

Universidad de Granada
Facultad de Ciencias



Departamento de Microbiología

**ESTUDIOS SOBRE FAGOS Y PARTICULAS
SIMILARES A COLAS DE FAGO
de Myxococcus coralloides D**

JOSE MUÑOZ DORADO

Tesis Doctoral

1985

1
17

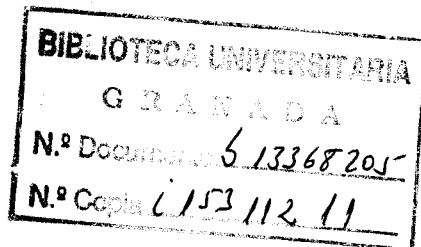


R. 30.740

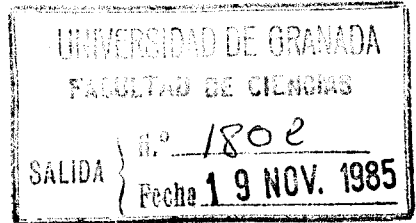
FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

ESTUDIOS SOBRE FAGOS Y PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGOS
DE Myxococcus coralloides D

José Muñoz Dorado



UNIVERSIDAD DE GRANADA
1985



"ESTUDIOS SOBRE FAGOS Y PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE
FAGO DE Myxococcus coralloides D"

Memoria presentada para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS

A handwritten signature in black ink, appearing to be "J. Muñoz Dorado".

Fdo: José Muñoz Dorado

VºBº

El Director de la Tesis

El Director del Departamento

A handwritten signature in black ink, appearing to be "José María Arias Peñalver".

Fdo: José M^a Arias Peñalver
Profesor Titular de Micro-
biología. Facultad de Ciencias

Fdo: Enrique Montoya Gómez
Catedrático de Microbiología
Facultad de Ciencias.

Granada, Noviembre de 1985

Tesis Doctoral dirigida por el Prof. D. José María Arias Peñalver, profesor titular de Microbiología de la Universidad de Granada. Fue leída el dieciseis de noviembre de 1985, obteniendo la calificación de apto "cum laude" ante el tribunal formado por los profesores Montoya Gómez, Murillo Araujo, Barea Navarro, Lupiáñez Cara y Extremera León.

Este Trabajo ha sido realizado en el Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Granada durante los años 1982-1985, siendo BECARIO DEL PLAN DE FORMACION DEL PERSONAL INVESTIGADOR

Parte de los resultados de esta Tesis han sido presentados en el 12th International Meeting on Myxobacteria (California-USA, 1985) y X Congreso Nacional de Microbiología (Valencia, 1985).

Mi agradecimiento

A José M^a Arias, por su constante ayuda y orientación durante la realización de este trabajo.

A Encarni Vázquez y Luis Mejías, por su paciencia en las largas sesiones de microscopia electrónica.

A mis compañeros del Departamento de Microbiología, por su amistad y colaboración durante estos cuatro años. Especialmente a Antonio Luis, a quien debo gran parte de mis conocimientos científicos.

Y a todos los que han hecho posible la realización de esta Tesis Doctoral.

INDICE

	<u>Pág</u>
INTRODUCCION	11
- Taxonomía de las bacterias deslizantes	12
- Características generales de las Mixobacterias	13
- Ciclos de vida de las Mixobacterias	22
- Autolisis	32
- Bacteriófagos defectivos	36
- Fagos y fagos defectivos de Mixobacterias	52
 OBJETO DEL TRABAJO	 59
 MATERIAL Y METODOS	 62
1.- Bacterias y fagos	63
2.- Medios de cultivo	64
2.1.- Medios sólidos	64
2.2.- Medios líquidos	65
3.- Técnicas de cultivo	66
3.1.- Mantenimiento y conservación de <u>M. corallo-</u> <u>des D</u>	66
3.2.- Condiciones de cultivo	66
4.- Medidas de crecimiento bacteriano	67
4.1.- Medidas turbidométricas	67
5.- Métodos utilizados en la purificación de las par- tículas similares a colas de fago	67
5.1.- Centrifugación diferencial	67
5.2.- Concentración por el sistema dextrano-sul- fato-polietilenglicol	68
5.3.- Precipitación con sulfato amónico	70
5.4.- Diálisis	71
5.5.- Cromatografía en Sepharose 4B	72

	<u>Pág</u>
5.5.1.- Montaje y preparación de la columna .	72
5.5.2.- Aplicación y elución de la muestra ..	73
5.5.3.- Medida del contenido proteico de las fracciones	74
5.6.- Ultracentrifugación en gradiente de sacaro- sa	74
5.6.1.- Preparación del gradiente de sacarosa	74
5.6.2.- Centrifugación	75
5.6.3.- Fraccionamiento de los tubos	75
6.- Análisis de la composición química de las partícu- las similares a colas de fago	76
6.1.- Determinación de proteínas	76
6.2.- Determinación de ADN	77
6.3.- Determinación de ARN	77
7.- Microscopía electrónica	78
7.1.- Preparación del soporte: rejillas con form- var	78
7.2.- Tinciones	79
7.3.- Montaje de las muestras en las rejillas y tinción	81
8.- Obtención de extractos sonicados de Mixobacterias	81
9.- Búsqueda de enzimas de restricción	82
9.1.- Preparación del polímero concentrado	82
9.2.- Preparación de los extractos de <u>M. coralloi-</u> <u>des D</u>	83
9.3.- Ensayo de endonucleasas de restricción.....	83
9.4.- Electroforesis en gel de agarosa	83
10.- Extracción de DNAsas del espacio periplásmico ..	84
11.- Ensayo de actividad DNasa	85

