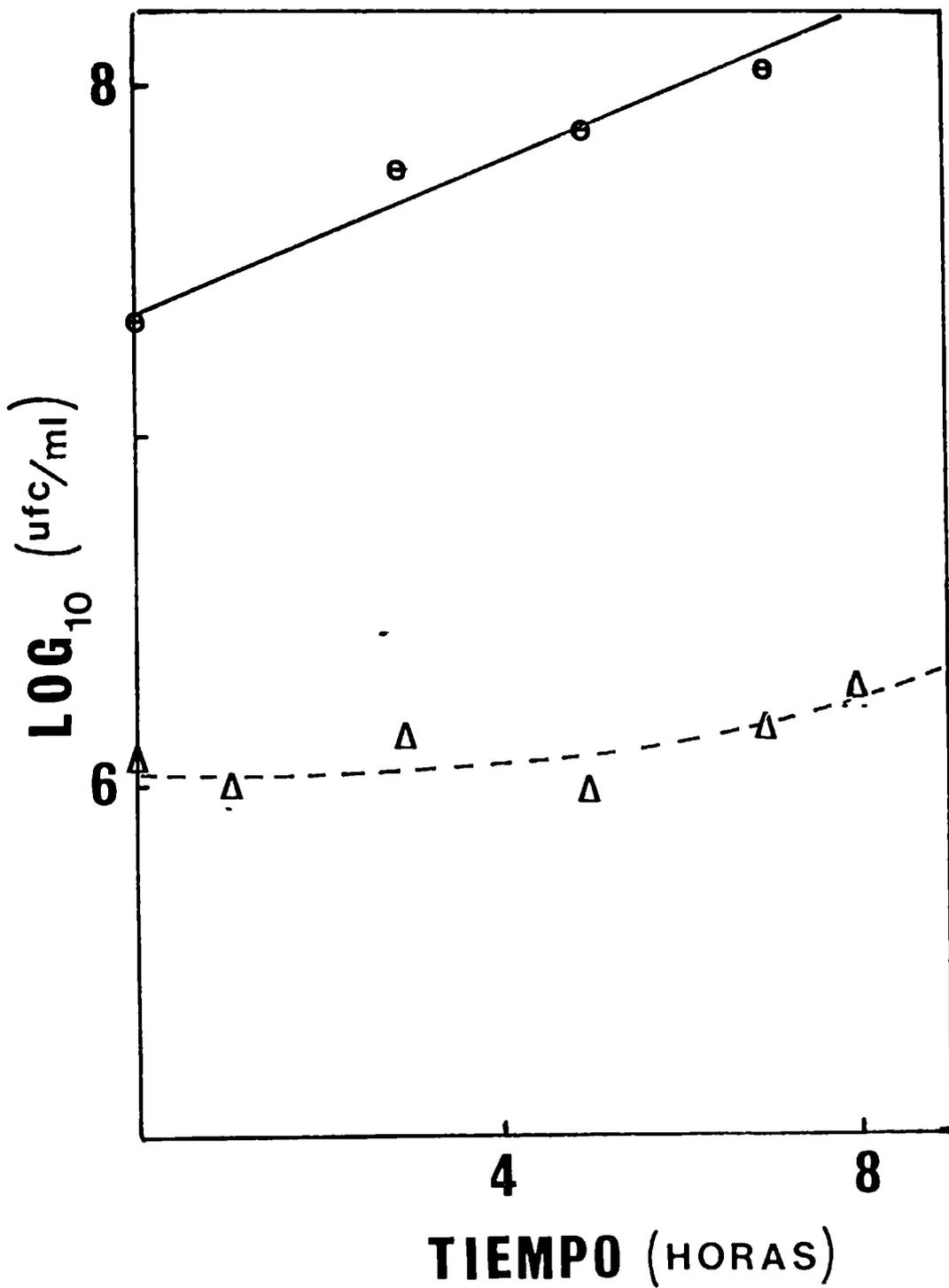
Inducción de R-491 por irradiación con luz ultravioleta



- Δ Cultivo inducido: fagos intracelulares + fagos libres
- Cultivo inducido: fagos libres + centros inducidos
- Cultivo control: fagos libres + centros inducidos

FIGURA III.11

Efecto ejercido por la irradiación ultravioleta sobre un cultivo de B-491 en un experimento de inducción



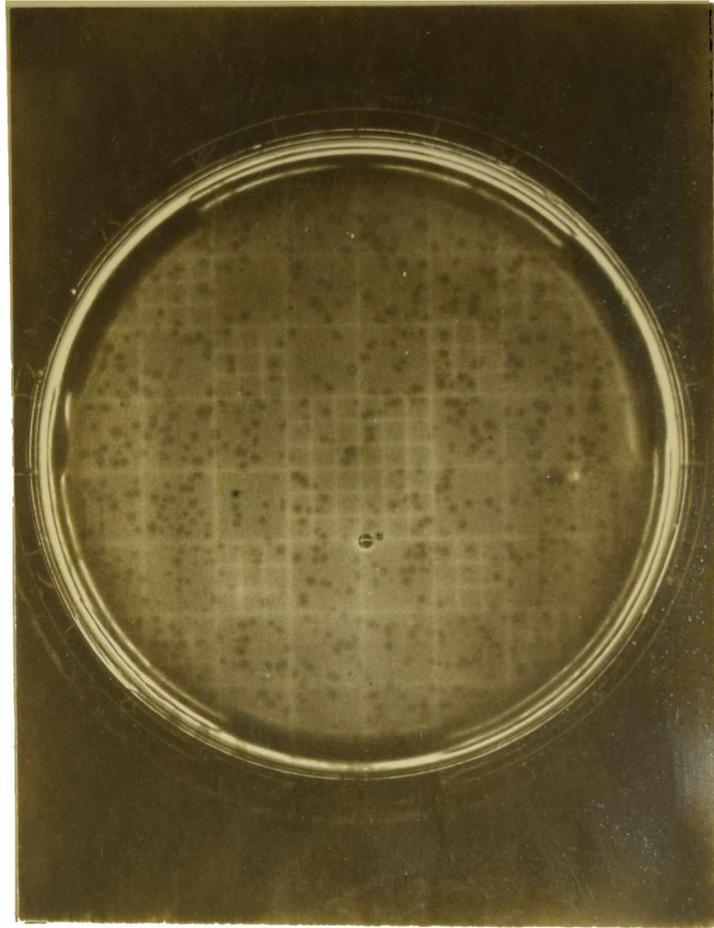
En este gráfico se representan los valores de log (ufc/ml) obtenidos en el mismo experimento de inducción graficado en la figura III.10.

Δ ufc/ml (cultivo inducido)

● ufc/ml (cultivo control)

F I G U R A I I I . 1 2

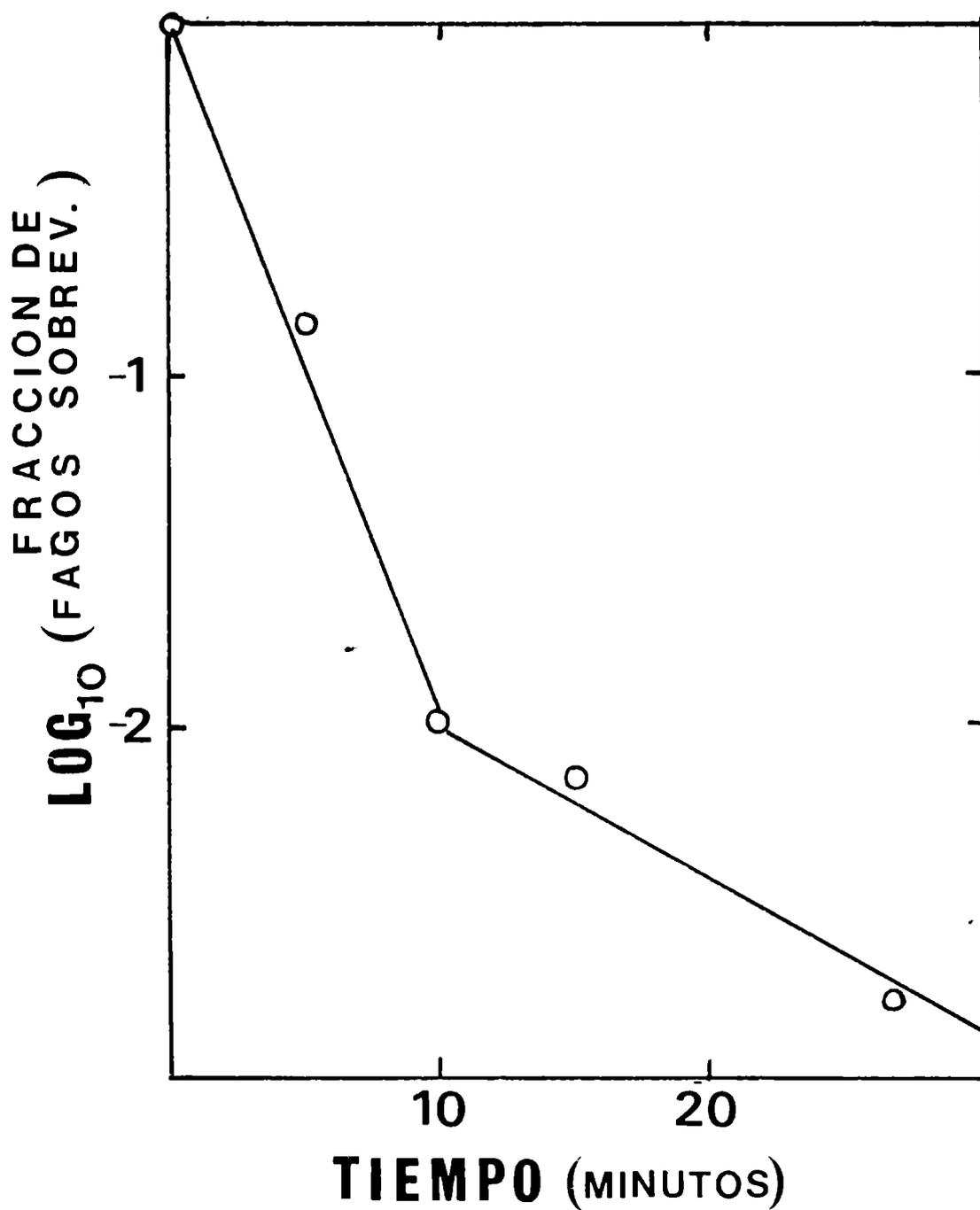
Morfología de las placas de lisis producidas por el fago
FL 1 sobre bacterias de la cepa B-19



Esta placa fue sembrada por el método de la doble capa de agar. Nótese la turbidez de las placas de lisis propia de bacteriofagos con escasa actividad lítica, en este caso disminuída por la lisogenización de las bacterias de la cepa indicadora.

