

UNIVERSIDAD
DE GRANADA

FACULTAD
DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE FAGOS HALÓFILOS MODERADOS AISLADOS
A PARTIR DE CEPAS LISOGÉNICAS DE *DELEYA HALOPHILA*

UNIVERSIDAD DE GRANADA

ACTA DEL GRADO DE DOCTOR EN FARMACIA

Curso de 1989 a 1990

Folio

Número

Reunido en el día de la fecha el Tribunal nombrado para el Grado de Doctor de Dña Ana María García de la Paz, el aspirante leyó un discurso sobre el siguiente tema, que libremente había elegido: "CARACTERIZACION DE PAGOS HALOFILOS MODERADOS AISLADOS DE CEPAS LILOGENICAS DE DELEYA HALOPHILA"

Terminada la lectura y contestadas las objeciones formuladas por los Jueces del Tribunal, éste le calificó de Apto "cum laude"

Granada, 25 de Junio de 1990

El Secretario del Tribunal,

EL PRESIDENTE,

El Vocal,

El Vocal,

El Vocal,

Firma del Graduado,

INVESTIDURA . . .

En el día de la fecha se ha conferido a D. _____ el Grado de Doctor en la Facultad de _____, conforme a lo prevenido en las disposiciones vigentes.

Granada, _____ de _____ de 19____

EL DECANO,

CERTIFICO: Que el Acta que antecede concuerda con la del expediente del interesado remitida a la Secretaría de la Universidad.

Granada, _____ de _____ de 19____

El Catedrático Secretario,

V.º B.º
EL DECANO,

Granada, 23 de Mayo de 1.990

Memoria presentada por
la Lda. en Farmacia Ana Maria
Garcia de la Paz para aspirar
al grado de Doctor en Farmacia
por la Universidad de Granada

EL DIRECTOR

Prof. Dr. Concepción Calvo Sainz

Prof. Titular de Microbiología
de la Facultad de Farmacia de
de la Universidad de Granada

Parte de los resultados de esta Memoria han sido presentados en el XI Congreso Nacional de Microbiología (Gijón, Junio de 1987), en el Simposium "The Microbiology of extreme environments and its biotechnological potential", celebrado en Troia (Portugal) en Septiembre de 1988 y en el XII Congreso Nacional de Microbiología (Pamplona, Septiembre de 1989).

Así mismo, de esta Tesis se ha extraído el trabajo "Isolation and characterization of phage F9-11 from a lysogenic *Deleya halophila* strain", publicado en la revista Current Microbiology, en 1988.

Una vez finalizado el trabajo deseo expresar mi agradecimiento a aquellas personas que han compartido conmigo estos últimos años y, que han ayudado, de un modo u otro, a la realización de esta Tesis.

Al Prof. D. Alberto Ramos Cormenzana, mi primer maestro y amigo, por sus lecciones y consejos recibidos.

A Concepcion Calvo Sainz, excepcional directora, estímulo y apoyo; genio auténtico y energía desbordante, influjo de Ciencia y vida.

A todos mis compañeros del Departamento, en especial a aquellos que siguieron más de cerca mis éxitos o fracasos de cada día que, con su entusiasmo y buen humor, ayudaron a superar los frecuentes baches de este "rumbo a lo desconocido".

A mis hermanos y a Carlos, por los "ratillos" que estuvieron en el laboratorio haciendo ese sinfín de tareas que en Domingo parecen muy penosas y que "soportaron" con paciencia mis frecuentes malhumores.

A los miembros de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada, donde se han llevado a cabo los estudios de microscopía electrónica.

A todos, muchas gracias.

A mis padres

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. INTRODUCCIÓN HISTÓRICA	1
1.1. Descubrimiento de los bacteriófagos	1
1.2. Investigación básica de los bacteriófagos	2
2. REPLICACIÓN DEL BACTERIÓFAGO	4
2.1. Adsorción	4
2.2. Separación del ácido nucleico de la cubierta protéica	6
2.3. Expresión y replicación del ácido nucleico	6
2.4. Ensamblaje	8
2.5. Liberación de las partículas de fagos maduros	9
2.6. Inhibición de la replicación del fago	9
2.6.1. Inducción de inmunidad	9
2.6.2. Alteración de la superficie celular	10
2.6.3. Exclusión del ADN superinfectante	10
2.6.4. Restricción endonucleotica del ADN	10
2.6.5. Infección abortiva	10
3. CURVA DE MULTIPLICACIÓN	11
4. EL "POOL" GENÉTICO	11
5. LISOGENIA	13
5.1. El profago	15
5.2. El proceso de lisogenización	16

5.3. Producción de fagos por bacterias lisogénicas	18
5.3.1. Producción espontánea	18
5.3.2. Inducción	18
5.4. Inmunidad	19
5.5. Lisogenia y genética bacteriana	21
6. PSEUDOLISOGENIA	22
7. BACTERIOCINAS	23
8. TAXONOMIA DE FAGOS	25
8.1. Familias de virus bacterianos	26
9. ECOLOGIA DE BACTERIOFAGOS	28
9.1. Métodos empleados en el estudio de la ecología de los fagos	28
9.1.1. Ensayo de fagos y medios	30
9.1.2. Enumeración e identificación de fagos	31
9.1.3. Rango de hospedador	33
9.1.4. Caracterización de fagos	34
9.2. Ecología de los fagos de suelo	35
9.2.1. Detección de fagos en suelo	36
9.2.2. Estado del bacteriófago en el suelo	37
9.2.2.1. Factores que influyen en la estabilidad de las partículas fágicas en el suelo	37
9.2.2.2. Factores que influyen en la replicación	38
9.2.3. Modelo de interacciones fago-bacteria	40

9.3. Ecología de fagos de aguas dulces	42
9.3.1. Distribución de fagos en ambientes de agua dulce	44
9.3.1.1. Factores que influyen en la supervivencia y multiplicación de los fagos en aguas dulces	44
9.4. Ecología de bacteriófagos marinos	48
9.4.1. Introducción histórica	48
9.4.2. Definición de bacteriófagos marinos	49
9.4.3. Aparición de bacteriófagos marinos	50
9.4.3.1. Cifras de bacteriófagos marinos	50
9.4.3.2. Distribución de los bacteriofagos marinos	51
9.4.3.2.1. Aislamiento a partir de aguas marinas	51
9.4.3.2.2. Aislamiento a partir de sedimentos marinos	53
9.4.3.2.3. Información adicional sobre bacteriófagos marinos	54
9.4.4. Observaciones ecológicas sobre los sistemas marinos fago-hospedador	55
9.4.4.1. El ambiente iónico	56
9.4.4.1.1. El ambiente iónico y la actividad lítica de los bacteriófagos	56
9.4.4.1.2. El ambiente iónico y la adsorción del fago sobre sus células hospedadoras	57
9.4.4.1.3. El ambiente iónico y la replicación del bacteriófago	57
9.4.4.1.4. El ambiente iónico y la supervivencia de los bacteriófagos marinos	58

9.4.4.2. Temperatura	59
9.4.4.3. Presion hidrostática	60
9.4.4.4. Anaerobiosis	60
9.5. Ecologia de bacteriófagos en ambientes extremos	61
10. <i>Deleya halophila</i> : CARACTERÍSTICAS	64
10.1. Descripción de <i>Deleya halophila</i>	65
11. OBJETIVOS DE TRABAJO	66
MATERIAL Y MÉTODOS	67
1. CEPAS	67
2. MEDIOS DE CULTIVO	67
2.1. Solucion de sales inorganicas totales de Rodriguez-Valera y col. (1981) al 30% (p/v)	67
2.2. Medios de cultivo liquidos	68
2.3. Medios de cultivo semisolidos	68
2.4. Medios de cultivo solidos	68
3. ESTUDIO DE LISOGENIA	68
3.1. Induccion	68
3.2. Estudio de la actividad de los filtrados	69
3.3. Aislamiento de los bacteriófagos	69
3.4. Obtención de las suspensiones de fagos de alto titulo	70
3.4.1. Método de la doble capa	70
3.4.2. Propagación en medio liquido	70
3.5. Titulación de las suspensiones de fagos	71

4. CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS	71
4.1. Espectro de actividad de los bacteriófagos	71
4.2. Eficacia de la multiplicación frente a las cepas de <i>Deleya halophila</i>	71
4.3. Influencia de la concentración salina del medio en la adsorción	72
4.4. Influencia de los electrolitos en la adsorción	72
4.5. Influencia de la concentración salina en la multiplicación de los bacteriófagos: curvas de multiplicación de un solo paso	72
4.6. Influencia del pH en la viabilidad de los fagos	73
4.7. Efecto de la temperatura en la viabilidad de los bacteriófagos	74
4.8. Influencia de la concentración salina en la viabilidad de los bacteriófagos	74
4.9. Estudio morfológico	74
RESULTADOS	75
1. ESTUDIO DE LISOGENIA	75
2. CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS	81
2.1. Espectro de actividad de los bacteriófagos frente a las cepas de <i>Deleya halophila</i> y otras cepas bacterianas halófilas moderadas y marinas	81
2.2. Eficacia de multiplicación de los bacteriófagos frente a las cepas de <i>Deleya halophila</i>	84
2.3. Influencia de la concentración de sales totales en adsorción	86
2.4. Influencia de los electrolitos en la adsorción	87
2.5. Influencia de la concentración salina en la multiplicación de los bacteriófagos: curvas de multiplicación de un solo paso	93
2.6. Influencia del pH en la viabilidad de los fagos	101

2.7. Influencia de la temperatura en la viabilidad de los bacteriófagos	103
2.8. Influencia de la concentración salina en la viabilidad de los bacteriófagos	107
2.9. Estudio morfológico al microscopio electrónico	111

DISCUSIÓN	114
-----------	-----

CONCLUSIONES	134
--------------	-----

BIBLIOGRAFÍA	135
--------------	-----

INTRODUCCIÓN

1.- INTRODUCCIÓN HISTÓRICA.

1.1.- Descubrimiento de los bacteriófagos.

Los bacteriófagos fueron los últimos virus descubiertos. Los virus de plantas se describieron en 1892 por Ivanowski y en 1897 por Beijerinck. Los virus animales se describen por vez primera, en 1902, por Loeffler y Froesch.

Más de una década después surgió la primera descripción de lo que ahora se conoce como bacteriófagos y una vez más dos nombres aparecieron asociados al descubrimiento: Twort y d'Herelle.

Twort, patólogo del Instituto Brown de Londres, encontró, trabajando con vacunas virales, contaminaciones por micrococcos que, a veces, se encontraban aquejados de una enfermedad (Twort, 1949). Cuando cultivaba estas bacterias en medio sólido aparecían zonas o halos de transparencia. Observó también que el agente causal era filtrable, que mataba a las bacterias y que se autorreplicaba. Sin embargo, aunque lo pensó, se abstuvo de concluir que había encontrado los virus bacterianos. También pensó que podría deberse a una "forma fluida de vida", un enzima co. poder de crecimiento (Twort, 1915).

En 1910, un joven bacteriólogo, d'Herelle, trabajando con unos cocobacilos que producían síntomas gastrointestinales en una plaga de

langostas en México, en 1910, observó que tras aislar al agente causal y sembrarlo en medios sólidos producía halos de aclaramiento de 2-3 mm de diámetro (d'Herelle, 1949). Además, este agente era tan pequeño que podía pasar a través de las bujías de Chamberland. Más tarde, en París estudió una epidemia de disentería. Filtró una emulsión de las heces de los enfermos y añadió una gota del filtrado a un cultivo líquido del bacilo disentérico aislado el primer día. Luego sembró una placa con la mezcla e incubó la placa y el tubo durante toda la noche. Al día siguiente, al abrir la estufa, encontró que el tubo, que la noche anterior estaba turbio, aparecía totalmente transparente y en la placa de agar no había crecimiento. Todas las bacterias habían desaparecido. De pronto comprendió que las placas de lisis eran producidas por un "microbio" filtrable y parásito de bacterias. Además, al ver que el enfermo mejoraba, pensó que lo mismo que había ocurrido en el tubo podría haber pasado en el intestino de su enfermo (d'Herelle, 1917).

Más tarde, Bordet, Premio Nobel de Inmunología, decía que el fenómeno observado por d'Herelle, era una actividad defensiva del organismo. Para Bordet, era más factible la idea de un enzima lítico capaz de autorreproducirse por sí mismo (Bordet y Ciuca, 1921).

Así, como decía d'Herelle, el fago podía estar al estado virulento y era capaz de replicarse y lisar al hospedador. Pero también puede estar al estado atenuado, integrarse en el hospedador y formar parte de su componente genético y, en determinadas circunstancias dar lugar a una progenie vírica sin infección aparente previa; en este caso podría parecer un producto celular, y así es como lo veía Bordet.

1.2.- Investigación básica de los bacteriófagos.

Es difícil determinar con exactitud quién fue el primero en interesarse por las características individuales del fago.

Muller, genético, en 1921, observó que tanto los genes como lo que se conocía como "cuerpos de d'Herelle" eran hereditarios y mutables y sugirió que no había realmente diferencias entre unos y otros (Judson, 1979).

Burnet, en la década de los 30 observó que había muchos tipos de bacteriófagos e inició los experimentos para ver cómo se multiplicaban: el fago se acumulaba primero en el interior de la célula para después salir en un estallido.

Schlesinger midió las dimensiones aproximadas de las partículas de fagos y su masa. También dedujo su composición química, siendo de aproximadamente un 50% de proteínas y un 50% de ADN, una composición similar a la del cromosoma.

Ellis, fue otro de los pioneros y también estudió la cinética de la reproducción del fago, confirmando los resultados de Burnet (Stent, 1963).

Delbruck, físico alemán, estableció definitivamente el modelo de "un paso" (one-step) en el proceso de crecimiento del fago (Judson, 1979). En 1940, viajó a California donde conoció a Luria, un físico italiano, y ambos se interesaron en el estudio de los fagos para poder comprender la naturaleza de los genes. Ellos, junto a Anderson, crearon el núcleo de lo que se conoció como "grupo de fagos". Tuvieron gran éxito y en relativamente pocos años determinaron la composición básica de los fagos y su estructura, así como los factores esenciales de su replicación. El ciclo de multiplicación de un paso de Ellis y Delbruck (1939) demostró que existía un periodo de latencia, una subida y un estallido repentino. También demostraron que había una fase de virus intracelulares que denominaron "fase de eclipse", periodo durante el cual no se pueden detectar fagos infectivos. La base de este periodo de eclipse fue deducida por los experimentos de Hershey y Chase (1952). Doermann (1951) vió que durante el periodo de latencia, en el cual el número de unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml.) no varía porque no hay multiplicación de la bacteria, hay un aumento rápido en el número de fagos intracelulares.

Durante más de media década se pensó que eran las proteínas las sustancias que transportaban la información genética. Pero las experiencias realizadas por Hershey y Chase (1952) concluyeron que el ADN era el portador de la información genética y el único componente necesario para la replicación del fago.

2.- REPLICACIÓN DEL BACTERIOFAGO.

El proceso de multiplicación del bacteriófago se puede desglosar en las siguientes fases:

- adsorción
- separación del ácido nucléico de la cubierta protéica
- expresión y replicación del ácido nucléico
- ensamblaje
- liberación de virus maduros.

2.1.- Adsorción.

La infección de una bacteria por un bacteriófago involucra la interacción del fago y del hospedador en una serie de hechos que comienzan con la adsorción del fago y finalizan con la liberación de una progenie infecciosa (Sinha, 1980). Dicha adsorción ocurre por interacción con un receptor específico, que varía enormemente en número y tipo, que debe ser accesible al fago y, por tanto, estar asociado a las estructuras más externas de la célula bacteriana (Lindberg, 1973).

La producción de fagos puede bloquearse por mutaciones en el hospedador o en el fago. Existen mutantes resistentes que han perdido sus receptores y bloquean el proceso de adsorción (Adams, 1959).

La fase de adsorción es bastante compleja y en ella pueden distinguirse tres etapas:

- contacto inicial
- unión reversible
- unión irreversible.

El contacto inicial está favorecido por el movimiento de las bacterias y del fago en medio líquido, viéndose facilitado por la agitación del medio de cultivo en donde se realiza el proceso. La unión reversible se debe a la asociación del virus con cualquier estructura de la célula, unidos de forma no específica por fuerzas electrostáti-

cas. Esta unión inespecífica está seguida por la aparición de uniones específicas a la superficie celular que pueden coincidir o no con los receptores de la unión irreversible.

Se ha observado en fagos que poseen fibras en la cola, como T4 de *E. coli*, que éstas le sirven de anclaje para la unión a la superficie celular (Goldberg, 1983).

Bayer (1968a), al obtener células de *E. coli* al estado plasmolizado, reveló que había áreas en las cuales la membrana citoplasmática estaba íntimamente asociada a la membrana externa, mientras que el protoplasto estaba contraído. Había entre 200 y 400 de estos lugares de adhesión por bacteria y este número coincidía en magnitud con el de receptores de bacteriófagos (Bayer, 1968b); se sabía también que cuando los bacteriófagos T1 a T7 se adsorbían a *E. coli*, se veían adosados casi exclusivamente a estas áreas. Se sugirió un modelo en el que cada una de las áreas de adhesión podía considerarse como una región que contuviera diferentes receptores ordenados y que constituyeran los requerimientos de adsorción de cada fago al cual la célula hospedadora era susceptible.

En un estudio posterior sobre la morfología y cinética de la interacción entre *E. coli* y el fago X174 (Bayer y Starkey, 1972), se vió que el 74% de las partículas de fago adsorbidas se situaban sobre áreas de adhesión de las membranas. Estas áreas podían ocupar un 5-6% de la superficie total bacteriana. Proponían un modelo en el que el fago se adsorbe a la célula por contacto, pero es capaz de moverse lateralmente por un proceso de "caminar al azar" sobre la superficie celular hasta alcanzar un lugar de adhesión, donde su material genético pueda inyectarse fácilmente en el citoplasma de la célula hospedadora.

Cole y Smith (1982), estudiando el fago pH11 activo frente a *Proteus mirabilis*, sugerían que había menos lugares de adhesión activos sobre células invasoras que sobre células no invasoras. Se sabe que las células invasoras tienen una actividad metabólica más baja que las no invasoras (Armitage, 1981); el nivel metabólico en células invasoras posiblemente no es suficiente para poder soportar el crecimiento bacteriano y así los lugares de adhesión podrían estar en menor número con el fin de que las células no perdieran su actividad. El incremento de la función metabólica que aparece al final de la fase in-

vasora aumenta de forma casi explosiva el número de receptores en la membrana.

2.2.- Separación del ácido nucléico de la cubierta protéica.

Parece ser que la unión irreversible del fago a la bacteria origina un cambio conformacional en la cubierta del fago que permite la liberación del ácido nucléico a un lugar donde pueda fácilmente entrar dentro de la célula. Así, el ADN de T4 se coloca fuera del citoplasma y posteriormente penetra (Anderson y Eigner, 1971).

Algunos componentes de la cubierta proteica, que quedan expuestos gracias a la contracción de la cola y a los cambios conformacionales derivados de la infección, causan modificaciones en la membrana celular que permiten la entrada del ácido nucléico.

Aunque no hay evidencias ni se ha identificado, se especula que la cubierta de los fagos puede contener ciertas proteínas que alteran la membrana citoplasmática, dejando así entrar el ácido nucléico (Wais y Goldberg, 1969).

Las experiencias realizadas con valinomicina en presencia de elevadas concentraciones de potasio se tradujeron en una no captación del ácido nucléico, indicando, pues, que es la alteración del potencial de membrana y no el gradiente de pH, como se pensó en un principio, lo que favorecía o impedía la entrada del ácido nucléico. Esto apoya la hipótesis de que el voltaje a ambos lados de la membrana controla la formación de un poro o canal a través del cual pasaría el ADN del fago T4 (Goldberg, 1983). Por otro lado, tan pronto como sucede la infección, se sintetiza una nueva proteína que imposibilita la entrada de cualquier otro ácido nucléico fágico a través de la membrana celular (Wais y Goldberg, 1969).

2.3.- Expresión y replicación del ácido nucléico.

Tras la entrada del ácido nucléico al interior de una bacteria se presentan dos respuestas: la primera de ellas es una respuesta lí-

tica, que se traduce en la producción de una progenie del fago y una lisis bacteriana. Dicha respuesta suele expresarse en términos de multiplicación (Luria y col., 1978; Stent y Calendar, 1978).

En segundo lugar puede darse una respuesta lisogénica, en la que el fago integra su ácido nucleico en el cromosoma bacteriano y se replica con él sin efecto nocivo sobre la célula (Kornberg, 1980; Luria y col., 1978).

El proceso de multiplicación vírica es un proceso secuencial que comprende muchos pasos y al conjunto de ellos se le denomina ciclo de multiplicación.

Los procesos bioquímicos que suceden en una célula infectada ocurren de un modo altamente controlado y ordenado, de forma progresiva y similar a lo que sucede con todos los procesos de diferenciación celular.

Una vez en el citoplasma bacteriano, parte del ADN fágico se transcribe por la ADN polimerasa celular. Comienzan por transcribirse los genes tempranos inmediatos. Su objetivo principal es tomar posesión de la maquinaria biosintética del hospedador y preparar a la célula para la producción de nuevos fagos. El factor "rho" se encarga de detener dicha transcripción (Luria y col., 1978).

Se observó que el proceso de infección de los fagos T impares era bastante rápido: varios minutos después de la infección se paraliza la síntesis de ARN, ADN y proteínas del hospedador. En cambio, los fagos "fantasmas" de los T impares paraban la biosíntesis de macromoléculas desde el momento en que se unían a la célula, produciendo la muerte celular (Duckworth, 1970). En un principio se intentó comparar ambos mecanismos de acción. Sin embargo, ahora se sabe que son totalmente diferentes: los fagos vacíos o fantasmas matan a la célula de forma muy rápida y sin síntesis de nuevas proteínas, y los fagos completos desarrollan un proceso más lento y requieren la síntesis de proteínas fágicas.

Siguiendo con el proceso de infección, los genes tempranos inmediatos harán que se expresen los genes tempranos, lo cual debe ocurrir antes de que la síntesis de ADN comience. Si el ADN fágico es distinto al del hospedador, ya sea en su composición o en su estructura, será necesaria la síntesis de nuevas enzimas. Además, incluso en

el caso de que ambos ADN no sean muy diferentes, serán necesarios nuevos enzimas para que la replicación del ADN del fago sea más eficiente. El fago tiene una gran facilidad para aumentar la capacidad biosintética en la célula, al mismo tiempo que disminuye la cantidad de ADN necesario. Esto se consigue con el solapamiento de genes y con la utilización de factores del hospedador, ya sean solos o en combinación con nuevas proteínas fágicas (Kornberg, 1980).

Los estudios genéticos llevados a cabo con el fago T4 indicaban que, para la replicación del ADN, se necesitaban más de veinte genes. Unos codificaban los enzimas tempranos y otros codificaban los enzimas necesarios para la polimerización del ADN. Así, se aislaron siete proteínas: una polimerasa; una proteína de unión al ADN de cadena sencilla (mantenía abierta la horquilla de replicación); dos responsables de la síntesis del ARN; tres de ellas se combinan con el ADN desenrollado y producen hidrólisis del ATP con objeto de liberar energía (Nossal y Alberts, 1983).

Los genes tempranos sintetizan al factor "sigma", necesario para que se inicie la transcripción de los genes tardíos. El producto de estos genes tardíos sintetizarán las proteínas estructurales de la cápsida, además de las necesarias para la morfogénesis (Rabussay, 1983). Una de las observaciones más recientes realizadas con los fagos T impares es que la síntesis de proteínas tardías depende totalmente de la síntesis de ADN vírico.

2.4.- Ensamblaje.

Los componentes de los fagos T impares se sintetizan de forma separada: cabeza, cola y fibras de la cola, y luego se ensamblan, originando el fago maduro (Kornberg, 1980). El proceso de autoensamblado es dirigido por el producto de ciertos genes víricos llamados morfopépticos. Estos dirigen, por ejemplo, la colocación de capsómeros especiales para formar los vértices de las cadenas poliédricas. La mutación de estos genes alteran la asociación de capsómeros formando estructuras estrafalarias como policabezas o polivainas.

2.5.- Liberación de las partículas de fagos maduros.

Finalmente, con la liberación de las partículas de fagos maduros se completa el ciclo lítico, y requiere normalmente dos tipos de acontecimientos: la hidrólisis del glicopéptido o mureína y un daño o alteración de la membrana citoplasmática. En los fagos T4 se observa que la lisis está precedida de una repentina parada de la respiración. El glicopéptido se hidroliza por la lisozima de T4 y una endolisina hidroliza los puentes cruzados de la mureína (Mathews y col., 1983).

2.6.- Inhibición de la replicación del fago.

El conocer cómo interaccionan los fagos entre si y con otros elementos extracromosómicos es de suma importancia en la comprensión de la ecología del bacteriófago.

Tanto los fagos atenuados como los virulentos inhiben la superinfección por fagos homólogos o heterólogos, dando lugar a lo que a menudo se conoce como "exclusión mutua" (Hausman, 1973).

También los plásmidos pueden inhibir la replicación de una amplia variedad de fagos.

Los mecanismos para prevenir la infección incluyen la inducción de inmunidad, la alteración de la superficie celular para producir resistencia (e incapacidad de adsorber), "exclusión" del ADN superinfectante, restricción endonucleótica del ADN, e infección abortiva (Duckworth y col., 1981).

2.6.1.- Inducción de inmunidad.

Los fagos atenuados pueden inhibir al fago homólogo induciendo inmunidad en su hospedador. En las células lisogénicas no se transcribe ninguno de los genes necesarios para la infección virulenta productiva. En cambio, un gen represor produce un producto que se enlaza al ADN del profago y previene la transcripción de la mayoría de los genes virales. Si una célula lisogenizada se infecta por otro fago ho-

mólogo, se reprime todo el ADN y no se puede iniciar un ciclo de desarrollo productivo. Las células lisogenizadas son así inmunes (Hershey, 1971; Kornberg, 1980; Luria y col., 1978). La replicación de fagos que no son totalmente homólogos también puede verse afectada si contienen una región homóloga de inmunidad.

2.6.2.- Alteración de la superficie celular.

El cambio de la superficie celular de un hospedador por lisogenización se vió por vez primera en *Salmonella anatum* que, clasificada antigénicamente como tipo O:3,10, al ser lisogenizada por el fago ϵ 15, pasaba al tipo O:3,15, o *Salmonella newington* (Uetake y col., 1958).

2.6.3.- Exclusión del ADN superinfectante.

Cuando se infecta *E. coli* por el fago virulento T5, sus receptores de superficie cambian de modo que no pueden unirse a nuevos T5 (Dun y Duckworth, 1977). Este es un ejemplo de un fago virulento que inhibe la infección por fagos homólogos.

2.6.4.- Restricción endonucleótica del ADN.

La restricción es aquel proceso en el cual el ADN "invasor" es destruido por endonucleasas celulares (Arber, 1965). El fenómeno se refiere generalmente a casos en los que el ADN, no modificado o no metilado, se hidroliza por endonucleasas de restricción (Nathans y Smith, 1975).

2.6.5.- Infección abortiva.

Las infecciones abortivas, por otro lado, parecen ser un modo mediante el cual los fagos lisogenizados pueden inhibir específicamente la replicación de fagos virulentos. Se han estudiado muchos casos

de infecciones abortivas por elementos extracromosómicos, plásmidos o fagos lisogenizados (Duckworth y col., 1981).

Aunque muchos de los mecanismos no están claros, una cosa sí es cierta; las interacciones entre fagos virulentos y otros elementos extracromosómicos son muy comunes y una importante parte del ciclo de vida de estas entidades subcelulares (Duckworth y col., 1981).

3.- CURVA DE MULTIPLICACIÓN.

Para seguir la cinética de dicho proceso se requiere una alta cantidad de bacterias y fagos para que la infección sea sincrónica. Debe, además, seleccionarse cuidadosamente una multiplicidad de infección para que haya una buena proporción de células productivas infectadas, identificadas como centros infecciosos, es decir, capaces de producir un halo de inhibición en los ensayos del virus (Adams, 1959).

Curva de multiplicación de un sólo paso.

Es la referida a un sólo ciclo de multiplicación vírica. En ella podemos distinguir los siguientes estadios:

- período de latencia: en él, la progenie vírica se va acumulando intracelularmente. Su final ocurre en el momento en que se liberan fagos "hijos" al medio.
- período de crecimiento: durante este período va acumulándose la concentración de fago extracelular hasta hacerse constante. En el momento en que deja de aumentar, puede decirse que se ha completado el ciclo de multiplicación. El número de unidades infecciosas de virus por célula productiva, presente en ese momento, es el rendimiento vírico o tamaño de la explosión.

4.- EL "POOL" GENÉTICO.

Los investigadores que iniciaron los estudios sobre los bacteriófagos, a finales de 1930, reconocieron que los ensayos en genética

debían realizarse sobre los organismos más simples, y así determinar las bases moleculares de los más complejos (Twort, 1949).

Para este propósito, los fagos ofrecen algunas ventajas; aproximadamente la mitad de su masa total es material genético, pueden conseguirse poblaciones mucho mayores que en el caso de bacterias y el número de genes es mucho menor que en las células (Okazaki y col., 1968).

En las dos últimas décadas, el desarrollo de la genética de bacteriófagos ha sido excepcional, contribuyendo a la aparición de la genética molecular. Se han conseguido muchos progresos mediante el estudio de mutantes, el uso de la hibridación del ácido nucleico y las endonucleasas de restricción (Epstein y col., 1963; Gussin y Peterson, 1972; Nathans y Smith, 1975).

Al ser los fagos haploides, las mutaciones que afecten a muchos genes serían letales para el mismo, pues perdería su capacidad de replicarse y propagarse.

En los primeros estudios en genética de bacteriófagos se utilizaron los mutantes que producen halos de morfología alterada (mutantes halo), ya que podían detectarse fácilmente con sólo inspeccionar las placas. Sin embargo, el empleo de dichos mutantes no permitía el uso de técnicas selectivas, dejando parte del mapa sin cartografiar. Por ello, en la actualidad, se recurre a los mutantes letales condicionales. Estos pueden afectar a un gen cualquiera y, gracias a ellos se ha ido conociendo el mapa genético de los bacteriófagos (Gussin y Peterson, 1972). Así, pues, los dos tipos de mutaciones más interesantes son las de tipo halo y las letales condicionales.

Los genes de los fagos están organizados en bloques con funciones relacionadas. El genoma se representa de forma circular porque dentro de las células y durante la transcripción el ADN vírico se encuentra de esta forma.

Para un fago determinado, podemos encontrar otros fagos relacionados con él atendiendo al criterio de homología de sus ADN o a la capacidad de producir recombinantes. Los mapas genéticos de todos estos fagos son muy similares, con genes análogos en posiciones paracidas. Pero ocurre que, entre fagos de especies diferentes, como son los

fagos P21 y P22 y el fago λ , las regiones de inmunidad son muy similares entre los dos primeros, mientras que difieren bastante de aquellas de λ ; sin embargo, los genes de la cola de λ y de P21 son homólogos entre ellos, aunque diferentes de los de P22. Hechos como éstos, llevaron a Hershey (1971) a concluir que los diferentes fagos relacionados con λ se originaron por recombinación entre otras razas de fagos.

Los recombinantes naturales se llegan a producir bajo dos circunstancias: por infección mixta de una única célula con dos tipos de fagos, o por superinfección con un fago en células que transportan un profago o un profago defectivo (Campbell, 1981).

En algunos casos, las secuencias de ADN indicaban claramente que, donde están entremezclados segmentos homólogos y heterólogos, los segmentos homólogos podían ser de un origen común bastante reciente. Entre estos segmentos se incluían los operones de integración de los fagos λ y 434 (Benedik y col. 1983), los genes *ral* de λ y 21 (Franklin, 1985) y los genes *ninR* de λ y P22 (Backhaus y Petri, 1984).

Como mencionábamos anteriormente, el fago 21 era muy similar al fago P22 (y diferente de λ) en su represor y genes *cro*, y muy similar a λ (y distinto de P22) en sus genes de la cola. Esta marcada relación indica una recombinación de origen.

La explicación más simple es que muchos de los fagos análogos a λ que se han estudiado están relacionados por recombinación genética. Debido a que muchos fagos son muy similares o idénticos en algunos segmentos de sus genomas, tal recombinación pudiera haber ocurrido muy recientemente. Además, al haber múltiples ejemplos donde se indica este hecho, la recombinación natural entre estos fagos debe tener lugar con bastante frecuencia (Campbell, 1981).

5.- LISOGENIA.

Los fagos en la naturaleza se pueden presentar al estado virulento, es decir, se multiplican vegetativamente y destruyen a las células al final del ciclo de crecimiento. Por el contrario, los fagos atenuados, además de multiplicarse vegetativamente, dan lugar al fenómeno de la lisogenia.

La lisogenia ha desempeñado un papel fundamental en el estudio de los bacteriófagos. Etimológicamente significa "producción de lisis" y es una propiedad hereditaria que poseen algunas cepas bacterianas gracias a la cual son capaces de producir bacteriófagos sin la infección previa con partículas externas. Las bacterias lisogénicas poseen y transmiten a su progenie la capacidad de producir bacteriófagos.

Dicha capacidad, sin lisis evidente del cultivo, no se aclaró bien hasta que Lwoff (1953) aisló las células bacterianas en microgotas, demostrando que el fago se produce por una pequeña proporción de las células que, al lisarse, lo liberan de una manera explosiva. Las otras células del cultivo que no causan una infección productiva, son inmunes al fago liberado.

Así, algunos investigadores encontraron que los filtrados obtenidos de cultivos bacterianos aislados de la naturaleza, a menudo contenían fagos, que lisaban a otras cepas de la misma especie o de especies estrechamente relacionadas (Adams, 1959).

En el estado lisogénico cada célula puede potencialmente producir fagos, y tras sucesivos aislamientos o tras exposición durante un tiempo prolongado a sueros antifagos, cada bacteria originará cultivos que contienen bacteriófagos. Al fago en este estado es a lo que se le denomina fago atenuado.

Una cepa se considera, por tanto, lisogénica si, en aislamientos repetidos, sus cultivos o sus filtrados forman placas de lisis de forma regular cuando se siembran sobre la cepa indicadora.

Obviamente, el carácter lisogénico sólo se detectará cuando se utilice la cepa bacteriana indicadora adecuada. Por otro lado, la mayoría de las cepas lisogénicas poseen tal carácter frente a varios fagos distintos pudiendo incluso, una misma cepa bacteriana liberar hasta cinco tipos diferentes de fagos (Adams, 1959).

La lisogenia parece estar ampliamente extendida en la naturaleza (Lowrie, 1974; Reyrolle y col., 1982; Sell y col., 1983), hasta el punto de que no puede decirse que una cepa bacteriana no sea lisogénica, sino que no se ha detectado dicha propiedad en la cepa estudiada.

5.1.- El profago.

En la lisogenia, el fago no infeccioso, al que se denomina profago, es un virus completo que se encuentra en un estado especial de gran estabilidad. El mantenimiento del profago requiere la producción del represor, el cual se sintetiza por la célula inmediatamente después de la entrada del fago y, es el que se encarga de bloquear la transcripción de dos operones del fago que contienen genes esenciales para el crecimiento lítico (Herskowitz y Hagen, 1980). En determinadas circunstancias, el represor puede inactivarse y el profago se escinde del cromosoma, originando una respuesta lítica idéntica a la que originan los fagos virulentos. El fago atenuado puede después originar ambas respuestas (Hershey, 1971; Kornberg, 1980; Stent y Calendar, 1978).