	<u>Pág</u>
RESULTADOS	87
- Detección de partículas similares a colas de fago .	88
- Estudios sobre producción de partículas similares a colas de fago en medios líquidos	89
- Producción en medios autóliticos	89
- Producción en medio CTP	93
- Estudios sobre producción de colas de fago en medios sólidos	96
- Producción en medio CTA	96
- Producción en agar levadura	96
- Inducción con luz ultravioleta	98
- Curva de inactivación de <u>M.coralloides</u> D por la luz U.V.	98
- Inducción con luz U.V.	102
- Inducción con luz U.V. y lisis con cloroformo .	104
- Inducción con mitomicina C	105
- Tratamiento de <u>M. coralloides</u> D con antibióticos que inducen lisis	107
- Purificación de las partículas similares a colas de fago	109
- Centrifugación diferencial	109
- Sistema Polietilenglicol-dextrano sulfato sódico	109
- Precipitación con sulfato amónico	110
- Diálisis	111
- Adsorción sobre carbón activado	111
- Esquema del proceso de purificación de las partículas similares a colas de fago	111
- Análisis de la composición química de las partículas similares a colas de fago	116

	<u>Pág</u>
- Determinación de proteínas	117
- Determinación de ADN	117
- Determinación de ARN	117
- Efecto de los agentes físicos y químicos sobre las partículas similares a colas de fago	118
- Estabilidad frente al calor	118
- Estabilidad frente al pH	118
- Efecto de los enzimas proteolíticos	121
- Efecto de la fuerza iónica	122
- Efecto de los agentes desnaturalizantes	122
- Efecto de los agentes quelantes	124
- Efecto de los detergentes	124
- Ensayo de actividad de las partículas similares a colas de fago frente a otras mixobacterias	124
- Inmunidad de <u>M. coralloides</u> D a las partículas fá- gicas defectivas que produce	128
- Intentos de aislamiento de fagos específicos para <u>M. coralloides</u>	129
- Enriquecimiento en medio líquido	129
- Enriquecimiento en medio sólido	130
- Efecto de los fagos de otras mixobacterias sobre <u>M. coralloides</u>	131
- Adsorción de los fagos de <u>M. virescens</u> sobre <u>M.co-</u> <u>ralloides</u> D	132
- Búsqueda de razas de <u>M. coralloides</u> D no producto- ras de colas de fago	135
- Tratamiento de <u>M. coralloides</u> D con anaranjado de acridina	136
- Pases repetidos por CTP	136

	<u>Pág</u>
- Búsqueda de enzimas de restricción de <u>M. coralloides</u> D.....	137
- Actividad DNasa en <u>M. coralloides</u> D	138
- Actividad DNasa en el espacio periplásmico de <u>M. co- ralloides</u> D	140
- Actividad DNasa extracelular de <u>M. coralloides</u> D ...	142
- Actividad DNasa de <u>M. virescens</u>	143
 DISCUSION.....	 145
 CONCLUSIONES.....	 159
 BIBLIOGRAFIA.....	 162

INTRODUCCION

TAXONOMIA DE LAS BACTERIAS DESLIZANTES

La octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) engloba en el apartado 2 a las bacterias deslizantes, grupo muy heterogéneo filogenéticamente, ya que son pocos los caracteres que comparten las bacterias que lo integran, entre los que destaca la capacidad de deslizarse. A pesar de dicha heterogeneidad, no se incluyen en él microorganismos procariotas que reúnen las pocas características comunes del grupo, como las cianobacterias deslizantes, muy similares a los géneros Beggiatoa, Thiotrix y Leucothrix. Esto, junto con un mejor conocimiento de todos los microorganismos deslizantes, ha llevado a Reichenbach y Dworkin (1981) a proponer una nueva clasificación. En ella, los microorganismos deslizantes son divididos en tres grupos muy diferentes entre sí:

- El primero incluye las bacterias verdes del azufre filamentosas, estrechamente relacionadas con la familia Chlorobiaceae.

- El segundo grupo reúne las cianobacterias deslizantes y organismos no fototróficos que parecen derivar de las cianobacterias. La mayoría forman también filamentos multicelulares.

- El tercer grupo engloba las bacterias deslizantes unicelulares.

Este último grupo incluye una sola clase, denominada Flexibacteriae, la cual había sido ya propuesta anteriormente por varios autores (Soriano, 1947; Soriano, 1973;



Reichenbach, 1981). Las flexibacterias presentan algunas características bastantes inusuales dentro de las bacterias aerobias Gram-negativas, como tener ácidos grasos isoramificados e hidroxilados en posiciones 2 y 3 (Schröder y Reichenbach, 1970; Ware y Dworkin, 1973; Fautz et al., 1979 y 1981) y contener exclusivamente menaquinonas en sus cadenas respiratorias (Kleining et al., 1974).

La clase Flexibacteriae es dividida en dos órdenes: Cytophagales y Myxobacterales. El primer orden incluye bacterias deslizantes unicelulares Gram-negativas con forma de bastón, a veces cortos, pero normalmente bastante largos. Muchos de ellos sufren cambios de forma que pueden llevar a la formación de microquistes o, al menos, a la aparición de poblaciones altamente pleomórficas, sin que en ningún caso lleguen a aparecer estructuras semejantes a cuerpos fructificantes. Es un orden bastante heterogéneo, como refleja su amplio rango en el contenido G+C, que oscila entre 28 y 67 moles por ciento (Mandel y Lewin, 1969).