F I G U R A III.13

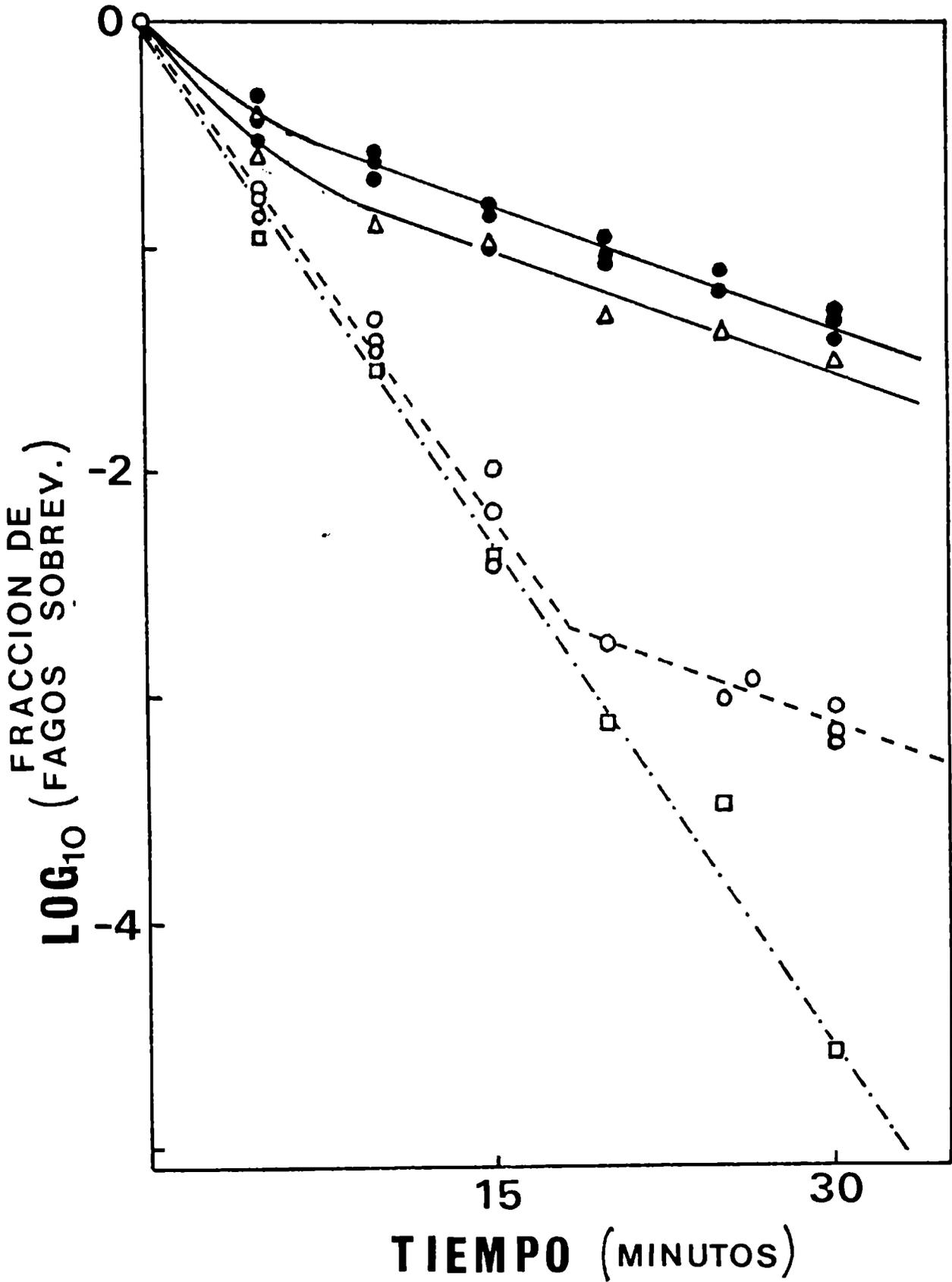
Inactivación térmica de los bacteriofagos liberados por
R-491



Temperatura de incubación: 66°C

FIGURA III.14

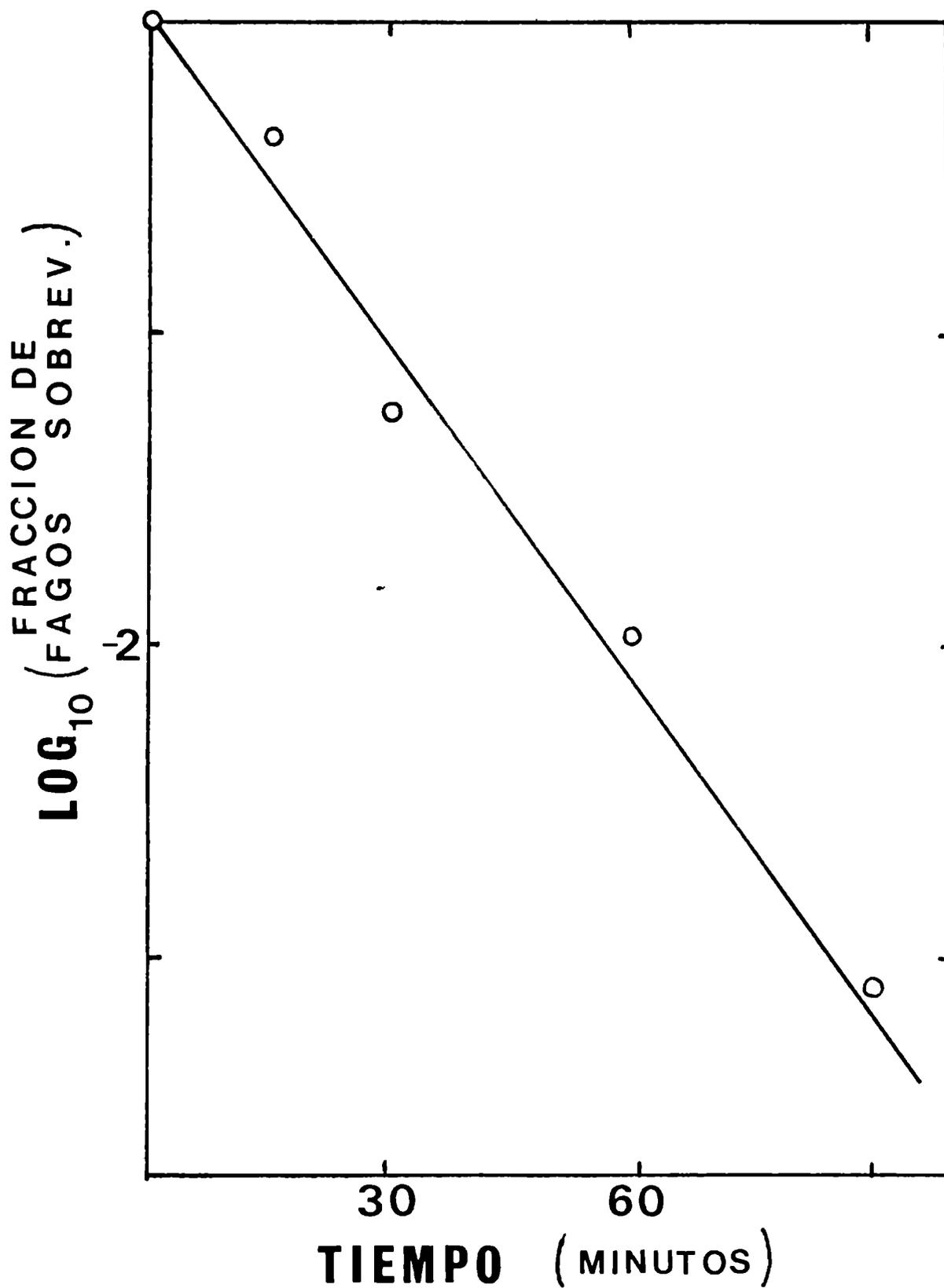
Inactivación térmica de los bacteriofagos FL 4 (PC),
FL 4 (PT) y FL 4 (ST)



- FL 4 (PC)
- Δ FL 4 (PT)
- FL 4 (ST)
- bacteriofagos liberados por R-491 obtenidos por lisis en medio sólido de R-493 con el sobrenadante de un cultivo centrifugado de R-491.

FIGURA III.15

Inactivación térmica del bacteriofago FL 1



Temperatura de incubación: 66°C

FIGURA III.16

Inactivación de los bacteriofagos liberados por R-491 por irradiación con luz ultravioleta.