Los fagos liberados por bacterias lisogénicas son capaces de establecer nuevos sistemas de lisogenia cuando infectan células sensibles de la cepa indicadora.

Estos fagos atenuados o temperados reestablecen la lisogenia por un proceso al que se le denomina lisogenización. Los clones lisogénicos producidos en el laboratorio no se diferencian de los aislados en la naturaleza.

El fago liberado por la bacteria lisogenizada permanece idéntico al fago usado para la infección inicial. La lisogenización es, por ello, específica y, después de la misma cada célula de la progenie transporta de algún modo la información genética necesaria para la biosíntesis de un tipo de partícula de fago. Sin embargo, el fago no se mantiene como tal en el interior de la bacteria lisogénica, sino en forma de unidades no infectivas (Stent y Calendar, 1978). Cada individuo de una población lisogénica posee, al menos, una de esas unidades a las que se había denominado profago (Adams, 1959).

En el estado de profago, el bacteriófago se multiplica en la bacteria lisogénica sin destruirla, distinguiéndose así del estado vegetativo, el cual se encamina a la producción de partículas de fago maduras y a la lisis de la célula (Adams, 1959).

La lisogenización podríamos definirla así como el proceso que convierte el material genético de los fagos en reposo en profago.

La multiplicación del fago en bacterias lisogénicas comienza con la transmisión desde el estado de profago al estado vegetativo y termina con la lisis de la célula.

De este modo, los fagos atenuados pueden encontrarse en tres formas diferentes: a) *Estado de profago*, en el cual el fago se multiplica como una unidad no infecciosa en perfecta coordinación con la división de la célula hospedadora. b) *Estado vegetativo*, en el que el material genético del fago se multiplica de forma independiente. c) *Estado infeccioso*, que se corresponde con el último estadio, en el cual la partícula vírica está completa y se libera al medio externo tras la lisis celular.

Una vez adquirido, el carácter lisogénico es generalmente estable y, aunque se han descrito para algunas cepas pérdida espontánea de lisogenia, parece ser tan estable como cualquier otro carácter hereditario (Hershey, 1971). La estabilidad del carácter lisogénico indica la transmisión del profago a ambas células hijas en cada división bacteriana (Lwoff, 1953).

Los análisis por cruzamiento entre bacterias lisogénicas y no lisogénicas (Drexler y Christensen, 1979) así como experiencias de transducción (Borchert y Drexler, 1980; Liebeschuetz y Ritchie, 1986), indican que el profago está localizado en un lugar determinado del cromosoma bacteriano y constituye la base determinante de lisogenia, de forma que dos tipos diferentes de profagos tendrán distintas localizaciones y cada uno ocupa un lugar específico.

De esta forma se puede definir a la bacteria lisogénica como aquella que posee el material genético del fago localizado en un lugar específico del cromosoma y ambas estructuras integradas se replican como un todo.

5.2.- El proceso de lisogenización.

Ante la infección con un fago atenuado, una bacteria sensible puede responder de dos maneras alternativas: en una cierta fracción de la población el fago infectante penetra, en estado de fago vegetativo,

lisa a la bacteria y se liberan partículas de fago. Esta es la llamada respuesta productiva. En la otra fracción el fago penetra al estado de profago, la bacteria sobrevive y da lugar a una progenie que contiene bacterias lisogénicas. Es la llamada respuesta lisogénica (Rosner, 1972). La frecuencia relativa con la cual estas dos respuestas ocurren depende en ambos casos de las condiciones de infección y de la constitución genética del fago.

Para un fago atenuado dado la frecuencia de lisogenización puede modificarse drásticamente variando las condiciones de la infección y, dependen, sobretodo, del sistema fago-bacteria que se esté estudiando. Así, en la respuesta de acción de un fago sobre *Shigella dysenteriae*, 90% de las células infectadas dan una respuesta productiva cuando se incuban a 37°C después de la infección, mientras que hay un 80% de respuesta lisogénica si se incuban a 20°C (Bertani y Nice, 1954). En un fago de *Salmonella typhimurium*, el tipo de respuesta dependía de la multiplicidad de infección; cuando era menor de uno, la mayoría de las bacterias infectadas se lisan y producen fago. Si se aumentaba a diez, aumenta la respuesta lisogénica y alcanza casi un 100% (Adams, 1959). En este mismo sistema, la frecuencia de lisogenización se ve influenciada por tratamientos tales como la falta de nutrientes o adición de antimetabolitos al medio de cultivo (Lwoff, 1953).

Aunque la variabilidad en la respuesta bacteriana a la infección con un fago atenuado dado depende de factores ambientales, la capacidad del fago para lisogenizar está genéticamente controlada (Adams y Luria, 1958).

Se han descrito muchas mutaciones que afectan a varias propiedades de los fagos atenuados, tales como rango de hospedador, tipo de placa, tamaño de placa, etc. Entre estas mutaciones, algunas son de particular interés, ya que afectan a la capacidad de lisogenizar. Las placas de lisis formadas por fagos atenuados son turbias, pues su centro está ocupado por el crecimiento de células lisogénicas. Por el contrario, las placas obtenidas por ciertos mutantes son claras, pues tales fagos son incapaces de lisogenizar, es decir, han perdido el carácter lisogénico (Scott y col., 1977).

5.3.- Producción de fagos por bacterias lisogénicas.

5.3.1.- Producción espontánea.

Un cultivo denso de bacterias lisogénicas contiene partículas de fago libres. Durante la fase exponencial de crecimiento el número de partículas libres de fago se incrementa proporcionalmente con el número de bacterias. Estudiando las bacterias aisladas con un micromanipulador Lwoff (1953) demostró que los fagos no se segregaban por bacterias vivas y en multiplicación, sino que se liberaban por lisis de una pequeña fracción de células bacterianas. En cada generación, una pequeña parte se lisa y libera partículas de fago. Bajo determinadas condiciones, la velocidad de producción, expresada como la probabilidad por bacteria y por generación para producir fago, es constante. Esta velocidad de producción es muy baja para un fago determinado. Para diferentes cepas bacterianas de la misma especie varía enormemente, desde 0,01 a 0,00001 de acuerdo con el tipo de profago transportado. Los factores que determinan la producción de fago en cultivos lisogénicos parece seleccionar al azar el pequeño número de células que se lisan en cada generación (Adams, 1959).

5.3.2.- Inducción.

En algunos sistemas lisogénicos la probabilidad de producción de fagos puede incrementarse próximamente a uno por la exposición de los cultivos a la acción de varios agentes tales como la luz ultravioleta (Clark y col. 1986; Huggins y Sandine, 1977), mitomicina C (Cluzel y col. 1987; Holmes y col., 1981; Liss, 1981; Maüel y Karamata, 1984; Nieves y col., 1981) y nitrosoguanidina (Thomson y Woods, 1974), etc. Una vez expuestos, el crecimiento bacteriano prosigue un tiempo, el correspondiente a una o dos divisiones, dando paso a una lisis masiva y a la liberación de una progenie vírica por la práctica totalidad de las células bacterianas. Este fenómeno, llamado inducción, conduce a comparar la producción de fagos por bacterias lisogénicas y la de bacterias sensibles infectadas con este mismo fago. Las características del desarrollo del fago en ambos sistemas parecen similares, lo

que indica que tras la inducción y tras la infección la multiplicación del fago ocurre en un estado común vegetativo (Lwoff, 1953).

Parece ser un rasgo típico de los fagos atenuados que, tanto tras la inducción de células lisogénicas como tras la infección de células sensibles, el desarrollo del bacteriófago no interfiera inmediatamente en el metabolismo de su hospedador. Se ha observado un periodo de latencia en la célula bacteriana en el que todavía es capaz de sintetizar enzimas propios (Adams, 1959).

Todos los agentes inductores externos afectan a la replicación del ADN por la producción de lesiones en él o por impedir la formación de la horquilla de replicación. Los agentes inductores activan a la proteína Rec A, la cual interacciona con el represor (Clark y col., 1986). Se pensaba que la proteína Rec A cortaba al represor, pero recientes estudios sugieren que "in vivo", el represor puede autocodificarse en un Rec A, iniciándose el proceso lítico (Little, 1984).

La mitomicina C, agente inductor de lisogenia, es un antibiótico antitumoral activo también frente a células bacterianas. En lo que respecta a su modo de acción se ha demostrado que su efecto bactericida es rápido, debiéndose a la inhibición selectiva de la síntesis del ADN, acompañada, en la mayoría de los casos, de una degradación masiva del ADN preexistente, no interfiriendo para nada en la síntesis de ARN y proteínas, de ahí que la bacteria pudiera sufrir aun una o dos divisiones (Gale y col., 1981)

5.4.- Inmunidad.

Las bacterias lisogénicas poseen la propiedad inherente de ser resistentes a la infección por el fago homólogo, es decir, son insensibles al bacteriófago que liberan, si bien pueden adsorberlo. Ante la exposición frente a partículas del fago homólogo, las bacterias lisogénicas sobreviven y el fago superinfectante no se multiplica (Chesney y Scott, 1975). Esta propiedad se llama inmunidad. La inmunidad de las bacterias lisogénicas implica un mecanismo de resistencia a la infección diferente de la incapacidad de adsorción. Se ha demostrado que el material genético de una partícula infectante puede inyectarse dentro

de una bacteria inmune por infección con un mutante del fago homólogo (Scott, 1975).

El material genético del fago que ha penetrado en una bacteria inmune no se multiplica y es expulsado al exterior durante el curso de la multiplicación bacteriana. La inmunidad refleja un impedimento en la multiplicación de fagos homólogos como consecuencia de la presencia del profago (Scott, 1975).

Por regla general, las bacterias que se infectan sucesivamente con dos mutantes atenuados del mismo fago, transportan sólo un tipo de profago. Excepcionalmente el fago infectante puede añadirse al profago original. En este caso se forman bacterias doblemente lisogénicas, y transportan dos profagos relacionados, observándose la recombinación genética entre los dos tipos de profagos (Arber, 1960).

La inmunidad constituye la característica más importante del estado lisogénico y se debe a la represión de ciertos genes del fago (Heilmann y col., 1980). La represión se pone de manifiesto en las células lisogénicas al demostrar la ausencia de ARN mensajero correspondiente a las regiones vegetativas. Estos ARN mensajeros se sustituyen por un ARN mensajero de pequeño tamaño, que transcribe parte de la región reguladora: el operón de la inmunidad. Las células lisogénicas contienen un represor de inmunidad, pero carecen de proteínas vegetativas, justamente al contrario de lo que ocurre en las células inducidas. El represor se corresponde con el gen *ci*, en la región de inmunidad (Baumstark y Scott, 1980). Las mutaciones que alteran al represor impiden la lisogenización, pero permiten el crecimiento vegetativo, produciendo así halos transparentes (Scott y col., 1977).

La inmunidad es altamente específica: incluso fagos estrechamente relacionados forman represores *ci* de diferentes especificidades, y cada fago reconoce exclusivamente al suyo propio. Se ha demostrado que una mutación puntual en un gen represor no cambia su especificidad por la de un fago diferente, incluso por uno muy relacionado. Los recombinantes heteroinmunes, que poseen la mayoría de las propiedades genéticas de un fago, pero la inmunidad de otro, han sido muy útiles en la revelación de los mecanismos de lisogenia (Wandersman y Yarmolinsky, 1977).

5.5.- Lisogenia y genética bacteriana.

La lisogenización de bacterias sensibles con un fago atenuado origina la aparición de dos nuevas propiedades en el hospedador: inmunidad y producción de fagos, las cuales expresan fenotípicamente la presencia de un profago (Adams, 1959). En la mayoría de los casos, estas dos propiedades son las únicas diferencias detectables entre derivados lisogénicos y no lisogénicos de la misma cepa, quienes, por otra parte, exhiben la misma velocidad de crecimiento y las mismas potencialidades bioquímicas (Adams, 1959).

Sin embargo, desde hace muchos años, se ha visto que la lisogenia puede modificar la potencialidad genética de la bacteria hospedadora. Por una parte, en el proceso de transducción, algunos fagos pueden transportar trozos de material genético de origen bacteriano de una bacteria a otra (Okada y Watanabe, 1968; Tyler y Goldberg, 1976). Por otro lado, ocurren alteraciones específicas de las propiedades bacterianas por lisogenización, las cuales parecen estar ligadas al carácter lisogénico, adscrito a la presencia de un profago. Tales alteraciones son fago-específicas y demuestran que, además de conferir capacidad para producir fagos e inmunidad, un profago puede alterar la función del hospedador en una variedad de formas. En el caso de *Corynebacterium diphtheriae*, la mayoría de las cepas toxigénicas son lisogénicas y liberan partículas de fagos que son activos frente a ciertas cepas no toxigénicas. La lisogenización de tales cepas con el fago las hace toxigénicas, y el carácter toxigénico puede pasar de unas cepas a otras por lisogenización (Freeman y Morse, 1952).

Dentro de la transducción podemos distinguir entre transducción generalizada, aquella que transfiere cualquier tipo de genes, y transducción especializada, aquella que transfiere sólo una parte del genoma del hospedador situado cerca del profago.

La transducción de genes bacterianos de una célula a otra por fagos se ha usado extensamente para el establecimiento del cromosoma de la bacteria.

La transducción generalizada se lleva a cabo a partir de una preparación de fagos a título elevado obtenida de la cepa donante, ya

sea por infección litica o bien por inducción de células lisogénicas (Masters, 1985).

La transducción especializada, que transfiere un grupo limitado de genes sólo se produce en el caso de inducción del profago. Los genes transducidos se incorporan en el genoma del fago por escisión anormal del profago (Rosner, 1975).

La relación evolutiva entre bacterias y fagos probablemente está basada en intercambios entre sus respectivos ADN. Un ejemplo de dicha relación lo muestran los profagos, que una vez insertados en el cromosoma bacteriano actúan como genes celulares en la replicación. Además, algunos profagos contienen genes que afectan a las propiedades celulares. El fenómeno de la transducción muestra la relación inversa, es decir, la incorporación del ADN bacteriano en el ADN del fago, donde actúa como vírico en la replicación y en la regulación (Masters, 1985). Una vez que los genes víricos y celulares se insertan en el ADN de un nuevo hospedador, podrían permanecer allí y evolucionar después hasta que desarrollasen una función que fuese útil para el hospedador.

Los profagos altamente defectivos podrían ser intermediarios en la evolución de los genes víricos a bacterianos; y, al contrario, los fagos transductores portadores de genes bacterianos, podrían ser los intermediarios en la evolución de bacterias a genes víricos. Por lo tanto, la herencia de bacterias y fagos es mixta: gran parte del genoma bacteriano puede ser de origen vírico; y los fagos pueden ser fragmentos de ADN bacteriano que han evolucionado en la dirección de la autonomía (Zillig y col., 1986).

6.- PSEUDOLISOGENIA.

La pseudolisogenia, también llamada estado transportador, fue descrita por Lwoff (1953) como una mezcla de bacterias y bacteriófagos en mayor o menor estado de equilibrio, en la que el fago se multiplica en una fracción de la población bacteriana (Barksdale, 1974).

Los mecanismos que conducen a la pseudolisogenia podrían resumirse en tres (Barksdale, 1974):

- 1) Infección del fago limitada por los receptores bacterianos. Las bacterias que poseen pocos receptores por célula limitan la probabilidad de infección. Algunos fagos se multiplican sólo a expensas de una fracción de la población bacteriana.
- 2) Pérdida de receptores debido a la acción de endolisinas. La pérdida de receptores para fagos llevan a la protección de algunas bacterias y se establece un eventual equilibrio entre crecimiento de la bacteria y del fago (Keller y Traub, 1974).
- 3) Pseudolisogenia debida a mutación del fago. Un cultivo bacteriano Bac(ϕ), lisogénico para un fago atenuado ϕ^* , es inmune a la superinfección con partículas de ϕ^* presentes en el medio. Sin embargo, el profago ϕ puede mutar a ϕ^{**} , que lisa a la población bacteriana. La replicación de ϕ^{**} trae consigo una infección viral persistente o pseudolisogenia en el cultivo bacteriano.

Los cultivos pseudolisogénicos, a diferencia de las verdaderas cepas lisogénicas, se pueden curar del fago por sucesivos reaislamientos o tras múltiples pasadas por sueros antifagos (Adams, 1959).

Las cepas bacterianas que exhiben el estado pseudolisogénico se detectan observando la aparición espontánea de placas de lisis cuando se cultivan sobre un medio de cultivo apropiado (Grange, 1975).

7.- BACTERIOCINAS.

Las bacteriocinas se definen como un grupo de proteínas que son producidas por ciertas bacterias y que tienen una acción letal sobre otras cepas de la misma familia u otras taxonómicamente emparentadas. Gratia, en 1925, observó que el sobrenadante de un cultivo de una cepa de *E. coli*, a la que denominó *E. coli* V por su virulencia, podía inhibir un cultivo de otra cepa de esta misma especie. A partir de esta observación se descubrieron y estudiaron las colicinas y, posteriormente, las bacteriocinas en general.

Las bacteriocinas se han comparado, a menudo, con los bacteriófagos (Bradley, 1967). Ambos agentes se adsorben a receptores específicos de la pared celular y matan a la bacteria sensible. En algunos casos, los receptores son comunes para ciertas bacteriocinas y fagos. Tanto bacteria lisogénica como bacteria bacteriocinogénica son inmunes frente a los agentes que ellas producen. La lisogenia y bacteriocinogénica son ambos caracteres potenciales y la producción de los agentes es, a menudo, inducible por algún tipo de tratamiento como irradiación con luz ultravioleta, etc., y es un proceso letal para cada bacteria. Sin embargo, hay una diferencia esencial entre bacteriocinas y bacteriófagos, ya que el fago es reproducible en la bacteria sensible mientras que las bacteriocinas no. Otra diferencia se puede demostrar por la formación de placas de lisis cuando se hacen diluciones a partir de un stock de fagos y se depositan gotas sobre un tapiz bacteriano. La dilución de una preparación de bacteriocinas da una progresiva pérdida de actividad lítica sobre el tapiz bacteriano, pero nunca formación de placas aisladas (Tagg y col., 1976).

Ito y Kageyama (1970) estudiaron la relación existente entre piocinas y el bacteriófago PS3 de *Pseudomonas aeruginosa*. El hecho de que el antisuero frente a la piocina R o R2 pudiera neutralizar la actividad del fago en una considerable extensión, sugería que existirían componentes comunes o muy similares en su estructura, y que éstos podrían residir probablemente en cualquier parte del fago excepto en la cubierta, ya que el antisuero frente a la cubierta de la piocina mostró una eficiente neutralización para las piocinas pero muy pobre o prácticamente ninguna para el fago. Así, pues, el fago PS3 recordaba a las piocinas no sólo morfológica e inmunológicamente, sino también en la especificidad de receptor.

Los mecanismos de acción de la mayoría de las bacteriocinas estudiadas con detalle afectan a la síntesis de proteínas, a la estabilidad del ADN, a cambios de energía o polaridad en la membrana y a la síntesis de lípidos (Reeves, 1979).

8.- TAXONOMÍA DE FAGOS.

La taxonomía de fagos está fundamentalmente basada en las características morfológicas y en la naturaleza del ácido nucléico (Grimont y Grimont, 1981).

El Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV) consideraba la forma, tamaño, estructura, peso, gradiente de densidad y composición del ácido nucléico como los principales criterios de clasificación.

Los dos mayores obstáculos para la taxonomía de fagos son la carencia de una definición operacional de unas especies de fagos y la falta de una colección internacional para la conservación de fagos (Grimont y Grimont, 1981).

Las consecuencias de estos obstáculos son una multiplicidad de descripciones para fagos posiblemente similares y una engorrosa y, a menudo frustante, búsqueda de fagos supervivientes descritos hace años.

Intuitivamente, los clones de fagos derivados de la misma cepa de donde procede el fago podrían pertenecer a las mismas especies. Los miembros de estas especies podrían, entonces, tener genomas homólogos y características antigénicas comunes y otras similitudes moleculares.

Por otra parte, dos fagos morfológicamente similares podrían no pertenecer a las mismas especies si sus ácidos nucléicos no están relacionados (Grimont y Grimont, 1981).

Las mutaciones pueden afectar a la longitud de la cola, al rango de hospedador y, posiblemente, a propiedades serológicas (seroneutralización). Además, las mutaciones, ya sean inserciones o deleciones, pueden alterar también las propiedades y longitud del ADN, pero una gran parte del genoma original permanece intacto para subsistir y ser identificado por hibridación del ADN.

Podría definirse una "especie" de fagos como un grupo de fagos con genoma "significante" relacionado. El término "significante" se definiría sólo cuando se utilicen suficientes datos comparativos (Grimont y Grimont, 1981).

Una "especie" de fagos se define, por tanto, como aquel grupo que presenta alto grado de hibridación del ácido nucléico.

Un único fago puede formar una especie por carencia de un genoma homólogo con especies conocidas.

Un fago puede agruparse mediante el uso de algunas características, como pudieran ser el rango de hospedador, la morfología de los viriones, el ácido nucleico, tipo de infección que producen, morfogénesis, filogenia, serología, sensibilidad a agentes físicos y químicos y propiedades dependientes del hospedador y del ambiente.

8.2.- Familias de virus bacterianos

Atendiendo al tipo de ácido nucleico que poseen y si llevan o no envoltura, los virus bacterianos se clasifican en las siguientes Familias:

1.- ADN bicatenario y desnudos:

Familia *Myoviridae*. - Cola larga y contráctil, con collar, placa basal, espículas y fibras largas. Cápsidas relativamente grandes. Cabeza isométrica o alargada.

Familia *Styloviridae*. - Cola larga no contráctil. Cabeza isométrica.

Familia *Podoviridae*. - Cola corta con fibras cortas y cabeza isométrica.

Familia *Tectiviridae*. - Sin cola. Icosaédricos. Espículas en los vértices. Cápsida doble.

Familia *Corticoviridae*. - Icosaédrica. Con espículas parecidas a cepillos en los vértices. Cápsida con varias capas.

2.- ADN bicatenario y con envoltura:

Familia *Plasmaviridae*.- Redondeados y ligeramente pleomórficos. En secciones se observa un núcleo pequeño, teñido densamente, dentro de la envoltura.

3.- ADN monocatenario y desnudos:

Familia *Inoviridae*.- Los viriones son varillas largas o cortas. Las cápsidas son helicoidales. No tienen envuelta.

Familia *Microviridae*.- Icosaédricos. Tienen 12 capsómeros y espículas como botones en los vértices.

4.- ARN monocatenario y desnudos:

Familia *Leviviridae*.- Viriones icosaédricos y con aproximadamente 32 capsómeros.

5.- ARN bicatenario y con envoltura:

Familia *Cystoviridae*.- Isométricos. Envoltura flexible y cápsida cubica.

9.- ECOLOGÍA DE BACTERIÓFAGOS.

9.1.- Métodos empleados en el estudio de la ecología de los fagos.

Desde el descubrimiento de los bacteriófagos por Twort (1915) y d'Herelle (1917) se han hecho numerosos avances para comprender la replicación y biología molecular de los bacteriófagos. Los fagos se han usado para el tipado de cepas bacterianas e incluso se han propuesto como indicadores de contaminación de aguas por virus humanos (Goyal, 1983; Kott y col., 1974; Singh y Gerba, 1983). Además, son herramientas útiles para examinar los procesos biológicos fundamentales y los mecanismos moleculares de la replicación del ADN, control de la transcripción y recombinación genética. El estudio de la ecología de fagos, sin embargo, no ha recibido gran atención y todavía está en sus comienzos. Una de las razones parece ser la falta de métodos adecuados.

La ecología de fagos puede definirse como la interacción de los fagos con el ambiente y con sus células hospedadoras y los efectos de tales interacciones sobre la composición y productividad de hábitats particulares (Primrose y col., 1982). En general, se han detectado bacteriófagos en ecosistemas donde existe multiplicación bacteriana, por ejemplo en el rumen de bóvidos y ovinos, aguas naturales, factorías de queso, suelo, heces, sedimentos y aguas de alcantarillado (Ewert y Paynter, 1980). Los fagos pueden desempeñar un papel importante en la dinámica genética y demográfica de las poblaciones bacterianas en el medio ambiente. Las inyecciones cruzadas con fagos pueden originar un intercambio genético entre diferentes cepas.

Para estudiar la relación cuantitativa entre el fago y su hospedador, es necesario estudiar la distribución (estacional y espacial), destino y supervivencia del fago en el ambiente. Así, es importante contar con métodos útiles para el aislamiento, enumeración e identificación de fagos en alimentos, agua, suelo, aguas residuales y aire.

En la mayoría de los hábitats los fagos se hallan en tan bajo número que hace que no se puedan detectar por ensayo directo de las muestras. Este hecho se da con especial énfasis en hábitats acuáticos poco polucionados. Por tanto, para detectar la presencia de bacterió-

fagos en aguas o ligeramente o no polucionadas se requiere un enriquecimiento previo.

Haudoroy (1923) fue el primero en investigar la presencia de fagos en agua. Desde entonces, diversos investigadores han intentado evaluar la distribución y estudiar las implicaciones de los fagos encontrados en el ambiente acuático (Bell, 1976; Dhillon y col., 1970; Dhillon y col., 1980; Furuse y col., 1981; Primrose y Day, 1977). Hidakaka (1971) observó que los fagos activos frente a enterobacterias podían aislarse fácilmente de aguas de estuarios polucionados y de aguas costeras, pero no de aguas que estaban alejadas de la contaminación terrestre. De un modo similar, Brown y col. (1978) fueron capaces de aislar fagos de *Arthrobacter* de aguas de ríos sólo cuando éstas se concentraban previamente.

Se han propugnado varios métodos para el aislamiento de bacteriófagos de hábitats acuáticos, que consisten en: cultivo directo, técnicas de enriquecimiento (Seeley y Primrose, 1979), deshidratación o precipitación con polietilenglicol (Padan y Shilo, 1969; Padan y col., 1967; Yamamoto y col., 1970), adsorción a hidroxapatito o polielectrolitos PE-60 (Primrose y Day, 1977; Sorber y col., 1971) y centrifugación diferencial (Metcalf, 1975).

Un método ideal debería ser rápido, barato, que pudiera usarse en el campo y que diera como resultado la obtención de un amplio rango de bacteriófagos. Además, debería poder adaptarse al uso de grandes volúmenes de agua de diferentes procedencias, por ejemplo, agua dulce, agua de estuarios y aguas residuales.

En el método directo, la muestra (sin filtrar o filtrada para eliminar las bacterias) se deposita mediante gotas sobre tapices de varias bacterias. Si el fago está presente en la muestra lizará la cepa bacteriana sensible y producirá una zona clara (placa de lisis) sobre el tapiz bacteriano. La cantidad de muestra ensayada por este procedimiento, obviamente, será pequeña. Por tanto, este método es útil cuando el fago se halla en alto número, lo cual es improbable en la mayoría de las situaciones. Para la detección, el aislamiento y la enumeración de un número bajo de fagos, por tanto, se requieren procedimientos que puedan concentrar grandes volúmenes de agua.

Los fagos se presentan en los hábitats donde se encuentran sus hospedadores. En ecosistemas naturales los fagos pueden afectar a la densidad de población y/o a la actividad de su bacteria hospedadora.

Con objeto de estudiar el papel ecológico de los bacteriófagos, Furuse y col. (1983) analizaron el número de colifagos y de cepas para los colifagos en las heces de individuos sanos y enfermos. Tras sucesivos ensayos, encontraron que los títulos más altos de fagos se presentaban en muestras procedentes de individuos enfermos, mientras que se observaron títulos más bajos en individuos sanos. Además, las muestras de los enfermos contenían fagos virulentos mientras que en individuos normales se encontraron fagos atenuados. Esto se atribuyó al uso de una terapia antibiótica en los enfermos, que destruían así a las bacterias hospedadoras.

La densidad de hospedador también es importante para determinar la extensión de la replicación del fago en la naturaleza. Reaney y Marsh (1973) encontraron altos títulos de fagos en suelo sólo cuando las condiciones eran adecuadas para la proliferación del hospedador. De modo análogo, Anderson (1948) encontró que un fago de *Salmonella typhi* podía replicarse en la naturaleza sólo cuando la concentración bacteriana era mayor o igual a 3×10^4 UFP/ml.

En resumen, para estudiar la ecología de bacteriófagos es esencial conocer la distribución geográfica del fago y la relación cuantitativa de fago-bacteria hospedadora en ecosistemas naturales. También debería conocerse el efecto de las variables ambientales sobre la distribución y fisiología de fago y bacteria. Esto sólo puede llevarse a cabo cuando se disponen de métodos adecuados para el estudio y distribución de fagos.

9.1.1.- *Ensayo de fagos y medios.* El método de la doble capa de Adams (1959) ha sido el más usado para la detección de fagos. Havelaar y Hogeboom (1983) describieron un método con una sola capa de agar que daba unas producciones más altas que las obtenidas con el método de la doble capa. Ambos métodos se basaban en ensayar cantidades de 1 ml.

Kott (1966) ideó un ensayo de número más probable con un límite de detección teórico de 2 UFP/100 ml. En este procedimiento se ensaya-

ron muestras de 65 ml. y los resultados se prorratearon para determinar la cantidad de colifagos en 100 ml. de agua. Grabow y Coubrough (1986) describieron un método directo de ensayo de una única capa de agar para detectar los colifagos en 100 ml. de agua. En este procedimiento, a una muestra de agua de 100 ml se le adicionaba *E. coli* como hospedador y se mezclaba con un medio preparado a base de agar y cationes divalentes, vertiéndose sobre placas Petri de 10-14 cm. de diámetro. La detección límite mínima teórica por este método era de 1 UFP/100 ml.

La adición de ciertos cofactores orgánicos e inorgánicos en los medios de aislamiento de fagos es beneficioso para la adsorción/interacción del sistema fago-hospedador. Anderson (1948) encontró que el colifago T4 requería 2×10^{-4} M de L-triptófano libre para que se produjera un anclaje óptimo a las células. Puck y col. (1951) encontraron que la adición de sulfato magnésico aceleraba la adsorción del fago. De un modo similar, se encontró que el calcio también incrementaba la adsorción a sus hospedadores (Adams, 1959).

Todas las muestras ambientales suelen contener una flora bacteriana indígena que puede interferir con el crecimiento de las bacterias hospedadoras y con el desarrollo y resolución de las placas de lisis sobre los tapices de hospedadores bacterianos (Kennedy y col., 1985). Por tanto, se hace esencial eliminar o inactivar la flora bacteriana en muestras concentradas. Algunos procedimientos que se han empleado en descontaminación incluyen: a) extracción con cloroformo, b) filtración, c) adición de antibióticos al medio de ensayo, y d) uso de medios selectivos.

9.1.2.- Enumeración e identificación de fagos.

Para estudiar la relación parásito-hospedador en el ambiente es necesario detectar la presencia del fago, identificarlo y hacer una estimación cuantitativa de su número. En los estudios con poblaciones de fagos uno se encuentra con la dificultad de que sólo se identifican aquellos que se registran en un ensayo específico, siendo difícil escoger entre las distintas especies de hospedadores las más adecuadas

para el ensayo. Hay muchos métodos para la enumeración e identificación de fagos.

Microscopía electrónica. Hidaka (1971) usó el microscopio electrónico para clasificar los bacteriófagos que se aislaron de agua de mar. Torrella y Morita (1979) mostraron la alta aparición de fagos en aguas de mar en la bahía Yaquina, en Oregón. Para estos estudios no se empleó ninguna técnica de enriquecimiento.

Cuando se utiliza la técnica de microscopía electrónica, los hospedadores no llegan a conocerse y, además, es de un valor limitado cuando se pretenden examinar morfologías no características, como las de los actinofagos. También cabe añadir que la tinción con acetato de uranilo causa artefactos que dificulta la identificación (Ackermann y col., 1974).

Sin embargo, según Ackermann y Nguyen (1983) el microscopio electrónico es adecuado para investigar la ecología de fagos ya que es un método simple y rápido, y útil para estudios de clasificación y ultraestructura de los fagos. Por otro lado, es una técnica cualitativa y no detecta todos los tipos de fagos presentes. Así, en la mayoría de los estudios, se aislaba una única placa, se propagaba y se examinaba al microscopio electrónico. Utilizando una técnica de enriquecimiento, Ackermann y Nguyen (1983) detectaron hasta diez variedades morfológicas de fagos en sedimentos enriquecidos con cultivos bacterianos.

Merece destacar, como desventaja, que es una técnica cualitativa con límites de visualización; por ejemplo, si una muestra contiene 10^6 partículas de fago por ml., no se visualizará al microscopio electrónico. Por otro lado, la naturaleza y el número de cepas indicadoras empleadas afectarán a los resultados.

Sharp (1960) analizó los métodos para estimar el número total de virus en plantas y animales, empleando el microscopio electrónico para la observación directa e identificación de las partículas de virus y desarrolló un rotor especial de centrifuga que permitía la sedimentación de los virus sobre películas de colodión. Estas películas se montaban sobre rejillas y se examinaban al microscopio electrónico.

Ewert y Paynter (1980) describieron una adaptación de este procedimiento para realizar el recuento del número total de fagos en

sistemas acuosos complejos, por ejemplo, aguas residuales. Este procedimiento permitía la cuantificación del número total de fagos independientemente de los hospedadores bacterianos. En esta técnica, se centrifugaban 25 ml. de muestra y se diluía el sobrenadante con glicerol, dejándolo sedimentar sobre una fina capa de agar. Las partículas de virus sedimentadas se recogían del agar y se colocaban en películas o colodión. Se teñían con acetato de uranilo y se examinaba al microscopio electrónico.

9.1.3.- *Rango de hospedador.* La mayoría de los fagos se diferenciaban por su rango de hospedador y tipo de placa. La determinación del espectro de actividad se realiza mediante la colocación de gotas a partir de la muestra sobre un tapiz del cultivo indicador.

La mayoría de los fagos son específicos para una especie; otros pueden infectar especies relacionadas y sólo, en algunos casos, son específicos para una sola cepa (Zaiss, 1981). Debido a la especificidad de hospedador, es necesario usar una amplia gama de hospedadores y que, además, estén creciendo activamente en fase exponencial, ya que la presencia de un gran número de bacterias muertas pueden permitir la adsorción del fago, dando un falso negativo o un bajo recuento de fagos.

Aunque el ensayo de formación de placas es bueno para la cuantificación, no da información concerniente al número total de fagos presentes en muestras que contengan múltiples tipos. Es importante, por tanto, optimizar los factores ambientales (pH, fuerza iónica, temperatura, nutrientes orgánicos) para cada sistema fago-hospedador antes de considerar el ensayo de formación de placas como cuantitativo (Adams, 1959; Anderson, 1957). Debe tenerse en cuenta, sin embargo, que incluso si todos los hospedadores sensibles son los adecuados y se usan como organismos indicadores, la suma de los tipos de fagos individuales ensayados probablemente no representaría el número que realmente existe en el sistema, ya que cada hospedador no sería necesariamente específico de un único tipo de fago. Además, las mutaciones en el hospedador y/o en el fago puede conducir a cambios en las especificidades del rango hospedador.

La mayoría de las cepas bacterianas que han sido objeto de prolongados cultivos en medios de laboratorio son excelentes indicadores para los diferentes tipos de fagos presentes en aguas residuales (Dhillon y col., 1970). Sin embargo, esta propiedad convierte a ciertas cepas bacterianas en inadecuadas para la detección de tipos específicos de fagos.

9.1.4.- *Caracterización de fagos.* Los criterios que han venido usándose para la caracterización de los fagos se describen a continuación:

1.- *Morfología de placas.* Dos fagos diferentes producen distintos tipos de placas. Los fagos virulentos suelen producir placas claras en el centro, mientras que los fagos atenuados producen placas que son turbias en el centro y más o menos claras en la periferia.