El orden Myxobacterales, por el contrario, es muy homogéneo, como indican su estrecha variación en el contenido G+C: 67-71 moles por ciento (Mandel y Leadbetter, 1965; McCurdy y Wolf, 1967), los estudios realizados sobre RNA 16 S (Ludwig et al., 1983) y su peculiar ciclo de vida.

CARACTERISITICAS GENERALES DE LAS MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos típicos, con los extremos afilados o redondeados. Presentan tres características sobresalientes que las diferencian del resto de las bacterias Gram-negativas: Se mueven por deslizamiento. Tienen un espectacular potencial morfogénético. Y son organismos sociales. Estas propiedades no son independientes unas de otras

y pueden tener su explicación en la ecología de las mixobacterias (Reichenbach, 1984).

La estructura de las células vegetativas es similar a la de otras bacterias Gram-negativas. Están rodeadas por una capa mucosa, compuesta por un complejo de proteínas, polisacáridos y lípidos (Gnospeilius, 1978 b). En el polisacárido abundan la manosa, la D-glucosa y la D-galactosa (Sutherland y Thomson, 1975). Son varias las funciones que se le ha atribuido a esta capa mucosa: adhesión de unas células a otras, adhesión al sustrato, protección frente a fagocitosis y toxinas e incluso intervenir en el movimiento deslizante; sin embargo, ninguna de estas funciones está completamente clara.

Debajo de la capa mucosa está la envuelta celular, la cual consta de tres capas: la membrana externa, el peptidoglucano y la membrana plasmática.

La membrana externa está formada por lipopolisacáridos, proteínas y fosfolípidos, igual que la del resto de las bacterias Gram-negativas, sin embargo, hay algunas diferencias entre la membrana externa de unas y otras. Así, las mixobacterias no tienen heptosa en el lipopolisacárido (Sutherland y Smith, 1973; Rosenfelder et al., 1974), azúcar bastante frecuente en el lipopolisacárido de bacterias Gram-negativas; además, la membrana externa de las mixobacterias es menos densa que la membrana celular, al contrario de lo que ocurre en E. coli (Orndorff y Dworkin, 1980), debido al alto contenido en fosfolípidos de la membrana externa de las mixobacterias.

El peptidoglucano tiene una composición similar al de E. coli, aunque está en menor proporción; sin embargo, la tripsina fragmenta el mucopéptido de las mixobacterias en trozos pequeños que pueden ser sedimentados por centrifugación, mientras que el del resto de las bacterias es resistente a este enzima proteolítico. Esta sensibilidad es debida a que el pepti-

doglucano de las mixobacterias no constituye una envuelta continua, sino una serie de paquetes unidos entre sí por material sensible a la tripsina. El material que hace de nexo parece ser que es la glicina, ya que tras el tratamiento con tripsina se solubiliza la mayoría de la glicina del mucopéptido (White et al., 1968). El bajo contenido en peptidoglucano y su discontinuidad pueden estar relacionados con la flexibilidad de las células y su capacidad para convertirse en mixósporas (Kaiser, Manoil y Dworkin, 1979).

El genomio de las mixobacterias tiene dos características relevantes: su gran tamaño y su alto contenido en G+C. El tamaño del ADN de Myxococcus xanthus, única mixobacteria en que se ha medido, es de 5690 \pm 510 Kb (Yee and Inouye, 1981 y 1982), casi el doble del de E. coli K-12, y uno de los genomios más grandes conocidos entre las bacterias. El por qué de este tamaño tan elevado no está aún aclarado. Parece ser que no se necesita un tamaño especial para la esporulación, ya que Bacillus subtilis tiene un ADN de tamaño similar al de E. coli (Wallace y Morowitz, 1973). Quizá sea necesario un exceso de ADN para la fructificación. Si esto fuese así todas las mixobacterias deberían tener un genomio grande, hecho que hasta el momento se desconoce.

En cuanto a la composición de bases, el contenido en G+C oscila entre 67-71 moles por ciento. Yee y Inouye (1984) basándose en los estudios realizados por Swenson y Setlow (1966) en E. coli, creen que este alto contenido en G+C ha sido desarrollado por las mixobacterias a lo largo de la evolución para protegerse de la radiación ultravioleta de la luz solar a la que están expuesta por vivir generalmente en la superficie del suelo.

Las mixobacterias han desarrollado además otros mecanismos para protegerse de la luz solar, como la producción de pigmentos de naturaleza carotenóidica unidos a la membrana citoplasmática (Kleinig, 1972), cuya síntesis es fotoinducible en muchos casos (Burchard y Dworkin, 1966 a; Arias y Montoya, 1982).

Las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua. Aunque este tipo de movimiento ha sido objeto de numerosos estudios, aún no se ha conseguido dilucidar el mecanismo del mismo. En la actualidad existen varias teorías que intentan explicar, aunque ninguna satisfactoriamente, cual es la fuerza directriz del movimiento deslizante. Una teoría sostiene que el deslizamiento se debe a la excreción de material de la capa mucosa extracelular (Fluegel, 1963). Este mecanismo está hoy prácticamente descartado, y el papel que se le atribuye actualmente a la capa mucosa en este movimiento es el de unirse a polisacáridos del sustrato y originar una matriz apropiada para el deslizamiento (Burchard, 1984). Otra teoría defiende que son gradientes de tensión superficial los que dirigen el movimiento (Keller et al., 1983). Y una tercera teoría atribuye el deslizamiento a la contracción de los filamentos intracelulares unidos a la membrana citoplasmática que han sido observados en muchas mixobacterias y que no se encuentran en mutantes que han perdido la capacidad de deslizarse (Schmidt-Lorenz y Kühlwein, 1968; MacRae y McCurdy, 1976; Burchard et al., 1977; Inouye et al., 1985). Todas estas teorías tan distintas son una consecuencia del desconocimiento que aún se tiene del deslizamiento, ya que en la actualidad no existen datos con suficiente firmeza para explicar en términos mecanísticos la movilidad deslizante.