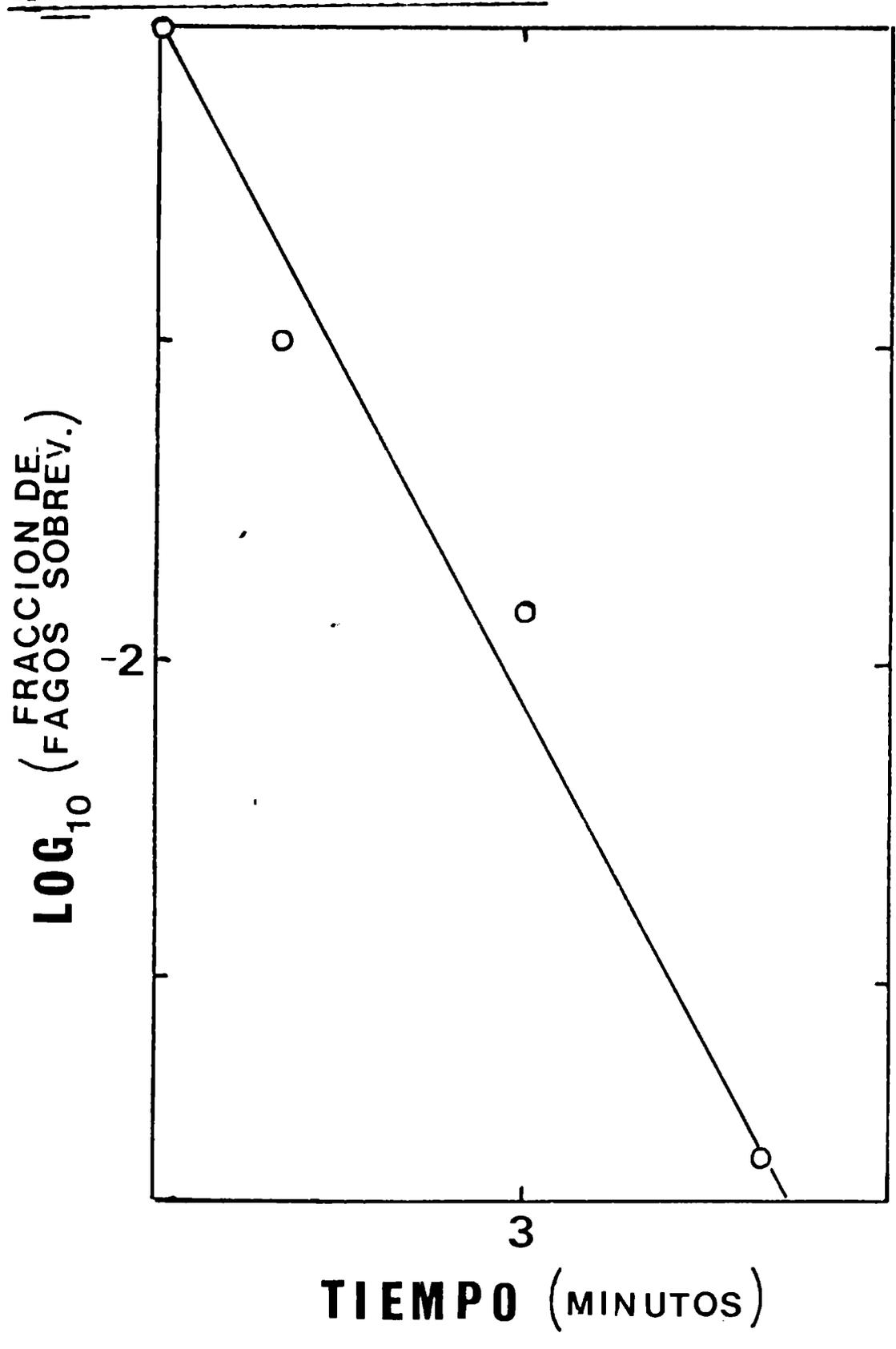


FIGURA III.17

Inactivación del bacteriofago FL 1 por irradiación con luz ultravioleta

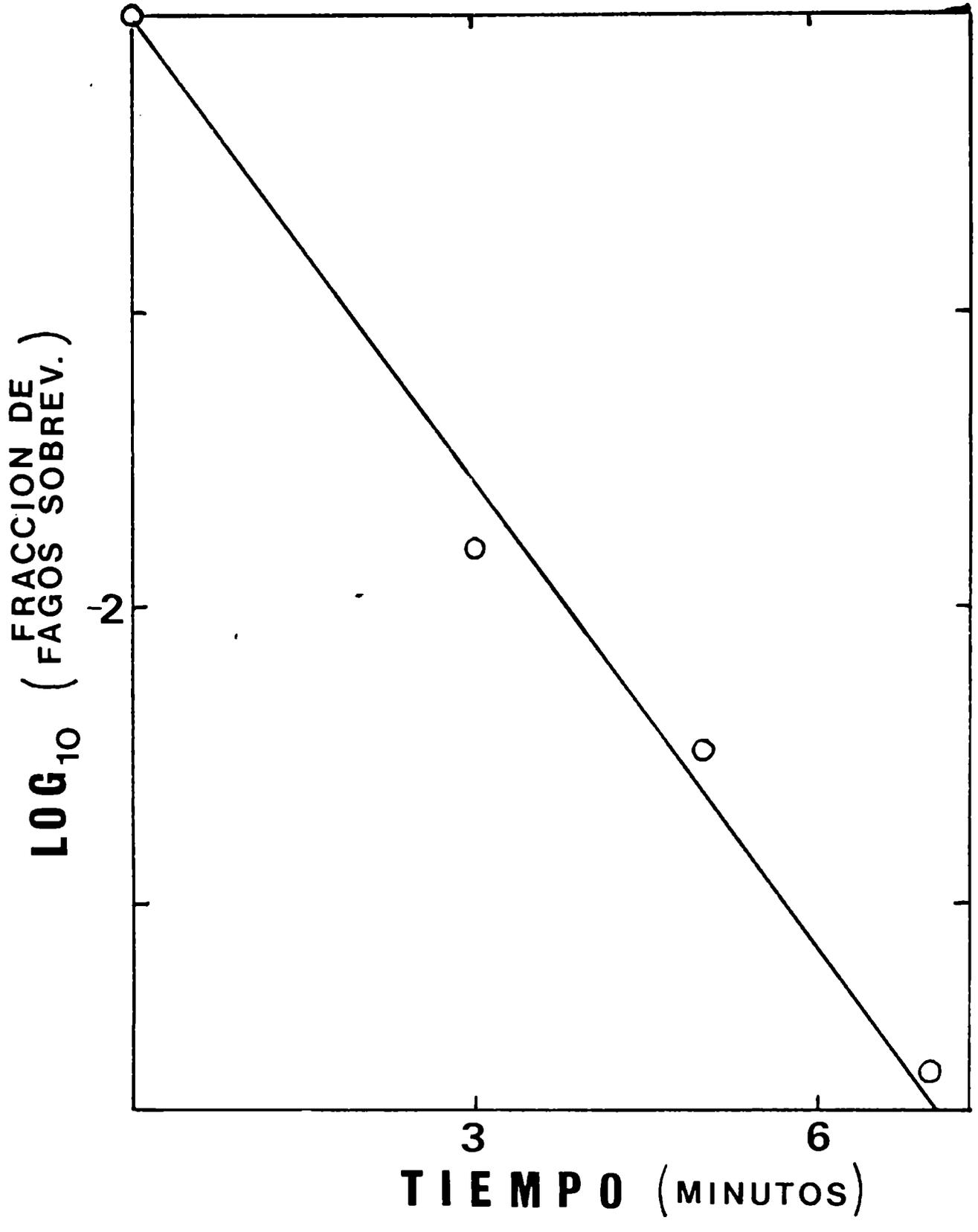
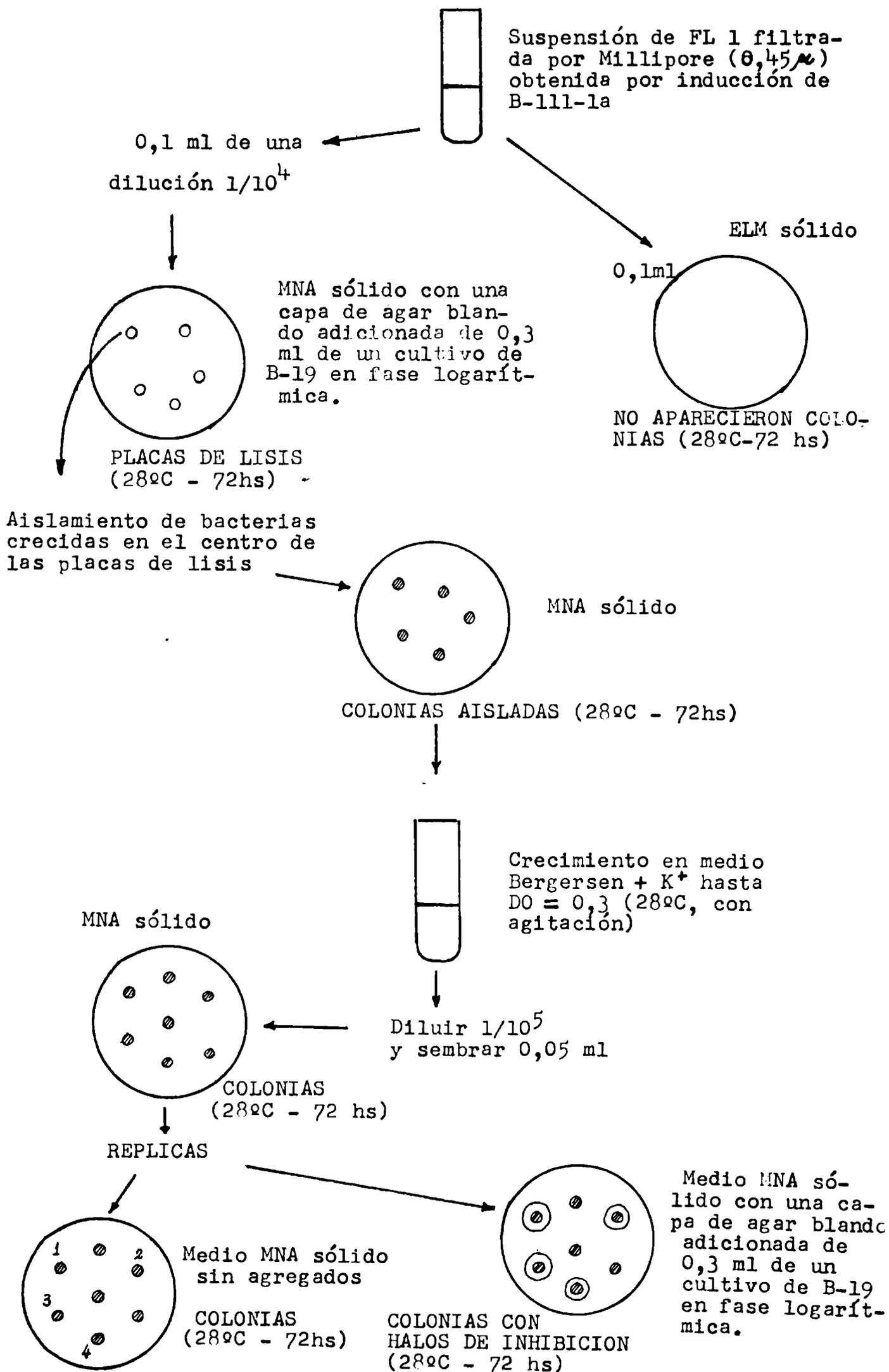