2.- *Características lisogénicas.* Un profago se clasifica como inducible por luz ultravioleta si el cultivo irradiado muestra un título más de 10 veces superior al del control (Dhillon y Dhillon, 1976).

La inmunidad al profago y la inmunidad a la superinfección se pueden usar para la caracterización de fagos (Dhillon y col., 1976)

3.- *Morfología del fago.* La estructura de la cabeza, cola y placa final de un fago puede usarse para la clasificación de fagos. La cabeza puede ser hexagonal y la cola contráctil o no. Si es contráctil, puede aparecer estirada o contraída. Además, puede ser larga o corta, delgada, cónica o ligeramente curvada. La placa basal puede presentar espículas o proyecciones lobuladas cortas.

- 4.- Determinación del espectro de actividad. Para determinar el espectro de actividad de un fago aislado, se colocan gotas sobre tapices de varias cepas bacterianas. La formación de placas de lisis o inhibición del crecimiento indica la sensibilidad de ese hospedador particular al fago.

- 5.- Otros criterios. Algunas otras propiedades que pueden usarse para la caracterización de un fago son: sensibilidad al cloroformo, pH y temperatura; actividad presentada tras un determinado tiempo de almacenamiento; curva de multiplicación de un paso; periodo de latencia; tamaño de la progenia virica; propiedades serológicas, y el efecto de variables ambientales, como salinidad, etc, sobre la distribución de fagos.

9.2.- Ecología de los fagos de suelo.

La mayoría de la información de la que disponemos sobre bacteriófagos del ecosistema terrestre es puramente cualitativa y no se sabe prácticamente nada acerca de su ecología. Esto se debe fundamentalmente a las dificultades técnicas que surgen al intentar estudiar los fagos dentro de este ecosistema.

La falta de conocimiento y el hecho de que el suelo sea una buena fuente para el aislamiento de bacteriófagos con los que luego podrán realizarse estudios genéticos, taxonómicos, etc., hace que las especulaciones sobre la distribución y ecología de los fagos sean muy numerosas. En este sentido, algunos autores piensan que los bacteriófagos podrían constituir los elementos genéticos más numerosos en este hábitat, pero quizás, en la mayoría de los casos, integrados en el ADN de la bacteria hospedadora (Reaney y col., 1983).

El estudio de la ecología de los fagos de suelo merece una especial atención, no sólo por la importancia de establecer los conceptos teóricos de la interacción huésped-parásito, sino también por la

influencia que pueden tener los fagos en las transformaciones químicas del suelo, ya sea por lisis de los microorganismos involucrados en estos procesos, ya sea como agente o vector que interviene en los procesos de intercambio de material genético dentro de la población bacteriana (Anderson y May, 1978).

9.2.1.- *Detección de fagos en suelo.*

Para la detección de los bacteriófagos en el suelo pueden considerarse dos técnicas básicas:

Métodos de enriquecimiento.

Demuestran la existencia de una o más partículas de fago en una muestra. Se basan en la incubación de caldos de cultivo más suelo y un inóculo de elevada densidad de la célula hospedadora.

Recuento directo.

Se basa en determinar el número aproximado de partículas viables por peso de suelo.

En general, es difícil el aislamiento de fagos a partir de suelos no tratados nutricionalmente, lo que debe ser un reflejo del bajo número de partículas libres presentes en el suelo. Las causas que pudieran conducir a ello podrían ser una inactividad de la bacteria hospedadora, la adsorción de fagos a partículas del suelo, la inactivación del fago en el suelo o el bajo rendimiento de los procesos de extracción (Lanning y Williams, 1982).

Tanto en los métodos de enriquecimiento como en el de recuento directo, la detección de fagos se hace por lisis de una bacteria hospedadora, no existiendo prácticamente ninguna demostración de la presencia de fagos por observación directa (Williams y Lanning, 1984).

9.2.2.- Estado del bacteriófago en el suelo.

Los fagos pueden encontrarse en el suelo formando asociaciones virulentas o lisogénicas con su hospedador.

Aunque no hay claras evidencias de ello, con frecuencia se han aislado fagos capaces de lisogenizar distintos hospedadores "in vitro", que originan placas turbias y a partir de las cuales se pueden aislar clones bacterianos lisogénicos resistentes a dicho fago. Esto apunta hacia la posibilidad o capacidad del bacteriófago para formar asociaciones lisogénicas en el suelo (Dowding y Hopwood, 1973).

Sin embargo, no existen razones para dudar de la presencia de fagos virulentos libres en el suelo, ya que la mayoría de los aislados son virulentos "in vitro", mostrando en muchos casos actividad frente a distintas bacterias de un mismo género, lo que supone una considerable ventaja para los fagos virulentos en su hábitat natural. Lo contrario ocurre con fagos atenuados, que suelen tener un espectro de actividad más reducido (Stuttard y Dwyer, 1981).

9.2.2.1.- Factores que influyen en la estabilidad de las partículas fágicas en el suelo.

Los bacteriófagos deben permanecer durante periodos prolongados de tiempo como viriones libres, sometidos a las fluctuaciones de los factores ambientales. Se ha observado que los fagos virulentos se adaptan con mayor facilidad a las condiciones ambientales que los fagos atenuados.

Entre los factores que pueden influir sobre los bacteriófagos se han estudiado con mayor o menor profundidad el uso de suelos estériles o no, los coloides presentes en el suelo, el pH y, poco se conoce sobre la influencia que pudieran ejercer otros factores. Así, la pérdida de estabilidad parece mayor en suelos no estériles que en suelos estériles, aunque en un estudio realizado con fagos de *Streptomyces*, éstos mostraron una estabilidad similar en ambos tipos de suelos, sucediendo la inactivación total en un periodo de cinco semanas (Manchester, 1986).

Por otro lado, las experiencias realizadas "in vitro" en el laboratorio pueden conllevar algún tipo de error, pues los fagos en el suelo no se comportarían exactamente igual, ya que se adsorben con relativa facilidad a partículas coloidales en sus hábitats naturales (Reaney y Marsh, 1973). Esta adsorción puede inducir tanto a la protección como a la inactivación del fago. En general, parece ser que los fagos pierden su actividad durante el proceso de elución necesario para la obtención del fago libre una vez adsorbido sobre un sustrato sólido (caolín, montmorillonita, etc.) y sustituidos después o no por distintos cationes (Sykes y Williams, 1978).

En cuanto al pH, los límites extremos de viabilidad parecen encontrarse entre los valores de 4 y 8. Se han observado diferencias de pH entre la superficie de los coloides y el suelo. Los fagos adsorbidos a coloides encuentran un pH más bajo que el del suelo (masa libre), lo que tiene gran importancia en suelos moderadamente ácidos (Sykes y col., 1981).

La información sobre el efecto de la temperatura en suelos es muy limitada. La mayoría de los fagos de suelo probablemente se inactivan a altas temperaturas, que raramente aparecen en estos ambientes. Así, Williams y Lanning (1984), estudiando la estabilidad de un fago de un estreptomiceto, e incubando a temperaturas que iban desde 5 a 40°C, encontró las mayores supervivencias a bajas temperaturas y una total inactivación a 40°C. Sin embargo, una mayor tolerancia a la temperatura se mostraba para los fagos de bacterias termófilas como *Thermoactinomyces*, *Micropolyspora* (Kurup y Heinzen, 1978), y *Bacillus stearothermophilus* (Saunders y Campbell, 1966).

9.2.2.2.- Factores que influyen en la replicación.

Para que un fago pueda replicarse en el suelo necesita encontrarse, adsorberse e infectar a un hospedador metabólicamente activo. Como consecuencia, la distribución de "sitios" capaces de originar un crecimiento bacteriano activo son de suma importancia.

La adsorción del fago-bacteria a sustratos coloidales pueden favorecer este encuentro fortuito. Cuando esto sucede, el desarrollo

del fago dependerá de la influencia de los factores ambientales en las distintas fases del ciclo de multiplicación.

Entre estos factores podemos citar los siguientes:

1.- Disponibilidad de hospedadores activos.

La mayoría de los suelos presentan propiedades oligotróficas para microorganismos quimioorganotrofos y cuando se determina la cinética global de crecimiento aparecen tiempos de generación muy largos. Sin embargo, lo que parece suceder es la aparición de periodos cortos intermitentes de crecimiento relativamente rápido seguidos de letargo, más que periodos prolongados de crecimiento extremadamente lentos (Parkina, 1973).

También, el aporte de energía, en forma de materia orgánica, sucede en el suelo de manera discontinua, tanto en el espacio como en el tiempo. Por ejemplo, el número de bacterias por peso seco de suelo es mucho más elevado en raíces cuyos árboles se encuentran en plena (o al inicio) caída de la hoja, y no parece que exista en el suelo de forma continuada una biomasa activa. Este comportamiento de las bacterias en el suelo (si se acepta) tiene una serie de consecuencias para los fagos (Williams, 1985).

La distribución de los hospedadores no es al azar y la oportunidad para la infección es esporádica, tanto en el tiempo como en el espacio. Así, el fago deberá mimetizar al hospedador con una rápida replicación en periodos de tiempo restringidos y mantener en el medio ambiente un número suficiente de viriones potencialmente infectivos.

La concentración de hospedadores activos en un microhábitat puede incrementar las posibilidades de encuentro en un tiempo reducido. Desgraciadamente, no existen datos concluyentes sobre la distribución de fagos y microhábitats. Sin embargo, lo que sí parece es que los fagos pueden replicarse y mantener su estabilidad durante periodos de tiempo significativamente largos bajo la mayoría de las condiciones ambientales (McLaren, 1973).

2.- Coloides.

El efecto de la adsorción a partículas coloidales sobre la infección y lisis producida por el fago parece ser contradictoria. Así, para algunos estreptomicetos, la adsorción a estos sustratos favorece la interacción fago-bacteria en estos microhábitats (Ruddick y Williams, 1972), mientras que en *E. coli* de sedimentos marinos se observó que quedaba protegida del ataque del fago cuando se adsorbía a montmorillonita y otros materiales coloidales (Roper y Marshall, 1974).

3.- pH.

El efecto del pH se deja notar tanto en el fago como en la bacteria. Además de influir sobre la estabilidad, lo hace también sobre la adsorción, penetración y replicación. La etapa más sensible a la acidez es la infección o replicación temprana, mientras que las últimas fases de la replicación sólo son sensibles a pH extremos (Sykes y col., 1981).

4.- Temperatura.

Aunque sólo las temperaturas extremas son las que influyen en la estabilidad de los fagos libres, los ciclos de replicación son más sensibles, ya que dependen de la actividad metabólica del hospedador.

La mayoría de las bacterias del suelo son mesófilas, es decir, crecen a temperaturas comprendidas entre 25 y 30°C, aunque la temperatura de muchos suelos no alcancen estos valores.

En colifagos se han descrito tres grupos fisiológicos según la temperatura óptima de replicación (Seeley y Primrose, 1980). Sin embargo, esto no ha podido determinarse en suelos.

En general, la temperatura del suelo es mucho más baja que la del óptimo para la replicación, y se concluye que la cantidad de fago está restringida por las temperaturas predominantes en el hábitat.

9.2.3.- Modelo de interacciones fago-bacteria.

Población dinámica.

Intrinsecamente, la abundancia de una especie queda determinada por los recursos disponibles para su crecimiento poblacional. Para el

fago, el primer recurso es la presencia de un hospedador susceptible. Por tanto, a priori, las poblaciones bacterianas y sus fagos deben coexistir a modo de acoplamiento dinámico en el cual las poblaciones bacterianas están de alguna manera reguladas por la abundancia de fagos, mientras el número de fagos está en función de la disponibilidad del hospedador.

La dinámica de esta interacción es un ejemplo claro de la relación "presa-predador" y deben comentarse cuatro características acerca de esta relación.

En primer lugar, las poblaciones de fagos deben contener tanto fagos virulentos como atenuados (Campbell, 1961) y, en ausencia de reducción permanecerán a modo de "banco" de viriones con una menor respuesta al efecto ejercido por los factores ambientales propios del ecosistema terrestre.

En segundo lugar, puede que la sensibilidad del hospedador no sea uniforme; por ejemplo, el grado de adsorción difiere entre las especies. En otros casos, como en los actinomicetos, la sensibilidad del hospedador va a depender de la fase de su ciclo de vida.

En tercer lugar, las poblaciones del hospedador están reguladas por la competición de los recursos abióticos. La influencia y su significado va a depender de la distribución de estos recursos en el espacio y en el tiempo. Cuando hay una renovación constante de este recurso, las poblaciones crecerán hasta que se lo permita la cantidad de dichos recursos. Así, podrán predominar las fases vegetativas o las fases de resistencia.

En cuarto y último lugar, el tiempo de generación en bacterias es muy corto y la respuesta a un posible aumento de los recursos es muy rápida. Sin embargo, el tiempo de desarrollo de las formas filamentosas es considerablemente largo, de ahí la duración de las respuestas a los cambios de nutrientes.

Desde el punto de vista ecológico, la principal cuestión de interés es la que determina la abundancia de fagos y el grado de estabilidad en la asociación fago-bacteria.

En el suelo, la distribución de los recursos es desigual y para un microhábitat determinado es cíclica en el tiempo, por la renovación

y agotamiento de recursos o nutrientes. Así, la población bacteriana es heterogénea: a falta de nutrientes se induce la esporulación. Pero también existen formas vegetativas recién germinadas y formas filamentosas. Estas dos últimas permiten la adsorción del fago y su replicación, lo que dará origen a una liberación de fagos libres, tras la lisis, que incrementará el "banco" de viriones. Estos viriones tendrán una probabilidad determinada de encontrar una unidad adsorbible (Manchester, 1986).

Parece ser que el polimorfismo de los fagos estabiliza su abundancia en hábitats o ambientes con recursos limitados. Se ha hipotetizado que los fagos atenuados tienen ventajas sobre los virulentos, ya que las colonias lisogénicas suponen un ahorro de nutrientes en ambientes pobres; además, la lisogenia supone una adaptación para mantener poblaciones a niveles aptos para el mantenimiento del fago (Stewart y Levin, 1984).

9.3.- Ecología de fagos en aguas dulces.

Debido a que los fagos pueden potencialmente influir en el número de bacterias presentes en un ambiente de agua dulce determinado, sus interacciones con el hospedador son de interés para entender la ecología microbiana.

La mayoría de los trabajos realizados sobre ecología de bacteriófagos en aguas dulces están dirigidos hacia el estudio durante el tratamiento de aguas de consumo (Havelaar y Hogeboom, 1983; Shields y col., 1986). Los estudios realizados para determinar el número de bacteriófagos en aguas residuales y en aguas para consumo se han llevado a cabo mediante el uso del microscopio electrónico (Ackermann y Nguyen, 1983). También, se han realizado estudios para determinar el número de bacteriófagos específicos como serían aquellos que se usan como indicadores de bacterias patógenas que están presentes en aguas de consumo tratadas y no tratadas (Grabow y col., 1984; Stetler, 1984).

Debido a que el nivel de nutrientes y la concentración de bacterias en aguas residuales son generalmente más altos que los encon-

trados en aguas dulces, los niveles de bacteriófagos son también, generalmente, más altos. Por tanto, el uso del microscopio electrónico aplicado para el estudio directo de bacteriófagos en aguas residuales no resulta ser práctico para la mayoría de los ambientes de agua dulce (Ackermann y Nguyen, 1983). Algunos de los procedimientos desarrollados para la obtención de enterovirus humanos a partir de aguas y de otras fuentes ambientales no son útiles para la detección de fagos en aguas dulces, ya que los pH extremos que se alcanzan en estos procedimientos tienden a inactivar a los bacteriófagos y reducir de un modo considerable la eficiencia de detección (Logan y col., 1980; Primrose y col., 1982; Sabitino y Maier, 1980).

Los procedimientos de adsorción-elución que usan filtros cargados positivamente demostraron ser de una gran utilidad para la obtención de una gran variedad de fagos. Estos filtros son capaces de adsorber virus a un pH igual al del ambiente o tras una ligera acidificación. Los virus adsorbidos se eluyen de los filtros con soluciones que contengan sales o detergentes (Goyal y col., 1980). En muchos casos, es suficiente un paso dentro del procedimiento de concentración para detectar a los fagos.

La mayoría de los procedimientos para detectar fagos usan la técnica de la doble capa, la cual permite la detección de fagos viables por su capacidad para formar placas sobre un hospedador susceptible (Adams, 1959). Havelaar y Hogeboom (1984) encontraron que la concentración de iones calcio y magnesio en los medios de cultivo influían en la sensibilidad del ensayo en placa. Primrose y col. (1982, 1983) describieron varios procedimientos para hacer los ensayos en placa específicos para tipos de fagos particulares. Usando indicadores mixtos fueron capaces de enumerar los fagos presentes en un lago eutrófico.

Las bacterias indígenas presentes en un muestra concentrada a partir de una muestra de agua dulce pueden desarrollarse más que la bacteria hospedadora y dificulta los ensayos de fagos. Se podría usar el cloroformo para matar a las bacterias, siempre que estos fagos no

contuvieran lípidos. Sin embargo, Kennedy y col. (1985) encontraron que sembrando las muestras sobre medios selectivos se reducían los problemas de contaminación cuando se usaba *E. coli* como hospedador.

9.3.1.- Distribución de fagos en ambientes de agua dulce.

En la mayoría de los estudios sobre la distribución de fagos en ambientes de agua dulce se ha usado a *E. coli* como bacteria hospedadora. Se han aislado colifagos de numerosos ambientes: lagos, ríos y otros tipos de ambientes de agua dulce en varias partes del mundo, encontrándose cifras de hasta 10^5 partículas por litro.

Para comprender el papel de los bacteriófagos en la ecología de los ambientes de agua dulce se requerirá, como mínimo, el conocimiento del número de bacterias individuales y sus fagos. Logan y col. (1980), Primrose y Day (1977) y Seeley y col. (1979) obtuvieron fagos activos frente a *Aeromonas hydrophila* en varias muestras de agua de río, a una concentración de 10^3 UFP/L. No se determinó la cantidad del hospedador, pero puede servir como indicador del nivel trófico de estos ambientes. Primrose y Day (1977) también obtuvieron fagos activos frente a *Pseudomonas aeruginosa*. Este microorganismo es capaz de metabolizar una amplia variedad de compuestos orgánicos y está ampliamente distribuida en ambientes naturales. Las variaciones en el número de bacterias y sus fagos durante cambios de los niveles nutricionales de las aguas dulces por la polución humana o cambios naturales en los niveles de nutrientes pueden ser también un modelo útil para estudiar la relación fago-hospedador bajo condiciones naturales.

9.3.1.1.- Factores que influyen en la supervivencia y multiplicación de fagos en aguas dulces.

La supervivencia de los bacteriófagos en aguas dulces se ha estudiado usando agua de manantial sembrada con bacteriófagos e incubada bajo condiciones de laboratorio "in situ" usando cámaras de supervivencia (Scheuerman y col., 1987; Yates y col., 1985).

Niemi (1976) estudió la supervivencia del fago T7 en diferentes tipos de aguas incluyendo río, pantano y lago, y concluyó que la temperatura de incubación y el tipo de agua influyó en la supervivencia del fago.

Yates y col. (1985) encontraron que la supervivencia de los virus no estaba correlacionada con el pH, concentración de nitratos, turbidez, etc. de las muestras de agua de manantiales obtenidas. Estos autores encontraron que la temperatura de incubación era la única variable correlacionada con la supervivencia del fago MS2.

Scheuerman y col. (1987) observaron que la velocidad de inactivación del fago MS2 era más baja que la de su bacteria indicadora.

Basado en estos y otros estudios se ha demostrado que son varios los factores que influyen sobre el número y actividades de los bacteriófagos en agua dulce. La densidad, tanto de la bacteria hospedadora como de sus fagos, la asociación de fagos y bacterias con sólidos, la presencia de materia orgánica, especialmente de materia orgánica que influye en la actividad metabólica de la bacteria hospedadora, luz ultravioleta y luz invisible, temperatura, pH, la concentración y tipo de iones y las actividades metabólicas de otros microorganismos presentes además de la bacteria hospedadora, son algunos ejemplos. Los efectos de algunas de estas variables sobre la supervivencia de los fagos se han estudiado con mayor profundidad bajo condiciones de laboratorio que bajo condiciones naturales.

Poco se conoce sobre el efecto de la luz sobre los fagos en agua dulce. Se ha visto que la luz visible puede causar fotooxidación de los virus (Wallis y Melnick, 1965). Al igual que la luz ultravioleta, la ultravioleta cercana afectan a la unión del bacteriófago T7 sobre su hospedador (Hartman y Eisenstark, 1981). Aunque la luz visible, la ultravioleta y la ultravioleta cercana tienen la capacidad de inactivar o alterar la unión de los fagos a las bacterias, no se ha determinado el papel que desempeñan en ambientes de agua dulce.

Los ácidos húmico y fúlvico se presentan de un modo natural en ambientes acuáticos. El ácido húmico influye sobre la unión de los enterovirus a los microporos de los filtros (Sobsey y Hickey, 1985). El ácido fúlvico acompleja a los virus y disminuye su capacidad de adsorción a suelos (Bixby y O'Brien, 1979). Puesto que los ambientes de aguas dulces contienen aguas coloreadas con relativamente altas concentraciones de estos dos ácidos, podría esperarse que estos compuestos influyeran en la unión de los bacteriófagos a los sedimentos y otros sólidos y, posiblemente, a sus bacterias hospedadoras. La presencia de materia orgánica puede también influir en el número de fagos variando la velocidad metabólica de las bacterias hospedadoras.

Anderson (1957) encontró que el título de fagos producido por *Salmonella typhi* en aguas residuales era similar al título obtenido cuando se sembraba en medios de laboratorio. La presencia de ciertos iones metálicos, sobretodo calcio y magnesio, influían en la producción de fagos bajo las condiciones de laboratorio (Havelaar y Hogebom, 1983). La concentración y naturaleza de los iones también influía sobre la adsorción a los microporos de los filtros. Basándose en los estudios de laboratorio, podría esperarse que los iones influyeran en la adsorción de los fagos a sólidos y en la replicación.

Además de la materia orgánica y de los iones inorgánicos, el pH también influye en la adsorción de los bacteriófagos (Gerba, 1984), aunque no se han realizado estudios sobre la influencia del pH en la distribución de bacteriófagos.

Las concentraciones de bacteriófago, y de bacterias hospedadoras son factores importantes en la ecología de fagos en ambientes de aguas dulces. A bajos niveles de bacterias hospedadoras, la probabilidad de un fago para encontrar a su hospedador es reducida y puede que no ocurra una infección productiva. Anderson (1957) concluyó que la replicación del fago no podía ocurrir si la concentración de la bacteria hospedadora (*Salmonella typhi*) era inferior a 3×10^4 partículas por mililitro. A concentraciones más bajas de bacteria, no se podía detectar la multiplicación del fago.

Los estudios realizados sobre el efecto de la temperatura en la adsorción y en la replicación del bacteriófago conducen a resultados interesantes. Anderson (1957) encontró que los títulos más altos de bacteriófagos se producían cuando se incubaba *Salmonella typhi* a 38,5°C, mientras que no se producían fagos si se incubaba a temperatura ambiente, 18-20°C.

Seeley y Primrose (1982) indicaron que los bacteriófagos podían clasificarse por el efecto de la temperatura sobre la eficiencia de la siembra en placa. Estos autores encontraron tres tipos de colifagos: → colifagos LT, cuyo óptimo de temperatura estaba por debajo de 30°C, colifagos MT, con un rango comprendido entre 15 y 42°C y, colifagos HT, en el rango de 25-42° ó 30-45°. Las heces humanas contenían mayoritariamente HT y MT, pero no LT. Las aguas residuales contenían tipos MT y LT. Por el contrario, las aguas del río Swift en Inglaterra contenían pocos fagos del tipo HT y un gran porcentaje de fagos LT. Cuando se usó *Aeromonas hydrophila* como bacteria hospedadora, sólo se aislaron fagos LT. Estos resultados sugerían que los bacteriófagos indígenas en ambientes de aguas dulces eran capaces de replicarse a temperaturas próximas a las del agua. Por el contrario, los fagos introducidos con la polución fecal no podían replicarse a las bajas temperaturas encontradas en algunos ambientes.

Cuando se autoclavaba agua de lago o un agua residual y se añadía con posterioridad un bacteriófago, se observaba poca o ninguna inactivación del fago adicionado tras un periodo de 30 días (Wiggins y Alexander, 1985). En cambio, el título del fago en las mismas muestras no esterilizadas, descendía a menos de un 0,1% de los valores iniciales en un periodo de tiempo análogo. Estos resultados sugieren que la actividad de los microorganismos indígenas era la responsable de la inactivación observada en las muestras no esterilizadas.

9.4.- Ecología de bacteriófagos marinos.

9.4.1.- Introducción histórica.

Poco después de la detección de los bacteriófagos por d'Herelle (1917), numerosos autores, usando bacterias entéricas como hospedadoras, aislaron fagos a partir de aguas cercanas a la costa (ZoBell, 1946). Utilizando estas bacterias no podían detectarse en zonas más alejadas a la costa, por lo que los autores concluyeron explicando que los fagos que se obtuvieron en aguas costeras no eran indígenas del ambiente marino, sino que se transportaban al agua de mar mediante ríos o aguas residuales.

Sin especificar la bacteria hospedadora, ZoBell (1946) detectó, con dificultad, la presencia de bacteriófagos en aguas a lo largo de la costa californiana. La baja frecuencia con la que se aislaban y el bajo número obtenido en los aislamientos que pudieron realizarse, indicaban que los bacteriófagos estaban en bajas concentraciones y aparecían sólo esporádicamente. Además, en ningún caso detectó fagos en aguas alejadas de la costa. De los resultados obtenidos, ZoBell concluyó que, ya que los bacteriófagos se encuentran generalmente asociados a un número elevado de bacterias en multiplicación, y puesto que en el ambiente oceánico las bacterias se encuentran muy esparcidas, los fagos no pueden encontrar a su hospedador y, como consecuencia, no se podrá detectar su actividad.

Kriss y Rukina (1947) estudiaron la formación de placas sobre bacterias aisladas de aguas y sedimentos del Mar Negro. Sus hallazgos, sin embargo, no se aceptaron como una demostración de bacteriófagos marinos, ya que no hicieron ningún intento de aislar el principio causante de la lisis (Spencer, 1960; Wiebe y Liston, 1968). Con posterioridad, Kriss, en 1963, detectó la presencia de fagos, aunque la bacteria hospedadora usada no era típicamente marina.

En 1954 se describió un nuevo sistema fago-hospedador marino cuyo hospedador precisaba una concentración de un 3% de ClNa para el crecimiento óptimo. Este sistema se aisló de cienago en la Bahía de San Francisco, un ambiente estuarino (Smith y Krueger, 1954).

La existencia de bacteriófagos marinos indígenas se demostró finalmente de la mano de Spencer (1955), quien estudió el aislamiento de un fago lítico para una bacteria luminosa marina a partir de una muestra de agua de mar tomada a diez millas de la costa escocesa en el Mar del Norte. Este bacteriófago podía lisar a su hospedador en un medio que contenía 0,5% de ClNa, aunque podía hacerlo también a concentraciones de 2-3% de la misma sal. Asimismo, la lisis tenía lugar cuando se empleaba un medio a base de agua de mar y se incubaba a 0°C.

No obstante, el hallazgo de un bacteriófago marino no generó un apreciable interés y, la siguiente publicación acerca de este tópico no apareció hasta 1960, precisamente por el mismo Spencer. Aunque el número de publicaciones basadas en estudios sobre fagos marinos ha aumentado considerablemente, se trata aún de un ambiente poco explorado.

9.4.2.- Definición de bacteriófagos marinos.

Atendiendo a la naturaleza parásita de los virus, no se puede dar una definición de bacteriófagos marinos sin tener en cuenta a la bacteria hospedadora, y así se hablará siempre de sistemas fago-hospedador. Ambas partes de dicho sistema dependerán de los factores típicos de ambientes marinos, afectándolos con distintos grados de intensidad. Tales factores no van a afectar al fago sólo en su adsorción, infección y replicación, sino que afectarán también a su estabilidad en el estado libre.

Basándose en lo que generalmente se acepta como bacteria marina, apartada de las especies terrestres, Spencer (1955) definió a los bacteriófagos marinos como aquellos cuya capacidad de reproducción y estabilidad dependían de la salinidad y de la temperatura que generalmente se encontraban en estos hábitats. Además, la tolerancia al calor debía ser más baja que la observada en bacteriófagos terrestres, los cuales no suelen estar expuestos a 60°C o más durante cortos períodos de tiempo (10-30 min.).

El primer fago aislado por Spencer (1955), que se inactivaba en 15 min. a 45°C, encajaba perfectamente en esta definición. Sin embargo, con otros fagos aislados con posterioridad, encontró que los de origen

marino diferían enormemente en cuanto a su tolerancia al calor (Spencer, 1963). Uno de estos fagos no se inactivaba totalmente durante 60 min. a 65°C. También observó que la sensibilidad a disolventes orgánicos era un medio para distinguir los fagos marinos de los terrestres. De mayor importancia, tanto fisiológica como ecológica, fueron sus hallazgos concernientes al impacto del ambiente iónico sobre la estabilidad e infectividad de los fagos ensayados (Spencer, 1963).

9.4.3.- *Aparición de bacteriófagos marinos.*

A partir de la información disponible puede concluirse que los bacteriófagos marinos están presentes en aguas marinas y en sedimentos que soportan la vida bacteriana. Como, sin embargo, los fagos marinos parecen estar a muy bajas concentraciones, su detección depende de métodos que, aunque disponibles, pudieran ejercer un injustificado esfuerzo. La falta de métodos apropiados para el aislamiento de sistemas fago-hospedador marinos de ambientes poco habitados por poblaciones bacterianas es una razón que explica, en parte, la falta de conocimiento dentro de este área.

9.4.3.1.- *Cifras de bacteriófagos marinos.*

Casi no existe información sobre el número de partículas de fagos en agua de mar, y apenas nada en lo que respecta a sedimentos marinos. Tal información se obtiene mediante la siembra directa de una muestra o aplicando el método del número más probable. Algunos investigadores han intentado, aunque insatisfactoriamente, aislar fagos por métodos directos, y otros, que si lograron aislarlos, no publicaron sus resultados.

Spencer (1960) encontró cuatro tipos diferentes de fagos en concentraciones que iban desde 1 a 100 unidades formadoras de placas por 10 mililitros de agua del Mar del Norte colectada a diez millas de la costa escocesa. En muestras de agua de mar cerca de Helgoland, en el Mar del Norte también, Moebus observó entre 1 y 3 UFP por ml. activos sobre cinco tipos diferentes de bacterias aisladas, pero no identificadas (datos no publicados). Contrastando a estos resultados, Ahrens

(1971), en el Mar Báltico, encontró alrededor de 25.000 y 36.000 UFP por ml. con dos cepas hospedadoras de *Agrobacterium stellatum*.

9.4.3.2.- Distribución de los bacteriófagos marinos.

La mayor parte de la información sobre la presencia de bacteriófagos en ambientes marinos está basada en el aislamiento vía enriquecimiento de los cultivos. Las muestras se tratan de algún modo para reducir el número de bacterias que colonizan este hábitat de forma natural, para posteriormente inocularlas con una alta cifra de presuntivas bacterias hospedadoras. Las bacterias hospedadoras preferentemente se aíslan de la misma muestra y deben almacenarse durante algún tiempo a baja temperatura.

Hidaka (1977) desarrolló un método, modificado después por Moebus (1980), en el que empleaba básicamente muestras enriquecidas sólo con nutrientes y se incubaban inmediatamente tras su recogida. Las bacterias usadas para detectar a los fagos se aislaban por otro lado a partir de la misma muestra y antes de su enriquecimiento nutricional. Este último método se emplea aún hoy, pero sólo con muestras de aguas oceánicas.

9.4.3.2.1.- Aislamiento a partir de aguas marinas.

Además de los estudios realizados por Spencer (1955, 1960) y Ahrens (1971) encontramos otros casos descritos de sistemas fago-hospedador de cuestionable naturaleza marina. Carlucci y Pramer (1960) hallaron fagos en una muestra tomada a 200 metros de la costa de New Jersey, usando *Serratia marnorubra* como hospedador. Como la actividad lítica del fago no dependía de la presencia de agua de mar en los medios de cultivo, probablemente por ello no los aceptaron como fagos marinos.

Stevenson y Albright (1972) aislaron un sistema fago-hospedador cuyos hospedadores crecían bien entre 5 y 30°C y necesitaban sales marinas por encima de 0,25%, lo cual es una baja concentración salina. No especificaron los requerimientos respectivos de los fagos.

Espejo y Canelo (1968a) aislaron un fago a partir de un agua tomada a una milla de la costa chilena en una bahía con un alto grado de polución. Los requerimientos para el crecimiento de dicho fago, que contenía lípidos en su estructura, no se determinaron, si bien el hos-

pedador precisaba temperaturas por debajo de 30°C y una concentración de ClNa similar a la del agua de mar (1968b).

Kakimoto y Nagatomi (1972) describieron seis sistemas fago-hospedador de la Bahía Kinko, en Japón. Atendiendo a los requerimientos salinos de los hospedadores, cuatro cepas se clasificaron como marinas o halófilas. Todas ellas eran más sensibles a la temperatura que sus fagos, los cuales sobrevivían a 60°C durante un tiempo que no especificaron.

Hidaka (1971, 1973) describió 20 sistemas fago-hospedador aislados de muestras tomadas en la Bahía Kagoshima o en el sur de Kyushu, a 50 metros de profundidad. La mayoría de los fagos sobrevivían bien a 50°C durante 30 minutos, y sólo cuatro de ellos se inactivaban completamente con este tratamiento (Hidaka, 1972). Tres de estas últimas cepas eran sensibles al cloroformo. Para la obtención de todos los fagos se aislaron unas 200 cepas bacterianas, con las que se hicieron un "screening" de sensibilidad a los fagos.

Aproximadamente 630 bacterias se aislaron de agua de mar y de sedimentos en el Mar de Arabia por Chaina (1965), de las cuales 10 eran sensibles a los fagos presentes en las muestras. No quedó especificada la fuente natural de la cual se obtuvieron los sistemas fago-hospedador de aguas o sedimentos. Los fagos permanecían viables durante 30 min. a 50°C pero perdían su actividad a 60°C durante 2-3 min.

Hidaka y col. (1979) tomaron muestras de agua en 14 estaciones a varias profundidades alrededor de las islas Ryukyu y determinaron el número de bacterias heterotróficas por mililitro y de aquellas que mostraron sensibilidad a los fagos presentes en la misma muestra. En aguas tomadas a 50 metros de profundidad, entre un 10 y un 50% de las bacterias eran sensibles a los fagos. Aunque el número de microorganismos heterotrofos era más o menos similar en las muestras tomadas a 50 y a 100 metros, el número de bacterias sensibles en aguas a 100 metros de profundidad era más bajo. Las muestras a 300 metros producían números más bajos de heterotrofos, y sólo se observaron muy pocos sistemas fago-hospedador. El número de fagos diferentes obtenidos en 250 ml. de agua de mar iban de 1 a 16, de 1 a 7, y de 1 a 3 en las muestras tomadas a 50, 100 y 300 metros de profundidad respectivamente.

Finalmente, aparecen dos estudios que detallan el aislamiento de sistemas fago-hospedador de ambientes oceánicos abiertos. Hidaka (1977) tomó agua a cinco profundidades diferentes entre 1 y 300 metros en 13 estaciones en el suroeste del Pacífico. De las 576 bacterias aisladas 72 eran susceptibles a los fagos. Se encontraron sistemas fago-hospedador en todas las estaciones hasta 50 metros. A 50 m. encontraron mayor diversidad de sistemas que en las muestras tomadas a 1 ó 3 m. por debajo de la superficie. En siete muestras tomadas a 200 m. sólo encontraron un sistema fago-hospedador, y ninguno en las tomas de agua a 300 m.