Además del movimiento de cada célula individual, las mixobacterias poseen capacidad para moverse como grupos coordinados, que reciben el nombre de enjambres. La velocidad de expansión del enjambre es proporcional a la densidad celular, debido a que es necesaria la interacción entre las células para que se de este movimiento coordinado (Kaiser y Crosby, 1983). En esta interacción juegan un papel importante las fimbrias que salen de los polos de las células, ya que las razas sin fimbrias no pueden moverse coordinadamente (Kaiser, 1979). Estas dos formas diferentes de movimiento están controladas por dos sistemas de genes diferentes: el sistema A, que controla el deslizamiento de las células individuales; y el sistema S, que controla el movimiento del enjambre (Hodgkin y Kaiser, 1979 a y b).

Desde hace mucho tiempo es conocido que las mixobacterias degradan y se alimentan de macromoléculas insolubles presentes en el medio ambiente y que pueden lisar a otros microorganismos, tales como eubacterias, tanto Gram-positivas como Gram-negativas, actinomicetos, cianobacterias, levaduras y otros hongos e incluso nematodos. Esta actividad lítica es debida a la producción de una amplia variedad de antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticos de la pared celular, proteasas, polisacaridasas, nucleasas y lipasas (Rosenberg y Varon, 1984).

Los enzimas líticos de la pared celular pueden dividirse en cuatro grupos, atendiendo al enlace que cortan: muramidases (Harcke et al., 1971 y 1972) que rompen el enlace 1-4 entre el ácido murámico y la glucosamina. Glucosaminidasas (Hart y Zahler, 1966; Sudo y Dworkin, 1972; Haská, 1974), que cortan el enlace 1-4 entre la glucosamina y el ácido murámico. Amidases (Katz y Strominger, 1967; Tsai et al., 1965; Sudo y Dworkin, 1972), que cortan el enlace entre el ácido murámico

y la alanina de la cadena peptídica. Y peptidasas (Tsai et al., 1965; Tipper et al., 1967; Sudo y Dworkin, 1972; Haská, 1974), que hidrolizan enlaces de la cadena peptídica. De los cuatro grupos, los tres primeros son, por el enlace que rompen, altamente específicos de la pared celular; sin embargo, el último puede actuar también sobre otros polipéptidos diferentes de los que forman la pared.

Junto con los enzimas que cortan la pared celular, los enzimas proteolíticos juegan un papel muy importante en la actividad bacteriolítica de las mixobacterias. Varios enzimas proteolíticos extracelulares han sido purificados y estudiados en detalle. Gnospelius (1978 a) encontró que al menos tres proteasas estaban presentes en los sobrenadantes de Myxococcus virescens, de las cuales sólo purificó una. El enzima purificado podía hidrolizar la caseína y la hemoglobina, cortando en aquellos puntos en que estaban implicados aminoácidos apolares. Myxobacter AL 1 produce dos enzimas proteolíticas extracelulares, denominados proteasa I y proteasa II, que se diferencian en que la primera puede actuar sobre paredes celulares y la segunda no (Jackson y Wolfe, 1968; Wingard et al., 1972). También se han detectado enzimas proteolíticos en Sorangium (Whitaker, 1965; Jurasek y Whitaker, 1965), Chondrococcus coralloides (Harcke et al., 1971) y Myxococcus xanthus (Rodríguez y Montoya, 1980). La actividad bacteriolítica y proteolítica es afectada por la composición del medio de crecimiento. Esto ha sido estudiado por Haská y Stahl (1971) en M. virescens y por Pérez López et al. (1978) en M. xanthus.

Las mixobacterias son también productoras de endonucleasas de restricción. Morris y Parish (1976) encontraron que una raza de M. virescens, denominada M. virescens V2, era

restrictiva para el fago Mx-1 y consiguieron separar dos enzimas de restricción, R.Mvi2I y R.Mvi2II, a partir de extractos sonicados de dicha raza. La nucleasa I corta el ADN del fago Mx-1 en 10 sitios, mientras que la nucleasa II lo corta en un gran número de puntos. Utilizando ADN del fago Mx-1 modificado por M. virescens V2, se encontró que dicho ADN era sólo sensible a la acción de la nucleasa II. Dos años más tarde, Mayer y Reichenbach (1978), utilizando un procedimiento de extracción de enzimas del espacio periplásmico de bacterias deslizantes que será descrito más adelante (Material y Métodos), encontraron que varias razas de Myxococcus fulvus, Myxococcus virescens, Myxococcus xanthus, Myxococcus stipitatus, Archangium serpens y Podangium erectum contenían endonucleasas de restricción en el espacio periplásmico, por lo que se pueden considerar las mixobacterias como una fuente rica en este tipo de enzimas. Debido a la localización de las endonucleasas, es difícil atribuirles algún papel en la lisis de otras bacterias, aunque puedan degradar el ADN liberado tras la lisis por otro tipo de enzimas.

Además, también se han descrito enzimas con actividad lipásica. Sørhaug (1974) encontró en M. xanthus una glicerol ester hidrolasa, cuya localización no ha sido aclarada. Posteriormente, Rodríguez et al., (1979) demostraron la existencia de actividad esterasa sobre la superficie celular. Ruiz-Rodríguez (1980) encontró dos sistemas enzimáticos con actividad lipásica en M. xanthus MD2 y MD4, uno de ellos extracelular y el otro unido a estructuras celulares.