FIGURA III.18

Lisogenización de la cepa B-19 con bacteriofagos normalmente portados por B-111-1a (FL 1)



Por comparación aislamiento de las colonias 1, 2, 3 y 4

FIGURA III.19

Ensayo de nodulación de 39-lis sobre plantas de alfalfa



En la fotografía puede apreciarse el estado de las plantas al cabo de 30 días de incubación en las condiciones especificadas en Materiales y métodos. Seleccionamos para este fin las plantas más representativas de cada población : (1) Control con nitrato. (2) Control sin nitrato. (3) Inoculada con 39. (7) Inoculada con DP-4. (9) Inoculada con 39-lis.

- IV -

..

DISCUSSION

Varios investigadores han realizado un gran número de estudios destinados a lograr un mejor conocimiento de los inconvenientes que deben vencer los rhizobios en su habitat natural para efectivizar la invasión a la raíz de la planta huésped. Algunos de ellos se refieren a la acción ejercida por bacterias de otros géneros u hongos sobre el crecimiento de cepas de *Rhizobium* (151)(152)(153)(154)(155)(156), sin embargo poco es lo que se conoce en relación a los antagonismos producidos entre cepas de *Rhizobium* (147) a pesar de la notable asiduidad con que se presenta este tipo de fenómenos en este género bacteriano.

Las tablas de interferencia que se muestran en este trabajo constituyen una nueva evidencia que pone de manifiesto la alta frecuencia de interacción inter e intraespecífica establecida entre cepas de *Rhizobium*. Los porcentajes de antagonismos obtenidos para las cepas de *Rhizobium meliloti* resultaron sin embargo ser sensiblemente inferiores a los determinados por Schwinghamer (147) para cepas de *Rhizobium trifolii*. Además de tratarse de una especie bacteriana diferente, podemos pensar que los valores elevados obtenidos por este investigador se debieron principalmente a que utilizó como indicadoras a cepas previamente seleccionadas como las más sensibles a los agentes antibacterianos.

Estos estudios de interferencia, realizados "in vitro", no permiten predecir con certeza lo que ocurriría en el suelo, pues las condiciones del entorno en ambos casos son muy diferentes. Sin embargo, presumimos que aquellos casos designados como (++) tienen una elevada probabilidad de produ-

cirse, aún en ese medio tan complejo, siempre y cuando las cantidades relativas de bacterias sensibles respecto de las inhibidoras no sean desproporcionadamente grandes. Además, aquellas cepas bacterianas que inhibieron el crecimiento de muchas otras es posible que colonicen más eficientemente la rizosfera de las leguminosas al ser aplicadas en los inoculantes, haciendo abstracción de otros factores que puedan conspirar contra su supervivencia en el suelo.

Las interferencias observadas en los ensayos que se describieron en III.2.a podrían explicarse por la liberación de antibióticos, bacteriocinas o bacteriofagos por parte de las cepas inhibidoras. Los antibióticos se caracterizan por su bajo peso molecular, lo que les confiere una gran difusibilidad y dialisabilidad. Las bacteriocinas, cuyas características fueron estudiadas en varias especies bacterianas (157), incluyendo entre ellas algunas pertenecientes al género *Rhizobium* (158)(159)(160), son agentes antibacterianos que oscilan en tamaño entre partículas pequeñas, similares a los antibióticos, y grandes partículas, semejantes a bacteriofagos. Sin embargo, tanto las bacteriocinas como los antibióticos se diferencian de los fagos en que los dos primeros son incapaces de reproducirse a partir de las células que lisan, y en consecuencia no presentan la propiedad de formar placas de lisis sobre cultivos de su cepa indicadora. Este fenómeno, privativo de los bacteriofagos, es utilizado entonces en su

reconocimiento para efectuar su aislamiento.

La naturaleza de algunos antagonismos observados entre cepas de *Rhizobium meliloti* fue determinada como debida a la existencia de bacteriofagos temperados. En otros casos, presumiblemente fueron originados por la acción de bacteriocinas o antibióticos poco potentes, pues se observaron zonas de lisis localizadas en el lugar en que se colocó la gota, y luego, al ser ensayadas las resuspensiones de esas zonas con el objeto de detectar la presencia de placas de lisis por el método de la doble capa de agar, se obtuvieron resultados reiteradamente negativos. Un estudio más profundo de algunas combinaciones tal vez podría derivar en el hallazgo de nuevos fagos que afecten a cepas de *Rhizobium*, sobre todo si pensamos en la posibilidad de la existencia de bacteriofagos defectivos como el descrito en *Rhizobium* por Takahashi y Quadling (161).

Las cepas R-492, 16-7, H-13-3 y 21 son productoras de potentes agentes antibacterianos inhibidores de un amplio espectro de cepas rhizobianas. De ellas puede esperarse que sean buenas competidoras en la nodulación de leguminosas en condiciones apropiadas de crecimiento, al menos en lo que respecta a la anulación de la colonización de la rizosfera por otros rhizobios. A priori, teniendo en cuenta las características observadas en las interferencias producidas por las cepas antes mencionadas, se podría pensar en la posibilidad de que los agentes antibacterianos por ellas liberados sean antibióticos, como el descrito por Schwinghamer para la cepa T-24 de *Rhizobium trifolii* (147)(162).

Para poder entender la acción que cumplen los agentes antibacterianos en este género microbiano sería necesario realizar ensayos de inoculación mixta con cepas antagónicas sobre las plantas apropiadas, como los ya efectuados con cepas no antagónicas (163)(164). Se establecería de esta manera la capacidad de competir en la nodulación y en la colonización de la rizosfera que presenta cada una de las cepas con respecto a las demás. Schwinghamer y colaboradores demostraron las ventajas competitivas de las cepas productoras de antibióticos (162), pero también sería de utilidad efectuar estos ensayos con cepas de *Rhizobium* capaces de liberar bacteriocinas o fagos.

En los ensayos de interferencia que realizamos con 57 cepas de *Rhizobium* se efectuaron 1007 combinaciones, obteniéndose un total de 240 casos positivos. Sólo se pudo comprobar que 12 de ellas, registradas entre cepas de *Rhizobium meliloti* se debían a la presencia de bacteriofagos, lo que constituye el 1,2% de las combinaciones probadas y el 5% de los casos de interferencia positiva. Si nos remitimos exclusivamente a lo ocurrido con las interferencias detectadas entre cepas de *Rhizobium meliloti* los porcentajes aumentan sensiblemente, ya que encontramos que de 392 combinaciones y 106 casos positivos, 12 fueron las interferencias debidas a la acción de bacteriofagos (3% respecto de los casos totales probados y 11,3% respecto de los positivos)(ver tabla IV.1)

De las cepas de *Rhizobium meliloti* que fueron ensayadas en estas pruebas de interferencia, un 27% resultaron liso-

génicas. Este valor es casi equivalente al obtenido por Ordogh y Szende en 1961 (177) quienes hallaron un 28% de lisogenia entre las cepas de *Rhizobium meliloti* estudiadas. Sin embargo, difiere de los datos publicados por Kowalski (123) que indicaban la existencia de lisogenia en el 70% de las cepas utilizadas. Cabe destacar que en los ensayos de interferencia no utilizamos la inducción por Mitomicina-C o por luz ultravioleta para aumentar nuestros hallazgos. De todas maneras, como ya lo indicamos, pudimos concretar el aislamiento de 12 bacteriofagos obtenidos a partir de cepas lisogénicas y otros 2 provenientes de la rizosfera de leguminosas. Este hecho sólo cuenta con el precedente en nuestro medio del aislamiento de un bacteriofago lítico, activo sobre cepas de *Rhizobium meliloti* (165).

Nuestro trabajo está dedicado fundamentalmente al estudio de las bacterias lisogénicas y de los bacteriofagos que éstas albergan al estado temperado. No obstante, en algunos experimentos utilizamos uno de los fagos líticos con fines comparativos.

Analizando las tablas que muestran los resultados de los ensayos de interferencia y los de espectro de infectividad de los bacteriofagos podemos observar que la cepa DP-4 de *Rhizobium meliloti* se mostró como la más sensible a la acción lítica de los distintos fagos, a pesar de ser ella misma una cepa lisogénica. FL 1, liberado por B-111-1a y FL 2, liberado por B-19, son capaces de realizar su ciclo lítico sobre bacterias de esta cepa, siendo también DP-4 la cepa indicadora del bacteriofago lítico F-1 y de

los fagos Ø 16-b, Ø 11 y Ø 39.