Moebus (1980) colectó agua a 6 m. de profundidad en 48 estaciones entre los bancos de arena del continente europeo y el Mar de los Sargazos. En 42 de las muestras se encontraron sistemas fago-hospedador y 258 fagos fueron activos frente a 213 cepas de las 931 aisladas. Los detallados estudios que se hicieron sobre modelos de sensibilidad de las bacterias frente a los fagos, revelaron que 326 de las 733 cepas probadas eran sensibles a uno o a varios fagos. De las 326 bacterias sensibles, 250 diferían unas de otras por sus distintos modelos de sensibilidad, mientras que 241 de los 258 fagos se diferenciaban por sus rangos de hospedador. Casi todas las bacterias se clasificaron como marinas (Moebus y Nattkemper, 1983).

9.4.3.2.2. - Aislamiento a partir de sedimentos marinos.

Hidaka (1973) aisló un sistema fago-hospedador de lodos de la Bahía de Kagoshima a 230 m. de profundidad, que más tarde se describió con detalle por Hidaka y Shirahama (1974). Wiebe y Liston (1968) describieron un sistema fago-hospedador aislado de sedimentos del Pacífico Norte a 825 m. de profundidad. Johnson (1968) aisló un fago a partir de sedimentos del Océano Índico tomados a más de 3000 m. de profundidad.

Zachary (1974) examinó muestras de lodos de marismas saladas, tomadas en la zona entre mareas en varios lugares a lo largo de la costa este y sur de los Estados Unidos, con objeto de detectar fagos activos frente a *Vibrio (Beneckea) natriegens*. Aparecían fagos con diversa morfología en casi todas las muestras cuya salinidad excedía de un 8%. Se estudiaron dos fagos con detalle y se observó que diferían considerablemente en la sensibilidad a la temperatura (Zachary 1976, 1978).

Finalmente, debemos mencionar el sistema fago-hospedador aislado por Keynan y col. (1974), aunque la fuente del fago no se conoce. La actividad del fago decrecía un 50% tras la exposición a 62°C durante 18 minutos.

9.4.3.2.3.- Información adicional sobre bacteriófagos marinos.

Recientemente las partículas fágicas y análogas se han observado al microscopio electrónico. Johnson y Sieburth (1978) obtuvieron partículas de fagos a partir de estuarios, bancos de arena y de aguas de océano abierto, cuya cifra más alta se presentaba en aguas de estuarios. Torrella y Morita (1979), de sus observaciones hechas en la Bahía Yaquina, en Oregon, estimaron que podría encontrarse un número de fagos del orden de 10^3 a más de 10^4 por ml. dependiendo del lugar de donde se tomara la muestra. Las observaciones de esta clase no proporcionan información de la naturaleza de los fagos.

Delisle y Levin (1969a, 1969b, 1972a, 1972b) estudiaron el aislamiento de fagos activos frente a *Pseudomonas* psicrófilas y las características de varios sistemas fago-hospedador. Aunque no se necesitaban medios de cultivo hechos a base de agua de mar para la propagación de la bacteria hospedadora y del fago, había diferencias entre las poblaciones de fagos dependiendo de su procedencia. En un estudio de *Pseudomonas putrefaciens* que incluía a cuatro cepas terrestres y 23 marinas, 40 fagos diferentes lisaban a 14 de las cepas marinas aisladas. Sólo una de las cepas marinas era susceptible a un fago aislado de aguas residuales.

La atención se ha centrado, en las últimas tres décadas, en una bacteria patógena de pescado de consumo humano, *Vibrio parahaemolyticus*, que aparece abundantemente en aguas próximas a la costa, ricas en nutrientes, y en los animales que habitan en ellas. Como mostraban Baross y Liston (1970), *Vibrio parahaemolyticus* depende de la presencia de ClNa en los medios de cultivo pero crece bien tanto a 37 como a 40°C y por tanto no se incluye como una bacteria indígena marina. Los bacteriófagos activos frente a ella se aislaron preferentemente de aguas de estuarios y de sedimentos (Sklarow y col., 1973). Su tolerancia a la temperatura presentaba una gran diversidad. El fago $\phi 6$ de Nakanishi y

col. (1966), aislada de una cepa lisogénica de *V. parahaemolyticus*, permanecía inalterado incluso después de 80 min. a 60°C.

9.4.4.- *Observaciones ecológicas sobre los sistemas marinos fago-hospedador.*

Existe un gran interés sobre el papel ecológico de los bacteriófagos relacionado con su impacto en poblaciones bacterianas, bien por la reducción, debida a la lisis, del número de células sensibles, o bien por transferencia del material genético de unas células a otras. No hay información en este aspecto en cuanto a fagos marinos. La falta de conocimiento en este campo es fácilmente comprensible: debido a la baja concentración en los ambientes marinos de fagos que atacan a bacterias específicas parece imposible trazar el desarrollo de los sistemas fago-hospedador en sus hábitats naturales, incluso bajo condiciones favorables. Así, Ahrens (1971) determinó las fluctuaciones estacionales en el número de agrobacterias y sus fagos en una caleta en Kiel. Mientras que durante el primer medio año se encontraron relativamente bajas cifras de unidades formadoras de colonias (UFC) y unidades formadoras de placas (UFP) por mililitro, se observó un sustancial incremento en UFC por ml. en el mes de Agosto, seguido de fluctuaciones pronunciadas desde Septiembre a Noviembre. Al mismo tiempo, apareció un brusco aumento en el número de UFP, que permanecían durante varias semanas en Agosto y Septiembre. En la segunda mitad de Septiembre se observó un considerable aumento tanto en el número de UFC como en UFP. La conclusión definitiva que se obtuvo a raíz de estos resultados era que el incremento en la concentración de bacterias sensibles era una precondición para el crecimiento de la población del fago. Para establecer este razonamiento, Ahrens (1971) se basó en el hecho de que siempre encontró números más bajos de fagos que de bacterias sensibles.

El hecho conocido de que la infección de bacterias sensibles con fagos virulentos resulta en la eliminación de las células infectadas y en la producción de progenies viricas, debe también aplicarse a los ambientes marinos. Sin embargo, tras esta generalidad, la cuestión sobre

la ecología de sistemas marinos fago-hospedador permanece aun incontestada, llevándonos a hacernos las siguientes cuestiones: durante cuánto tiempo pueden estar las partículas de fagos libres bajo condiciones naturales, en qué fase de su metabolismo debe encontrarse una célula hospedadora para que pueda ser infectada y producir nuevos viriones, qué cantidad de viriones se producen de modo natural y cómo pueden aplicarse los resultados obtenidos en laboratorio a lo que realmente ocurre en la naturaleza.

Como mostramos a continuación, el conocimiento recopilado hasta el momento sobre estas cuestiones es bastante escaso.

9.4.4.1.- El ambiente iónico.

Por definición, vimos que los fagos marinos dependían de las características de salinidad de su hábitat natural. En la mayoría de las investigaciones realizadas con sistemas marinos fago-hospedador, los requerimientos iónicos se determinaban mediante el uso de medios de cultivo preparados con agua de mar natural o artificial. En algunos casos, las sales de mar se reemplazaban por ClNa (Smith y Krueger, 1954; Spencer, 1955).

9.4.4.1.1.- El ambiente iónico y la actividad lítica de los bacteriofagos.

Trabajando con dos fagos diferentes, Spencer (1963) encontró que la capacidad de lisar a sus hospedadores dependía de la concentración de Mg^{2+} , además de la de Na^+ . Para un fago, la proporción entre ambas iones era crítica, mientras que en el otro, no. Con el sistema fago-hospedador aislado por Wiebe y Liston (1968), la lisis tenía lugar en un caldo con agua de mar a 10 y 22°C, y sólo a 10°C en un medio que contuviera 0,05 M de Mg^{2+} adicionado a 0,085 M de Na^+ , siendo ésta última la mínima concentración a la cual el hospedador era capaz de crecer. Poca lisis se detectaba si el Mg^{2+} se reemplazaba por 0,01 de Ca^{2+} . Sin embargo, estos experimentos no demuestran en qué paso (adsorción, infección o replicación) de los que conducen a la lisis bacteriana influyen las condiciones iónicas del medio.

9.4.4.1.2.- El ambiente iónico y la adsorción del fago sobre sus células hospedadoras.

Varios investigadores han estudiado la velocidad de adsorción de los fagos (Hidaka y Ichida, 1976; Johnson, 1968; Kakimoto y Nagatomi, 1972), pero la influencia de los iones sobre la adsorción sólo se ha investigado en dos ocasiones. El fago aislado por Keynan y col. (1974) se adsorbía casi igual (>90%) en 10 min. en agua de mar, agua destilada, en un 3% de ClNa, y en un 3% de ClNa más 15 mM de $Mg^{2+} + Ca^{2+}$. Zachary (1976) ensayó dos fagos en un medio nutritivo con cuatro sales en el que variaba la concentración de ClNa entre un 0,06 a 0,41 M. El fago nt-6 se adsorbía menos de un 30% durante 20 min. a las concentraciones ensayadas, mientras que el fago nt-1 mostraba una fuerte dependencia de la concentración de ClNa. Sólo un 8% del fago se adsorbía a una concentración 0,06 M en contraste con más de un 80% de adsorción observada a 0,16 y a 0,25 M de ClNa. Con este último fago también se observó que la adición de ClK al medio compensaba la falta de ClNa, debido a la osmolaridad.

9.4.4.1.3.- El ambiente iónico y la replicación del bacteriófago.

Zachary (1976) también investigó la influencia de la concentración de ClNa sobre la producción de fagos, empleando el medio nutritivo con cuatro sales en experiencias de multiplicación de un sólo paso. Con el fago nt-1 se observó un incremento del número de fagos producidos por célula infectada desde 12 hasta más de 500 cuando la concentración de ClNa se incrementaba desde 0,06 hasta 0,25 y 0,41 M. El período de latencia decrecía desde 90 min. a 0,06 M de ClNa hasta 45 min. a 0,25 M de ClNa y subía nuevamente hasta 50 a concentraciones más altas. Con el fago nt-6, la máxima producción de fagos a partir de cada célula infectada era de 600 a concentraciones de ClNa de 0,13 y 0,16 M, mientras que las bajas eran de 300 y 311 con 0,06 M y con 0,41 M respectivamente. El período de latencia de este fago decrecía desde 90 min. a 0,06 M hasta 60 min. a las concentraciones más bajas. Con ambos fagos se encontró que el ClK podía compensar parcialmente al ClNa, tanto en la cantidad de fagos producidos como en el período de latencia.

9.4.4.1.4.- El ambiente iónico y la supervivencia de los bacteriófagos marinos.

El fago descrito por Keynan y col. (1974) era estable en agua de mar natural y artificial durante al menos 24 horas a 4°C. En solución de 3, 2, y 1% de ClNa se inactivaba alrededor de un 70, 80 y 90% respectivamente. La adición de 15 mM de Mg²⁺ más Ca²⁺ a las soluciones de ClNa resultaba en un descenso de la inactivación a 35, 35, y 86% respectivamente. En agua destilada y en soluciones que contenían 1 o 15 nM de Mg²⁺ + Ca²⁺, sin embargo, menos de un 1% del fago sobrevivía después de dos horas a 4°C. La función protectora del Mg²⁺ y del Ca²⁺, por tanto, dependía de una concentración suficientemente alta de Na⁺.

Las observaciones realizadas por Spencer (1963) eran bastante diferentes, aunque sus experiencias se realizaron a 40°C. El fago P/14 permanecía estable a esta temperatura durante al menos 10 min. cuando se suspendía en agua de mar, pero se inactivaba hasta menos de un 1% tras este tiempo de exposición en agua destilada y en soluciones de ClNa entre 0,5 y 2,75%. En soluciones con un 3% de ClNa aparecía una inactivación de aproximadamente 0,1% en 2 min. En una solución que contenía 0,495% de Cl₂Mg y 2,75% de ClNa, más de un 10% del fago sobrevivía después de 10 min., y en presencia de 0,495% o 0,99% de Cl₂Mg solamente, la inactivación era mucho más baja que en soluciones de ClNa.

Hidaka (1972) estudió cinco fagos para comprobar su infectividad tras 24 horas a 5°C en agua destilada, en soluciones de ClNa al 0,5 y 3%, en medio con cantidades variables de agua de mar artificial y medio con agua de mar natural. La supervivencia de los cinco fagos era de un 100% en los dos últimos medios. Uno de los fagos no se afectaba por ninguno de los otros medios y tres fagos presentaban pérdida de su actividad, con efecto más pronunciado en soluciones con un 0,5% de ClNa. Sólo un fago se inactivaba totalmente en agua destilada y en las soluciones con ClNa.

Zachary (1976) realizó experiencias de supervivencia durante periodos de tiempo más prolongados, 120 días, y estudió dos fagos en agua de estuario no tratada, autoclavada y filtrada-esterilizada, agua de pantano, agua destilada y dos versiones de su medio que contiene cuatro sales con 0,06 y 0,16% de ClNa. El fago nt-1 sobrevivía a 20°C durante 120 días en todos estos medios, excepto en agua de estuario no

tratada (14% de supervivencia después de 10 días). El fago nt-6 también se inactivaba rápidamente en agua de estuario no tratada pero, en contraste con el nt-1, se afectaba seriamente en agua destilada (5% de supervivencia después de 30 días) y en agua de pantano (45% de supervivencia después de 120 días).

En resumen, los efectos de las condiciones iónicas sobre diferentes fagos varía considerablemente. El Mg^{2+} o el $Mg^{2+} + Ca^{2+}$ generalmente ejercen una influencia positiva sobre la supervivencia y actividad litica de los fagos, mientras que el Na^+ varía considerablemente. En el rango de concentraciones ensayadas, el efecto del Na^+ en la adsorción y supervivencia en algunos casos era débil o no afectaba, pero en otros era muy diferente. Como estas observaciones se hicieron con un pequeño número de fagos y una gran variedad de métodos, no puede extenderse a lo que ocurriría realmente con los fagos marinos. Debería estudiarse con más profundidad, incluso simulando condiciones naturales.

9.4.4.2.- Temperatura.

Los experimentos sobre la influencia de la temperatura en fagos marinos se han realizado principalmente a elevadas temperaturas (40°C o más) en el intento de establecer las diferencias en cuanto a la sensibilidad al calor entre fagos marinos y fagos no marinos. Al hablar de los fagos marinos, vimos que la mayoría de ellos eran resistentes a 50°C durante 30 min., y gran parte estables incluso a temperaturas más altas.

El sistema descrito por Johnson (1968) es único en cuanto a la formación de placas, las cuales aparecían a 6 y 25°C, pero no a 30°C, dependiendo en alto grado de la temperatura a la que había crecido previamente el hospedador. Las condiciones óptimas se obtuvieron cuando el hospedador crecía a 30°C y se incubaban las placas a 18°C para la formación de las placas de lisis.

Zachary (1978) estudió dos fagos, determinando que la cantidad de fagos en cada progenie y el período de latencia estaban fuertemente influenciados por la temperatura. Con el fago nt-1, la cantidad de UFP por célula era de 520 a 27°C, y se reducía a 115 a 17°C, mientras que

el periodo de latencia se incrementaba de 45 min. a 27°C a 170 min. a 17°C. Con el fago nt-6, la progenie obtenida por célula de 500 a 27°C se reducía a 27 a 17°C, pero el periodo de latencia de 55 min. a 27°C sólo aumentaba a 120 a 17°C. A 10°C el periodo de latencia de ambos fagos era más largo de 10 horas.

Moebus (1983) observó marcadas diferencias entre las eficiencias de la siembra en placa de 39 sistemas marinos incubados a 5, 15 y 25°C respectivamente. Estos sistemas, aislados del Atlántico Norte en Febrero, producían un mayor número de placas a 15°C.

→ 4.3.- Presión hidrostática.

Sólo el sistema aislado por Wiebe y Liston (1968) se estudió bajo la influencia que podían ejercer las variaciones en la presión hidrostática. Sus hallazgos demostraban que la bacteria hospedadora era capaz de crecer, aunque sólo levemente, y propagar al fago a presiones hidrostáticas incluso más altas de las que este sistema tenía que soportar en sus condiciones naturales, la cual era de 82,5 atmósferas.

→ 4.4.- Anaerobiosis.

El efecto de la anaerobiosis fue estudiado por Zachary (1978) sobre sistemas aislados de sedimentos en marismas saladas, que, excepto para los pocos centímetros superficiales, eran anaerobios. La bacteria hospedadora, *Vibrio natriegens*, es una anaerobia facultativa y podía propagar a los fagos nt-1 y nt-6 anaeróticamente. También se observó que la producción de fago era similar bajo ambos tipos de condiciones.

Los estudios más recientes de bacteriófagos en el ambiente marino son los realizados con *Desulfovibrio salexigens*, una bacteria sulfato-reductora con requerimientos salinos (Kamikura y Araki, 1989). El bacteriófago aislado frente a esta bacteria es un miembro típico de la familia Styloviridae (Matthews, 1982).

Como señalan estos autores, al estar presentes tanto fago como bacteria hospedadora en aguas de mar, se podría estudiar el efecto ecológico del bacteriófago sobre la dinámica de la población de las bacterias sulfato-reductoras, teniendo siempre presente el hecho de que el

tiempo que pueden permanecer viables las partículas de fagos en el ambiente acuático no está perfectamente definido (Rodgers y col., 1981).

9.5.- Ecología de bacteriófagos en ambientes extremos.

En el curso de la investigación de los flagelos de *Halobacterium salinarium* al microscopio electrónico, Torsvik y Dundas (1974) observaron partículas de fagos. Las preparaciones que contenían fagos no podían formar placas de lisis al sembrarlas sobre células que se hallaban en fase exponencial. Los intentos de inducir los cultivos de la bacteria con luz ultravioleta resultaron en curvas normales de muerte sin una concomitante producción de fagos.

Fueron nuevamente estos mismos investigadores quienes, estudiando cultivos de *Halobacterium salinarium* cepa 1, encontraron que frecuentemente se infectaban con un fago virulento, el fago Hs1, y apuntaban que esta infección siempre había ocurrido desde que fue aislada la bacteria (Torsvik y Dundas, 1978).

Los cultivos persistentemente infectados de *H. salinarium* cepa 1 muestran dos características principales: la lisis esporádica de la mayoría de las bacterias, acompañada por una liberación masiva de las partículas del fago, y la capacidad de las bacterias hospedadoras de formar colonias. Por otro lado, no se detectaron clones lisogénicos estables (Torsvik y Dundas, 1974, 1978).

La formación de colonias infectadas con fagos sugerían la existencia de un estado transportador, en el cual la bacteria infectada podría continuar multiplicándose durante un periodo limitado de tiempo antes de la lisis. La adsorción de Hs1 dependía fuertemente de la concentración de ClNa en el medio, disminuyendo conforme aumentaba la concentración. Fago y bacteria precisaban diferentes concentraciones de ClNa para su óptimo de generación. El periodo de latencia del fago a elevadas concentraciones salinas era de 2 a 5 veces más largo que el tiempo de generación bacteriana.

La destrucción de las células infectadas estaba fuertemente influenciada por las concentraciones de ClNa del medio. La lisis rápida-

mente aparecía tras la infección por el fago en aquellas células que se hallaban en un medio con menos de 4,3 M de ClNa, pero se establecía una infección persistente a concentraciones de ClNa mayores. Este modelo maximiza la probabilidad de supervivencia de fagos en ambientes donde varía la concentración salina, como son aquellos en donde se encuentran las halobacterias en la naturaleza (Torsvik y Dundas, 1980).

El cambio sufrido desde una infección lítica en su origen, a una infección persistente, es de gran importancia ecológica, tanto para la bacteria como para el fago. Durante el proceso de producción de sal en una salina, encontramos, en un principio, unas concentraciones de sal bajas, las mínimas para el crecimiento bacteriano, pero son, en cambio, las ideales para la supervivencia del fago. Conforme aumenta la concentración salina, la bacteria va obteniendo sus condiciones óptimas para el crecimiento, mientras que el fago se ve así perjudicado. Estas diferentes condiciones han dado lugar al establecimiento del estado transportador, que protege simultáneamente a la bacteria de la lisis por bacteriófagos y proporciona la perpetuación del fago.

Wais y col. (1975) describieron al fago Jal activo frente a varias cepas de *Halobacterium halobium* y *Halobacterium cutirubrum* y observaron que el fago precisaba soluciones de alta fuerza iónica para su supervivencia. En este caso particular, el tiempo de generación bacteriana coincidía con el período de latencia del fago. Los requerimientos salinos eran diferentes para el fago y para el hospedador, y el fago no precisaba un ambiente tan extremo para su replicación.

Pauling (1982) aisló dos halofagos, Hh1 y Hh3 procedentes de salsa de pescado fermentada, activos frente a unas cepas de laboratorio de *H. halobium* y también frente a *H. cutirubrum*, aunque con menor eficacia de multiplicación (e.o.p.). No consiguió aislar bacterias halófilas extremas en las conservas. Ambos fagos eran estables en soluciones que sus hospedadores no podían tolerar. El fago Hh1 era extremadamente resistente a las variaciones de la fuerza iónica de la solución en la que se hallaban suspendidos. La adsorción para ambos fagos no dependía de la concentración salina, a diferencia de lo que ocurría con el fago Hs1. Estos resultados sugerían que la influencia de la concentración de

ClNa en la velocidad de adsorción no podía hacerse extensible al resto de los halofagos extremos.

Schnabel (1982) describió el halofago extremo ϕ H, el cual apareció espontáneamente en un cultivo de *H. halobium* cepa R1. ϕ H recordaba en tamaño y morfología a los otros dos fagos de *Halobacterium*. Las curvas de multiplicación de un sólo paso mostraban un eclipse de 5,5 h., un periodo de latencia de 7 h. y una progenie vírica de 170 partículas por célula infectada.

Wais y Daniels (1985) realizaron un estudio sobre la flora y fagos de un estanque de salmuera en distintos periodos en los que había fluctuaciones de salinidad. Así, tomó una muestra A un día antes de que cayera un fuerte aguacero, determinando una concentración de ClNa de 5 M. La muestra B se tomó cuatro días después del aguacero, cuando apenas se veían trazas de flora bacteriana y la concentración de cloruros se había reducido a 1,3 M. La muestra C se tomó 24 días más tarde, cuando se había alcanzado una saturación y aparecía una flora halobacteriana similar a la primera. Observaron que había un sustancial incremento en el número de fagos tras la destrucción de la primera flora halobacteriana (muestra B). Más tarde, después de que el estanque hubiera reducido su volumen y hubiera vuelto a la saturación (muestra C), los fagos presentes tras la destrucción de la primera flora bacteriana ya no se pudieron aislar. Se observaba una relación inversa entre densidad bacteriana y presencia de fagos.

Con posterioridad, Vogelsang-Wenke y Oesterhelt (1988) describieron al fago ϕ N, que también aparecía espontáneamente sobre su cepa hospedadora, *H. halobium* NRL/JW. La diferencia entre este fago y el anterior descrito por Schnabel se encontraba en la endonucleasa de restricción: el ácido nucléico del fago ϕ N no se podía digerir ni por la mayoría de las endonucleasas de restricción ni por RNA... La razón de esta propiedad se encontró en la metilación de todas las citosinas en el ADN. Por tanto, este es el primer fago que se conoce que tiene el genoma modificado dentro de las arqueobacterias.

Este halofago extremo retiene infectividad en soluciones de baja fuerza iónica, incluso en agua destilada, aun tras un prolongado periodo de incubación.

El fago ϕ N es el halofago extremo más estable descrito hasta ahora. Su infectividad, tras prolongada exposición en agua destilada, indica una integridad física o una estabilidad de la estructura del fago por sí misma. Puede haber adquirido esta propiedad para asentar su supervivencia en un ambiente donde hay cambios en las concentraciones salinas.

Una ventaja específica de la metilación del ADN para ϕ N podría serle atribuida a la siguiente condición fisiológica: si se exponían durante un tiempo prolongado al agua, las partículas de fago podían liberarse eventualmente y el ADN quedaba libre en el ambiente natural. La posterior digestión con una nucleasa específica podía prevenirse satisfactoriamente por la metilación del genoma, si se comparara con moléculas de ADN no modificadas.

10.- *Deleya halophila*: CARACTERÍSTICAS.

En zonas próximas a las salinas existe un tipo de hábitat de gran interés ecológico y raramente estudiado con anterioridad: son los suelos de elevada salinidad. A lo largo de las investigaciones realizadas, se planteó la importancia que tendría el estudio bacteriológico de los suelos hipersalinos que acompañan a este tipo de salinas.

Así, Quesada y col. (1982) realizaron un "screening" inicial de la flora total de unos suelos salinos constituidos por los estanques de una antigua salina, actualmente desecada. El grupo más abundante y homogéneo de este hábitat fue el de bacilos Gram negativos halófilos moderados. Posteriormente, con este grupo se hizo un estudio taxonómico, según el cual, las cepas quedaron asignadas a los géneros *Alcaligenes*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas* y *Flavobacterium* (Quesada y col., 1983).

El último resultado de esas investigaciones fue la descripción de una especie nueva de microorganismo halófilo moderado: *Deleya halophila* (Quesada y col., 1984), que incluye parte de las cepas asignadas inicialmente al género *Alcaligenes*.

10.1.- Descripción de *Deleya halophila* (Quesada y col., 1984).

Las bacterias halófilas moderadas se definen como aquellas que pueden crecer en un amplio rango de concentraciones salinas (0,4- 4 M), que coincide en parte con el máximo para bacterias no halófilas (0,6 M) y el mínimo para microorganismos halófilos extremos (1,5 M) (Kogut, 1980; Kushner, 1985).

Se sabe que estas bacterias tienen requerimientos específicos para el ión Na^+ , que no puede ser reemplazado por otros cationes o solutos no ionizables, y también que estos microorganismos se lisan en soluciones hipotónicas (Kushner, 1985). Además, el óptimo de la concentración salina para el crecimiento está influenciado por la temperatura de incubación y por la composición de nutrientes del medio de cultivo (Chang y Leung, 1979; Vreeland y Martin, 1980).

Deleya halophila, bacteria halófila moderada y aislada de suelos hipersalinos (Quesada y col., 1984) es un bacilo Gram negativo no esporulado, móvil por 1-8 flagelos peritricos, aerobio estricto, catalasa y oxidasa positivo. Se determinó que el óptimo para el crecimiento de la cepa tipo (*Deleya halophila* CCM 3662), a diferentes concentraciones de sales en un medio complejo era de 7,5% (p/v) de sales marinas totales (Rodríguez-Valera y col., 1981), incubada a 32°C. Sin embargo, debido a su fuerte carácter eurihalino, era capaz de crecer a concentraciones salinas entre 2,5% y 25% (p/v), tanto en un medio complejo como en un medio definido (Ferrer y col., 1987).

Deleya halophila presentó un requerimiento específico y único para el ión Na^+ , que no podía reemplazarse por otros cationes o glucosa (Quesada y col., 1987).

La muerte de la cepa CCM 3662 a baja concentración salina estaba relacionada con la temperatura de incubación, y era mayor conforme aumentaba la temperatura.

11.- OBJETIVOS DEL TRABAJO.

Deleya halophila es una nueva especie de bacteria halófila moderada aislada de suelos hipersalinos de la provincia de Alicante. De la descripción de la especie por Quesada y col. (1984), debemos destacar su fuerte carácter eurihalino, que le permite crecer en un margen de concentraciones salinas comprendidos entre el 2,5 y el 25% (p/v).

→ Hace un año observamos que algunas cepas de *Deleya halophila* eran capaces de liberar, tras inducción con mitomicina C, partículas de fagos, e iniciamos el estudio sobre la propiedad de lisogenia de esta nueva especie.

Numerosos investigadores han estudiado las características de los fagos activos frente a bacterias halotolerantes, marinas y halófilas extremas, así como la influencia de los factores ambientales en los sistemas fago-bacteria. Sin embargo, los estudios realizados sobre fagos activos frente a bacterias halófilas moderadas son prácticamente inexistentes, a excepción de la descripción del fago φF9-11 de *Deleya halophila* (Calvo y col., 1988).

Estableciendo un paralelismo con la definición de fagos marinos y fagos halófilos extremos, para poder clasificar a un bacteriófago como halófilo moderado, hemos de considerar el sistema fago-bacteria como una unidad y definirla como halófila moderada.

Los fagos aislados de cepas lisogénicas de *Deleya halophila* cumplen el primer requisito, su hospedador es una bacteria halófila moderada. Por esta razón, el objetivo que nos planteamos, y siguiendo las indicaciones de Spencer (1960) para los fagos marinos, fue el determinar la influencia de la concentración salina en la replicación y estabilidad de los fagos aislados, así como el efecto de los cambios de pH y temperatura en la viabilidad de los mismos, estudiándonos preferentemente a valores próximos a los imperantes en el hábitat del cual se aisló la bacteria hospedadora, para poder así clasificar a estos fagos como halófilos moderados.

MATERIAL Y MÉTODOS

1.- CEPAS.

Se han utilizado 35 cepas de *Deleya halophila* pertenecientes a la colección de nuestro Departamento, aisladas de unas salinas abandonadas próximas a la localidad de Santa Pola (Alicante) (Quesada y col., 1984).

2.- MEDIOS DE CULTIVO.

2.1.- Solución de sales inorgánicas totales de Rodríguez-Valera y col. (1981) al 30% (p/v).

Composición:

NaCl.....	234,00 g
MgSO ₄ .7H ₂ O.....	59,32 g
MgCl ₂ .2H ₂ O.....	41,60 g
KCl.....	6,00 g
CaCl ₂ .2H ₂ O.....	1,10 g
NaBr.....	0,70 g
NaHCO ₃	0,20 g
FeCl ₃ .6H ₂ O.....	trazas
Agua destilada c.s.p.....	1000,00 ml

Para facilitar la disolución se utilizó un agitador magnético.

2.2.- Medios de cultivo líquidos.

Como medio base para el cultivo de los microorganismos se ha utilizado el medio MH descrito por Quesada y col. (1984) cuya composición base es la siguiente: Extracto de levadura (Difco) 1%, Proteosa-peptona n°3 (Difco) 0,5%, Glucosa 0,1%. Este medio se preparo a las concentraciones de 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25% de sales inorgánicas totales a partir del stock de sales del apartado anterior.

2.3.- Medios de cultivo semisólidos.

Este medio de cultivo se obtuvo añadiendo agar ((Difco) al medio MH líquido anterior, a una concentración final del 6%.

2.4.- Medios de cultivo sólidos.

Al igual que en el apartado anterior, los medios sólidos se obtuvieron a partir del medio MH líquido más la adición de agar, a una concentración final del 20%.

3.- ESTUDIO DE LISOGENIA.

3.1.- Inducción.

9 ml de medio MH líquido al 5% de sales totales se inocularon con 0,1 ml de un cultivo de 18 horas en medio líquido al 5% de la cepa a estudiar y se incubaron a 32°C durante 18 horas. A continuación se añadió Mitomicina C (Sigma Chemical Co. St. Louis, Mo.) a una concentración final de 2,5 µg/ml y se incubaron a 32°C durante 7 horas.

Transcurrido este tiempo, se centrifugaron a 4.000 r.p.m. durante 30 minutos y se filtraron a través de una membrana Millipore de 0,22 μ m de tamaño de poro.

3.2.- Estudio de la actividad de los filtrados.

El estudio de la actividad litica se realizó por el método de la gota (Adams, 1959).

Sobre una placa de medio MH sólido al 5% (p/v) de sales totales, previamente sembrada, con espátula de vidrio, con un cultivo de 18 horas en medio líquido de cada una de las cepas reveladoras, se depositaron, con pipeta Pasteur, gotas de los filtrados obtenidos. Se dejaron a temperatura ambiente durante 30 minutos para que las gotas se secaran y posteriormente se incubaron a 32°C durante 24 horas.

3.3.- Aislamiento de los bacteriófagos.

Para llevarlo a cabo, se siguió la técnica de la doble capa (Adams, 1959).

A 3,5 ml de medio semisólido al 5% (p/v) de sales totales se añadieron 0,2 ml del filtrado a estudiar y 0,1 ml de un cultivo de 18 horas de la cepa reveladora (a partir de ahora utilizada como cepa propagadora). Tras agitar la suspensión, se vertió sobre una placa de medio sólido al 5% (p/v) de sales totales y se llevó a incubar a 32°C durante 24 horas. En los casos en los que se obtuvo una lisis confluyente se hicieron diluciones con el fin de obtener placas de lisis aisladas.

Para aislar el bacteriófago se tomó, con ayuda de una pipeta Pasteur, una placa de lisis aislada y se introdujo en 1 ml de medio líquido al 5% (p/v), manteniéndolo a temperatura ambiente durante 20 minutos. A 3,5 ml de medio semisólido al 5% (p/v) se añadieron 0,2 ml de una dilución adecuada de esta suspensión, a fin de obtener placas de

lisis aisladas, más 0,2 ml de un cultivo de 18 horas en medio líquido de la cepa propagadora, y se vertió sobre una placa de medio sólido, incubando a 32°C durante 18 horas. Para asegurar un buen aislamiento, y siguiendo la metodología de Adams (1959), se repitió la operación tres veces consecutivas.

3.4.- Obtención de las suspensiones de fagos de alto título.

3.4.1.- Método de la doble capa.

Se seleccionó la dilución adecuada de las suspensiones de fagos con el fin de obtener una lisis semiconfluyente.

A 2,5 ml de medio semisólido al 5% (p/v) de sales totales se añadieron 0,2 ml de un cultivo de 18 horas en medio líquido de la cepa propagadora, más 0,1 ml de la suspensión de fago. Tras agitarlo, se vertió sobre una placa de medio sólido.

Tras 18 horas de incubación, se añadieron a cada placa 10 ml de medio líquido, manteniéndolo 30 minutos a temperatura ambiente. Con ayuda de una espátula de vidrio se recuperó la capa de agar semisólido, que llevaba incorporados el fago y la bacteria. Se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de un filtro Millipore de 0,22 μ m. de tamaño de poro.

3.4.2.- Propagación en medio líquido.

A 10 ml de medio líquido al 5% en sales se le adicionaron 0,2 ml de un cultivo de 18 horas en medio líquido y 0,1 ml de una suspensión del bacteriófago y se llevó a incubar 18 horas a 32°C.

Transcurrido este tiempo se centrifugó a 4.000 r.p.m. durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana Millipore de 0,22 μ m de tamaño de poro.

3.5.- Titulación de las suspensiones de fagos.

El titulo de las suspensiones de fagos se expreso en unidades formadoras de placas por mililitro (UFP/ml). Para su determinación se hicieron diluciones decimales y se depositaron 0,05 ml de cada una de las diluciones sobre una placa de medio solido, previamente sembradas con la cepa reveladora y se incubó a 32°C durante 18 horas.

4.- CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS.

4.1.- Espectro de actividad de los bacteriófagos.

El espectro de actividad se determinó por tests cualitativos depositando gotas sobre placas sembradas con las cepas de *Deleya halophila* asi como a otras especies halófilas moderadas y marinas, usando stocks de fagos que contenian aproximadamente 10⁸ UFP/ml.

Para ello, sobre una placa de MH sólido al 5% (p/v), previamente sembrada con un cultivo de 18 horas en MH líquido de la cepa a estudiar, se depositaron 0,05 ml de cada uno de los filtrados. Las placas se llevaron a incubar a 32°C durante 24 horas.