En relación con la actividad lítica de las mixobacterias se encuentra también la producción de antibióticos y bacteriocinas.

Aunque Oxford (1947), Nóren (1953) y Nóren y Raper (1962) encontraron evidencias indirectas de producción de antibióticos por mixobacterias, no consiguieron aislar el componente activo de los cultivos líquidos, lo que hace difícil evaluar cuántos de los fenómenos descritos eran debidos a antibióticos y cuántos a otros factores, tales como enzimas bacteriolíticos.

El primer antibiótico caracterizado fue la mixina, producida por Sorangium (Peterson et al., 1966). Es un antibiótico de espectro de acción muy amplio, ya que actúa frente a bacterias, levaduras y otros hongos. Estudios sobre el modo de acción indicaron que inhibe la síntesis de ADN (Behki y Lesley, 1972). Desde entonces han sido bastantes los antibióticos aislados de cultivos de mixobacterias (Rosenberg et al., 1973; Arias et al., 1979; Gerth et al., 1982; Ringel et al., 1977; Gerth et al., 1980; Kunze et al., 1982; Gerth et al., 1982; Irschik et al., 1983; Höfle et al., 1984), sobre todo en los últimos años, debido a que un grupo alemán se dedica casi exclusivamente a la búsqueda de antibióticos en mixobacterias.

A pesar de que las mixobacterias son también productoras de bacteriocinas y de que éstos agentes deben jugar un papel importante en los efectos antagónicos de las mixobacterias sobre otras bacterias, existen muy pocos datos sobre estos agentes antibacterianos. Así, sólo se han descrito en tres especies: M. xanthus (McCurdy y MacRae, 1974), M. fulvus (Hirsch, 1977) y M. coralloides (Muñoz et al., 1984).

Aunque en algunos casos la lisis de microorganismos por mixobacterias pueda atribuirse a la producción extracelular de enzimas y antibióticos exclusivamente (bacterias Gram-positivas, por ejemplo), en otros se requiere que haya además un contacto directo entre la mixobacteria y su presa (Burnham et al.,

1981; Shilo, 1970). Haská et al. (1972) encontraron que ácidos grasos de la superficie de M. xanthus hacen sensible al ataque por enzimas líticas a bacterias que anteriormente eran resistentes, por un cambio en la permeabilidad de la pared. Gnospeilius (1978 b) aisló de la capa mucosa un complejo proteína-polisacárido-lípido que se une a las proteínas, formando un complejo que es más fácilmente atacado por los enzimas proteolíticos.

Debido a la producción de este amplio rango de enzimas epi y extracelulares, bacteriocinas y antibióticos, las mixobacterias pueden crecer mejor y más rápidamente en medios de cultivo a base de macromoléculas, bacterias o levaduras que en los medios bacteriológicos convencionales. Este hecho es tan sumamente notable que ya fue descrito en las primeras investigaciones realizadas sobre mixobacterias (Jahn, 1924).

La complejidad de los medios de cultivo, unida al hecho de que las mixobacterias tienden a crecer agrupadas, ha dificultado y retrasado enormemente los estudios sobre el metabolismo intermediario de estos microorganismos. En épocas relativamente recientes (Dworkin, 1962) se han podido conseguir cultivos dispersos de Myxococcus xanthus y, posteriormente, de otras mixobacterias. En nuestro laboratorio, Arias y Montoya (1978) aislaron una raza de Myxococcus coralloides, denominada M. coralloides D, capaz de crecer de manera dispersa en medio líquido. Unos años más tarde se consiguieron también medios mínimos donde podía crecer M. xanthus (Hemphill y Zahler, 1968; Bretscher y Kaiser, 1978). Estos dos hallazgos han permitido conocer algunos de los requerimientos nutritivos de las mixobacterias (más concretamente de M. xanthus, ya que todos los trabajos han sido realizados con esta mixobacteria) y su metabolismo intermediario. Hoy se conoce que las fuentes de carbono y energía de peso molecular más bajo que utiliza M.

xanthus son los aminoácidos, el acetato y el piruvato y que los carbohidratos, aunque no son utilizados como nutrientes, sí son bien incorporados dentro de las células. También se han podido conocer muchas de las rutas metabólicas que poseen las mixobacterias, como el ciclo de los ácidos tricarbóxicos, el ciclo del glioxalato, la mayoría de los enzimas de la glucólisis, la gluconeogénesis, etc... Esta última ruta tiene bastante importancia ya que, al crecer normalmente las mixobacterias en medios a base de aminoácidos, deben sintetizar los azúcares a partir de determinados metabolitos intermediarios del ciclo de los ácidos tricarbóxicos (Watson y Dworkin, 1968). También se conoce que pueden sintetizar la mayoría de los aminoácidos (Kaiser, Manoil y Dworkin, 1979).

CICLOS DE VIDA DE LAS MIXOBACTERIAS

La característica más sobresaliente de las mixobacterias es su alto potencial morfogenético, el cual tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis cooperativa, que conduce a la formación de cuerpos fructificantes por la acción conjunta de cientos de miles de células; y una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la aparición de células de reposo, denominadas mixósporas, que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes.

El proceso de fructificación está íntimamente relacionado con los factores nutricionales del medio, disparándose cuando se agotan o están en cantidad limitante algunos de los aminoácidos u otros componentes del medio de cultivo (Ma-

noil y Kaiser, 1980). Por el contrario, en medios ricos no ocurre fructificación sino que se sigue un ciclo de vida vegetativo. Este ciclo es muy simple, especialmente si se compara con el ciclo de desarrollo, ya que sólo ocurren divisiones binarias. El ciclo de vida vegetativo puede tener lugar tanto en medio sólido como en medio líquido; este último caso sólo se da en aquellas mixobacterias capaces de crecer dispersas.