En nuestro intento por obtener suspensiones de alto título, apelamos primero a los métodos comunes de reproducción de bacteriofagos. La obtención de fagos por liberación espontánea por parte de bacterias lisogénicas no resultó satisfactoria dado que sólo para el caso de uno de los bacteriofagos aislados se llegó a obtener títulos superiores a 1×10^8 ufp/ml (145).

La infección de bacterias de la cepa indicadora con una suspensión de bacteriofagos se efectuó tanto en medio líquido como en medio sólido, pero con suerte variada. Con el primero de los métodos no obtuvimos aumentos significativos en el título de FL 1, posiblemente debido a una mala adsorción del bacteriofago a los receptores específicos situados en la pared bacteriana. Sin embargo, utilizando medios sólidos mejoramos notablemente los rendimientos, aún partiendo de suspensiones poco concentradas. Esta eficiencia en la producción de fagos fue aumentada aún más realizando el cultivo sobre membranas de celofán, método que ya había sido aprovechado por Barnet para efectuar el crecimiento de bacteriofagos de *Rhizobium* (114). En nuestro caso, alcanzamos las 10^{11} ufp/ml para 3 de los 6 bacteriofagos utilizados (tabla III.11).

Sin embargo la concatenación de las relaciones entre cepas bacterianas y bacteriofagos hacía peligroso el aislamiento y crecimiento de estos últimos por ciclo lítico sobre bacterias de la cepa indicadora, sobre todo si pretendíamos establecer el espectro de infectividad de los bacteriofagos aislados. La dificultad radicaba en que una suspensión de fagos crecidos sobre una cepa indicadora que

a la vez era lisogénica y por lo tanto portadora de otro fago, podía llevar a este último como impureza. Esta situación fue en parte superada para FL 1 efectuando la inducción de cultivos de bacterias de la cepa B-111-1a en medio líquido empleando diferentes agentes.

Para entender la acción de los agentes inductores es necesario tener presente que el establecimiento de lisogenia involucra la interrupción del ciclo lítico a través de la represión dirigida por el fago, seguida de la integración del DNA viral en el DNA bacteriano a través de una recombinación. La posterior transición de profago a bacteriofago vegetativo puede producirse espontáneamente o en respuesta a agentes inductores. La inducción representa el fracaso de la represión, hecho que puede ocurrir en algunas bacterias como resultado de alguna variación azarosa en la interacción entre el represor y el profago (inducción espontánea), o bien puede darse en una mayor cantidad de bacterias si ocurre la inactivación del represor o se reprime su síntesis (inducción artificial). Esto da lugar a una serie de eventos que conducen a la escisión del genoma del fago del DNA bacteriano y culmina con la producción masiva de fagos libres y generalmente la lisis de la bacteria.

En el bacteriofago lambda la inducción se puede producir por acción de varios agentes: Mitomicina-C, irradiación ultravioleta, deprivación de Timina (inhibidores de la síntesis de DNA) o por choque térmico (inactivación de un represor sensible a la temperatura). La Mitomicina-C es un antibiótico que actúa químicamente como agente al-

quilante (172)(173)(174) inhibiendo selectivamente la síntesis de DNA (175). Cuando se lo utiliza en la concentración apropiada, modifica el DNA de la bacteria pero no el del bacteriofago temperado integrado, y es así que se logra su inducción.

Con este antibiótico logramos aumentar los títulos de FL 1 y de los bacteriofagos liberados por R-491 en 40 - 130 veces con respecto a los obtenidos por liberación espontánea (tabla III.12), aunque apenas superaron las 10^8 ufp/ml en sólo uno de los ensayos. Este resultado es algo inferior al obtenido por otros autores en *Escherichia coli* K 12(λ), donde los títulos aumentaron cerca de 170 veces (166). En *Agrobacterium tumefaciens* LV-1, bacteria emparentada con las del género *Rhizobium* los aumentos fueron superiores aún : aproximadamente mil veces con $1 \mu\text{g/ml}$ de Mitomicina-C luego de 7 horas de incubación (167). Zelazna-Kowalska (168), por su parte, ha logrado la inducción de la cepa 41 de *Rhizobium meliloti* con dosis superiores a $0,5 \mu\text{g/ml}$ de la misma droga.

La técnica de inducción de bacterias lisogénicas por irradiación con luz ultravioleta, empleada por primera vez por Lwoff y colaboradores en 1950 (169) fue utilizada a partir de entonces en muchos otros sistemas, incluyendo a bacterias del género *Rhizobium* (123)(169). Schwinghamer comparó, en sus experiencias de irradiación con luz ultravioleta, el porcentaje de bacterias formadoras de placas de lisis sobre un cultivo confluyente de bacterias de la cepa indicadora existentes en un cultivo irradiado y en otro no tratado. Obtuvo de esta manera una eficiencia en la inducción de 4:1 - 32:1, en relación al cultivo no irradiado. Kowalski, trabajando con un gran número de cepas

obtuvo títulos que resultaron entre 10 y 1.000 veces superiores a los de sobrenadantes de cultivos de bacterias no inducidas. (123)

Nuestros resultados con B-111-1a y R-491, tomando el dato de unidades formadoras de placas (centros inducidos + fagos libres) que aparecieron en la siembra efectuada inmediatamente después de la irradiación, alcanzaron hasta 91:1 para la primera de las cepas y 47:1 para la segunda. Para B-19 y DP-4 las relaciones fueron menores, sin embargo los aumentos de unidades formadoras de placas a tiempos superiores a las 3 horas, en que ya se produjo la liberación de fagos, oscilaron entre 40 y 250 veces respecto del control, permitiendo de esta manera la obtención de títulos de hasta $1,0 \times 10^{10}$ ufp/ml para el fago FL 2 liberado por B-19 (145). Con las cepas B-111-1a y R-491 se obtuvieron títulos bastante inferiores (hasta $2,4 \times 10^8$ y $1,2 \times 10^6$ respectivamente). Como ya lo hemos señalado anteriormente, para obtener títulos elevados de FL 1 debimos recurrir al método de crecimiento por lisis confluyente en caja de Petri sobre papel celofán.

Cabe destacar que la inducción de R-491 se efectuó solamente con el fin de estudiar su comportamiento en este tipo de experimentos, ya que de esta forma no se podía esperar obtener suspensiones puras de ninguno de los bacteriofagos por ella liberados.

El espectro de infectividad de los bacteriofagos aislados, efectuado con bacterias de las especies *R. meliloti*, *R. lupini*, *R. trifolii*, *R. leguminosarum* y *R. japonicum*, fue capaz de mostrar diferencias apreciables en su comportamiento aún cuando no se registraron transgresiones interes-

pecíficas. Esta marcada especificidad de especie difiere de los resultados obtenidos por otros investigadores con bacteriofagos de *Rhizobium meliloti* y de otras especies de *Rhizobium* (ver tabla IV.2).

Ø 39, Ø 11, Ø 16b y FL 4 (ST) resultaron ser estrictamente específicos con respecto a su bacteria huésped, al menos considerando solamente las cepas por nosotros probadas. FL 1, FL 4 (PC) y FL 4 (PT) mostraron en cambio un mayor rango de infectividad dentro siempre de la especie *Rhizobium meliloti*. FL 4 (PC) y FL 4 (PT) tuvieron un comportamiento equivalente frente a las cepas indicadoras usadas, exceptuando el hecho de que FL 4 (PT) presentó una mayor eficiencia en la formación de placas de lisis sobre bacterias de la cepa DP-4.

De confirmarse nuestras sospechas de que los títulos obtenidos sobre B-251, R-491, U-45, Y-3 y 39 no correspondieron a la acción de F-1 sino a la presencia de fagos liberados por DP-4 como inevitables contaminantes de sus lisados, este bacteriofago tendría un espectro de infectividad similar al de los fagos citados en primer término.

En los distintos casos observamos la presencia de placas de lisis de distinta turbidez y morfología, con bordes netos o difusos. Básicamente pudimos distinguir 4 tipos de placas: (1) turbias (FL 1, FL 4(PT), FL 4(ST), Ø L-38), (2) claras (F-8 y FL 4 (PC)), perforantes (F-1) y "ojo de buey" (Ø 16b, Ø 39 y Ø 11). Barnet (114) describió también 4 tipos distintos de placas de lisis formadas por bacteriofagos de *Rhizobium trifolii*, las cuales tienen bastante en común con las descritas por nosotros por Marants y colaboradores

y por Krsmanovic-Simic y Werquin en *Rhizobium meliloti* (112)(113).

Los resultados de las inactivaciones térmicas y por acción de la luz ultravioleta dieron nuevas pautas para la caracterización de los bacteriofagos aislados. FL 4 (suspensión obtenida por inducción de R-491), por inactivación térmica, dio una curva bifásica que resultaba coincidente con la obtención de más de un tipo de placas de lisis a partir de sus lisados. La primera parte de la curva fue casi coincidente con las obtenidas para FL 2 y FL 3, distinguiéndose así de FL 1, mucho más resistente a la acción de la temperatura. Un estudio exhaustivo del comportamiento de las diferentes variedades de bacteriofagos liberados por R-491 demostró que FL 4 (ST) difería de FL 4 (PT) y FL 4 (PC) en su resistencia al choque térmico además de en la turbidez de sus placas de lisis, correspondiendo su cinética de inactivación con la de la primera parte de la curva original de FL 4. El hecho de que las curvas de inactivación de FL 4 (PT) y FL 4 (PC) fueran similares entre sí y similares a la vez a la segunda parte de la curva de FL 4 justificó la forma bifásica observada para esta última suspensión.

No hemos podido establecer ninguna correlación entre las propiedades estudiadas. Esta falta de correlación entre morfología de placas, sensibilidad a diversos agentes y espectros de infectividad frente a distintos huéspedes fue también notada por Marants y colaboradores, quienes también obtuvieron una respuesta heterogénea frente a la acción de la temperatura por parte de diferentes fa-

gos(112).