4.2.- Eficacia de multiplicación frente a las cepas de *Deleya halophila*.

Para su estudio se empleo MH sólido al 5% (p/v) y se determinó por el método de la gota.

Sobre placas sembradas con cada una de las cepas que en el estudio anterior se mostraron sensibles a cada uno de los fagos, se depositaron 0,05 ml. de diluciones decimales realizadas a partir de las suspensiones stocks de fagos, dejando secar las gotas antes de llevar las placas a incubar a 32°C durante 18 horas.

Tras el periodo de incubación se determinó el número de UFP/ml. sobre cada una de las cepas seleccionadas.

4.3.- Influencia de la concentración salina del medio en la adsorción.

La influencia de la concentración de sales se estudió en MH líquido. Para ello se seleccionaron 8 concentraciones de sales totales (p/v): 0, 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25%.

Se siguió la técnica del recuento del número de fagos no adsorbidos descrita por Adams (1959).

A 10 ml de medio líquido de la concentración a estudiar se añadieron 0,1 ml de una suspensión del fago de alto título y se hicieron diluciones para determinar el número de fagos en el tubo de adsorción. A continuación se añadieron 0,1 ml de una suspensión bacteriana de 18 horas a una multiplicidad de infección de 1, incubándose a 32°C.

Tras 10 minutos de incubación se añadieron 0,1 ml de cloroformo, se agitó y se dejó reposar hasta que se formaran dos capas. A partir de la capa acuosa se tituló la suspensión para determinar el número de fagos no adsorbidos. Los resultados se expresaron en porcentaje de fago adsorbido.

4.4.- Influencia de los electrolitos en la adsorción.

Para determinar la influencia de los electrolitos se utilizaron soluciones de sales sin adición de nutrientes. Se seleccionaron los siguientes cationes: Na⁺, K⁺, Ca²⁺, Mg²⁺, adicionados al medio en forma de cloruros, y una solución de sales totales, todos ellos a 7 concentraciones salinas diferentes (% p/v): 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25%.

La metodología seguida fue similar a la del apartado anterior.

4.5.- Influencia de la concentración salina en la multiplicación de los bacteriófagos: curvas de multiplicación de un sólo paso.

El procedimiento para dicha experiencia es similar al descrito por Kelln y Warren (1971).

Para dicho estudio se usó el medio MH líquido a las siguientes concentraciones salinas (% p/v): 2,5, 5, 7,5, 10, 15, 20 y 25. Los tubos se mantuvieron a 32°C con el fin de no alterar el metabolismo bacteriano debido a las variaciones de temperatura.

A 0,1 ml de una suspensión del fago que contenía 10^8 UFP/ml se adicionaron 0,9 ml de un cultivo bacteriano de 18 horas, quedando finalmente a una multiplicidad de infección de 0,1, y se incubó a 32°C durante 5 minutos. Pasado este tiempo, se tomaron 0,1 ml y se adicionaron a un tubo con 10 ml de medio líquido a la concentración salina adecuada, con el fin de detener la adsorción, y se filtró a través de una membrana Millipore de 0,22 μ m de tamaño de poro para eliminar el fago no adsorbido.

El filtro se resuspendió en el mismo volumen (10 ml) de la misma concentración y a partir de ahí se hicieron las diluciones 1/100 y 1/10.000, obteniéndose así el primer y segundo tubo de crecimiento respectivamente.

Se tomaron, a intervalos de tiempo determinados, alícuotas de 0,1 ml para hacer los recuentos de UFP/ml.

Una vez preparado el primer tubo de crecimiento, se tomaron 0,5 ml y se pusieron en un tubo al que se adicionaron 0,1 ml de cloroformo, obteniéndose así el número de fagos libres que quedaron adheridos al filtro.

4.6.- Influencia del pH en la viabilidad de los bacteriófagos.

Hemos realizado dicho estudio utilizando MH líquido al 5% (p/v) de sales totales a 7 valores diferentes de pH: 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10.

A 5 ml de medio de un determinado valor de pH se adicionaron 0,1 ml de la suspensión del bacteriófago y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 1 hora. Transcurrido este tiempo se procedió a su titulación para obtener el número de partículas viables.

4.7.- Efecto de la temperatura en la viabilidad de los bacteriófagos.

El efecto de la temperatura se determinó en MH líquido al 5% (p/v) de sales totales.

Se prepararon varios tubos conteniendo 5 ml de MH líquido a los que se añadieron 0,1 ml de una suspensión del bacteriofago y se incubaron a las temperaturas seleccionadas: (4, 25, 32, 37, 50 y 60°C).

A intervalos de tiempo (0 horas, 10 min., 30 min., 1 hora, 3 horas, 7 horas y 24 horas) se procedió a la titulación de las suspensiones.

4.8.- Influencia de la concentración salina en la viabilidad de los bacteriófagos.

A 5 ml de medio líquido a diferentes concentraciones salinas se añadieron 0,1 ml de una suspensión del bacteriófago y se mantuvieron a 10°C.

A intervalos de tiempo (0, 1, 7, 15, 30 y 45 días) se titularon las suspensiones para determinar el número de partículas viables, expresándose los resultados en porcentaje de adsorción.

Todos los ensayos en placa realizados en cada uno de los apartados se hicieron por triplicado.

4.9.- Estudio morfológico.

Los estudios morfológicos se realizaron por microscopía electrónica.

Se ultracentrifugó una suspensión de fagos a 30.000 r.p.m. durante 90 minutos, tirando el sobrenadante y resuspendiendo el "pellet" en 1 ml de agua destilada. La suspensión del fago se fijó en una rejilla y se realizó tinción negativa con acetato de uranilo al 1% (p/v), observándose en un microscopio electrónico de alta resolución EM 10C/CR.

RESULTADOS

1.- ESTUDIO DE LISOGENIA.

La actividad de cada uno de los filtrados obtenidos tras la inducción con mitomicina C se determinó frente a las 35 cepas de *Deleya halophila*, cuyos resultados quedan reflejados en la tabla 1.

27 de los filtrados inhibían el crecimiento de una o más cepas. Los filtrados procedentes de las cepas F5-4, F6-8, F9-11 y F12-9 eran activos frente a gran número de cepas, si bien, no todas presentaban el mismo tipo de sensibilidad a los bacteriófagos. En cambio, los filtrados procedentes de las cepas F6-5, F9-10, F9-12, F10-7, F12-6, G-2, G-25 y G-26 no presentaron actividad frente a ninguna de las cepas ensayadas.

Atendiendo a la sensibilidad a los bacteriófagos, la mayoría de las cepas eran sensibles a uno o a varios de los filtrados. Las cepas F5-9, F8-8, F12-9, G-2, G-3 y G-5 mostraron sensibilidad a un gran número de filtrados. Por el contrario, las cepas F1-10, F6-8, F6-10 y F10-8 no mostraron sensibilidad a ninguno de ellos.

Los filtrados obtenidos a partir de las cepas F5-9 y F6-6 presentaron inhibición frente a esas mismas cepas.

Tras el estudio de lisogenia en la especie *Deleya halophila*, seleccionamos los filtrados procedentes de las cepas F5-4, F9-11 y F12-9 para realizar el aislamiento y la posterior caracterización parcial de

los bacteriófagos responsables de la actividad litica de dichos filtrados.

Dicha selección atendía a dos hechos fundamentales; el primero de ellos era la gran actividad que presentaban frente a un gran número de cepas de la misma especie; el segundo, y más importante, su fácil manejabilidad, dado que las placas de lisis que formaban eran observables a simple vista y sus capacidades y actividades de propagación eran estables y reproducibles, lo que no sucedía con los filtrados de otras cepas que también presentaron actividad litica.

Como cepas propagadoras se seleccionaron: la cepa F5-7 para el filtrado procedente de la cepa F5-4; la G-2 para el filtrado de la cepa F9-11 y la F6-5 para el filtrado procedente de la cepa F12-9. Estas mismas cepas se usaron como reveladoras y propagadoras para todo el estudio posterior.

La nomenclatura seguida para los fagos aislados se corresponde con el nombre de la cepa precedido de la letra griega ϕ . Así, al fago aislado del filtrado procedente de la cepa F5-4 lo hemos denominado ϕ F5-4. Los tres fagos aislados en nuestro estudio adoptan, por tanto, las denominaciones ϕ F5-4, ϕ F9-11 y ϕ F12-9.

Aunque *Deleya halophila* tiene su óptimo de crecimiento a una concentración del 7,5% (p/v) de sales totales, hemos seleccionado la concentración del 5% (p/v) para preparar los medios de cultivo empleados para el crecimiento de las células hospedadoras y para el revelado de las experiencias. Esta selección se debe al hecho de que a la concentración indicada, las placas de lisis eran más aparentes y fácilmente detectables, si bien había diferencias entre los tipos de placa que presenta cada uno de los fagos.

Todos producían placas de lisis redondas y turbias, con bordes poco definidos y generalmente tenían un diámetro de 0,5 a 0,8 mm. En las placas de cultivo mantenidas durante 2-3 días a 4°C, las calvas llegaban a ser muy turbias y presentaban un halo alrededor de la placa de lisis, que crecía conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento. Las placas formadas por ϕ F5-4 eran menos turbias y de mayor tamaño que las de los otros dos fagos. En cambio, las producidas por ϕ F9-11, más pequeñas, eran extremadamente turbias.

Resultados

Por otro lado, se observaba que el estado de humedad de las placas de medio de cultivo influía sobre el tamaño de las calvas. Así, las placas de lisis eran más grandes y menos turbias si se usaban medios de cultivo vertidos el día anterior o si se almacenaban en bolsas de plástico y a 4°C.

Para facilitar la observación y recuento de las placas de lisis hemos usado un cuentacolonia de fondo oscuro.

En la Tabla I los números asignados a los filtrados corresponden con los de las cepas reveladoras.

CLV: lisis confluyente con presencia de cultivo secundario.
CL : lisis confluyente
+ : 1-50 placas de lisis
++ : 50-100 placas de lisis
+++ : más de 100 placas de lisis
- : no actividad

Resultados

TABLA I.- Actividad de los filtrados obtenidos a partir de las cepas de *Deleya halophila*.

Cepas re- veladoras	Filtrados											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1 F1-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2 F2-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	CLV
3 F5-4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4 F5-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 F5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
6 F5-7	-	-	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7 F5-9	-	-	-	CL	CL	CL	CL	-	-	-	-	-
8 F6-3	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9 F6-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 F6-5	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11 F6-7	-	-	-	-	-	CL	-	-	-	-	-	-
12 F6-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 F6-9	-	-	-	-	CLV	CLV	-	-	-	-	-	-
14 F6-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 F8-8	-	-	-	-	CL	CL	CL	CL	CL	-	-	-
16 F8-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	CLV
17 F8-13	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
18 F8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	++
19 F9-9	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	++
20 F9-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
21 F9-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 F9-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23 F10-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 F10-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+++
25 F10-11	-	-	-	-	-	-	-	-	CL	-	-	++
26 F10-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 F12-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	++
28 F12-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
29 F12-9	-	-	-	CLV	CLV	CLV	-	++	-	-	-	CL
30 G-2	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
31 G-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32 G-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 G-22	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
34 G-25	CLV	CLV	-	CL	+	-	-	++	-	-	-	-
35 G-26	-	-	-	-	-	-	CL	-	-	-	-	-

Resultados

TABLA I.- (Continuación). Actividad de los filtrados obtenidos a partir de las cepas de *Deleya halophila*.

Cepas re- veladoras	Filtrados											
	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24
1 F1-10	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
2 F2-9	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 F5-4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
4 F5-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 F5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 F5-7	CL	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
7 F5-9	-	-	CL	-	CL	-	CL	-	-	-	-	++
8 F6-3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
9 F6-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 F6-5	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
11 F6-7	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
12 F6-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 F6-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 F6-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 F8-8	-	-	-	-	-	-	CL	-	-	-	-	-
16 F8-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 F8-13	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
18 F8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 F9-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 F9-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21 F9-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 F9-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23 F10-7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 F10-9	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 F10-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 F10 12	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 F12-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28 F12-6	++	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
29 F12-9	+	-	-	+	+++	-	-	-	-	-	-	-
30 G-2	CLV	-	-	-	-	-	-	-	CLV	-	-	-
31 G-3	-	++	-	-	+++	CLV	CL	-	-	-	-	-
32 G-5	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 G-22	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
34 G-25	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35 G-26	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

TABLA I.- (Continuación). Actividad de los filtrados obtenidos a partir de las cepas de *Deleya halophila*.

Cepas re- veladoras	Filtrados										
	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
1 F1-10	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
2 F2-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3 F5-4	-	-	-	-	++	-	-	-	-	-	-
4 F5-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5 F5-6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6 F5-7	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
7 F5-9	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8 F6-3	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
9 F6-4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10 F6-5	-	-	-	-	CL	-	-	-	-	-	-
11 F6-7	-	-	-	-	CL	-	-	-	-	-	-
12 F6-8	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13 F6-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14 F6-10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15 F8-8	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
16 F8-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17 F8-13	-	-	-	-	CLV	-	-	-	-	-	-
18 F8-14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19 F9-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20 F9-10	-	-	-	-	-	-	CLV	-	-	-	-
21 F9-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22 F9-12	CLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23 F10-7	CLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24 F10-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25 F10-11	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26 F10-12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27 F12-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28 F12-6	-	-	-	-	-	-	-	-	CLV	-	-
29 F12-9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30 G-2	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
31 G-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
32 G-5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
33 G-22	-	-	-	-	-	-	CLV	++	-	-	-
34 G-25	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
35 G-26	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

2.- CARACTERIZACIÓN DE LOS BACTERIOFAGOS.

2.1.- Espectro de actividad de los fagos frente a las cepas de *De'eya halophila* y otras cepas halófilas moderadas y marinas.

Los resultados obtenidos quedan expresados en la tabla II.

Una vez obtenidas las suspensiones de fagos a título elevado, se determinó la actividad de los mismos sobre diferentes cepas halófilas moderadas y marinas, observándose actividad sólo frente a algunas de las cepas de *Deleya halophila*, mostrándose el resto de las cepas de especies relacionadas resistentes a los bacteriófagos.

Ocho cepas se mostraron sensibles a la actividad lítica de los bacteriófagos. #F9-11 era activo frente a estas ocho cepas. #F12-9 dió actividad frente a siete y #F5-4 frente a cinco cepas.

Por otra parte, las cepas F5-7, F6-3, F6-5, F8-13 y G-2 presentaban sensibilidad a los tres fagos.

En la Tabla II los signos expresan:

- + : actividad de los filtrados
- : no actividad

TABLA II.- Espectro de actividad de los fagos frente a las cepas de *Deleya halophila* y otras cepas halófilas moderadas y marinas.

Cepas	φF5-4	φF9-11	φF12-9
F1-10	-	+	+
F2-9	-	-	-
F5-4	-	+	+
F5-5	-	-	-
F5-6	-	-	-
F5-7	+	+	+
F5-9	-	-	-
F6-3	+	+	+
F6-4	-	-	-
F6-5	+	+	+
F6-7	-	+	+
F6-8	-	-	-
F6-9	-	-	-
F6-10	-	-	-
F8-8	-	-	-
F8-12	-	-	-
F8-13	+	+	+
F8-14	-	-	-
F9-9	-	-	-
F9-10	-	-	-
F9-11	-	-	-
F9-12	-	-	-
F10-7	-	-	-
F10-9	-	-	-
F10-11	-	-	-
F10-12	-	-	-
F12-5	-	-	-
F12-6	-	-	-

TABLA II.- (Continuación). Espectro de actividad de los fagos frente a las cepas de *Deleya halophila* y otras cepas halófilas moderadas y marinas.

Cepas	φF5-4	φF9-11	φF12-9
F12-9	-	-	-
G-2	+	+	+
G-3	-	-	-
G-5	-	-	-
G-22	-	-	-
G-25	-	-	-
G-26	-	-	-
<i>Flavobacterium marinotypicum</i>	-	-	-
<i>Flavobacterium okeanokoites</i> (NCMB 561)	-	-	-
<i>Flavobacterium halmeophilum</i>	-	-	-
<i>Beneckea natriegens</i>	-	-	-
<i>Pseudomonas nautica</i> (DSM 50418)	-	-	-
<i>Pseudomonas halosacharolytica</i> (CCM 2651)	-	-	-
<i>Acinetobacter aquamarinum</i>	-	-	-
<i>Chromobacterium marismortui</i> (ATCC 17056)	-	-	-
<i>Marinococcus halophilus</i> (NRCC 14033)	-	-	-
<i>Micrococcus halobius</i> (CCM 2571)	-	-	-
<i>Paracoccus halodenitrificans</i> (CCM 286)	-	-	-
<i>Vibrio costicola</i> (NCMB 701)	-	-	-
<i>Deleya venusta</i> (NCMB 1979)	-	-	-
<i>Deleya cupida</i> (NCMB 1978)	-	-	-
<i>Deleya pacifica</i> (NCMB 1977)	-	-	-
<i>Deleya marina</i> (ATCC 25374)	-	-	-
<i>Deleya aesta</i> (NCMB 1980)	-	-	-

2.2.- Eficacia de la multiplicación de los bacteriófagos frente a las cepas de *Deleya halophila*.

Dichos resultados quedan expuestos en la tabla III.

Se ha dado el valor 1 a la actividad del fago sobre aquella cepa utilizada como propagadora desde su aislamiento.

φF9-11, propagado sobre la cepa G-2, dió una eficacia de multiplicación sobre F6-3 doble a la obtenida con su cepa propagadora. La eficacia sobre el resto de las cepas era menor a 1. Sobre la cepa F8-13 no se lograron obtener placas de lisis aisladas.

La mayor eficacia de multiplicación de φF12-9 se obtuvo sobre su cepa propagadora. Tampoco se lograron obtener placas de lisis aisladas cuando se enfrentó a la F8-13 y G-2.

Finalmente, φF5-4 dió una mayor eficacia de multiplicación sobre su cepa propagadora y en tres de las cepas sensibles, F6-3, F8-13 y G-2, no se obtuvieron placas de lisis aisladas.

En la tabla III hemos expresado con CL (lisis confluyente) los casos en los que no se lograron obtener placas de lisis aisladas, y entre paréntesis se indica la concentración mínima a la que se obtenía inhibición del crecimiento.

TABLA III.- Eficacia de multiplicación de los fagos frente a las cepas de *Deleya halophila*.

Cepas	φF5-4	φF9-11	φF12-9
F1-10	0	1.0×10^{-4}	3.0×10^{-3}
F5-4	0	1.0×10^{-2}	0
F5-7	1	8.0×10^{-3}	0.9
F6-3	CL(10^{-2})	2	1.0×10^{-4}
F6-5	0.8	2.0×10^{-2}	1
F6-7	0	4.0×10^{-2}	0.9
F8-13	CL(10^{-1})	CL(10^{-1})	CL(10^{-1})
G-2	CL(10^0)	1	CL(10^{-1})

2.3.- Influencia de la concentración de sales en la adsorción en medio MH líquido.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en la tabla IV.

Se observa que, en general, los fagos presentan un mayor porcentaje de adsorción a concentraciones comprendidas entre 2,5 y 7,5% (p/v). En medios sin sales ningún fago presentaba adsorción. #F5-4 presenta un máximo de adsorción de un 54% a una concentración de 5 y 7,5% (p/v). #F9-11 y #F12-9 muestran su máximo de adsorción, de 45 y 50% respectivamente, a 2,5 y 5% (p/v). A una concentración de 25% (p/v) se observa un mínimo de adsorción de 2% para #F12-9 y sólo para este fago.

Tabla IV.- Adsorción a los 10 min. en medio MH líquido a diferentes concentraciones.

Concentración (% p/v) de sales totales en medio MH	% Adsorción		
	#F5-4	#F9-11	#F12-9
0	0	0	0
2,5	35	45	50
5	54	46	51
7,5	54	40	36
10	20	34	36
15	23	26	37
20	23	12	24
25	0	0	2

2.4.- Influencia de los electrolitos en la adsorción.

En las tablas V, VI, VII, VIII y IX se recogen los resultados obtenidos.

En solución de sales totales los tres bacteriófagos estudiados presentaron un máximo de adsorción al 5% (p/v), dando unos valores de 35, 65 y 49% para ϕ F5-4, ϕ F9-11 y ϕ F12-9, respectivamente. Se observa que la concentración de sales totales no afecta de un modo considerable a la adsorción de ϕ F5-4, presentando pocos cambios de unas concentraciones a otras. En cambio, si se observan grandes variaciones en el porcentaje de adsorción de los fagos ϕ F9-11 y ϕ F12-9.

En lo que respecta a la influencia de la concentración de Na^+ , pudo observarse diferencias en cuanto a las concentraciones óptimas para los diferentes fagos. Así, para los fagos ϕ F5-4 y ϕ F12-9, el óptimo se situó entre el 5 y el 7,5% (p/v), mientras que para el fago ϕ F9-11, el margen de concentraciones fue más amplio (5 y 15% p/v).

La concentración de K^+ influye igualmente en el porcentaje de adsorción de los tres fagos. El máximo se observó a un 7,5% (p/v), con un descenso progresivo de adsorción según aumentaba o disminuía la concentración.

El efecto que ejerce el Ca^{2+} en la adsorción es variable dependiendo de la concentración. De este modo, ϕ F12-9 presenta una adsorción muy elevada (82-90%) a concentraciones comprendidas entre 2,5 y 10% (p/v). ϕ F9-11 se adsorbe entre un 60 y 70% a las mismas concentraciones y ϕ F5-4 presenta unas adsorciones mucho más bajas (32-37%) a concentraciones entre 2,5 y 7,5% (p/v). Por otro lado, se observó inactivación total o parcial de los fagos ϕ F9-11 y ϕ F12-9 a concentraciones superiores al 15% (p/v) y a partir del 10% para el fago ϕ F5-4.

Finalmente, estudiando la adsorción en presencia de Mg^{2+} , se observaron altos porcentajes de adsorción en un rango de concentraciones comprendidas entre 2,5 y 15% (p/v).

Tabla V.- Adsorción a los 10 min. en solución de sales totales.

Concentración (% p/v) de sales totales	% Adsorción		
	ϕF5-4	ϕF9-11	ϕF12-9
0	0	0	0
2,5	25	47	33
5	35	65	49
7,5	32	56	43
10	30	35	42
15	23	27	17
20	20	18	15
25	16	19	6

Tabla VI.- Adsorción a los 10 min. en solución de Na⁺ a diferentes concentraciones.

Concentración (% p/v) de Na ⁺	% Adsorción		
	ϕF5-4	ϕF9-11	ϕF12-9
0	0	0	0
2,5	33	37	33
5	40	47	75
7,5	38	47	72
10	26	45	44
15	25	45	34
20	25	26	31
25	22	22	32

Tabla VII.- Adsorción a los 10 min. en solución de K⁺ a diferentes concentraciones.

Concentración (% p/v) de K ⁺	% Adsorción		
	ϕF5-4	ϕF9-11	ϕF12-9
0	0	0	0
2,5	17	17	47
5	22	33	61
7,5	51	38	72
10	46	32	55
15	45	24	55
20	41	16	43
25	41	7	27

Tabla VIII.- Adsorción a los 10 min. en solución de Ca^{2+} a diferentes concentraciones.

Concentración (% p/v) de Ca^{2+}	% Adsorción		
	ϕF5-4	ϕF9-11	ϕF12-9
0	0	0	0
2,5	32	62	84
5	33	69	85
7,5	37	68	90
10	6	58	82
15	5	11	18
20	0	0	0
25	0	0	0

Tabla IX.- Adsorción a los 10 min. en solución de Mg^{2+} a diferentes concentraciones.

Concentración (% p/v) de Mg^{2+}	% Adsorción		
	ϕF5-4	ϕF9-11	ϕF12-9
0	0	0	0
2,5	48	59	46
5	42	60	50
7,5	42	52	63
10	41	51	58
15	35	51	44
20	27	47	13
25	7	47	9

2.5.- Influencia de la concentración salina en la multiplicación de los bacteriófagos: curvas de multiplicación de un sólo paso.

Las figuras 1, 2 y 3 reflejan la influencia de la concentración salina en la multiplicación de los bacteriófagos.

En las tablas X, XI y XII se han expresado el período de latencia, la producción media de partículas de fagos por célula infectada o tamaño de la explosión y el período de ascenso, todos ellos en función de la concentración salina.

El fago #F5-4 presentó un ciclo de multiplicación más rápido a una concentración de 5 y 7,5% (p/v) de sales totales. La mayor producción se observaba al 7,5% (p/v).

El fago #F9-11, mostró su ciclo de multiplicación más rápido a concentraciones bajas, 2,5 y 5% (p/v) y, al contrario, sus mayores producciones a concentraciones más elevadas, de 10 y 15% (p/v).

Finalmente, el fago #F12-9 se multiplicaba más rápidamente a una concentración de 5% (p/v) de sales totales y su producción era mayor al 7,5% (p/v).

TABLA X.- Estudio de las curvas de multiplicación de un paso del fago ϕ F5-4 en medio MH líquido a diferentes concentraciones de sales totales.

Concentración (% p/v)	Periodo latencia (min.)	Tamaño explosión (UFP/ml.)	Periodo de subida (min.)
2.5	130	152	50
5	110	157	30
7.5	115	262	25
10	120	163	25
15	180	67	60

TABLA XI.- Estudio de las curvas de multiplicación de un paso del fago φF9-11 en medio MH líquido a diferentes concentraciones de sales totales.

Concentración (% p/v)	Periodo latencia (min.)	Tamaño explosión (UFP/ml.)	Periodo de subida (min.)
2,5	135	152	15
5	105	150	45
7,5	130	109	40
10	135	200	45
15	190	180	40

TABLA XII.- Estudio de las curvas de multiplicación de un paso del fago ϕ F12-9 en medio MH líquido a diferentes concentraciones de sales totales.

Concentración (% p/v)	Periodo latencia (min.)	Tamaño explosión (UFP/ml.)	Período de subida (min.)
2,5	125	18	45
5	115	22	15
7,5	130	57	30
10	130	12	40
15	300	5	50

Fig. 1.- Curvas de multiplicación de un sólo paso del fago ϕ F5-4 en medio MH a diferentes concentraciones.

Fig. 2.- Curvas de multiplicación de un sólo paso del fago ϕ F9-11 en medio MH a diferentes concentraciones.

Fig. 3.- Curvas de multiplicación de un sólo paso del fago ϕ F12-9 en medio MH a diferentes concentraciones.

Δ : 2,5% (p/v)

\blacktriangle : 5% (p/v)

\square : 7,5% (p/v)

\blacksquare : 10% (p/v)

\star : 15% (p/v)

Fig. 1

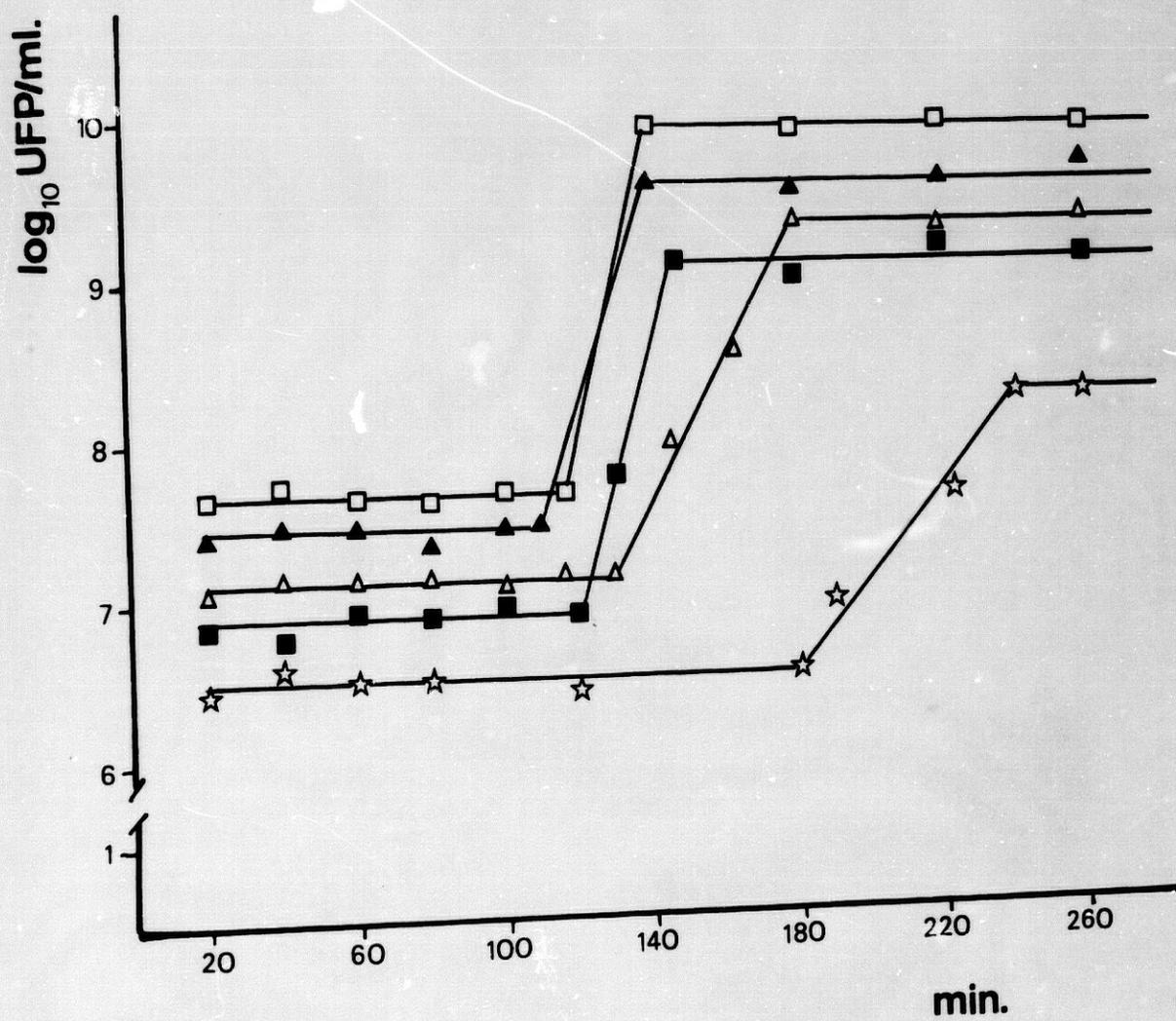


Fig. 2

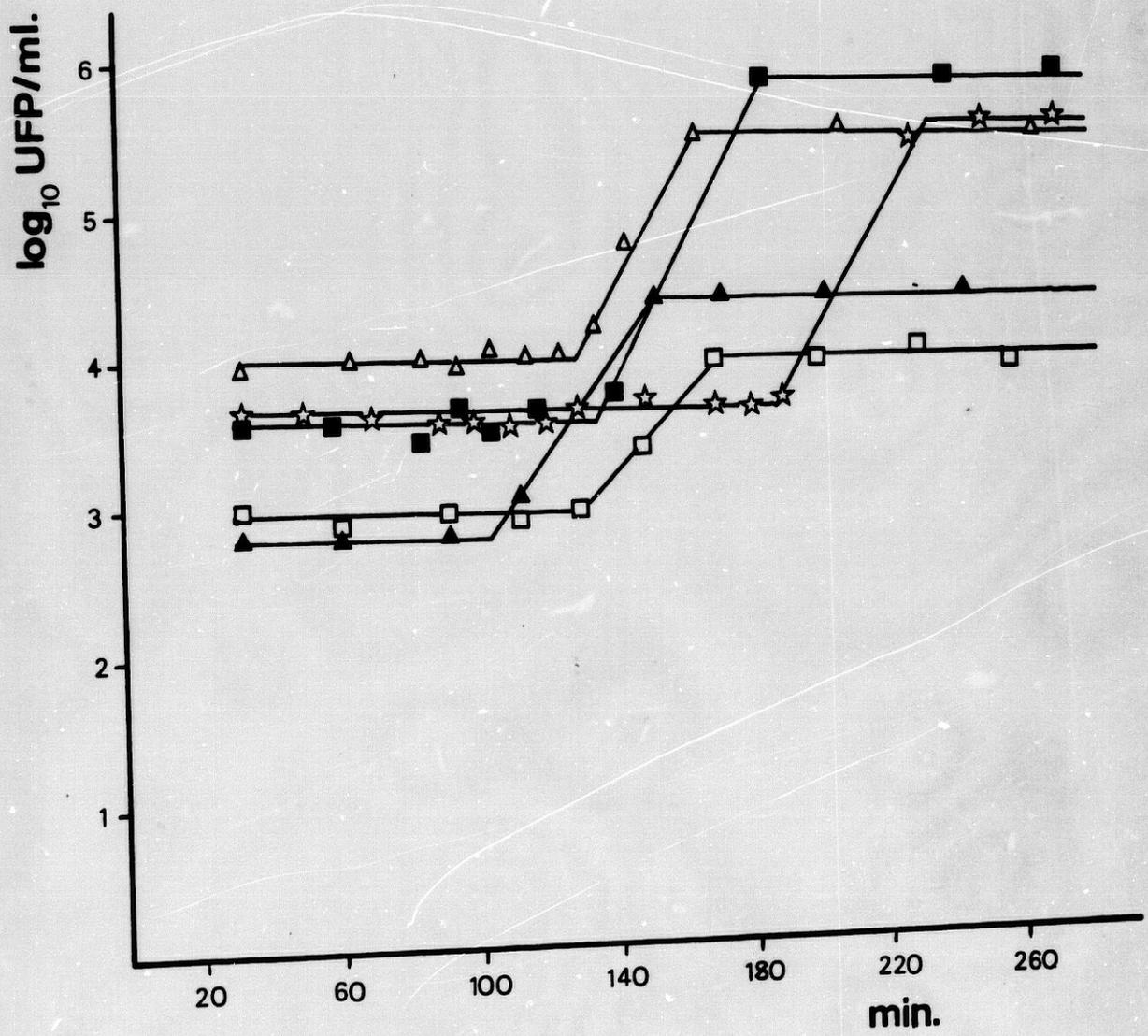
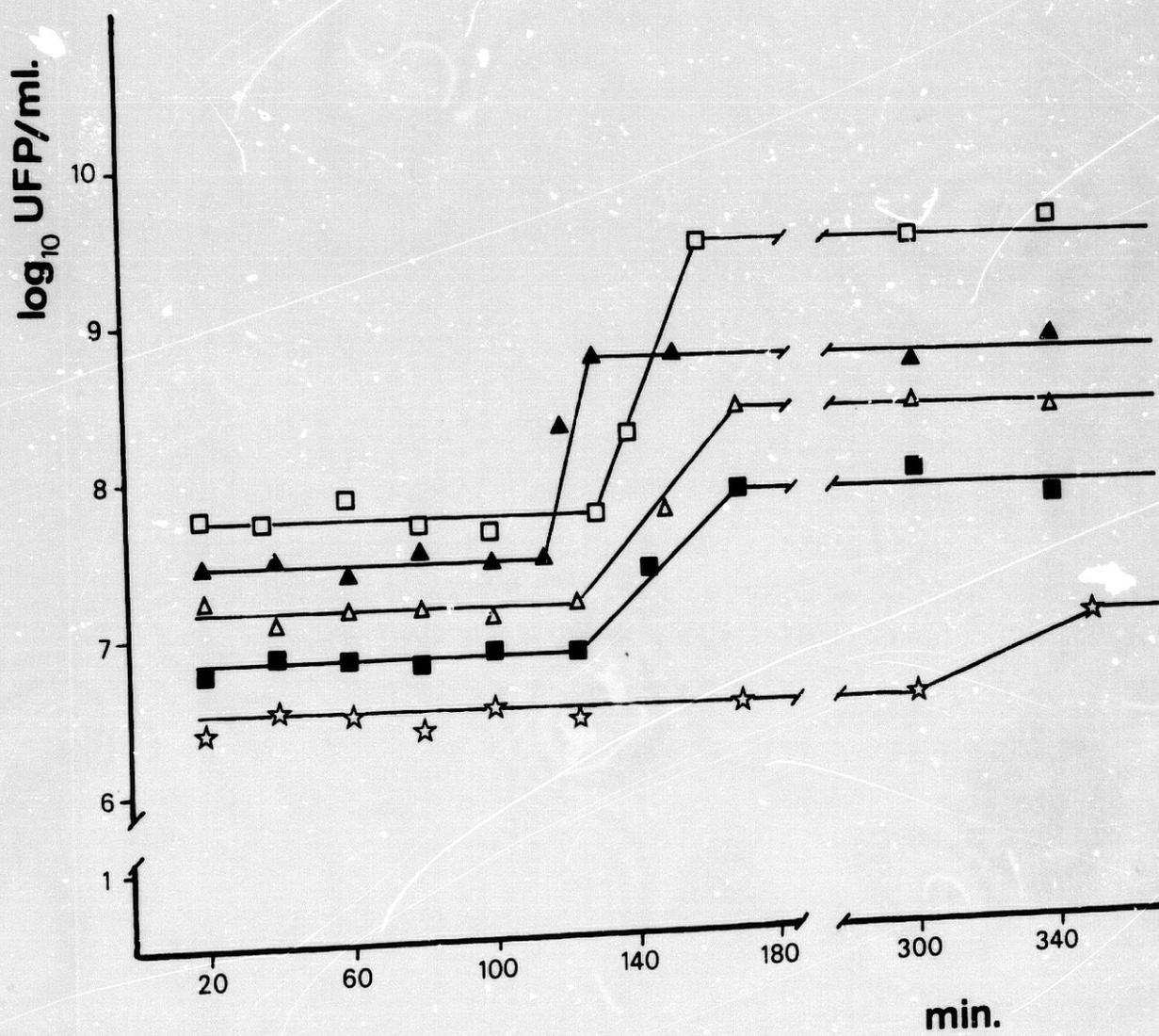


Fig. 3



2.6.- Influencia del pH en la viabilidad de los bacteriófagos.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las tablas XIII, XIV y XV.