Fructificación

En el ciclo de vida de las mixobacterias ocurren procesos que, si bien normalmente se dan uno a continuación del otro, también pueden darse por separado, lo que demuestra que, aunque tengan algunos puntos de conexión, son bastante independientes. Estos dos procesos son la agregación y la esporulación.

Agregación

El proceso de agregación en mixobacterias se inicia cuando se encuentra en concentración limitante algún factor nutritivo del medio de cultivo. El factor limitante puede ser algún aminoácido esencial, algún aminoácido no esencial o incluso la fuente de carbono y energía o el fosfato inorgánico. Durante un tiempo se creyó que el disparador de la iniciación de la fructificación era la acumulación de guanosina tetrafosfato y guanosina pentafofosfato, ya que los niveles de ambos compuestos aumentan cuando las células se encuentran en estado de inanición (Manoil y Kaiser, 1980). Sin embargo, recientemente (Zusman, 1984), se ha comprobado que mutantes deficientes en la síntesis de estos dos compuestos pueden fructificar. Esto



hace que aún no esté claro cuál es el mecanismo por el que se inicia la fructificación y el papel que juegan en el proceso los nucleótidos hiperosforilados.

Para la agregación, además de la inanición son requeridos otros dos factores: la presencia de una superficie sólida y una densidad celular alta. El hecho de que no aparezcan cuerpos fructificantes en medio líquido se debe a que las mixobacterias no pueden moverse, lo que impide que puedan concentrarse en puntos concretos. Recientemente se ha podido conseguir fructificación en cultivos sumergidos (Kuner y Kaiser, 1982). Este hallazgo descarta la posibilidad de que durante la agregación intervengan sustancias altamente solubles en agua que actuarían como señales químicas para atraer a las células a puntos concretos.

En relación con la densidad celular, Wireman y Dworkin (1975) encontraron que la fructificación era mucho más rápida cuanto mayor era la densidad celular y que cuando ésta era inferior a 2.5×10^8 cel/ml no aparecían cuerpos fructificantes ni aún después de 7 días de incubación. La explicación de este fenómeno parece ser que está en la necesidad de una distancia crítica entre célula y célula. Cuando se supera dicha distancia se dificulta la comunicación intercelular y no se produce agregación. Shimkets y Dworkin (1981) encontraron que la adenina estaba implicada en todo este proceso de comunicación intercelular.

De otra parte, se ha descrito una hemoaglutinina que puede jugar un papel importante en el proceso de agregación. Fue aislada por Cumsky y Zusman (1979) a partir de células recogidas de medios sólidos en los que estaba produciéndose agregación. La actividad hemoaglutinante no ha podido ser detec-

tada en células que se encuentran en un estado muy temprano del desarrollo, se alcanza el punto máximo de producción cuando la agregación célula-célula es más fuerte y decae posteriormente, cuando las células empiezan a diferenciarse a mixósporas maduras. En un principio se pensó que la hemoaglutinina de las mixobacterias intervenía sólo en el proceso de agregación; sin embargo, estudios posteriores revelaron que quizá intervenga también en la esporulación, ya que algunos mutantes defectivos en este proceso no producen hemoaglutinina (La Rossa *et al.*, 1983). Esto es de gran interés, ya que la producción de hemoaglutinina podría representar un punto de unión entre agregación y esporulación.

Una vez cumplidos los requisitos previos de inanición, punto de apoyo para el deslizamiento y distancia óptima entre células se inicia la agregación. Las células empiezan a deslizarse hacia puntos concretos, normalmente formando oleadas. En esos puntos de atracción se originan unos agregados, los cuales van creciendo de tamaño hasta constituir el cuerpo fructificante maduro. Como ya se ha mencionado, en todo el proceso es de suma importancia la comunicación intercelular.

La morfología de los cuerpos fructificantes varía según los distintos géneros. Los más simples son los de la familia Myxococcaceae, cuyo aspecto es el de montículos esféricos o alargados, a veces con un tallo corto, de consistencia blanda y mucosa. En otros géneros, como Stigmatella, son más complejos; constan de un pedúnculo del que salen varios esporangiolos, recubierto todo por una pared dura. En el caso de Chondromyces crocatus el pedúnculo es ramificado y cada rama termina en un racimo de esporangiolos.

Esporulación

Una vez que las células se han agregado, empiezan a sufrir una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que conducen a la formación de mixósporas. Las mixósporas se diferencian de las esporas formadas por especies del género Bacillus en dos características fundamentalmente: las esporas de Bacillus son células formadas de ново, mientras que, en el caso de las mixobacterias, las células completas se transforman en mixósporas. La otra diferencia estriba en que las mixósporas, aunque son algo más resistentes que las células vegetativas a las condiciones extremas del medio ambiente, lo son muchos menos que las endosporas. Estas dos razones han hecho pensar que las mixósporas son formas de reposo, más que de resistencia.

El proceso de esporulación ocurre normalmente después de la agregación; sin embargo, puede producirse sin que se haya producido agregación anteriormente. A partir de una colección de mutantes defectivos en el proceso de agregación, en el de esporulación, en ambos y mutantes no fructificantes termosensibles, se ha podido conocer que la esporulación y la agregación son dos rutas separadas y paralelas en el desarrollo, aunque interrelacionadas (Morrison y Zusman, 1979; Zusman, 1982).