Kowalski y colaboradores señalaron que fagos de distintas especies de *Rhizobium* se comportaban en forma diferente frente a la irradiación con luz ultravioleta, aunque no encontraron esa heterogeneidad en bacteriofagos que afectaban a la misma especie.(178). Del mismo modo, Marants y colaboradores (112) observaron un efecto equivalente de dichas radiaciones sobre los fagos de *Rhizobium meliloti*. Nuestros experimentos mostraron pequeñas diferencias en la sensibilidad de los distintos fagos de *Rhizobium meliloti* a las radiaciones ultravioleta, diferencias que están comprendidas dentro del error del método de estimación de la concentración de bacteriofagos por recuento de placas de lisis y que por lo tanto no se consideran significativas.

Hemos podido identificar el tipo de ácido nucleico que constituye el genoma de aquellos fagos de los cuales pudimos obtener títulos superiores a 1×10^{11} ufp/ml. Los bacteriofagos estudiados por De Antoni (145) al igual que FL 4 (PC) demostraron contener ácido desoxirribonucleico de doble cadena, mientras que en FL 1 se detectó la presencia de ácido desoxirribonucleico pero de cadena simple utilizando el método de Bradley descrito en Materiales y Métodos. Esta cualidad, no demasiado frecuente, es por demás anormal en un bacteriofago capaz de realizar ciclos lisogénicos, hecho que resulta de relevante interés teórico.

La complejidad de las interrelaciones entre rizobios y fagos nos hace presumir que la importancia ecológica de estos últimos debe radicar en la posibilidad de contribuir

a provocar fluctuaciones en las poblaciones rizobianas a través del intercambio de material genético por transducción y a través de la lisis de las bacterias sensibles.

Con la idea de estudiar las posibilidades que ofrecía este sistema en el intercambio de material genético hemos lisogenizado con el bacteriofago FL 1 a bacterias de la cepa B-19, normalmente portadora de otro fago, el FL 2. B-19 parece haber sido lisogenizada en una alta proporción en nuestra experiencia, a juzgar por la gran cantidad de colonias formadoras de halos de inhibición encontradas en las réplicas. Estas bacterias resultaron ser doblemente lisogénicas al incorporar a FL 1 como profago en su genoma y mantener al fago FL 2 como profago. También transferimos un bacteriofago portado por bacterias de la cepa DP-4 a bacterias de la cepa 39, con lo que comprobamos que la lisogenia es un fenómeno que se ve favorecido en bacterias del género *Rhizobium* y que la probabilidad de que un fago pase al estado de profago es tal vez mayor en este sistema que en los clásicamente descritos.

Efectuamos un ensayo de nodulación en plantas con un cultivo obtenido a partir de las bacterias sobrevivientes a una lisis confluyente de 39 por acción de bacteriofagos liberados por bacterias de la cepa DP-4. El alto porcentaje de plantas noduladas por 39-Lis (bacterias de la cepa 39 lisogenizadas con fagos normalmente portados por DP-4) (5 sobre 6) en relación a las noduladas por 39 no lisogenizadas (1 sobre 6) indica que la frecuencia de lisogenización de 39 ha sido muy elevada y/o que el poder de competición de 39-Lis para nodular a plantas de alfal-

fa es superior al de la cepa original (cepa 39).

T A B L A I V . 1

Frecuencia de hallazgos de lisogenia en experimentos de interferencia

	Interferencias R. meliloti - R. meliloti.	Interferencias totales
Nº de combinaciones probadas	392	1007
Nº de interferencias positivas	106	240
Porcentaje de interferencias positivas	27	24
Nº de cepas probadas	29	57
Nº de cepas lisogénicas	8	8
Porcentaje de cepas lisogénicas	27	14
Nº de interferencias producidas por fagos	12	12
Porcentaje de interfe- rencias producidas por fagos respecto de las combinaciones totales probadas	3	1,2
Porcentaje de interfe- rencias producidas por fagos respecto de los casos positivos	11,3	5

T A B L A IV.2

Espectro de infectividad de bacteriofagos aislados por otros investi-

gadores

Origen de los fagos	Referencia bibliográfica	BACTERIAS INDICADORAS					
		R. trifoli	R. leguminosa	R. meliloti	R. lupini	R. japonicum	R. phaseolii
Trifolium	(104)	+	+	-	-	-	-
	(101)	+	+	-	-	-	-
	(95)	+	-	+	-	-	-
	(171)	+	+	+	-	+	-
	(94)	+	-	-	-	-	-
	(98)	+	-	+	-	-	-
	(92)	+	-	-	-	-	-
	(170)	+	+	-	-	-	-
Pisum	(104)	+	+	+	+	+	-
	(101)	+	+	-	-	-	-
	(95)	+	+	+	-	-	+
	(171)	+	+	+	-	-	+
	(170)	+	+	-	-	-	+
Vicia sativa	(104)	+	+	+	+	+	-
Vicia faba	(104)	+	+	+	-	-	-
Lupinus	(104)	+	+	+	+	-	-
	(95)	+	+	+	+	-	+
Medicago sativa	(104)	+	+	+	+	-	-
	(95)	+	+	+	+	-	+
	(171)	-	+	+	-	-	-
	Este trabajo	-	-	+	-	-	-
Ornithopus sativus	(104)	+	+	+	+	+	-
	(92)	-	-	-	+	-	-
Glycine max	(104)	+	+	+	+	+	-
	(171)	-	-	-	-	+	-
Phaseolus	(104)	+	+	+	-	-	+
	(171)	+	+	+	-	-	+

- V -

.

C O N C L U S I O N E S

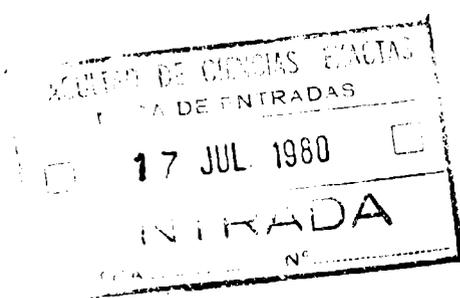
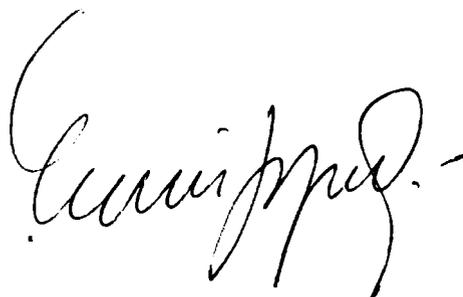
- 1.- En los ensayos de interferencia observamos un alto porcentaje de casos positivos, de los cuales un 5% se debió a la presencia de bacteriofagos.
- 2.- Observamos la existencia de lisogenia en el 25% de las cepas de *Rhizobium meliloti*, no detectando este fenómeno en cepas pertenecientes a otras especies.
- 3.- Realizamos el aislamiento de 2 bacteriofagos líticos y otros 12 provenientes de cepas lisogénicas, teniendo en cuenta su origen y morfología de placas de lisis. Se estudiaron en mayor detalle los fagos FL 1, FL 4 (PT), FL 4 (ST) y FL 4 (PC), los que fueron caracterizados también por otros métodos.
- 4.- De los métodos ensayados para el crecimiento de los bacteriofagos, el desarrollo por ciclo lítico en medio sólido sobre membranas de celofán nos permitió obtener suspensiones de alto título, superiores en algunos casos a 10^8 ufp/ml. En los casos en que el crecimiento por ciclo lítico representaba un peligro de contaminación, optamos por la inducción por medio de alguno de los tres agentes probados (irradiación con luz ultravioleta, choque térmico, Mitomicina-C).
- 5.- A través de los agentes inductores nombrados elevamos la liberación de bacteriofagos por parte de las cepas portadoras, en relación a lo observado sin el uso de los mismos. Los títulos, sin embargo, apenas superaron las 10^8 ufp/ml en algunos casos.
- 6.- La inducción no resultó un método adecuado para el desarrollo de bacteriofagos portados por cepas polilisogénicas, como tampoco lo fue el crecimiento de fagos por ciclo lítico sobre bacterias indicadoras a su vez lisogénicas, debido a la inevitable contaminación arrastrada en el proceso.
- 7.- Los bacteriofagos aislados presentaron inconvenientes para su desarrollo en medio líquido.

8.- Se caracterizó a los bacteriofagos aislados en base a la morfología de sus placas de lisis, rango de infectividad, inactivación térmica y naturaleza de su material genético. Todos estos métodos en alguna medida permitieron diferenciar a los fagos estudiados, no sucediendo lo mismo mediante la aplicación de la inactivación por irradiación ultravioleta.

9.- El rango de infectividad de los fagos se restringió a cepas de *Rhizobium meliloti*.

10.- Comprobamos por el método de Bradley la existencia de un bacteriofago que contenía DNA monoténico, a pesar de producir lisogenia en bacterias de la especie *Rhizobium meliloti*.

11.- Efectuamos la lisogenización de B-19 con el fago FL 1 y de 39 con un bacteriofago portado por DP-4.