A valores de pH comprendidos entre 5 y 10, el título de los bacteriófagos permanece practicamente invariable. A pH 4, el comportamiento varia de un fago a otro. Así, se observa que el porcentaje de supervivencia de ϕ F5-4, tras una hora de incubación, es de 5,2%. Un bajo porcentaje muestra el fago ϕ F12-9 y se observa una gran inactivación para ϕ F9-11, cuyo porcentaje de supervivencia es inapreciable.

Para los fagos ϕ F5-4 y ϕ F12-9 el pH óptimo era de 7; para el fago ϕ F9-11, el pH óptimo era de 6.

TABLA XIII.- Efecto del pH en la supervivencia de ϕ F5-4 tras 1 hora de incubación en MH liquido al 5% (p/v) de sales totales a 32°C.

pH	UFP/ml	% supervivencia
4	4.4×10^5	5.2
5	3.6×10^6	42.8
6	3.8×10^6	45.2
7	8.4×10^6	100
8	5.6×10^6	66.6
9	6.0×10^6	71.4
10	6.2×10^6	73.8

TABLA XIV.- Efecto del pH en la supervivencia de ϕ F9-11 tras 1 hora de incubación en MH líquido al 5% (p/v) de sales totales a 32°C.

pH	UFP/ml	% supervivencia
4	5.49	0
5	3.0×10^6	38
6	7.9×10^6	100
7	5.6×10^6	70.9
8	2.8×10^6	35.4
9	2.3×10^6	29.1
10	3.9×10^6	49.3

TABLA XV.- Efecto del pH en la supervivencia de ϕ F12-9 tras 1 hora de incubación en MH líquido al 5% (p/v) de sales totales a 32°C.

pH	UFP/ml	% supervivencia
4	1.0×10^4	0.13
5	3.0×10^6	37.5
6	4.0×10^6	50
7	8.0×10^6	100
8	4.0×10^6	50
9	3.8×10^6	47.5
10	4.0×10^6	50

2.7.- Influencia de la temperatura en la viabilidad de los bacteriófagos.

Los resultados se expresan en las tablas XVI, XVII y XVIII.

Los títulos de los bacteriófagos permanecen invariables a temperaturas comprendidas entre 4 y 37°C.

A 50 y a 60°C aparecen curvas de inactivación de tipo exponencial para los tres fagos, si bien, la velocidad de inactivación es mucho mayor a 60 que a 50°C.

Cabe resaltar la mayor resistencia mostrada por ϕ F5-4 a temperaturas de 50 y 60°C si se compara a la de los otros dos fagos.

Tras 7 horas de incubación a 50°C, ϕ F5-4 permanece con un alto grado de viabilidad. A 60°C, es capaz de mantenerse viable durante una hora.

El comportamiento de ϕ F9-11 y ϕ F12-9 es prácticamente análogo a 50 y 60°C. A 50°C, se mantienen viables durante 1 hora, y hay una inactivación total de ambos fagos a las tres horas de incubación.

A 60°C, muestran actividad tras un periodo de 10 minutos y se inactivan totalmente a los 30 minutos.

TABLA XVI.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F5-4 en MH líquido al 5% (p/v) a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

Tiempo	Temperatura (°C)					
	4	25	32	37	50	60
0 h	100	100	100	100	100	100
10 min	100	100	100	100	15	8.3×10^{-2}
30 min	100	100	100	100	12	2.1×10^{-4}
1 h	100	100	100	100	8.1×10^{-2}	4.8×10^{-5}
3 h	100	100	100	100	3.9×10^{-2}	0
7 h	100	100	100	100	8.1×10^{-5}	0
24 h	100	100	100	100	0	0

TABLA XVII.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F9-11 en MH líquido al 5% (p/v) a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

Tiempo	Temperatura (°C)					
	4	25	32	37	50	60
0 h	100	100	100	100	100	100
10 min	100	100	100	100	5.6	1.8×10^{-3}
30 min	100	100	100	100	4	0
1 h	100	100	100	100	7.5×10^{-4}	0
3 h	100	100	100	100	0	0
7 h	100	100	100	100	0	0
24 h	100	100	100	100	0	0

TABLA XVIII.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F12-9 en MH líquido al 5% (p/v) a diferentes temperaturas y tiempos de incubación.

Tiempo	Temperatura (°C)					
	4	25	32	37	50	60
0 h	100	100	100	100	100	100
10 min	100	100	100	100	86	2.1×10^{-6}
30 min	100	100	100	100	47	0
1 h	100	100	100	100	2.7×10^{-4}	0
3 h	100	100	100	100	0	0
7 h	100	100	100	100	0	0
24 h	100	100	100	100	0	0

2.8.- Influencia de la concentración salina en la viabilidad de los bacteriófagos.

Los resultados obtenidos quedan reflejados en las tablas XIX, XX y XXI.

La máxima estabilidad para los fagos aparece en medio MH líquido a una concentración de 10% (p/v) en sales totales, si bien, se observan apreciables diferencias. De este modo, ϕ F12-9 no sufre apenas modificación en su título a los 45 días, mientras que ϕ F5-4 muestra un 80% de viabilidad y ϕ F9-11 solo un 42%.

A la concentración de 7.5% se observa unos porcentajes de viabilidad paralelos a los obtenidos al 10%, aunque ligeramente inferiores.

Frente al resto de las concentraciones cada fago presenta un comportamiento diferente.

ϕ F5-4 se mantiene estable en soluciones a concentraciones comprendidas entre 7.5 y 15%. Al 2,5% y en agua destilada, la viabilidad desciende considerablemente.

ϕ F9-11 muestra unos porcentajes muy bajos a todas las concentraciones ensayadas. La máxima estabilidad la presentan a 7,5 y 10%, con unos porcentajes de 35 y 41, respectivamente, a los 45 días de almacenamiento. En el resto de las concentraciones se observa pérdida casi absoluta de su estabilidad.

Finalmente, estudiando la supervivencia de ϕ F12-9 se observa entre un 60 y un 70% de viabilidad a concentraciones de 2,5, 5 y 15%. A elevadas concentraciones, 20 y 25%, muestra porcentajes inferiores a 30% y en agua destilada, muestra inactivación total a los 45 días de almacenamiento.

TABLA XIX.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F5-4 en medio NH líquido a diferentes concentraciones salinas y tiempo de incubación.

Concentración (%p/v)	Tiempo (días)					
	0	1	7	15	30	45
Agua destilada	100	89	72	36	21	7
2.5	100	93	78	42	29	18
5	100	95	81	52	42	39
7.5	100	100	92	85	84	69
10	100	100	100	93	92	81
15	100	100	95	86	81	67
20	100	96	74	47	43	42
25	100	95	63	41	39	36

TABLA XX.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F9-11 en medio MH líquido a diferentes concentraciones salinas y tiempo de incubación.

Concentración (%p/v)	Tiempo (días)					
	0	1	7	15	30	45
Agua destilada	100	25	18	13	8	4
2.5	100	31	22	17	13	6
5	100	67	60	28	17	6
7.5	100	80	70	50	41	35
10	100	92	83	61	45	42
15	100	75	30	15	9	7
20	100	22	16	11	8	4
25	100	15	9	7	6	2

TABLA XXI.- Porcentaje de supervivencia de ϕ F12-9 en medio MH líquido a diferentes concentraciones salinas y tiempo de incubación.

Concentración (%p/v)	Tiempo (días)					
	0	1	7	15	30	45
Agua destilada	100	96	72	39	12	0
2.5	100	100	96	83	72	61
5	100	100	100	89	83	72
7.5	100	100	100	100	96	94
10	100	100	100	100	100	98
15	100	100	89	77	71	62
20	100	93	74	61	43	25
25	100	82	70	48	27	6

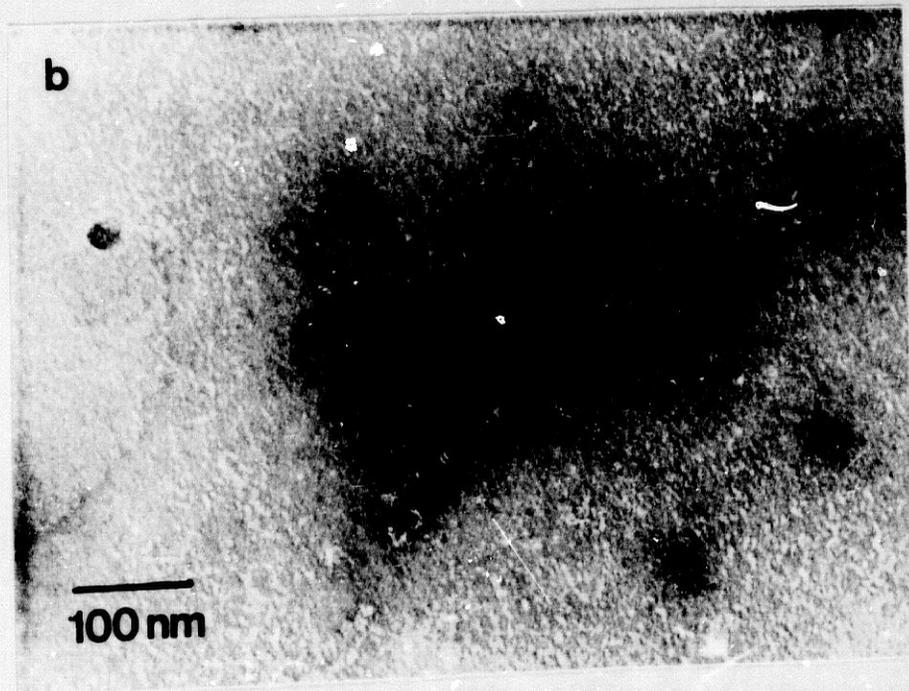
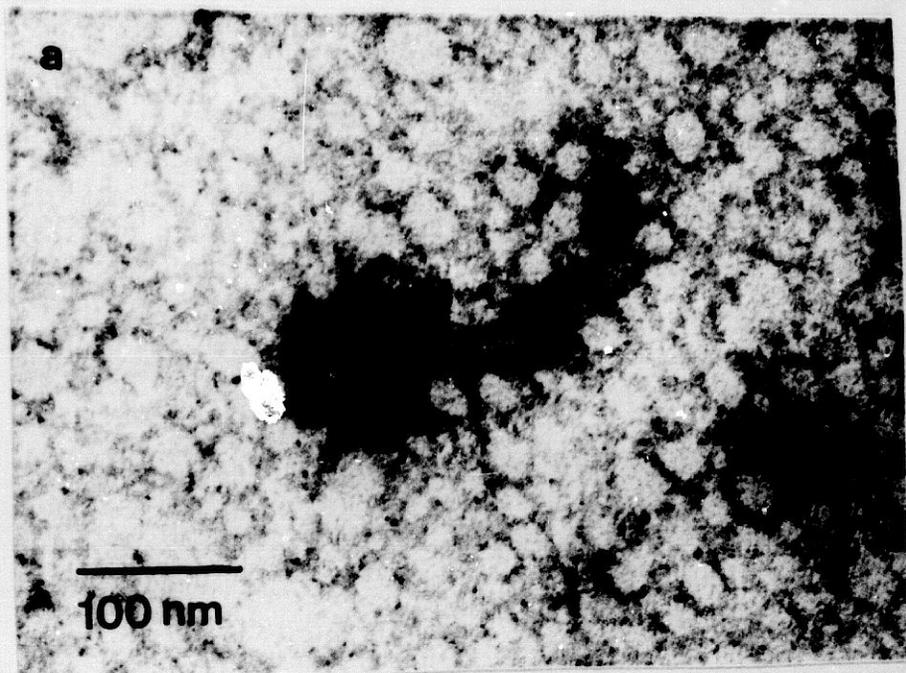
2.9.- Estudio morfológico al Microscopio Electrónico.

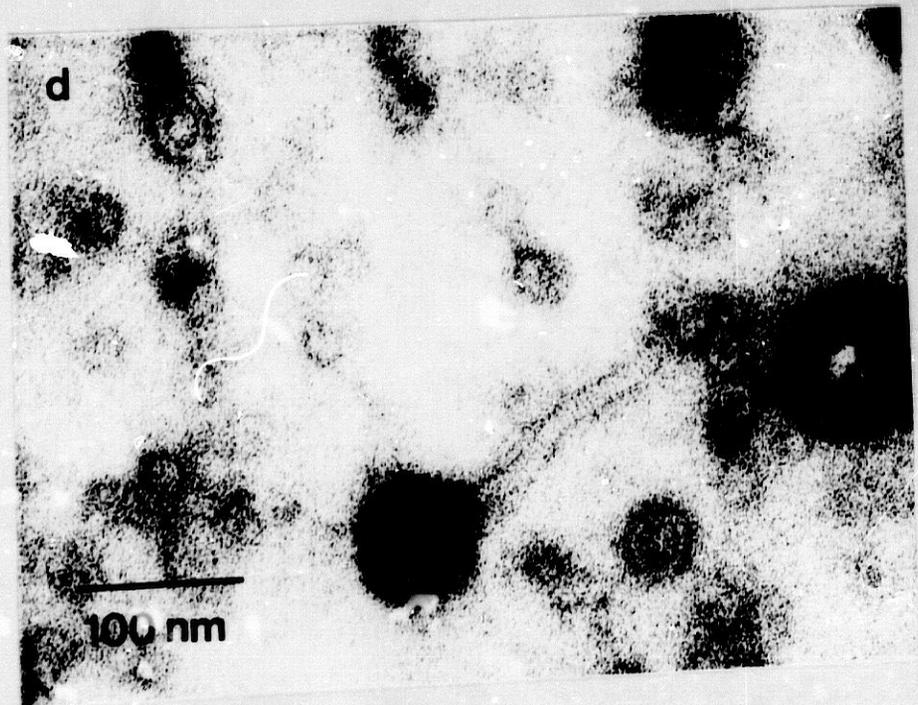
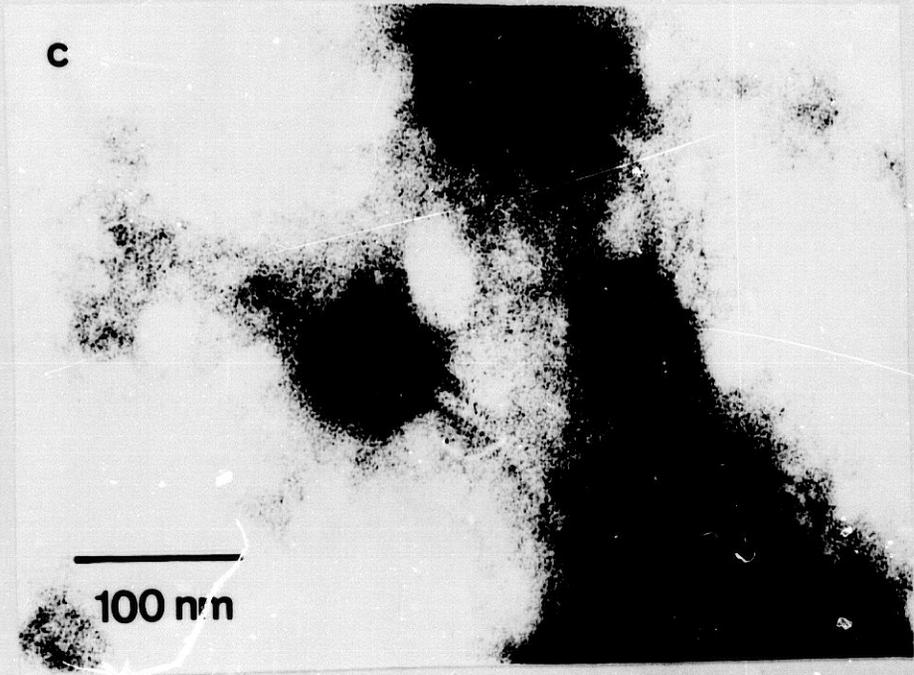
Los tres fagos muestran una morfología similar, como puede observarse en la figura 4. La cabeza es icosaédrica, sin collar y con cola flexible, larga, no contráctil y estriada. No se observan fibrillas ni espículas al final de la cola.

Fig. 4.a : Fago #F5-4.

Fig. 4.b : Fago #F9-11.

Fig. 4.c y 4.d : Fago #F12-9.





DISCUSIÓN

El estudio de bacterias halófilas moderadas en suelos hipersalinos constituye una línea de investigación que viene desarrollándose en nuestro Departamento desde 1976 (Quesada y col., 1983, 1984, 1985, 1986, 1987).

Por otra parte, en las tres últimas décadas, se ha intensificado el estudio de bacteriófagos obtenidos a partir de muy diversos hábitats. Sin embargo, y en base a la bibliografía consultada, se ha podido constatar que no existen referencias acerca del aislamiento o estudio de bacteriófagos activos frente a microorganismos halófilos moderados, a excepción del realizado por Calvo y col. (1988).

Por este motivo, el presente estudio supone una importante aportación al campo del halofilismo moderado y, más concretamente, a la repercusión ecológica que los bacteriófagos pueden ejercer sobre dichas poblaciones.

Una cepa se consideró lisogénica si producía fagos, bien espontáneamente o bien tras inducción, siendo capaz de formar placas de lisis sobre una cepa indicadora. Asimismo, se verificó la inmunidad de la cepa lisogénica hacia su propio fago.

En estudios preliminares se pudo observar que las cepas de *Deleya halophila* no eran capaces de producir bacteriófagos de un modo espontáneo, hecho que condujo a la utilización de un agente inductor externo.

Se seleccionó la Nitomicina C basandonos en estudios realizados por numerosos autores (Yokokura y col., 1974; Liss, 1981; Stevens y col., 1982; Timme y Brennan, 1984) y tras el fracaso obtenido con otras sustancias que, en principio, ofrecían menor riesgo en cuanto a manipulación o eran de tenencia habitual en el laboratorio. como pudiera ser el agua oxigenada. Yokokura y col. (1974) encontraron que la inducción con Nitomicina C dependía de la concentración a la que se adicionaba, de la temperatura de incubación y de la edad del cultivo. Se seleccionó la concentración de 2,5 µg/ml como óptima para la inducción de cultivos en fase exponencial de crecimiento, ya que a dicha concentración se obtuvieron resultados satisfactorios.

Las experiencias realizadas por Clark y col. (1986), demostraban que el ambiente donde se desarrollaban los bacteriófagos desempeña un papel muy importante en la producción de fagos por bacterias lisogénicas. Así, cuando una cepa sensible se infecta con un bacteriófago obtenido de una bacteria lisogénica, hay dos factores ambientales importantes que influyen en la decisión lisis-lisogenia: la multiplicidad de infección y la composición del medio (Kourilsky, 1973). A mayor multiplicidad de infección o cuando el hospedador crece en un medio pobre en nutrientes, se favorece el ciclo lisogénico sobre el lítico.

En nuestro estudio de lisogenia se emplearon varios medios de cultivo a diferentes concentraciones de nutrientes y sales con objeto de favorecer la lisis. Los resultados óptimos se obtuvieron con medio MH al 5% (p/v) de sales totales.

La frecuencia de lisogenia se ha determinado entre una muestra representativa de cepas y del estudio realizado se desprende que el porcentaje de cepas con actividad lítica es bastante elevado (77%).

Sin embargo, este porcentaje puede ser incluso más alto, teniendo en cuenta que los lisados obtenidos tras la inducción, al liberarlos de las células por filtración, pueden perder su posible actividad, bien porque los factores activos queden retenidos en el filtro o bien porque se inactiven. De este modo, Betz y Anderson (1964) encontraron que, mientras 9 cepas de *Clostridium sporogenes* inhibían el crecimiento de otras cepas de la misma especie, sus filtrados libres de células eran inactivos. Nieves y col. (1981), tras inducir los bacteriófagos a par-

tir de varias especies de *Clostridium* con Mitomicina C, de los lisados libres de células, sólo uno retenía actividad después de la filtración.

No obstante, estudios preliminares demostraron que los lisados obtenidos tras inducción no presentaban actividad lítica cuando se ensayaban directamente o tras la adición de cloroformo. Estos resultados nos indujeron a utilizar la filtración a través de membranas Millipore (0,22 μm de diámetro) como tratamiento previo y a ensayar la actividad lítica de los filtrados.

Por otro lado, debe considerarse que alguno de los fagos se liberaban, a veces, en tan bajo número que no podían ser detectados.

La actividad lítica de los filtrados podía deberse a la acción de un bacteriófago, o bien, a la acción de una sustancia tipo bacteriocina, ambos obtenidos tras la inducción. La ausencia, en algunos casos, de placas de lisis aisladas, condición imprescindible para involucrar a un bacteriófago en cualquier actividad lítica (Tagg y col., 1976) condujo a la anterior afirmación.

Además, no se podía descartar el hecho de que algunas de las cepas, cuyos filtrados dieron actividad lítica, pudieran producir ambos tipos de agentes al mismo tiempo (Traub y col., 1974).

Los filtrados procedentes de las cepas F5-4, F6-8, F8-13, F9-11 y F12-9 eran activos frente a gran número de cepas, mientras que los filtrados procedentes de las cepas F6-5, F9-10, F9-12, F10-7, F12-6, G-2, G-25 y G-26 no produjeron ningún tipo de actividad, lo que nos permite afirmar que, en el 23% de las cepas de *Deleya halophila* estudiadas no se ha detectado, hasta el momento, la propiedad de lisogenia.

En cuanto a la sensibilidad de las cepas a los distintos filtrados, algunas, como F5-9, F8-8, F12-9, G-2, G-3 y G-25 eran sensibles a gran número de ellos, mientras que otras, F1-10, F6-8, F6-10 y F10-8, fueron resistentes a todos ellos.

En los filtrados obtenidos a partir de las cepas F5-9 y F6-6 no se pudo demostrar la presencia de un fago atenuado típico, ya que las mismas cepas inducidas eran sensibles a sus filtrados y, además, no conseguimos obtener placas aisladas de lisis. Keogh y Shimmin (1969) indujeron la lisis de *Streptococcus cremoris* por radiación ultravioleta

y encontraron que el filtrado obtenido era activo frente a la cepa de la que se obtuvo. El examen al microscopio electrónico demostró que el filtrado contenía partículas análogas a fagos, la mayoría de ellas, cabezas vacías. Atribuían la capacidad antibacteriana del filtrado a la presencia de un bacteriófago defectivo o a un componente letal de él. En una cepa de *Bacillus stearothermophilus*, tratada con Mitomicina C, se liberaba el fago ϕ n-4, que podía detectarse por la formación de placas sobre la cepa de la cual se indujo (Holmes y col., 1981). Timme y Brennan (1984), tras inducir varias cepas de micobacterias, encontraron que los filtrados eran activos frente a sus cepas de origen

Nosotros hemos atribuido este hecho al establecimiento del estado transportador, también llamado pseudolisogenia, en el que hay un equilibrio entre bacterias y fago, y el profago coexiste con el hospedador, pero sin establecer una unión hereditaria estable de sus respectivos genomas. Hay una liberación espontánea de partículas de fago y la segregación de bacterias sensibles al fago.

Tras el estudio de lisogenia se procedió al aislamiento de los bacteriófagos. Un problema considerable, sólo soslayado en parte, era la dificultad que ofrecía la visualización de las placas de lisis, ya que estas eran muy pequeñas y turbias, debido este último hecho, probablemente, a la aparición de clones bacterianos resistentes que son lisogenizados por el fago (Adams, 1959) y que enmascaran la zona de inhibición.

Además, se requería una concentración óptima de células hospedadoras para que las placas del fago pudieran verse sobre el tapiz de su hospedador. Si se añadían demasiadas células a la capa de agar, las células hospedadoras alcanzaban un máximo de turbidez y paraban de crecer antes de que se formaran placas visibles. Si se añadían pocas células, los tapices no llegaban a ser suficientemente turbios y no se podían observar placas.

Estas dificultades explican las diferencias existentes entre las actividades de filtrados procedentes de la misma cepa, pero obtenidos en distintas experiencias, como es el caso del filtrado de la cepa de *Deleya halophila* F12-9, que en una primera experiencia fue activo sobre la cepa G-26 (Calvo y col., 1988) y que en estudios posteriores no dió

actividad . Incluso el fago aislado de este filtrado, #F12-9, fue inactivo frente a *Deleya halophila* G-26. Esta discrepancia parece, además, indicar que la cepa F12-9 es capaz de liberar, o bien, otro bacteriófago, o bien, una sustancia con actividad litica, tipo bacteriocina.

Son muchos los factores que influyen en la formación, tamaño, turbidez, etc. de las placas de lisis. Gliesche y col. (1988) encontraron que cuando los bacteriófagos se propagaban sobre cepas hospedadoras con tiempos de generación largos, el tamaño de placa se incrementaba.

Hemos demostrado que la mayor parte de las cepas de *Deleya halophila* liberaban partículas de bacteriófagos tras exponerlos a la acción de agentes inductores, como en este caso, la Mitomicina C. Sin embargo, la viabilidad (como medida de la capacidad de formar placas de lisis) de las partículas liberadas sólo ha podido demostrarse en el 11% de los casos en que se obtuvo actividad. Ello nos conducía a hacernos la pregunta de si alguna de las partículas inducidas eran defectivas, se trataba de un sustancia tipo bacteriocina o si las condiciones para determinar la viabilidad eran las adecuadas. Terzaghi y Terzaghi (1978), trabajando con estreptococos lácticos, ya se encontraron con problemas de este tipo. Ellos demostraron que la formación de placas, incluso utilizando los hospedadores óptimos, estaba fuertemente influenciada por el pH y por la edad del cultivo.

En nuestro intento de mejorar la visualización de las placas de lisis, ensayamos medios de cultivo a varias concentraciones de sales, seleccionando finalmente el medio MH al 5% (p/v) de sales totales y con un alto grado de humedad.

Por otra parte, alguno de los bacteriófagos aislados en principio, como los fagos F6-8 y F8-13, que mostraron actividad frente a gran número de cepas, eran inestables en el tiempo y difíciles de propagar bajo las condiciones de ensayo.

La elección de los fagos #F5-4, #F9-11 y #F12-9, como ya indicábamos en el capítulo de resultados, se debió principalmente a su fácil manejabilidad y reproducción.

Las placas de lisis que formaban estos fagos presentaban un halo alrededor, que crecía conforme aumentaba el tiempo de almacenamiento. Se piensa que este halo puede ser debido a que el fago induce la producción de un enzima por parte de la bacteria. Brown y col. (1978) atribuían este hecho a la inducción y liberación de una despolimerasa del polisacárido en las células infectadas. Otras investigaciones realizadas a este respecto demostraban que los bacteriófagos que infectan bacterias capsuladas, como lo es *Deleya halophila*, a menudo usan la capa de polisacárido capsular como un receptor de superficie celular primario. La penetración del bacteriófago a través de la capsula para alcanzar la propia superficie celular es mediada por la acción de un enzima, la glicanasa, que queda asociada al fago. Whitfield y Lam (1986) encontraron, trabajando con un bacteriófago activo frente a *Escherichia coli* K30, que durante la replicación del bacteriófago se producía un exceso de glicanasa, apareciendo grandes halos alrededor de las placas de lisis.

El filtrado de la cepa F12-9 de *Deleya halophila* producía dos tipos de placas de lisis, que solo se diferenciaban en el tamaño. Ello sugería que más de un tipo de fagos podía estar presente en la preparación. Tras realizar sucesivos aislamientos, tal y como describe Adams (1959), tanto a partir de las placas de lisis grandes como pequeñas, volvían a aparecer en ambos casos una mezcla de los dos tipos de placas. Resultados análogos obtenían Robakis y col. (1985) trabajando con fagos de *Gluconobacter*, y tras observarlos al microscopio electrónico, detectaron una única morfología. En las observaciones realizadas por nosotros, encontramos igualmente, un sólo tipo de fago, por lo que concluimos señalando que los dos tipos de placas formadas eran simplemente variaciones originadas por un único tipo de fago.

Al estudiar el espectro de actividad de los tres fagos encontramos que solo eran activos frente a cepas de *Deleya halophila* y no mostraron ningún tipo de actividad frente al resto de las cepas halófilas moderadas y marinas. Esto está de acuerdo con la naturaleza lisogénica de los fagos.

El espectro de actividad de los tres fagos está estrechamente relacionado. Ocho cepas mostraron sensibilidad a los fagos; las cepas

F1-10, F5-4 y F6-7 eran sensibles a los fagos ϕF9-11 y ϕF12-9; las otras cinco cepas, F5-7, F6-3, F6-5, F8-13 y G-2 eran sensibles a los tres fagos. De este modo, ϕF5-4 puede distinguirse de los otros dos fagos atendiendo a su espectro de actividad.

Se sabe que las células bacterianas son inmunes a la superinfección con el fago homólogo, pero capaces de soportar al heterólogo, como lo demuestra la cepa F5-4, que transporta al fago ϕF5-4 y puede ser infectada por los fagos ϕF9-11 y ϕF12-9. En este caso, se producen recombinantes naturales (Campbell, 1981). Los fagos, realmente pueden beneficiar a su población hospedadora por actuar como agentes de intercambio genético (Campbell, 1981).

Los fagos poseen una alta especificidad para un número limitado de cepas hospedadoras. Estas propiedades en cuanto al espectro de actividad pueden usarse para diferenciar taxonómicamente dichas cepas (Imbesi y Manning, 1982). Hasta el momento, hemos aislado un "set" formado únicamente por tres fagos; sin embargo, ampliando dicho número, podríamos llegar a diferenciar distintos fagotipos dentro de la especie *Deleya halophila*.

Al estudiar la eficacia de multiplicación, pudimos observar que el fago ϕF5-4 era incapaz de originar placas de lisis aisladas sobre las cepas F6-3, F8-13 y G-2; igual sucedía con el fago ϕF9-11 sobre la cepa F8-13 y con el fago ϕF12-9 sobre F8-13 y G-2. Debido a que las placas de lisis formadas por los tres fagos sobre sus hospedadores más susceptibles eran muy pequeñas, pudiera ocurrir, en los casos anteriormente citados, que se formasen placas liticas microscópicas no detectables. Otra explicación posible podría ser aquella en la que, una vez el fago adsorbido, no aumentara su producción, debido al fenómeno de "lisis desde afuera", donde la lisis celular surge sólo por la mera adsorción de gran número de fagos y donde la replicación del fago no tiene lugar. Así, las diluciones de las suspensiones stocks con bajo número de partículas viricas, tendrían una concentración inferior a la necesaria para originar la lisis bacteriana. Resultados análogos obtuvieron Souza y col. (1972) cuando trabajaban con un fago polivalente para varias especies de enterobacterias. Demostraron que el fago era capaz de

adsorberse sobre alguna de las cepas pero no de multiplicarse intracelularmente.

En los estudios realizados sobre la adsorción de bacteriófagos marinos y halofagos extremos a sus células hospedadoras en función de la concentración salina, los investigadores centraron su atención sobre el efecto que el ClNa, como única sal presente en los medios empleados, pudiera ejercer en la etapa citada (Torsvik y Dundas, 1978; Torsvik y Dundas, 1980). Tan solo, Zachary (1976) observaba las diferencias de adsorción que los fagos nt presentaban cuando variaba las concentraciones de ClNa, por un lado, y cuando añadía ClK a los medios de ensayo con concentraciones variables de ClNa.

Nosotros hemos realizado la adsorción en MH líquido, a diferentes concentraciones de sales totales, observando que los mayores porcentajes de adsorción aparecían a concentraciones comprendidas entre 2,5 y 7,5% (p/v). No se detectó adsorción en medio MH sin sales, de lo que se deduce que los fagos de *Deleya halophila* no son capaces de adsorberse y, por tanto, de multiplicarse, en ausencia de sales.

También observamos que el cloroformo no reducía la eficacia de multiplicación de ninguno de los fagos; de ello concluimos que en su estructura no había presencia de lípidos.

Las diferencias de adsorción presentadas por los fagos cuando se variaba la concentración salina del medio podría deberse a una alteración de la conformación molecular o una alteración de cargas a las diferentes concentraciones (Keogh y Pettingill, 1963).

Al utilizar soluciones de sales totales a diferentes concentraciones y comparar los resultados obtenidos con las adsorciones encontradas en el medio MH líquido, pudimos constatar que la adsorción seguía siendo eficaz en ausencia de nutrientes, si bien podían observarse ligeras diferencias dependiendo del fago estudiado. Así, el fago #F9-11 presentó mayor porcentaje de adsorción en solución de sales que en medio MH líquido, mientras que los fagos #F5-4 y #F12-9 se adsorbían mejor en el medio complejo que en la solución de sales. Por otra parte, se observó que los fagos #F9-11 y #F12-9 requerían para su óptimo de

adsorción mayor concentración salina en solución de sales que en medio MH.

Deleya halophila tiene su óptimo de crecimiento a una concentración de 7,5% (p/v) de sales totales. El Na⁺ le es imprescindible para su crecimiento y no puede ser sustituido por ningún otro catión. La combinación de Na⁺ con Mg²⁺ favorece el crecimiento. El Ca²⁺ no es indispensable para el crecimiento (Quesada y col., 1987).