El proceso de esporulación es reversible hasta las 32 h de haberse iniciado el desarrollo; pasado este tiempo, la esporulación continúa aunque las células sean transferidas a un medio rico (Wireman, 1979).

Un hecho muy significativo relacionado con la esporulación es la autólisis del 80% aproximadamente de las células

que se han agregado, de manera que sólo el 20% llegan a formar mixósporas (Wireman y Dworkin, 1975 y 1977). Esta autólisis masiva parece ser que está íntimamente unida al desarrollo, ya que los mutantes spo C, que no muestran comportamiento autolítico, no esporulan, a no ser que se estimule la lisis a niveles normales (Shimkets y Kaiser, 1982). Wireman y Dworkin (1977) han formulado algunas hipótesis para explicar este fenómeno autolítico. Una teoría sostiene que la muerte de la mayor parte de la población haría que las células supervivientes dispusieran de suficientes nutrientes para esporular, ya que se encuentran en estado de inanición. Otra teoría sostiene que algunos de los productos liberados en la lisis podrían actuar como señales químicas que inducirían la esporulación. Shimkets y Kaiser (1982) confirmaron esta segunda hipótesis al comprobar que los componentes del mucopéptido son capaces de inducir la esporulación en los mutantes spo C. Estas dos teorías consideran la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población; sin embargo, hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sufriendo morfogénesis son bastante sensibles al choque osmótico y, por tanto, están expuestas a lisis (Zusman, 1984). Esto apunta hacia una autólisis no cooperativa o al menos no activa.

Durante la esporulación, las células vegetativas se van recubriendo de una cubierta gruesa y van cambiando de forma. Sin embargo, el cambio de forma no ocurre en todos los grupos de mixobacterias; así, en el suborden Soranginae, la morfología de las mixósporas es prácticamente igual a la de las células vegetativas. Por el contrario, en el suborden Cystobacterinae, el cambio de forma es muy acusado, por lo que las mixósporas tienen forma esférica o casi esférica.

A parte de las morfológicas, existen otras diferencias entre células vegetativas y mixósporas. Por ejemplo, éstas últimas poseen una cubierta gruesa, constituida por tres capas. Entre los componentes de la cubierta destaca una proteína, denominada proteína S. Además, las mixósporas presentan una tasa respiratoria nula, aparecen refringentes al microscopio de contraste de fases y son más resistentes que las células vegetativas al calor, la sonicación y la desecación.

La diferenciación de las células vegetativas a mixósporas no sólo se produce cuando se forman cuerpos fructificantes. Dworkin y Gibson (1964) observaron que la adición de glicerol 0.5 M a cultivos de M. xanthus en fase exponencial producía mixósporas. Posteriormente, Bacon y Rosenberg (1967) encontraron que otros polialcoholes y el dimetilsulfóxido tenían el mismo efecto que el glicerol.

Las mixósporas obtenidas tras la inducción con glicerol son similares a las que se encuentran en los cuerpos fructificantes en lo que respecta a forma, refringencia y resistencia; sin embargo, son diferentes en otros aspectos. Así, por ejemplo, presentan una tasa respiratoria más elevada, acumulan gran cantidad de carbohidratos y su cubierta es mucho más delgada, al carecer de proteína S. Otra diferencia está en el patrón de síntesis de proteínas durante la formación de cuerpos fructificantes y la formación de mixósporas por inducción con glicerol. Los dos rasgos más sobresalientes en la síntesis de proteínas durante la formación de cuerpos fructificantes son la sobreproducción de proteína S y la producción de proteína U, dos proteínas asociadas a la cubierta de las esporas maduras. La síntesis de proteína S se inicia a las 3-6 horas después de empezar el ciclo de desarrollo; a las 24 horas se alcan-

za el máximo de producción y después decae, dejando de sintetizarse a las 48 h. Por el contrario, la proteína U empieza a sintetizarse cuando cesa la síntesis de proteína S, aproximadamente (Inouye et al., 1979).

En el caso de la inducción de esporas con glicerol y otros agentes químicos, el patrón de síntesis de proteínas es diferente, ya que no hay síntesis de proteína S, aunque sí de proteína U. Tampoco se sintetiza hemoaglutinina (Komano et al., 1980). Estas diferencias se cree que son debidas a que en la esporulación inducida con glicerol sólo tienen lugar los últimos pasos del proceso de esporulación que se da durante la formación de los cuerpos fructificantes (Zusman, 1984).

Todos los eventos que tienen lugar durante el ciclo de desarrollo en las mixobacterias en general, y que hemos venido comentando, obedecen a un programa coordinado, que ha sido esquematizado por Zusman (1984). Dicho esquema aparece en la Figura A.

Germinación y significado del ciclo de desarrollo

La mayoría de los estudios realizados sobre el ciclo de desarrollo han sido enfocados hacia los procesos de agregación y esporulación; sin embargo, pocas veces ha sido abordado el proceso de germinación y, por tanto, son pocos los conocimientos que se tienen a cerca de él.