- VI -

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

(') Consultados los resúmenes del Biological Abstracts

- 1.- Dixon, R.O.D. (1969) Ann.Rev.of Microbiol 23, 137
- 2.- Hubbell, D.H. (1970) Bot.Gaz. 131,337
- 3.- Yao, P.Y.; Vincent,J.M.; (1969) Australian J.Biol. Sci. 22, 413
- 4.- Li,D.; Hubbell,D.H. (1969) Can.J.Microbiol 15,1133
- 5.- Dart,P.J.; Mercer,F.V. (1964) Arch.Mikrobiol. 47, 334.
- 6.- Nutman,P.S. (1956) Biol.Rev.Cambridge Phil.Soc. 31, 109.
- 7.- Hamblin,J.S.; Kent,S.P. (1973) Nature New Biol. 245, 28.
- 8.- Bohlool,L.E.; Schmidt,E.L. (1974) Science 185,269
- 9.- Dazzo,F.B.; Hubbell,D.H. (1975) Appl.Microbiol. 30, 1017.
- 10.- Dazzo, F.B.; Napoli,C.A.; Hubbell,D.H. (1976) Appl. and Environm.Microbiol. 32, 166
- 11.- Rougé,P.; Labroue,L. (1977) C.R.Acad.Sc.Paris Série D, 284, 2423.
- 12.- Goodchild,D.J.; Bergersen,F.J. (1966)
- 13.- Raggio,M.; Raggio,N. (1962) Ann.Rev.of Plant Physiol. 13, 109.
- 14.- Lindemann,W.C.; Schmidt,E.L.; Ham,G.E. (1974) Soil Sci. 118, 274.
- 15.- Libbenga,K.R.; Harkes,P.A.A. (1973) Planta (Berl.) 114, 17
- 16.- Dixon,R.O.D. (1967) Arch.Mikrobiol. 56,156.
- 17.- Tu, J.C. (1974) J. of Bacteriol. 119,.986

- 18.- Dixon, R.O.D. (1964) Arch.Mikrobiol. 48,166.
- 19.- Kidby,D.K.; Goodchild,D.J. (1966) J.Gen.Microbiol. 45, 147.
- 20.- Gourret,J.P.; Fernández Arias,H. (1974) Can.J.Microbiol. 20,1169.
- 21.- Werner,D.; Stripf,R. (1978) Z.Naturforsch. 33c, 245
- 22.- Paaü,A.S.; Cowles,J.R. (1978) Plant Physiol. 62,526.
- 23.- Kennedy,I.R.; Parker,C.A.; Kidby,D.K. (1966) Biochem. Biophys.Acta 130, 517.
- 24.- Genetic Engineering for Nitrogen Fixation, ed. by A. Hollaender. Plenum Press, New York (1977)
- 25.- Limitations and Potentials for Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, ed. by J.Döbereiner, R.H. Burris, A.Hollaender, A.A.Franco, C.Neyra, D. Barry Scott. Plenum Press, New York, (1978)
- 26.- Koch,B.; Evans, H.J. (1966) Plant Physiol. 41, 1748
- 27.- Hardy,R,W.F.; Holsten,R.D.; Jackson,E.K.; Burns,R.C. (1968) Plant Physiol. 43, 1185.
- 28.- Sprent,J.L. (1969) Planta (Berl.) 88, 372.
- 29.- Bergersen, F.J.; Turner, G.L. (1967) Biochem. Biophys. Acta 141, 507.
- 30.- Koch,B.; Evans,H.J.; Russell,S. (1967) Plant Physiol. 42, 466
- 31.- Dart, P.J. (1968) Proc 4th European Reg. Conf. Electr. Micro. p.69.
- 32.- Verma,D.P.S.; Nash,D.T.; Schulman,H.M. (1974) Nature 251, 74.
- 33.- Verma,D.P.S.; Bal,A.K.; (1976) Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A. 73, 3843.

- 34.- Cutting, J.A.; Schulman, H.M. (1969) *Biochem. Biophys. Acta*, 192, 486
- 35.- Cutting, J.A.; Schulman, H.M. (1971) *Biochem. Biophys. Acta*, 229, 58
- 36.- Yocum, C.S. (1974) *Science* 146, 432
- 37.- Bergersen, F.J.; Turner, G.L. (1975) *J. Gen. Microbiol.* 89, 31
- 38.- Wittenberg, J.B.; Bergersen, F.J.; Appleby, C.A.; Turner, G.L. (1974) *J. Biol. Chem.* 249, 4057
- 39.- Appleby, C.A. (1969) *Biochem. Biophys. Acta* 188, 222
- 40.- Child, J.J. (1975) *Nature* 253, 350.
- 41.- Scowcroft, W.R.; Gibson, A.H. (1975) *Nature* 253, 351
- 42.- Kurz, W.G.W.; La Rue, T.A. (1975) *Nature* 256, 407
- 43.- Mc Comb, J.A.; Elliott, J.; Dilworth, M.J. (1975) *Nature* 256, 409
- 44.- Pagan, J.D.; Child, J.J.; Scowcroft, W.R.; Gibson, A.H. (1975) *Nature* 256, 406.
- 45.- Tjepkema, J.; Evans, H.J. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (1975) 65, 625
- 46.- Keister, D.L. (1975) *J. of Bacteriol.* 123, 1265
- 47.- Keister, D.L.; Evans, W.R. (1976) *J. of Bacteriol.* 129, 149
- 48.- Pankhurst, C.E.; Craig, A.S. (1978) *J. Gen. Microbiol.* 106, 207.
- 49.- Trinick, M.J. (1973) *Nature* 244, 459
- 50.- Dunican, L.K.; Tierney, A.B. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 57, 62.
- 51.- Bishop, P.E.; Evans, H.J.; Daniel, R.M.; Hampton, R.O. (1975) 381, 248
- 52.- Donald, C.M. (1960) *J. Aust. Inst. Agr. Sci.* 26, 319

- 53.- Hardy, R.W.F; Havelka, U.D. (1975) *Science* 188, 633.
- 54.- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology 8th ed. (1974) The Williams and Wilkingson Co. Ed.
- 55.- Skrdleta, V. (1966) *Rostlinna Vyroba* 12, (1), 23.
- 56.- Hornez, J.P.; Courtois, B.; Derieux, J.C. (1976) *C.R. Acad. Sci. Paris, Série D*, 283, 1559
- 57.- Norris, D.O. (1965) *Plant and Soil* 22, 143
- 58.- Graham, P.H. (1964) *J.Gen.Microbiol.* 35, 511.
- 59.- De Ley, ; Rassel, (1965) *J.Gen.Microbiol.* 41, 85.
- 60.- t'Mannetje, L. (1967) *Antonie van Leewenhoek, J. Microbiol. Serol.* 33, 477
- 61.- Drozanska, D. (1966) *Acta Microbiol Pol.* 15, 323
- 62.- Staniewski, R. (1970) *Acta Microbiol. Pol. Ser. B* 2 (19), N^o1, 3.
- 63.- Zelazna-Kowalska, I. (1971) *Plant and Soil, Special Vol.* 67.
- 64.- Lorkiewicz, Z.; Melke, A. (1970) *Acta Microbiol. Pol. ser. A* 2(19) N^o2, 75.
- 65.- Schwinghamer, E.A. (1964) *Can.J.Microbiol.* 10, 221
- 66.- Schwinghamer, E.A. (1967) *Antonie van Leewenhoek, J. Microbiol. Serol.* 33, 121.
- 67.- Schwinghamer, E.A. (1968) *Can.J.Microbiol.* 14, 355.
- 68.- Kleczkowska, J. (1950) *J.Gen.Microbiol.* 4, 298.
- 69.- Kleczkowska, J. (1965) *J.Gen.Microbiol.* 40, 377
- 70.- Hendry, G.S.; Jordan, D.C. (1969) *Can.J.Microbiol.* 15, 671.
- 71.- Jordan, D.C.; Yamamura, Y; Mc Kague, M.E. (1969) *Can J. Microbiol.* 15, 671
- 72.- Malek, W. (1974) *Acta Microbiol. Pol. Ser. A* 6 (23) N^o3, 225.
- 73.- Scherrer, A.; Dénarié, J. (1971) *Plant and Soil Special Vol.* 39.

- 74.- Truchet,G.; Dénarié,J. (1973) C.R.Acad.Sci.Paris
Série D 277, 841
- 75.- Truchet,G.; Dénarié,J. (1973) C.R.Acad.Sci.Paris
Série D 277, 925.
- 76.- Scherrer,A. (1973) Annales de Phytopathologie 5, 105
- 77.- Balassa,G. (1963) Bact.Rev. 27, 228
- 78.- Zelazna,I. (1963) Acta Microbiol.Pol. 12, 166
- 79.- Kern,H. (1969) Arch.Mikrobiol. 66, 63
- 80.- O'Garra,F.; Dunican,L.K. (1973) J. of Bacteriol. 116,
1177
- 81.- Dunican,L.K.; Tierney,A.B. (1973) Molec.Gen.Genet.
126, 187
- 82.- Lange,R.T.; Alexander,M. (1961) Can.J.Microbiol. 7,
959.
- 83.- Zelazna-Kowalska,I.; Zurkowski,W.; Lorkiewicz,Z.;
Menzies,J.D. (1974) Acta Microbiol.Pol.Ser.A 6, 269
- 84.- Davis,B.D.; Dulbecco,R.; Eisen,H.N.; Ginsberg,H.S.;
Wood,W.B. (1971) Salvat ed.
- 85.- Balassa,R. (1960) Nature 188, 246
- 86.- Higashi,S. (1967) J.Gen.Appl.Microbiol. 13, 391
- 87.- Heumann,W. (1968) Molec.Gen.Genet. 102, 132.
- 88.- Boucher,C.; Bergeron,B.; Barate de Bertalmio,M.;
Dénarié,J. (1977) J.Gen.Microbiol. 98, 253
- 89.- Beringer,J.E. (1974) J.Gen.Microbiol. 84, 188
- (') 90.- D'Herelle,F. (1917) C.R.Acad.Sci.Paris 165, 373
- (') 91.- Loew,O.; Aso,K. (1908) Tokyo College of Agr. Bull.
7, 572
- 92.- Gerretsen,F.C.; Grijns,A.; Sack,J; Söhngen,N.L. (1923)
Zentralblatt für Bakteriologie 60 Abt II, 311
- 93.- Grijns,A. (1927) Zentralblatt für Bakteriologie 71,
Abt II, 248