Muchos bacteriófagos han mostrado requerir mayor concentración de cationes divalentes, como calcio y magnesio, en alguna etapa de su ciclo de desarrollo, que la requerida para el crecimiento de sus bacterias hospedadoras (Watanabe y Takesue, 1972). Sin embargo, la naturaleza de estos requerimientos varía dependiendo del bacteriófago estudiado. Por ejemplo, Rountree (1955) describió algunos fagos de estreptococos que requerían iones calcio para su multiplicación. El fago p465 de *Brevibacterium lactofermentum* (Oki y Ozaki, 1967) requería iones calcio o magnesio para su adsorción. Por otro lado, el colifago T5 (Adams, 1949; McCorquodale y Lanni, 1964) y el fago P1 de *Microbacterium ammoniophilum* (Seto y col., 1964) requerían iones calcio o magnesio para la penetración. Los fagos activos frente a especies psicrófilas de *Pseudomonas* necesitaban iones Ca²⁺ para su crecimiento (Olsen y col., 1968). El fago ml3, activo frente a *Streptococcus lactis* ML3, no se adsorbía en ausencia de cationes mono o divalentes y requería cationes divalentes para la multiplicación, pero no para la adsorción (Oram y Reiter, 1968). Chater y Carter (1979) encontraron que el fago R4, activo sobre especies de *Streptomyces*, presentaba unos requerimientos extraordinariamente altos de cationes divalentes para una adsorción óptima.

Mención aparte debemos hacer de los fagos de bacterias lácticas que, debido al medio en que se desarrollan, es lógico pensar que presenten mayores requerimientos de cationes divalentes, especialmente, de calcio. Con el fago PL-1, activo frente a *Lactobacillus casei* ATCC 27092, los iones calcio no se requerían para la adsorción del fago, aunque sí para la penetración (Watanabe y Takesue, 1972). Por el contrario, Kalso y col. (1986) encontraron que el fago KSY1, activo frente a estreptococos lácticos, se adsorbía en mayor proporción en presencia de iones calcio. Además, los incrementos en concentraciones de iones

calcio y magnesio favorecían, como se esperaba, la adsorción de KSY1 a su hospedador.

Al estudiar el efecto de los cationes monovalentes en la adsorción, los mayores porcentajes se encontraron, generalmente, a concentraciones intermedias. El K⁺ favorecía la adsorción del fago ϕ F5-4, mientras que en el caso de los fagos ϕ F9-11 y ϕ F12-9 la adsorción era más eficaz en presencia de Na⁺ que de K⁺. Por otra parte, el fago ϕ F12-9 mostró porcentajes de adsorción elevados al 5 y 7,5% (p/v) en presencia de ambos cationes, superiores a los que dieron los otros dos fagos.

En el estudio del efecto de los cationes divalentes en el proceso de adsorción, observamos que el fago ϕ F5-4 presentaba, una vez más, un comportamiento distinto del de los fagos ϕ F9-11 y ϕ F12-9. De este modo, el Ca²⁺ inhibía, en cierta medida, la adsorción de este fago, mientras que el ión Mg²⁺ parecía favorecerla, observándose porcentajes de adsorción similares a los obtenidos en presencia de K⁺. Por el contrario, para los fagos ϕ F9-11 y ϕ F12-9 la adsorción en presencia de Ca²⁺ era inusualmente alta a concentraciones comprendidas entre el 2,5 y 10% (p/v). Además, y de forma general, a concentraciones elevadas (a partir de 10-15%), los tres fagos se inactivaban o perdían completamente su viabilidad.

Zachary (1976) estudiando los fagos nt de *Beneckeia natriegens*, encontró que la adsorción del fago nt-1 era dependiente de la concentración de cationes monovalentes en el medio, que requería la presencia de ClNa para la adsorción y que la adición de ClK como osmótico iónico, favorecía la adsorción. El fago nt-6 se adsorbía en más baja proporción, pero a todos los niveles de ClNa ensayados, siendo, por tanto, independiente de la concentración de ClNa. Torsvik y Dundas (1980) demostraron que la adsorción del fago Hs-1 de *Halobacterium salinarium* dependía considerablemente de la concentración de ClNa del medio. Sin embargo, Pauling (1982), demostró con posterioridad que esta dependencia no podía hacerse extensible a todos los halofagos extremos, ya que los fagos, Hh-1 y Hh-3, no mostraban grandes diferencias de adsorción en medios de concentraciones variables de ClNa.

De los resultados obtenidos podemos deducir que, a excepción del efecto inhibitor que el Ca^{2+} parece ejercer sobre la adsorción del fago $\phi\text{F5-4}$, en general, los cationes divalentes permiten un porcentaje de adsorción óptimo en unos márgenes de concentraciones salinas más amplios que los cationes monovalentes, la solución de sales totales o el medio de cultivo MH.

Las curvas de multiplicación de un paso realizadas a distintas concentraciones salinas proporciona el modo de cuantificar los efectos de las variaciones de los niveles iónicos sobre la replicación del bacteriófago.

Un factor importante en la realización de las curvas de multiplicación de un paso es la edad del cultivo en el momento de iniciar la experiencia. Hemos utilizado cultivos de *Deleya halophila* en fase logarítmica de crecimiento ya que, en ensayos previos, encontramos mayor producción de fagos a dicha edad. En este sentido, Kropinski y Warren (1970) encontraron que, los fagos activos sobre *Pseudomonas acidovorans*, presentaban un tamaño de la explosión de 30 cuando se utilizaban células en fase estacionaria, y de 600 cuando las células bacterianas estaban al final de la fase logarítmica.

La mayoría de los estudios realizados sobre las curvas de multiplicación de un paso se hicieron a la concentración óptima para el crecimiento de la célula hospedadora. En general, los fagos activos frente a microorganismos procedentes de hábitats salinos (halotolerantes, marinos y halófilos extremos) presentan periodos de latencia largos y tamaño de explosión variables. Thomson y Woods (1974) estudiaron fagos activos frente a una bacteria halotolerante, *Achromobacter*, y observaron que las curvas de multiplicación de un paso revelaban periodos de latencia largos (de 85 a 100 min.) y tamaños de las explosiones grandes (de 230 a 380 partículas liberadas por célula infectada).

Por otro lado, en el estudio de las curvas de multiplicación de un paso de fagos marinos, Chen y col. (1966) detectó largos periodos de latencia, de 150 y 180 min., y bajos tamaño de la explosión, 28 y 20.

Los fagos de bacterias halófilas extremas eran aún más lentos en su replicación. Así, el halofago Ja-1, aislado por Wais y col. (1975) presentaba un periodo de latencia de varias horas y aproximadamente igual al tiempo de generación de su bacteria hospedadora, *Halobacterium cutirubrum*, y un tamaño de la explosión de 140. El fago Hs-1 activo frente a *Halobacterium salinarium* y estudiado por Torsvik y Dundas (1980), presentaba un periodo de latencia que, a elevadas concentraciones salinas podía ser incluso, 2-5 veces mayor que el tiempo de generación de su hospedador. El tamaño de la explosión era de 500. Por otro lado, para el halofago Hh-3 encontraron un periodo de latencia de 8 horas. El tamaño de la explosión fue de 425 fagos por célula infectada (Pauling, 1982). El periodo de latencia para el fago ϕ N de *Halobacterium halobium* era de 14 horas tras la infección. El tamaño de la explosión fue de 400 a 450 fagos por célula infectada (Vogelsang-Wenke y Oesterhelt, 1988).

Al 7,5% (p/v) de sales totales, concentración óptima para el crecimiento de *Deleya halophila*, los fagos ϕ F5-4, ϕ F9-11 y ϕ F12-9 presentaron periodos de latencia relativamente largos (entre 115 y 130 min.) y distintos tamaños de explosión (entre 57 y 262). Comparando nuestros resultados con los de los diversos autores, podemos observar que la multiplicación de los tres fagos aislados recuerda a la de los fagos marinos y a la de los fagos de bacterias halotolerantes, más que a la de los halofagos. Este hecho guarda también relación con las diferencias existentes entre la cinética de crecimiento de las bacterias marinas, halotolerantes y halófilas moderadas respecto de las halófilas extremas.

En el estudio realizado sobre la influencia de la variación de la concentración de sales totales en la multiplicación, hemos observado que los tres fagos presentaron los periodos de latencia más bajos al 5% (p/v). Un aumento o disminución de la concentración salina incrementaba paralelamente el tiempo de dicho periodo. Sin embargo, las mayores producciones de fagos se obtuvieron a una concentración de 7,5% (p/v), exceptuando el fago ϕ F9-11 que, al contrario, mostraba una mínima producción a esta concentración y presentaba el óptimo al 10 y 15% (p/v). Zachary (1976) encontró que la producción del fago nt-1 era máxima a la

concentración óptima para el crecimiento bacteriano, mientras que la producción para nt-6 era mayor a un valor de concentración inferior al óptimo para el crecimiento de la célula hospedadora.

Es interesante señalar las bajas producciones obtenidas con el fago ϕ F12-9 a todas las concentraciones salinas y, especialmente, a elevadas concentraciones, añadiendo a ello un periodo de latencia extremadamente largo.

Al observar periodos de latencia largos y bajas producciones intracelulares de fagos, podríamos pensar que la frecuencia de lisogenización por estos fagos es bastante elevada. Por otro lado, cabe pensar que los aumentos de los periodos de latencia a concentraciones salinas subóptimas, podría ser debido a la reducida actividad metabólica del hospedador.

Como hemos señalado, el tamaño de la explosión para el fago ϕ F12-9 era muy bajo a todas las concentraciones salinas (entre 5 y 57 partículas infectivas por célula). Además, cuando se propagaba dicho fago, obteníamos títulos de 10^7 - 10^8 UFP/ml. Ackermann y col. (1978) encontraron que el fago cúbico Bam35, activo sobre *Bacillus megaterium* cepa Tiberius, presentaba un bajo tamaño de explosión, de 39 partículas por célula, y alcanzaba un título de hasta sólo 10^7 UFP/ml, sugiriendo que la cepa utilizada no debiera ser el mejor hospedador. Al realizar el espectro de actividad del fago y obtener las eficacias de multiplicación sobre las cepas sensibles, encontramos que la mayor eficacia de multiplicación se obtenía sobre su cepa hospedadora. De este modo, pensamos que pudiera existir otra cepa de *Deleya halophila*, que no ha sido aislada, y que pudiera ser el mejor hospedador para el fago ϕ F12-9. Por otra parte, Taylor y col. (1980), trabajando con un fago de *Pseudomonas*, el Psp231a, hallaban un tamaño de la explosión inusualmente bajo, de aproximadamente 20 partículas por célula infectada, cuando en otras cepas de la misma especie, las producciones eran muy superiores. Observaciones realizadas al microscopio electrónico mostraban un elevado número de partículas incompletas en los lisados obtenidos. Cuando nosotros realizamos la observación al microscopio electrónico de los filtrados, hallamos gran cantidad de cabezas vacías y colas sueltas, algunas de ellas de gran tamaño. Este hecho, junto con los elevados porcentajes de

adsorción presentados en las experiencias anteriormente citadas, parecen indicar una deficiencia en la multiplicación intracelular del fago ϕ F12-9.

A concentraciones de 20 y 25% (p/v) no hemos observado multiplicación de los bacteriófagos, por lo que pensamos que a concentraciones elevadas, los fagos pierden su capacidad para multiplicarse. Torevik y Dundas (1980) describieron al fago Hs-1; la lisis de su bacteria hospedadora, *Halobacterium salinarium*, una vez infectada por el fago, estaba fuertemente influenciada por la concentración de ClNa del medio de cultivo. La lisis aparecía rápidamente cuando la concentración en el medio era de 4,3 M de ClNa, pero se establecía una infección persistente en medios con altas concentraciones. Al observar adsorción y no multiplicación al 20% para los tres fagos (23, 12 y 24% de adsorción para ϕ F5-4, ϕ F9-11 y ϕ F12-9, respectivamente), pensamos que a esta concentración, el material genético del fago puede penetrar al interior de la bacteria y, una vez dentro, pudiera tener dos destinos diferentes: por un lado, podría perder su capacidad de replicación y ser posteriormente destruido por enzimas bacterianas y, por otro lado, pudiera ser que el material genético del fago se integrara en el cromosoma bacteriano por un proceso de lisogentización.

Hemos realizado el estudio de la influencia que el pH ejercía sobre la viabilidad de los fagos y pudimos observar que los fagos eran activos a valores de pH comprendidos entre 5 y 10. El máximo de estabilidad era 7, excepto para el fago ϕ F9-11 que presentaba su máxima estabilidad a pH 6. A un valor de pH 4 el fago ϕ F5-4 mantenía un 5,2% de viabilidad, el fago ϕ F12-9 sufría una fuerte inactivación, dando un 0,13% de supervivencia y, finalmente, el fago ϕ F9-11 se inactivó casi totalmente. Los estudios realizados sobre la influencia del pH en la viabilidad de los bacteriófagos han revelado que, en general, mantienen su viabilidad a pH comprendidos entre 5 y 11 para los fagos aislados de hábitats acuáticos (Holmes y col., 1981; Olsen y col., 1968; Thomson y Woods, 1974; Whitman y Marshall, 1971), y entre 5 y 9 para los aislados del suelo (Sykes y col., 1981). Una excepción parecen constituirlos los fagos aislados por Chaina del Mar del Norte y del Mar de la India, los

cuales solo permanecían viables a pH comprendidos entre 7,3 y 7,9 (Chaina, 1965). Como podemos observar, los fagos de *Deleya halophila* siguen el modelo general, manteniéndose viables a pH elevados e inactivándose a pH ácidos.

En cuanto a la rápida transición hacia la inestabilidad en el pequeño rango de unidades observado (1 unidad) es característico de la desnaturalización ácida de las proteínas (Sykes y col., 1981).

En los estudios de supervivencia a diferentes temperaturas y tiempos de incubación, encontramos que la cinética de inactivación era de tipo exponencial. Los fagos F9-11 y F12-9 perdían viabilidad tras 3 horas de incubación a 50°C y a los 10 min. a 60°C. Por el contrario, el fago F5-4 fue más resistente a la inactivación térmica, observándose una inactivación total a las 7 horas de incubación a 50°C y tras 1 hora a 60°C.

Son numerosos los estudios realizados sobre la influencia de la temperatura en la viabilidad de los bacteriófagos, sobretodo en lo que se refiere a fagos de bacterias marinas.

En un principio, se había sugerido que los fagos marinos eran más susceptibles a la inactivación por elevadas temperaturas que los fagos de origen no marino (Spencer, 1965).

Por otro lado, dentro del ambiente marino, los fagos aislados por Spencer (1961) del Mar del Norte, fueron más sensibles al calor que aquellos aislados de aguas tropicales. Los fagos marinos examinados por Spencer (1963) se inactivaban en 1 hora a 55°C. Los fagos aislados por Chaina (1965) a partir de aguas de mar de la India y del Mar del Norte, eran más estables al calor que sus hospedadores, y podían tolerar 50°C durante 30 min. Todos los bacteriófagos se inactivaban a 60°C durante 15 min., pero eran viables a 60°C durante 2-5 min. Los fagos activos frente a la bacteria halotolerante *Achromobacter*, aislados por Thomson y Woods (1974), presentaban curvas de inactivación a 60°C que eran bifásicas. Zachary (1976), estudiando el sistema marino formado por *Be-neckeia natriegens* y sus fagos, encontró que el fago nt-1 era estable a temperaturas de 37°C, mostrando un descenso lento en el título cuando incubaba a 50°C (50% de descenso después de 20 días), y se inactivaba rápidamente a 60°C. El fago nt-6 era más susceptible a la inactivación

térmica, mostrando un descenso del título a 37°C y una inactivación rápida a 50 y 60°C. Koga y col. (1982) estudiaron fagos activos sobre *Vibrio parahaemolyticus* aislados de aguas residuales y encontraron que alguno de los fagos se inactivaban totalmente cuando se exponían a 55°C durante 30 min. Otros, más sensibles, perdían su actividad lítica a 45°C. Había otro grupo de fagos que eran más resistentes al calor, y se inactivaban a 60°C durante 30 min. Nakanishi y col. (1966) encontraron que un fago filamentososo de *Vibrio parahaemolyticus* era completamente resistente a un calentamiento de 60°C durante 80 min. El fago rp-1 de *Vibrio fisheri* MJ-1 era estable a temperaturas inferiores a 35°C, pero se inactivaba rápidamente a temperaturas de 45°C o superiores (Levisohn y col., 1987).

Las investigaciones realizadas con fagos de bacterias halófilas extremas no abarcaron este aspecto, por lo que no tenemos criterios de comparación.

Por otro lado, la información existente sobre el efecto de la temperatura en la inactivación de bacteriófagos de suelos, es bastante escasa. En general, la mayoría de los fagos de origen telúrico se inactivan a elevadas temperaturas. Williams y Lanning (1984), estudiando la estabilidad de los fagos de estreptomicetos, observaron mayores porcentajes de supervivencia a bajas temperaturas y una inactivación total a 40°C. Comparando con los datos anteriormente expuestos, podemos considerar que los fagos de *Deleya halophila* son bastante resistentes a la inactivación térmica con un comportamiento similar a la mayoría de los fagos aislados del ambiente marino.

En las experiencias realizadas sobre la influencia de la fuerza iónica en la estabilidad de los bacteriófagos encontramos que los porcentajes de supervivencia del fago #F9-11 sufrían un fuerte descenso en el momento de suspenderlos en soluciones de bajas o elevadas concentraciones. Este brusco descenso al comienzo de realizar las experiencias, junto con la estabilización que se observaba después podría deberse al choque osmótico que se producía cuando los fagos pasaban bruscamente de suspensión al 5% (p/v) a otras de más baja o más alta fuerza iónica.

Anderson y col. (1953), trabajando con los colifagos T2, T4 y T6, encontraron que, después de incubarlos en medios con una concentra-

ción 4 M de ClNa y mezclarlos de un modo rápido sobre agua destilada, desaparecía la capacidad de formar placas de lisis de dichos fagos. Esto no ocurría cuando la mezcla se hacía de un modo progresivo. En el estudio del choque osmótico, Whitman y Marshall (1971) encontraron que los fagos psicrófilos de *Pseudomonas* estudiados por ellos se inactivaban en un 99% cuando se diluían 1/100 en agua destilada partiendo de una concentración 4 M de ClNa.

Hemos comprobado que los fagos de *Deleya halophila* son más resistentes al choque osmótico que aquellos de Anderson y col. (1953) y los de Whitman y Marshall (1971).

Continuando con el estudio de supervivencia, los tres fagos mostraron sus mayores porcentajes de supervivencia al 10% (p/v) de sales totales. Tras 45 días de incubación, el fago #F12-9 conservaba un alto grado de viabilidad en un amplio margen de concentraciones (entre 61 y 98% de viabilidad a concentraciones entre 2,5 y 15%); #F5-4 tenía una supervivencia relativa menor y en un rango de concentraciones más estrecho (entre un 67 y 81% de viabilidad a concentraciones de 7,5 y 15%); por último, #F9-11 se inactivaba aproximadamente un 95% en todas las concentraciones ensayadas, excepto al 7,5 y 10%, mostrando porcentajes de supervivencia de 35 y 42%, respectivamente.

El efecto que ejerce la fuerza iónica en la supervivencia de los bacteriófagos ha sido estudiado por numerosos autores. Los fagos aislados por Chaina (1965) a partir de aguas de mar de la India y del Mar del Norte, podían tolerar una concentración salina de hasta un 17% (p/v), pero no especificaron el tiempo de incubación. Dos fagos marinos aislados por Chen y col. (1966) presentaron sus más altos porcentajes de supervivencia en medios con una concentración aproximada de ClNa del 4% (p/v), requiriendo, además, Mg^{2+} para mantener, al menos, una parcial viabilidad. Uno de estos fagos permanecía viable en agua destilada (75% de viabilidad tras 4 días de incubación a 4°C) y el otro se inactivaba totalmente bajo las mismas condiciones. En un principio, el criterio usado para caracterizar a los fagos marinos era por sus requerimientos iónicos específicos (Spencer, 1965). Sin embargo, el fago rp-1, activo frente a la bacteria luminosa marina *Vibrio fisheri* MJ-1, aislado del ambiente marino y específico para un hospedador marino, difiere marcadamente de otros fagos marinos con respecto a su estabilidad iónica.

ca. Incluso en agua destilada, donde otros fagos marinos se lisaban en minutos (Keynan y col., 1974), el fago rp-1 era estable durante 24 horas. Aunque la inactivación no ocurría con cambios en la fuerza iónica, sí se veía afectada la adsorción del fago, máxima al 3% (p/v) de ClNa (cerca de la total salinidad del agua de mar), y decrecía rápidamente en concentraciones o más altas o más bajas (Levisohn y col., 1987).

Los fagos activos frente a especies de *Pseudomonas* psicrófilas sufrían altas inactivaciones cuando se exponían a 4 M de ClNa (Olsen y col., 1968).

En los estudios de la supervivencia de fagos halófilos extremos en medios de variable fuerza iónica encontramos, en primer lugar, que el halofago Ja-1 descrito por Wais y col. (1975) requería soluciones de alta fuerza iónica para su supervivencia, pero sobrevivía en márgenes de concentraciones salinas más amplio que su bacteria hospedadora. Los fagos descritos por Pauling (1982), Hh-1 y Hh-3, diferían marcadamente en sus capacidades de supervivencia en soluciones de variable fuerza iónica. Hh-1 no dependía especialmente de la concentración de ClNa para su estabilidad; parecía estar estabilizado por el Mg^{2+} , y sobrevivía sin pérdida de viabilidad durante periodos de tiempo considerables en soluciones de diferente fuerza iónica y composición. Hh-3, por otro lado, tenía un requerimiento específico de ClNa para mantener su estabilidad y también se estabilizaba por el Mg^{2+} . El halofago Hh-1 de Pauling, siendo más resistente a ambientes de más baja fuerza iónica, mantenía sólo un 0,63% de viabilidad tras exponerlo en agua destilada durante 5 min. En contraste, el fago ϕ N (Vogelsang-Wenke y Oesterhelt, 1988) es el primer halofago que conserva infectividad incluso después de incubación prolongada en agua destilada. Tras 48 horas de exposición en un medio con reducida fuerza iónica (25% de aquel usado para el cultivo), el 100% de los fagos sobrevivían y tras incubarlo en agua destilada durante el mismo tiempo, más del 50% de los fagos eran todavía infecciosos.

Generalmente, los halofagos extremos son menos sensibles a la reducción de la fuerza iónica que sus hospedadores, pero todos ellos requieren altos niveles de ClNa o SO_4Mg para la supervivencia y crecimiento (Pauling, 1982).

Los fagos de *Deleya halophila* han mostrado una tolerancia de exposición en soluciones de alta y baja fuerza iónica que excede, con creces, de aquella de su bacteria hospedadora.

Al igual que la bacteria hospedadora, los fagos se encuentran en la naturaleza en salinas y se sabe que estos hábitats de alta salinidad están expuestos a inundaciones con agua de lluvia. La posibilidad de sobrevivir expuestos a aguas de baja fuerza iónica confiere a estos fagos la capacidad de poder soportar un influjo de agua de lluvia que pudiera ser letal para su hospedador y, por tanto, ofrece una ventaja selectiva para los fagos. De este modo, los fagos servirían para preservar algunos genes del hospedador una vez que hubiera desaparecido la flora, para posteriormente donarlos a células similares en una subsecuente aparición de organismos hospedadores.

Estos fagos son transportados por las bacterias bajo una condición lisogénica. El estado lisogénico supone una ventaja para los fagos que habitan en ambientes extremos, como son las salinas. Bajo determinadas condiciones puede darse una producción de fagos suficiente sin la necesidad de una infección previa de las bacterias sensibles cuando éstas se hallen bajo condiciones óptimas que favorezcan su crecimiento. Al mismo tiempo, permite que los fagos sobrevivan a cambios en el ambiente local que puedan resultar en la eliminación temporal de la población bacteriana. De este modo, el establecimiento de un estado lisogénico, en el caso de *Deleya halophila*, junto con la tolerancia de los fagos a soluciones de baja fuerza iónica, sugiere que estos fagos están bien adaptados a un ambiente que sufre amplias variaciones de salinidad.

El estudio morfológico de los fagos al microscopio electrónico revela partículas con cabeza de forma hexagonal y cola no contráctil, características que los encuadra en la Familia *Styloviridae* (Matthews, 1982). En los tres fagos se observaron estriaciones en la cola por lo que podemos intuir que dichas colas pudieran estar formadas, bien por una serie de anillos, o bien por una estructura dispuesta helicoidalmente a lo largo del eje de la cola, dando una ligera flexibilidad, como puede observarse en las fotografías.

Los estudios realizados sobre bacteriofagos marinos ponían de manifiesto que estos fagos tenían características físicas, tales como morfología, requerimientos iónicos para la estabilidad e inactivación térmica que son similares a fagos de origen no marino (Chaina, 1965; Hidaka, 1972; Kakimoto y Nagatomi, 1972; Keynan y col., 1974; Zachary, 1976). Estas mismas observaciones se han realizado con los fagos de *Deleya halophila*. La similitud en las características físicas de fagos de diferentes ambientes refleja la naturaleza resistente y la reducida susceptibilidad de estos organismos a la selección por factores ambientales.

Hasta ahora, dentro del estudio de fagos activos sobre microorganismos que habitan en zonas salinas, se daban únicamente las definiciones de bacteriofagos marinos y de halofagos, refiriéndose éstos últimos a los fagos activos frente a bacterias halófilas extremas.

El aislamiento de fagos de bacterias halófilas moderadas con características y requerimientos salinos distintos, tanto de los bacteriofagos marinos como de los halofagos, induce, a nuestro modo de ver, a la diferenciación de los mismos en tres grupos: fagos marinos, fagos halófilos moderados y fagos halófilos extremos.

Este es el primer trabajo realizado sobre fagos activos frente a *Deleya halophila* y, también, el primero sobre fagos activos frente a bacterias halófilas moderadas en general. Queda así abierta una gran puerta que conduce a investigar sobre qué efecto ecológico pudieran ejercer los fagos halófilos moderados en las poblaciones que habitan los ambientes extremos que hoy día son objeto de numerosas investigaciones.

CONCLUSIONES

- 1.- Los fagos de lisogenia de *Deleya halophila* #F5-4, #F9-11 y #F12-9 deben considerarse como fagos halófilos moderados atendiendo a su origen y a la influencia de la concentración salina sobre la adsorción y replicación de los mismos.
- 2.- A excepción del efecto inhibitor del Ca^{2+} sobre la adsorción del fago #F5-4, los cationes divalentes permiten, en general, un porcentaje de adsorción óptimo en unos márgenes de concentraciones salinas mas amplios que los cationes monovalentes, la solución de sales totales o el medio MH.
- 3.- El amplio margen de concentraciones salinas a los cuales estos fagos se multiplican y mantienen su viabilidad demuestra el carácter eurihalino de los mismos, en consonancia con el de su bacteria hospedadora.
- 4.- La estabilidad térmica, la viabilidad en soluciones de distinta fuerza iónica y la resistencia a los cambios de pH indican la adaptación de los fagos #F5-4, #F9-11 y #F12-9 a su hábitat.

BIBLIOGRAFIA

- ACKERMANN, H.V., JOLICOEUR, P. y BERTHIAUME, L.** 1974. Avantages et inconvenients de l'acetate d'uranyle en virologie comparee: etude de quatre bacteriophages caudes. *Can. J. Microbiol.* 20: 1093-1099.
- ACKERMANN, H.V. y NGUYEN, T.M.** 1983. Sewage coliphages studied by electron microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1049-1059.
- ADAMS, M.H.** 1949. The calcium requirement of coliphage T5. *J. Immunol.* 62: 505-516.
- ADAMS, M.H.** 1959. *Bacteriophages*. Interscience, New York.
- ADAMS, A.M. y LURIA, S.E.** 1958. Transduction by bacteriophage P1. Abnormal phage function in transducing particles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 44: 590-594.
- AHRENS, R.R.** 1971. Untersuchungen zur Vorbereitung von Phagen der Gattung *Agrobacterium* in der Ostsee. *Kiel Meeresforsch.* 27: 102-112.
- ANDERSON, T.F.** 1948. The activation of the bacterial virus T4 by L-tryptophan. *J. Bacteriol.* 55: 637-649.
- ANDERSON, E.S.** 1957. The relations of bacteriophages to bacterial ecology. Seventh Symp. of the Soc. for Gen. Microbiol., Royal Institution, London.
- ANDERSON, C.W. y EIGNER, J.** 1971. Breakdown and exclusion of superinfecting T-even bacteriophage in *Escherichia coli*. *J. Virol.* 8: 869-886.
- ANDERSON, R.M. y MAY, R.M.** 1978. Regulation and stability of host-parasite population interactions. I. Regulatory processes. *J. Anim. Ecol.* 47: 219-249.
- ANDERSON, T.F., RAPPAPORT, C. y MUSCATINE, M.A.** 1953. On the structure and osmotic properties of phage particles. *Ann. Inst. Pasteur* 84:5-14.
- ARBER, W.** 1960. Polylysogeny for bacteriophage lambda. *Virology*, 11: 250-272.

- ARBER, W. 1965. Host-controlled modification of bacteriophage. *Ann. Rev. Microbiol.* 19: 365-378.
- ARMITAGE, J.P. 1981. Changes in metabolic activity of *Proteus mirabilis* during swarming. *J. Gen. Microbiol.* 125: 445-450.
- BACKHAUS, H. y PETRI, J.B. 1984. Sequence analysis of the region from the early right operon in phage P22 including the replication genes 18 and 12. *Gene* 32: 289-293.
- BARKSDALE, L. y ARDENS, S.B. 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Annu. Rev. Microbiol.* 28: 265-284.
- BAROSS, J. y LISTON, J. 1970. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington state. *Appl. Microbiol.* 20: 179-186.
- BAUMSTARK, B. R., y SCOTT, J.R. 1980. The cI repressor of bacteriophage P1. I. Isolation of the cI protein and determination of the P1 DNA region to which it binds. *J. Mol. Biol.* 140: 471-480.
- BAYER, M.E. 1968a. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Gen. Microbiol.* 53: 395-404.
- BAYER, M.E. 1968b. Adsorption of bacteriophages to adhesions between wall and membrane of *Escherichia coli*. *J. Virol.* 2: 346-356.
- BAYER, M.E. y STARKEY, T.W. 1972. The adsorption of bacteriophage ϕ X174 and its interaction with *Escherichia coli*; a kinetic and morphological study. *Virology* 49: 236-256.
- BELL, R.G. 1976. The limitations of the ratio of fecal coliforms to coliphages as a water pollution index. *Water Res.* 10: 745-748.
- BENEDICK, M., MASCARENHAS, D. y CAMPBELL, A. 1983. The integrase promoter and T1 terminator in bacteriophages λ and 434. *Virology* 126: 658-662.
- BERTANI, G. y NICE, S.J. 1954. Studies on lysogenesis. II. The effect of temperature on the lysogenization of *Shigella dysenteriae* with phage P1. *J. Bacteriol.* 67: 202-209.
- BIXBY, R.L. y O'BRIEN, D.J. 1979. Influence of fulvic acid on bacteriophage adsorption and complexation in soil. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 840-845.
- BORCHERT, L.D. y DREXLER, H. 1980. T1 genes which affect transduction. *J. Virol.* 33: 1122-1128.
- BORDET, J. y CIUCA, M. 1921. Remarques sur l'histoire des recherches concernant la lyse microbienne transmissible. *C. R. Soc. Biol. Paris* 84: 745-747.
- BRADLEY, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bact. Rev.* 31: 230-314.

- BROWE, D.R., HOLT, J.G. y PATTEE, P.A. 1978. Isolation and characterization of *Arthrobacter* bacteriophages and their application to phage typing of soil arthrobacters. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 185-191.
- CALVO, C., GARCÍA DE LA PAZ, A.M., BÉJAR, V., QUESADA, E. y RAMOS-COR-MENZANA, A. 1988. Isolation and characterization of phage F9-11 from a lysogenic *Deleya halophila* strain. *Current Microbiol.* 17: 49-53.
- CAMPBELL, A. 1961. Conditions for the existence of bacteriophages. *Evolution* 15: 153-165.
- CAMPBELL, A. 1981. Evolutionary significance of accessory DNA elements in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 35: 55-74.
- CARLUCCI, A.F. y PRAMER, D. 1960. An evaluation of factors affecting the survival of *Escherichia coli* in seawater. IV. Bacteriophages. *Appl. Microbiol.* 8: 254-256.
- CHAINA, P.H. 1965. Some recent studies on marine bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 45: 25.
- CHANG, K.I. y LEUNG, O.C. 1979. Nutrition and growth of the moderately halophilic bacteria *Micrococcus morrhuae* K-17 and *Micrococcus luteus* K-15. *Microbios* 25: 71-84.
- CHATER, K.F. y CARTER, A.T. 1979. A new, wide host-range, temperate bacteriophage (R4) of *Streptomyces* and its interaction with some restriction-modifications systems. *J. Gen. Microbiol.* 115: 431-442.
- CHEW, P.K., CITARELLA, R.V., SALAZAR, O. y COLWELL, R.R. 1966. Properties of two marine bacteriophages. *J. Bacteriol.* 91: 1136-1139.
- CHESNEY, R.H. y SCOTT, J.R. 1975. Superinfection immunity and prophage repression in phage P1. II. Mapping of the immunity difference and ampicillin resistance loci of phage P1 and ϕ AMP. *Virology* 67: 375-384.
- CLARK, D.W., MEYER, H.P. y FIECHTER, A. 1986. Effects of growth medium on phage production and induction in *E. coli* K-12 lambda lysogens. *J. Biotechnol.* 3: 271-280.
- CLUZEL, P.J., VEAUX, M., ROUSSEAU, M. y ACCOLAS, J.P. 1987. Evidence for temperate bacteriophages in two strains of *Lactobacillus bulgaricus*. *J. Dairy Research* 54: 397-405.
- COLE, S.A. y SMITH, D.G. 1982. Binding of a bacteriophage to wall-membrane adhesions in *Proteus mirabilis*. *Zeit. Allg. Mikrobiologie* 22: 299-307.
- DELSISLE, A.L. y LEVIN, R.E. 1969a. Bacteriophages of psychrophilic pseudomonads. I. Host range of phage pools active against fish spoilage and fish-pathogenic pseudomonads. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 35: 307-317.
- DELSISLE, A.L. y LEVIN, R.E. 1969b. Bacteriophages of psychrophilic pseudomonads. I. Host range of phage active against *Pseudomonas putrefaciens*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 35: 318-324.

- DELISLE, A.L. y LEVIN, R.E. 1972a. Characteristics of three phages infectious for psychrophilic fishery isolates of *Pseudomonas putrefaciens*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 38: 1-8.
- DELISLE, A.L. y LEVIN, R.E. 1972b. Effect of temperature on an obligately psychrophilic phage-host system of *Pseudomonas putrefaciens*. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 38: 9-15.
- D'HERELLE, F. 1917. Sur un microbe invisible antagonistic des bacilles dysenteriques. *C. Acad. Sci. Paris* 165: 373-375.
- D'HERELLE, F. 1949. The bacteriophage. *Sci. News* 14: 44-59.
- DHILLON, E.K.S., DHILLON, T.S., LAM, Y.Y. y TSANG, A.H.C. 1980. Temperate coliphages: classification and correlation with habitats. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1,046-1053.
- DHILLON, T.S., CHAN, Y.S., SUN, S.M. y CHAU, W.S. 1970. Distribution of coliphages in Hong Kong sewage. *Appl. Microbiol.* 20: 187-191.
- DHILLON, T.S. y DHILLON, E.K.S. 1976. Studies on bacteriophage distribution. II. Isolation and host range based classification of phages active on three species of *Enterobacteriaceae*. *Jpn. J. Microbiol.* 16: 296-307.
- DHILLON, T.S., DHILLON, E.K.S., CHAN, H.C., LI, V.K. y TSANG, A.H.C. 1976. Studies on bacteriophage distribution: virulent and temperate bacteriophage content of mammalian feces. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 68-74.
- DOERMANN, A.H. 1951. The intracellular growth of bacteriophages. I. Liberation of intracellular phage T4 by premature lysis with another phage or with cyanide. *J. Gen. Physiol.* 35: 645-656.
- DOWDING, J.E. y HOPWOOD, D.A. 1973. Temperate bacteriophages for *Streptomyces coelicolor* A3 (2) isolated from soil. *J. Gen. Microbiol.* 78: 349-359.
- DREXLER, H. y CHRISTENSEN, J.R. 1979. Transduction of bacteriophage lambda by bacteriophage T1. *J. Virol.* 30: 543.
- DUCKWORTH, D.H. 1970. Biological activity of bacteriophage ghosts and "take-over" of host functions of bacteriophage. *Bacteriol. Rev.* 34: 344-363.
- DUCKWORTH, D., GLENN, J. y MCCORQUODALE, D.J. 1981. Inhibition of bacteriophage replication by extrachromosomal genetic elements. *Microbiol. Rev.* 45: 52-71.
- DUNN, G.B. y DUCKWORTH, D.H. 1977. Inactivation of receptors for bacteriophage T5 during infection of *Escherichia coli* B. *J. Virol.* 24: 419-421.
- ELLIS, E.L. y DELBRUCK, M. 1939. The growth of bacteriophage. *J. Gen. Physiol.* 22: 365-384.
- EPSTEIN, R.H., BOLLE, A., STEINBERG, D.M., KELLENBERGER, E., BOY de la TOUR, E., CHEVALLEY, R., EDGAR, R.S., SUSMAN, M., DENHARDT, G.H. y LIELAUSIS, I. 1963. Physiological studies of conditional lethal mutants of bacteriophage T40. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 28: 375-392.

- ESPEJO, R.T. y CAMELO, E.S. 1968a. Properties of bacteriophage PM2: a lipid-containing bacterial virus. *Virology* 34: 738-747.
- ESPEJO, R.T. y CAMELO, E.S. 1968b. Properties and characteristics of the host bacterium of bacteriophage PM2. *J. Bacteriol.* 95: 1887-1891.
- EVERT, D.L. y Paynter, M.J.B. 1980. Technique for determining total bacterial virus in complex aqueous systems. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 253-260.
- FERRER, M.R., DEL MORAL, A., QUESADA, E. y RAMOS-CORNENZANA, A. 1987. Growth rate and some physiological features of *Deleya halophila* CCM 3662 at different salt concentrations. *Annu. Inst. Pasteur* 138: 49-57.
- FRANKLIN, M.C. 1985. Conservation of genoma form but not sequence in the transcription antitermination determinants of bacteriophages λ , ϕ 21 and P22. *J. Mol. Biol.* 181: 75-83.
- FREEMAN, V.J. y MORSE, I.U. 1952. Further observations on the change to virulence of bacteriophage infected virulent strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 63: 407-414.
- FURUSE, K., ANDO, A., OSAWA, S. y WATANABE, I. 1981. Distribution of ribonucleic acid coliphages in raw sewage from treatment plants in Japan. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1,139-1,143.
- FURUSE, K., OSAWA, S., KAWASHIRO, J., TANAKA, R., OZAWA, A., SAVAMURA, S., YAMAGAWA, Y., NAGAO, T. y WATANABE, I. 1983. Bacteriophage distribution in human feces: continuous survey of healthy subjects and patients with internal and leukemic diseases. *J. Gen. Microbiol.* 64: 2039-2043.
- GALE, E.F., CUNDLIFFE, E., REYNOLDS, P.F., RICHMOND, M.H. y VARIIG, M.J. 1981. The molecular basis of antibiotic action. 2ª ed. Ed. John Wiley e hijos. London, pp. 258-547.
- GERBA, C.P. 1984. Applied and theoretical aspects of virus adsorption to surfaces. *Adv. Appl. Microbiol.* 30: 153-168.
- GLIESCHE, C.G., HOLM, M.C., BEESE, M., NEUMANN, M., VOLKER, H., GEBERS, R. y HIRSCH, P. 1988. New bacteriophages active on strains of *Hyphomicrobium*. *J. Gen. Microbiol.* 134: 1,339-1,353.
- GOLDBERG, E. 1983. Recognition, attachment and injection. pp. 32-39. In C. K. Mathews, E. M. Kutter, G. Mosig and P. B. Berget, (eds.), *Bacteriophage T4*. American Soc. Microbiol., Washington, DC.
- GOYAL, S.M. 1983. Indicators of viruses, pp. 211-230. In G. Berg (ed.), *Viral Pollution of the Environment*, vol. 1, CRC Press, Boca Raton, Florida.
- GOYAL, S.M., ZERDA, K.S. y GERBA, C.P. 1980. Concentrations of coliphages from large volumes of water and wastewater. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 85-91.
- GRABOW, V.O.K. y COUBROUGH, P. 1986. Practical direct plaque assay for coliphages in 100 ml. samples of drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 430-433.

- GRABOW, W.O.K. y COUBROUGH, P., NUPEN, E.M. y BATEMAN, B.W. 1984. Evaluation of coliphages as indicators of the virological quality of sewage-polluted water. *Water SA*, 10: 7-14.
- GRANGE, J.M. 1975. Pseudolysogeny in *Mycobacterium diernhoferi* ATCC 19,341. *J. Gen. Microbiol.* 89: 387-391.
- GRIMONT, F. y GRIMONT, P.A.D. 1981. DNA relatedness among bacteriophages of the morphological group C3. *Current Microbiol.* 6: 65-69.
- GUSSIN, G.H. y PETERSON, V. 1972. Isolation and properties of *rex* mutants of bacteriophage lambda. *J. Virol.* 10: 760-765.
- HARTMAN, P.S. y EISENSTARK, A. 1981. Alteration of bacteriophage attachment capacity by near-UV irradiation. *J. Virol.* 43: 529-532.
- HAUDOROY, Z. 1923. Reserches du bacteriophage d'Herelle dans differents milieux. *C. R. Seances Soc. Biol. Filiales*, 88: 1.084-1.092.
- HAUSMAN, R. 1973. The genetics of T-odd phages. *Ann. Rev. Microbiol.* 27: 51-67.
- HAVELAAR, A.H. y HOGEBOOM, W.M. 1983. Factors affecting the enumeration of coliphages in sewage and sewage-polluted waters. *Antonie van Leeuwenhoek J. Microbiol.* 49: 387-397.
- HAVELAAR, A.H. y HOGEBOOM, W.M. 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 439-447.
- HEILMANN, H. REEVE, J.H. y PUHLER, A. 1980. Identification of the repressor and repressor bypass (antipresor) polypeptides of bacteriophage P1 synthesized in infected minicells. *Mol. Gen. Genet.* 178: 149-154.
- HERSHEY, A.D. (ed.). 1971. The bacteriophage lambda. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.
- HERSHEY, A.D. y CHASE, M. 1952. Independent functions of viral protein and nucleic acid in growth of bacteriophage. *J. Gen. PPhysiol.* 36: 39-56.
- HERSKOVITZ, I. y HAGEN, D. 1980. The lysis-lysogeny decision of phage: explicit programming and responsiveness. *Annu. Rev. Genet.* 14: 399-445.
- HIDAKA, T. 1971. Isolation of marine bacteriophages from sea water. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 37: 1199-1206.
- HIDAKA, T. 1972. On the stability of marine bacteriophages. *Bull. Jap. Soc. Sci. Fish.* 38: 517-523.
- HIDAKA, T. 1973. Characterization of marine bacteriophages newly isolated. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 22: 47-61.
- HIDAKA, T. 1977. Deteccion and isolation of marine bacteriophage systems in the southwestern part of the Pacific Ocean. *Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ.* 26: 55-62.

- HIDAKA, T. y ICHIDA, K. 1976. Properties of a marine RNA-containing bacteriophage. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 25: 77-89.
- HIDAKA, T., KAWAGUCHI, T. y SHIRAHAMA, M. 1979. Analytical research of microbial ecosystems in seawater around fishing ground. I. Distribution of bacteriophage systems in seawater around Ryukyu Island arc. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 28: 137-148.
- HIDAKA, T. y SHIRAHAMA, M. 1974. Preliminary characterization of a temperate phage system isolated from marine mud. Mem. Fac. Fish., Kagoshima Univ. 27: 79-90.
- HOLMES, D., WOJTKIEWICZ, P. y BARRIDGE, B.D. 1981. Properties of the virulent form of a mitomycin C or temperature-induced thermophilic bacteriophage. J. Gen. Virol. 52: 141-144.
- HUGGINS, A.R. y SANDINE, W.E. 1977. Incidence and properties of temperate bacteriophages induced from lactic streptococci. Appl. Environ. Microbiol. 33: 184-191.
- IMBESI, F. y MANNING, P.A. 1982. Biotypic-specific restriction and modification of DNA in *Vibrio cholerae*. J. Clin. Microbiol. 16: 552-554.
- ITO, S. y KAGEYAMA, M. 1970. Relationship between pyocins and a bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Appl. Microbiol. 16: 231-240.
- JOHNSON, R.M. 1968. Characteristics of a marine *Vibrio* bacteriophage system. J. Arizona Acad. Sci. 5: 28-33.
- JOHNSON, P.W. y SIEBURTH, J.McN. 1978. Morphology of non-cultured bacterioplankton from estuarine, shelf and open ocean water. Abst. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol. N95, p. 178.
- JUDSON, H.F. 1979. The eighth day of creation Simon and Shuster, New York.
- KAKIMOTO, D. y HAGATOMI, H. 1972. Bacteriophages of Kinko Bay. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish. 38: 271-278.
- KALSO, S., FURNIAHO-LASSILA, E.L., SAHELIN, M.L. y SUNDMAN, V. 1986. Some characteristics of the lactic streptococcal phage KSV1. Milchwissenschaft 41: 65-68.
- KAMIKURA, K. y ARAKI, M. 1989. Isolation and characterization of a bacteriophage lytic for *Desulfovibrio salaxigens*, a salt requiring sulfate reducing bacterium. Appl. Environ. Microbiol. 55: 645-648.
- KELLER, R. y TRAUB, M. 1974. The characterization of *Bacteroides fragilis* phage recovered from animal sera: observations on the nature of *Bacteroides* phage carrier cultures. J. Gen. Virol. 24: 179-189.
- KELLEN, R.A. y WARREN, A.J. 1971. Isolation and properties of a bacteriophage lytic for a wide range of pseudomonads. Can. J. Microbiol. 17: 677-682.
- KENNEDY, Jr., J.J., BITTON, G. y OBLINGER, J.L. 1985. Comparison of selective media for assay of coliphages in sewage effluent and lake water. Appl. Environ. Microbiol. 49: 33-36.

- KBOGH, B.P. y SHIMMIE, P.D. 1969. An inducible antibacterial agent, produced by a strain of *Streptomyces cremoris*. J. Dairy Res. 36: 87-92.
- KBOGH, B.P. y PETTINGILL, G. 1983. Adsorption of bacteriophage eb7 on *Streptococcus cremoris* E87. Appl. Environ. Microbiol. 45: 1.946-1.948.
- KEYMAN, A., NEALSON, K., SIDEROPOULOS, H. y HASTINGS, J.V. 1974. Marine transducing bacteriophage attacking a luminous bacterium. L. Virol. 14: 333-340.
- KOGA, T., TOYOSHIMA, S. y KAWATA, T. 1982. Morphological varieties and host ranges of *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophages isolated of sea water. Appl. Environ. Microbiol. 44: 466-470.
- KOGUT, M. 1980. Strategies of microbial adaptability. Trends Biochem. Sci. 5: 47-50.
- KORNBERG, A. 90. DNA replication. Freeman, San Francisco.
- KOTT, Y. 1966. Estimation of low numbers of *Escherichia coli* bacteriophage by use of the most probable number method. Appl. Microbiol. 14: 141-144.
- KOTT, Y., NOZE, H., SPERBERS, S. y BETZER, H. 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. Water Res. 8: 165-171.
- KOURILSKY, P. 1973. Lysogenization by bacteriophage lambda. I. Multiple infection and the lysogenic response. Mol. Gen. Genet. 122: 183-195.
- KRISS, A.E. 1963. Marine microbiology, pp. 284-288. Oliver and Boyd, Edinburg-London.
- KRISS, A.E. y RUKINA, E.A. 1947. Bacteriophage in the sea. Doklady Akad. Nauk SSSR 57: 833-836.
- KROPINSKI, A.M.B. y WARREN, R.A.J. 1970. Isolation and properties of a *Pseudomonas acidovorans* bacteriophage. J. Gen. Virol. 6: 85-93.
- KURUP, V.P. y HEINZEN, R.J. 1978. Isolation and characterization of actinophages of *Thermoactinomyces* and *Micropolyspora*. Can. J. Microbiol. 24: 794-797.
- KUSHNER, D.J. 1985. The *Halobacteriaceae*. In: Woese CR, Wolfe RS (eds). The bacteria, vol 8. Archaeobacteria. New York: Academic Press, pp 171-214.
- LANNING, S. y WILLIAMS, S.T. 1982. Methods for the direct isolation and enumeration of actinophages in soil. J. Gen. Microbiol. 128: 2.063-2.071.
- LEVISOHN, R., MORELAND, J. y NEALSON, K.H. 1987. Isolation and characterization of a generalized transducing phage for the marine luminous *Vibrio fischeri* MJ-1. J. Gen. Microbiol. 133: 1.577-1.582.
- LIEBESCHUETZ, J. y RITCHIE, D.A. 1986. Phage T1-mediated transduction of a plasmid containing the T1 *pac* site. J. Mol. Biol. 192: 681-693.
- LINDBERG, A.A. 1973. Bacteriophage receptors. Ann. Rev. Microbiol. 27: 205-241.
- LISS, A. 1981. Release of a group 1 mycoplasma virus from *Acholeplasma laidlawii* after treatment with mitomycin C. J. Virol. 40: 285-288.

- LITTLE, J.V. 1984. Autodigestion of *lexA* and phage repressors. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 81: 1375-1379.
- LOGAN, K.B., REES, G.E., SERLEY, M.D. y PRIMROSE, S.B. 1980. Rapid concentration of bacteriophages from large volumes of freshwater: evaluation of positively charged, microporus filters. J. Virol. Methods, 1: 87-97.
- LOWRIE, R.J. 1974. Lysogenic strains of group N lactic streptococci. Appl. Microbiol. 27: 210-217.
- LURIA, S.E., DARNELL, J.E., BALTIMORE, D. y CAMPBELL, A. 1978. General Virology. Wiley, New York.
- LVOFF, A. 1953. Lysogeny. Bacteriol. Rev. 17: 269-337.
- MCLAREN, A.D. 1973. A need for counting microorganisms in soil mineral cycles. Environ. Lett. 5: 143-154.
- MANCHESTER, L. 1986. Modelling the interaction of Streptomycetes and their phage. Ph. D. thesis, pp.289. University of Liverpool, Liverpool, England.
- MASTERS, M. 1985. Generalized transduction. In The Genetics of Bacteria (J. G. Scaife, D. Leach and A. Galizzi, eds.), pp. 197-215, Acad. Press, New York.
- MATHEWS, D.K., KUTTER, E.M., MOSIG, G. y BERGET, P.B. (eds.) 1983. Bacteriophage T4. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- MATHEWS, R.E.F. 1982. Classification and nomenclature of viruses. Intervirology, 17: 4-199.
- MAUEL, C. y KARAMATA, D. 1984. Characterization of proteins induced by Mitomycin C treatment of *Bacillus subtilis*. J. Virol. 49: 806-812.
- MCCORQUODALE, D.J. y LANNI, Y.T. 1964. Molecular aspects of DNA transfer from phage T5 to host cells. (I) Characterization of first-step-transfer materials. J. Mol. Biol. 10: 10-18.
- METCALF, T.G. 1975. Evaluation of shellfish sanitary quality by indicators of sewage pollution. In A. L. H. Gameson (ed.), Discharge of sewage from Sea Outfalls, Pergamon, London.
- MOEBUS, K. 1980. A method for the detection of bacteriophages from ocean water. Helgolander Meeresunters, 34: 1-14.
- MOEBUS, K. y NATTKEMPER, H. 1983. Taxonomic investigations of bacteriophage sensitive bacteria isolated from marine waters. Helgolander Meeresunters, 36: 357-373.
- NAKAHISHI, H., IIDA, Y., MAESHIMA, K., TERAMOTO, T., HOSAKA, Y. y OZAKI, M. 1966. Isolation and properties of bacteriophages of *Vibrio parahaemolyticus*. Biken J. 9: 149-157.
- NATHANS, D. y SMITH, H.O. 1975. Restriction endonuclease in the analysis and restructuring of DNA molecules. Ann. Rev. Biochem. 44: 273-293.

- NIEMI, M. 1976. Survival of *Escherichia coli* phage T7 in different water types. Water Res. 10: 751-755.
- NIEVES, B.M., GIL, F. y CASTILLO, F.J. 1981. Growth inhibition activity and bacteriophage and bacteriocin-like particles associated with different species of *Clostridium*. Can. J. Microbiol. 27: 216-225.
- ROSSAL, H.G. y ALBERTS, B.M. 1983. Mechanism of DNA replication catalyzed by purified T4 proteins, pp. 71-81. In Mathews, D. K., Kutter, E. M., Mosig, G. y Berget, P. B. (eds.) 1983. Bacteriophage T4. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- OKADA, M. y WATANABE, T. 1968. Transduction with phage P1 in *Salmonella typhimurium*. Nature, 218: 185-187.
- OKAZAKI, R.T., OKAZAKI, K., SAKABA, K., SUGIMOTO, K. y SUGINO, A. 1968. Mechanism of DNA chain growth. I. Possible discontinuity and unusual secondary structure of newly synthesized chains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 59: 598-603.
- OKI, T. y OZAKI, A. 1967. Bacteriophages of L-glutamic acid-producing bacteria. (VIII) Growth characteristics of *Brevibacterium* phages. Agric. Biol. Chem. 31: 1466-1473.
- OLSEN, R.H., METCALF, E.S. y TODD, J.K. 1968. Characteristics of bacteriophages attacking psychrophilic and mesophilic pseudomonads. J. Virol. 2: 357-364.
- PADAN, E. y SHILO, M. 1969. Distribution of cyanophages in natural habitats. Verh. Int. Ver. Limnol. 32: 745-751.
- PADAN, E., SHILO, M. y KISLEY, H. 1967. Isolation of cyanophages from freshwater ponds and their interaction with *Plectonema boryanum*. Virology, 32: 234-246.
- PARINKINA, O.M. 1973. Determination of bacterial growth rates in tundra soils, pp. 303-309. In T. Rosswall (ed.), Modern Methods in the study of Microbial Ecology. Swedish Natural Science Research Council, Stockholm.
- PAULING, C. 1982. Bacteriophages of *Halobacterium halobium*: isolation from fermented fish sauce and primary characterization. Can. J. Microbiol. 28: 916-921.
- PRIMROSE, S.B. y DAY, M. 1977. Rapid concentration of bacteriophages from aquatic habitats. J. Appl. Bacteriol. 42: 417-421.
- PRIMROSE, S.B., SEELEY, H.D. y LOGAN, K.B. 1983. The recovery of viruses from water: methods and applications, pp. 211-231. In M. Goddard and M. Butler (eds.), Viruses and Wastewater Treatment. Pergamon, Oxford.
- PRIMROSE, S.B., SEELEY, H.D., LOGAN, K.B. y NICOLSON, J.W. 1982. Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. Appl. Environ. Microbiol. 43: 694-701.
- PUCK, T.T., GAREN, A. y CLINE, J. 1951. Mechanism of virus attachment to host cells: role of ions in primary reaction. J. Exp. Med. 93: 65-88.
- QUESADA, E., BÉJAR, V., VALDERRAMA, M.J. y RAMOS-CORMEZANA, A. 1987. Growth characteristics and salt requirement of *Deleya halophila* in a defined medium. Current Microbiol. 16: 21-25.

- QUESADA, E., BÉJAR, V., VALDERRAMA, M.J., VENTOSA, A. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1985. Isolation and characterization of moderately halophilic non-motile rods from different saline habitats. *Microbiologia* 1: 89-96.
- QUESADA, E., VALDERRAMA, M.J., BÉJAR, V., VENTOSA, A., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1986. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram-negative non-motile eubacteria. *Appl. Microbiol.* 9: 132-137.
- QUESADA, E., VENTOSA, A., RODRIGUEZ-VALERA, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1982. Types and properties of some bacteria isolated from hypersaline soils. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 155-161.
- QUESADA, E., VENTOSA, A., RODRIGUEZ-VALERA, F., MEGIAS, L. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1983. Numerical taxonomy of moderately halophilic Gram negative bacteria from hypersaline soils. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2649-2657.
- QUESADA, E., VENTOSA, A., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1984. *Deleya halophila*, a new species of moderately halophilic bacteria. *Intern. J. Syst. Bacteriol.* 34: 287-292.
- RABUSSAY, D. 1983. Phage-evoked changes in RNA polymerase, pp. 167-173. In Mathews, D. K., Kutter, E. M., Mosig, G. y Berget, P. B. (eds.) 1983. *Bacteriophage T4*. American Society for Microbiology, Washington, DC.
- REANNEY, D.C. y MARSH, S.C.H. 1973. The ecology of viruses attacking *Bacillus stearothermophilus* in soil. *Soil Biol. Biochem.* 5: 399-408.
- REANNEY, D.C., GOVLAND, P.C. y SLATER, J.H. 1983. Genetic interactions among microbial communities, pp. 379-422. In J. H. Slater, R. Whittenbury and J. W. T. Wimpenny (eds.), *Microbes in their Natural Environments*. Cambridge University Press, Cambridge.
- RBEVES, P. 1979. The concept of bacteriocins. *Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A* 244: 78-89.
- REYROLLE, J., CHOPIN, M.C., LETELLIER, F. y NOVEL, G. 1982. Lysogenic strains of lactic acid streptococci and lytic spectra of their temperate bacteriophages. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 349-356.
- ROBAKIS, H.K., PALLERONI, H.J., DESPREAUX, C.W., BOUBLIK, M., BAKER, C.A., CHURN, P.J. y CLAUS, G.W. 1985. Isolation and characterization of two bacteriophages of *Gluconobacter oxydans*. *J. Gen. Microbiol.* 131: 2467-2473.
- RODRÍGUEZ-VALERA, F., RUIZ-BERRAQUERO, F. y RAMOS-CORMENZANA, A. 1981. Characteristics of the heterotrophic bacterial populations: hypersaline environments of different concentrations. *Microbiol. Ecol.* 7: 235-243.
- ROSNER, J.L. 1972. Formation, induction and curing of bacteriophage P1 lysogens. *Virology*, 48: 679-689.
- ROSNER, J.L. 1975. Specialized transduction of "pro" genes by coliphage P1: structure of a partly diploid P1-pro prophage. *Virology*, 67: 4255.

- ROUNTREE, P.M. 1955. The role of divalent cations in the multiplication of Staphylococcal bacteriophages. *J. Gen. Microbiol.* 12: 275-285.
- RUDDICK, S.M. y WILLIAMS, S.T. 1972. Studies on the ecology of actinomycetes in soil. V. Some factors influencing the dispersal and adsorption of spores in soil. *Soil Biol. Biochem.* 4: 93-103.
- SABITINO, C.M. y MAIER, S. 1980. Differential inactivation of three bacteriophages by acid and alkaline pH used in the membrane adsorption elution method of virus recovery. *Can. J. Microbiol.* 26: 1403-1407.
- SAUNDERS, G.F. y CAMPBELL, L.L. 1966. Characterization of a thermophilic bacteriophage for *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 91: 340-348.
- SCHUEBERMAI, P.R., FARRAH, S.R. y BITTON, G. 1987. Reduction of microbiological indicators and viruses in a cypress strand. *Water Sci. Technol.* 19: 539-546.
- SCHNABEL, H., ZILLIG, W., PFAFFLE, M., SCHNABEL, R., MICHEL, H. y DELIUS, H. 1982. *Halobacterium halobium* phage Φ H. *EMBO J.* 1: 87-92.
- SCOTT, J.R. 1975. Superinfection immunity and prophage repression in phage P1. *Virology*, 65: 173-178.
- SCOTT, J.R., KROPF, M. y MENDELSON, L. 1977. A phage P1 virulent mutation at a new map location. *Virology*, 78: 346-348.
- SSEELEY, N.D., HALLARD, G. y PRIMROSE, S.B. 1979. A portable device for concentrating bacteriophages from large volumes of freshwater. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 145-152.
- SSEELEY, N.D. y PRIMROSE, S.B. 1979. Concentration of bacteriophages from natural waters. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 103-116.
- SSEELEY, N.D. y PRIMROSE, S.B. 1980. The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J. Gen. Virol.* 46: 87-95.
- SSEELEY, N.D. y PRIMROSE, S.B. 1982. The isolation of bacteriophages from the environment. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 1-17.
- SELL, T.L., SCHABERG, D.R. y FEKETY, F.R. 1983. Bacteriophage and bacteriocin typing scheme for *Clostridium difficile*. *J. Clin. Microbiol.* 17: 1148-1152.
- SETO, S., OSAWA, T. y YAMAMOTO, S. 1964. Studies on bacteriophages for L-glutamic acid-producing bacterium *Microbacterium ammoniophilum*. (III) Selection of inhibitors for phage multiplication, presumption on inhibiting mechanism for phage multiplication by tripolyphosphate and application of tripolyphosphate for actual L-glutamic acid production (in Japanese). *Aminosan-Kakusan* 10: 27-36.
- SHARP, D.G. 1960. Sedimentation counting of particles via electron microscopy, pp. 542-548. In *Proceedings of the Fourth International Congress on Electron Microscopy*, Berlin, 1958. Springer, Berlin.

- SHIELDS, P.A., LING, T.F., TJATHA, V., SHAH, D.O. y FARRAH, S.R. 1986. Comparison of positively charged membrane filters and their use in concentrating bacteriophages in water. *Water Res.* 20: 145-151.
- SINGH, S.N. y GERBA, C.P. 1983. Concentration of coliphage from water and sewage with charge-modified filter aid. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 232-237.
- SINHA, R.P. 1980. Alteration of host specificity to lytic bacteriophages in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 326-332.
- SKLAROV, S.S., COLWELL, R.R., CHAPMAN, G.B. y ZANE, S.F. 1973. Characteristics of a *Vibrio parahaemolyticus* bacteriophage isolated from Atlantic coast sediment. *Can. J. Microbiol.* 19: 1519-1520.
- SMITH, L.S. y KRUEGER, A.P. 1954. Characteristics of a new *Vibrio*-bacteriophage system. *J. Gen. Physiol.* 38: 161-168.
- SORSEY, M.D. y HICKEY, A.R. 1985. Effects of humic and fulvic acids on poliovirus concentration from water by microporus filtration. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 259-264.
- SORBER, C.A., SAGIK, B.A. y MALINA, J.F. 1971. Monitoring of low-level virus in natural waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 22: 334-338.
- SOUZA, K.A., GINOSA, H.S. y HAIGHT, R.D. 1972. Isolation of a polyvalent bacteriophage for *E. coli*, *K. pneumoniae* and *Aerobacter aerogenes*. *J. Virol.* 9: 851-856.
- SPENCER, R. 1955. A marine bacteriophage. *Nature* 175: 160-161.
- SPENCER, R. 1960. Indigenous marine bacteriophages. *J. Bacteriol.* 79: 614.
- SPENCER, R. 1963. Bacterial viruses in the sea, pp. 350-365. In C. H. Oppenheimer (ed.), *Symposium on marine microbiology*. Charles C. Thomas, Publisher, Springfield, Ill.
- STENT, G.S. 1963. *The molecular biology of bacterial viruses*. Freeman, San Francisco.
- STENT, G.S. y CALENDAR, R. 1978. *Molecular Genetics*. Freeman, San Francisco.
- STETLER, R.E. 1984. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 668-670.
- STEVENS, R.H., HAMMOND, B.F. and LAI, C.H. 1982. Characterization of an inducible bacteriophage from a leukotoxic strain of *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Infect. Immunity.* 35: 343-349.
- STEVENSON, J.H. y ALBRIGHT, L.J. 1972. Isolation and partial characterization of a marine bacteriophage. *Z. Allg. Mikrobiol.* 12: 599-603.
- STEWART, F.M. y LEVIN, B.R. 1984. The population biology of bacterial viruses: why be temperate. *Theor. Pop. Biol.* 26: 93-117.
- STUTTARD, C y DWYER, M. 1981. A new temperate phage of *Streptomyces venezuelae*: morphology, DNA molecular weight and host range of SW2. *Can. J. Microbiol.* 2: 496-499.

- SYKES, I.K. y WILLIAMS, S.T. 1978. Interactions of actinophage and clays. *J. Gen. Microbiol.* 108: 97-102.
- SYKES, I.K., LANNING, S. y WILLIAMS, S.T. 1981. The effect of pH on soil actinophage. *J. Gen. Microbiol.* 122: 271-280.
- TAGG, J.R., DAJANI, A.S. y VANHAMAKER, L.V. 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40: 722-756.
- TERZAGHI, E.A. y TERZAGHI, B.B. 1978. Effect of lactosa concentration on the efficiency of plating of bacteriophages on *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 471-478.
- THOMSON, J.A. y WOODS, D.R. 1974. Bacteriophages and cryptic lysogeny in *Achromobacter*. *J. Gen. Virol.* 22: 153-157.
- TINNE, T.L. y BRENNAN, P.J. 1984. Induction of bacteriophage from members of the *Mycobacterium avium*, *M. intracellulare*, *M. scrofulaceum* serocomplex. *J. Gen. Microbiol.* 130: 2059-2066.
- TORRELLA, F. y MORITA, R.Y. 1979. Evidence by electron micrographs for a high incidence of bacteriophage particles in the waters of Yaquina Bay, Oregon: ecological and taxonomical implications. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 774-778.
- TORSVIK, T y DUNDAS, I.D. 1974. Bacteriophages of *Halobacterium salinarum*. *Nature*, 248: 680-681.
- TORSVIK, T y DUNDAS, I.D. 1974. Halophilic phage for *Halobacterium salinarum* str. 1. In *Energetics and structure of halophilic microorganisms*, pp. 609-614. Edited by S.R. Caplan and M. Ginzburg. Amsterdam, New York: Elsevier/North-Holland Biomedical press.
- TORSVIK, T y DUNDAS, I.D. 1974. Persisting phage infection in *Halobacterium salinarum* str. 1. *J. Gen. Virol.* 47: 29-36.
- TRAUB, W.H., ACKER, G. y KLBER, J. 1974. Studies on phage tail bacteriocins of *Proteus rettgeri*. *Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig.* 229: 362-371.
- TWORT, F.W. 1915. An investigation on the nature of ultra-microscopic viruses. *Lancet*, 2: 1241-1243.
- TWORT, F.W. 1949. The discovery of the bacteriophage. *Sci. News*, 14: 33-34.
- TYLER, B.M. y GOLDBERG, R.B. 1976. Transduction of chromosomal genes between enteric bacteria by bacteriophage P1. *J. Bacteriol.* 125: 1105-1111.
- UETAKE, H., LURIA, S.E. y BURROWS, J.W. 1958. Conversion of somatic antigens in *Salmonella* by phage infection leading to lysis or lysogeny. *Virology*, 5: 68-91.
- VOGELSANG-WENKE, H. y OESTERHELT, D. 1988. Isolation of a halobacterial phage with a fully cytosine-methylated genome. *Mol. Gen. Genet.* 211: 407-414.

- VREBLAND, R.D. y MARTIN, E.L. 1980. Growth characteristics, effects of temperature and ion specificity of the halotolerant bacterium *Halomonas elongata*. *Can. J. Microbiol.* 26: 746-752.
- WAIS, A.C. y GOLDBERG, E.B. 1969. Growth and transformation of phage T4 in *E. coli* B/4, *Salmonella*, *Aerobacter*, *Proteus* and *Serratia*. *Virology*, 39: 153-161.
- WAIS, A.C., KON, H., McDONALD, R.E. y STOLLAR, B.D. 1975. Salt-dependent bacteriophage infecting *Halobacterium cutirubrum* and *H. halobium*. *Nature*, 256: 314-315.
- WAIS, A.C. y DANIELS, L.L. 1985. Populations of bacteriophage infecting *Halobacterium* in a transient brine pool. *FEMS Microbiology Ecology*, 31: 323-326.
- WALLIS, C. y MELNICK, J.L. 1965. Photodynamic inactivations of animal viruses: a review. *Photochem. Photobiol.* 4: 159-170.
- WANDERSMAN, C. y YARMOKINSKY, M. 1977. Bipartite control of immunity conferred by the related heteroimmune plasmid prophages, P1 and P7 (formerly ϕ Amp). *Virology*, 77: 386-400.
- WATANABE, K. y TAKESUE, S. 1972. The requirement for calcium in infection with *Lactobacillus* phage. *J. Gen. Virol.* 17: 19-30.
- WHITFIELD, C. y LAN, M. 1986. Characterization of coliphage K30, a bacteriophage specific for *Escherichia coli* capsular serotype K30. *FEMS Microbiol. Lett.* 37: 351-355.
- WHITMAN, P.A. y MARSHALL, R.T. 1971. Characterization of two psychrophilic pseudomonads bacteriophages isolated from ground beef. *Appl. Microbiol.* 22: 463-468.
- WIEBE, W.J. y LISTON, J. 1968. Isolation and characterization of a marine bacteriophage. *Mar. Biol.* 1: 244-249.
- WIGGINS, B.A. y ALEXANDER, M. 1985. Minimum bacterial density for bacteriophage replication: implications for significance of bacteriophages in natural ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 19-23.
- WILLIAMS, S.T. 1985. Oligotrophy in soil: fact or fiction? pp. 81-110. In M. M. Fletcher and G. D. Floodgate (eds.), *Bacteria in their natural environment*. Academic, Orlando.
- WILLIAMS, S.T. y LANNING, S. 1984. Studies of the ecology of streptomycete phage in soil, pp. 437-483. In L. Ortiz-Ortiz, L. F. Bojalil and V. Yakoleff (eds.), *Biological, biochemical aspects of actinomycetes*. Academic, London.
- YAMAMOTO, K.R., ALBERTS, B.M., BENZINGER, R., LAUTHORNE, L. y TREIBER, G. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale virus purification. *Virology*, 40: 734-744.
- YATES, M.V., GERFA, C.P. y KELLEY, L.M. 1985. Virus persistence in groundwater. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 778-781.
- YOKOKURA, T., KODAIRA, S., ISHIWA, H. y SAKURAI, T. 1974. Lysogeny in lactobacilli. *J. Gen. Microbiol.* 84: 277-284.

Bibliografía

- ZACHARY, A. 1974. Isolation of bacteriophages of the marine bacterium *Beneckea natriegens* from coastal salt marshes. *Appl. Microbiol.* 27: 980-982.
- ZACHARY, A. 1976. Physiology and ecology of bacteriophages of the marine bacterium *Beneckea natriegens*: salinity. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 415-422.
- ZACHARY, A. 1978. An ecological study of bacteriophages of *Vibrio natriegens*. *Can. J. Microbiol.* 24: 321-324.
- ZAISS, U. 1981. Dispersal and fate of coliphages in the River Saar. *Zbl. Bakt., Hyg., I. Abt. Orig. B.* 197: 160-173.
- ZILLIG, W., GROPP, F., HENSCHEN, A., NEUMANN, H., PALM, P., REITER, W. D., RETTENBERGER, M., SCHNABEL, H. y YEATS, S. 1986. Archaeobacterial virus host systems. *System. Appl. Microbiol.* 7: 58-66.
- ZOBELL, C.E. 1946. *Marine Microbiology*. Waltham Mass. Chronica Botanica Co.