- 94.- Dorosinskij, L.M. (1941) Mikrobiologiya 10, 208
- 95.- Demolon, A.; Dunez, A. (1933) C.R.Acad.Sci.Paris 197,
1344
- 96.- Vandecaveye, S.C.; Katznelson, H. (1936) J.of Bacteriol.
31, 465
- 97.- Kowalski, M.; Ham, G.E.; Frederick, L.R.; Anderson, I.C.
(1974) Soil Science 118, 221
- 98.- Laird, D.G. (1932) Arch.Mikrobiol. 3, 159
- 99.- Almon, L.; Wilson, P.W. (1933) Arch.Mikrobiol. 4, 209
- 100.- Bruch, C.W.; Allen, O.N. (1955) Soil Sci.Soc.Am.Proc.
19, 175
- 101.- Kleczkowska, J. (1957) Can.J.Microbiol. 3, 171
- 102.- Gupta, B.M.; Kleczkowska, J. (1962) J.Gen.Microbiol.
27, 473
- 103.- Atkins, G.J.; Hayes, A.H.(1972) J.Gen.Microbiol. 73,
273.
- 104.- Staniewski, R.; Kowalski, M; Gogacz, E.; Sokolowska, F.
(1962) Acta Microbiol.Pol. 11, 245
- 106.- Staniewski, R. (1970) Can.J.Microbiol. 16, 1003
- 107.- Staniewski, R.; Jurzyk, I.; Lorkiewicz, Z. (1973) Acta
Microbiol.Pol. Ser.A Vol.5 (22) №1, 21.
- 108.- Staniewski, R.; Kowalska, W. (1974) Acta Microbiol.Pol.
Ser.A Vol.6, (23) №2, 183.
- 109.- Adams, M.H. (1959) Bacteriophages.Interscience, N.Y.
- 110.- Ley, A.N.; Warner, H.R.; Kahn, P.L. (1972) Can.J.Micro-
biol. 18, 375
- 111.- Lotz, W.; Mayer, F. (1972) Can.J.Microbiol. 18, 1271
- 112.- Marants, L.A.; Moskalenko, L.N.; Rautenshtein, Y.I. (1973)
Mikrobiologiya 42, (6) 1088.
- 113.- Krsmanovic-Simic, D.; Werquin, M. (1973) C.R.Acad.Sci.
Paris, Série D, 276, 2745.

- 114.- Barnet, Y.M. (1972) *J.Gen.Virol.* 15, 1
- 115.- Atkins, G.J. (1973) *J.of Virol.* 12, 149
- 116.- Bradley, D.E. (1967) *Bact.Rev.* 31, 230
- 117.- Orosz, L.; Sváb, Z.; Kondorosi, A.; Sik, T. (1973)
Molec.Gen.Genet. 125, 341
- 118.- Szende, K. (1971) *Plant and Soil Special Vol.* 81
- 119.- Orosz, L.; Sik, T. (1970) *Acta Microbiol.Acad.Sci.*
Hung. 17, 185.
- 120.- Atkins, G.J. (1973) *J.of Virol.* 12, 157
- 121.- Marshall, K.C. (1956) *Nature* 177, 92
- 122.- Szende, K.; Ordogh, F. (1960) *Naturwissenschaften*
17, 404
- 123.- Kowalski, M. (1966) *Acta Microbiol.Pol.* 15, 119
- 124.- Staniewski, R.; Lorkiewicz, Z.; Chomicka, Z. (1971)
Acta Microbiol.Pol. Ser.A 3 (20) N^o3-4, 97.
- 125.- Kondorosi, A.; Orosz, L.; Svab, Z.; Sik, T. (1974)
Molec.Gen.Genet. 132, 153.
- 126.- Kowalski, M. (1967) *Acta Microbiol.Pol.* 16, 7.
- 127.- Kowalski, M.; Dénarié, J. (1972) *C.R.Acad.Sci.Paris*
Série D, 275, 141
- 128.- Rosenberg, C.; Dénarié, J. (1976) *C.R.Acad.Sci.Pa-*
ris, Série D, 283, 423
- 129.- Ellis, N.J.; Kalz, G.G.; Doncaster, J.J. (1962) *Can.*
J.Microbiol. 8, 835
- 130.- Mareckova, H. (1969) *Arch.Mikrobiol.* 68, 113
- 131.- Raina, J.L.; Modi, V.V. (1969) *J.Gen.Microbiol.* 57,
125
- 132.- Raina, J.L.; Modi, V.V. (1972) *J.of Bacteriol.* 116,
1177.
- 133.- Kowalski, M. (1970) *Acta Microbiol.Pol. Ser.A* 2 (19)
N^o3, 15.

- 134.- Vincent, J.M. (1970) "A manual for the Practical Study of the Root Nodule Bacteria" IBP Handbook Nº15, Blackwell Scientific Publications, Oxford, England.
- 135.- Barnett, Y.M.; Vincent, J.M. (1970) J.Gen.Microbiol. 61, 319
- 136.- Bergersen, F.J. (1961) Aust.J.Biol.Sci. 14, 349
- 137.- Favelukes, G. (1974) Comunicación personal.
- 138.- Schiel, E.; Ragonese, A.E.; (1942) Revista Argentina de Agronomía 9, (2) 114.
- 139.- Schiel, E.; Olivero, E.G.de; Yepes, M. (1959) Revista de Investigaciones Agrícolas (INTA) 13, 257.
- 140.- Lopreto, C.R. (1975) Universidad Nacional de La Plata, Facultad de Ciencias Exactas. Tesis.
- 141.- Hershey, A.D.; Kalmanson, G.; Bronfenbrenner, J. (1944) J.Immunol. 48, 221
- 142.- Avdeeva, A.V.; Sabelnikov, A.G.; Panchava, N.N.; Ilyashenko, B.N. (1970) Virol. 42, 1151
- 143.- Bradley, D.E. (1966) J.Gen.Microbiol. 44, 383
- 144.- Lopardo, H.A.; De Antoni, G.L.; Grau, O. Resultados no publicados.
- 145.- De Antoni, G.L. (1978) Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Tesis.
- 146.- Sicardi de Mallorca, M.; Castells, A. (1972) VIa Reunión Latinoamericana sobre Rhizobium. Montevideo. Uruguay.
- 147.- Schwinghamer, E.A. (1971) Soil Biol.Biochem. 3, 355
- 148.- Roussaux, J.; Kurkdjian, A.; Beardsley, R.E. (1968) Ann.Inst.Pasteur (Paris) 114, 237.

- 149.- Staniewski,R.; Kowalski,M. (1965) Acta Microbiol.
Pol. 14, 231
- 150.- Golebiowska,J.; Sawicka,A.; Sypniewska,U. (1971)
Polish J. of Soil Sci. 4, 131
- (')151.- Abdel Ghaffar,A.S.; Allan,O.N. (1952) 4th. Intern.
Soil Sci. Congr. Amsterdam.
- 152.- Hattingh,M.J.; Louw,H.A. (1966) South African J.
Agr.Sci. 9, 239
- 153.- Hely,F.W.; Bergersen,F.J.; Brockwell,J. (1957) Aust.
J.Agr.Res. 8, 24
- 154.- Holland,A.A.; Parker,C.A. (1966) Plant and Soil 25,
329.
- 155.- van Schreven,D.A. (1964) Plant and Soil 21, 283
- 156.- Patel,J.J. (1974) Plant and Soil 41, 395.
- 157.- Nomura,M. (1967) Ann.Rev.of Microbiol. 21, 257
- 158.- Roslycky,E.B. (1967) Can.J.Microbiol. 13, 431
- 159.- Schwinghamer,E.A.; Pankhurst,C.E.; Whitfield,P.R.(1973)
Can.J.Microbiol. 19, 359
- 160.- Lotz,W.; Mayer,F. (1972) J.Virol. 9, 160
- 161.- Takahashi,I.; Quadling,C. (1961) Can.J.Microbiol.114,
237.
- 162.- Schwinghamer,E.A.; Belkengren,R.P. Arch.Mikrobiol. 64,
130
- 163.- Marques Pinto,C.; Yao,P.Y.; Vincent,J.M. (1974) Aust.
J.Agr.Res. 25, 317
- 164.- Skrdleta,V.; Karimova,J. (1969) Arch.Mikrobiol.66, 25
- 165.- Camugli,E.N. (1950) Bol. de la Soc.Arg. de Bot.3, 143
- 166.- Otsugi,N.; Sekiguchi,M.; Iijima,T.; Takagi,Y.; (1959)
Nature 184, 1079
- 167.- Pootjes,C.; Stemberger,B. (1974) Can.J.Microbiol.20,367

- (') 168.- Zelazna-Kowalska, I. (1972) *Ann. Univ. Mariae Curie-Sklodowska. Sect. C.* 27, 121
- 169.- Lwoff, A.; Siminovitch, L.; Kjeldgaard, N. (1950) *Ann. Inst. Pasteur (Paris)* 79, 815
- 170.- Ronto, G.; Noack, D. (1974) *Acta Biochim. et Biophys. Acad. Sci. Hung.* 9, 275
- 171.- Conn, H.J.; Bottcher, E.J.; Randall, C. (1945) *J. of Bacteriol.* 49, 359
- 172.- Iyer, V.N.; Szybalski, W. (1963) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 50, 355.
- 173.- Weissbach, A.; Lisio, A. (1965) *Biochemistry* 4, 196
- 174.- Lipsett, M.N.; Weissbach, A. (1965) *Biochemistry* 4, 206
- 175.- Shiba, S.; Terawaki, A.; Taguchi, T.; Kawamata, J. (1959) *Nature* 183, 1056.
- 176.- Stent, G.S. (1963) "Molecular Biology of Bacterial Viruses" W.H. Freeman and Co. San Francisco, EEUU.
- 177.- Ordogh, F.; Szende, K. (1961) *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung.* 8, 65
- 178.- Kowalski, M.; Staniewski, R.; Paraniak, M. (1963) *Acta Microbiol. Pol.* 12, 180.
- 179.- Remington, R.D.; Schork, M.A. (1974) "Estadística biométrica y sanitaria" Prentice Hall International.