La germinación ocurre cuando las mixósporas son colocadas en un medio rico, por lo que se cree que algunos nutrientes del medio deben actuar como señal que desencadene todo el proceso. Existen evidencias de que, en M. xanthus, el fosfato inorgánico actúa como disparador en la germinación de las mixósporas obtenidas con glicerol (Dworkin, 1973); sin

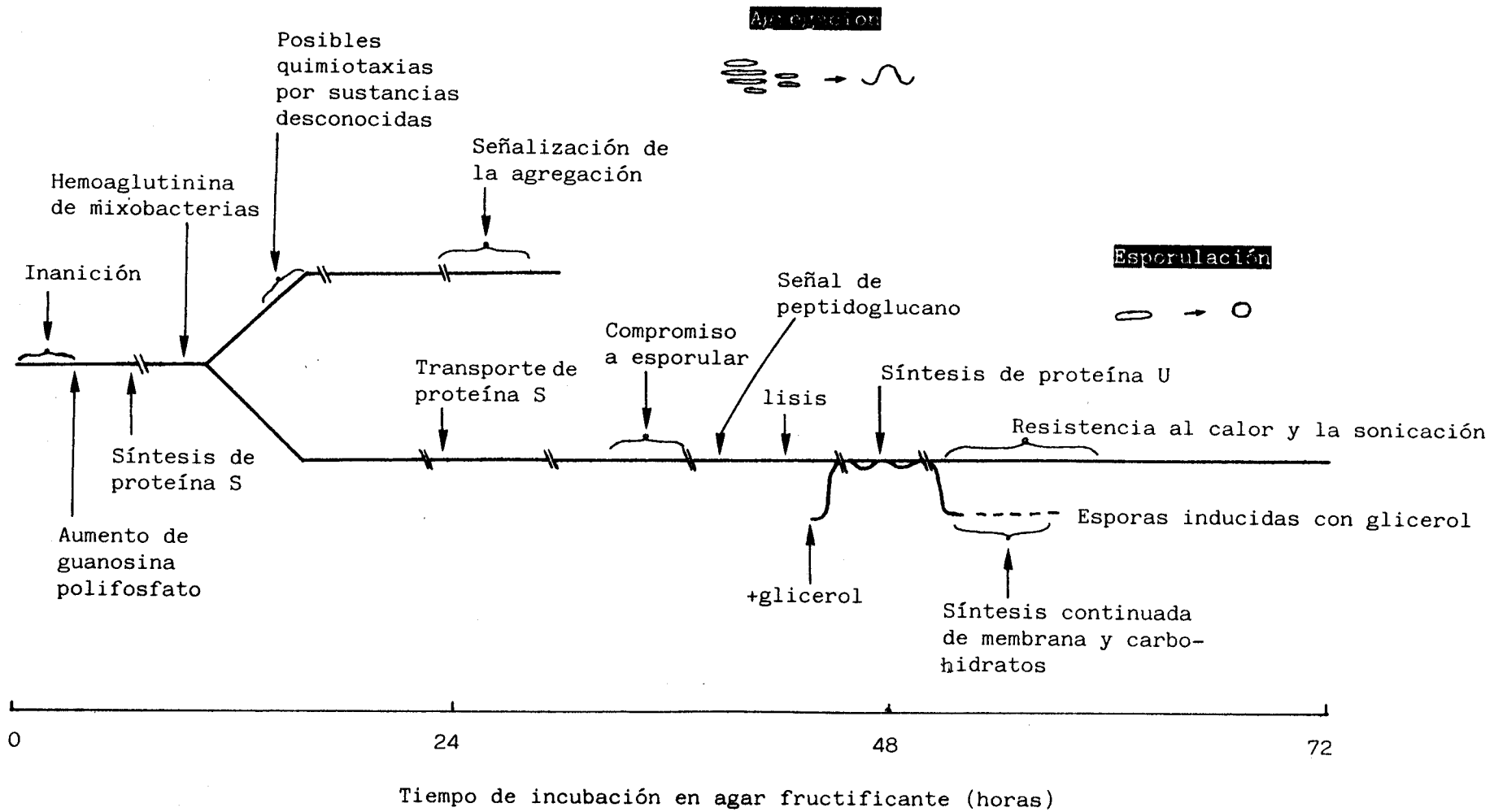


FIGURA A. Programa de desarrollo de *Myxococcus xanthus*. || representa sitios de la ruta para los cuales se han obtenido mutantes.

embargo, las mixósporas de los cuerpos fructificantes no parecen responder a la señal del fosfato (White, 1975). Por el contrario, en M. coralloides, para el caso de las mixósporas inducidas con glicerol, la germinación es independiente de la concentración de fosfato (González, comunicación personal). Cualquiera que sea el mecanismo que lo dispare, cuando esto ocurre acontecen una serie de cambios en las esporas. En primer lugar, las mixósporas pierden la refringencia y, a continuación, la cubierta de la espora se rompe, saliendo la nueva célula vegetativa bacilar y dejando detrás la cubierta vacía (Voelz y Dworkin, 1962).

Para que ocurra la germinación parece ser que se requiere una densidad celular alta, ya que Dworkin (1973), estudiando la germinación de mixósporas inducidas con glicerol en agua destilada encontró que era requerida una densidad celular de 5×10^9 c/ml aproximadamente, para que se inicie la germinación. Densidades celulares más bajas son suficientes si la inducción se produce en medios más ricos. De cualquier manera, no se da la germinación de una célula aislada, sino la de toda una comunidad. La población de células resultante de la germinación se mantiene unida y se comporta como un nuevo enjambre. En estos, las células siguen el ciclo de vida vegetativo hasta que se agoten los nutrientes. En este momento se originarán varios puntos de atracción dentro del enjambre, adonde migrarán las células, se agregarán, se diferenciarán y aparecerán varios cuerpos fructificantes nuevos.

Durante mucho tiempo se ha especulado sobre el significado biológico de este ciclo de vida, habiéndose llegado a la conclusión de que su función es asegurar que se inicie un nuevo ciclo a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían

colonias en reposo. Ahora cabe preguntarse ¿por qué se requiere o es tan necesario que el ciclo se inicie con una comunidad?. La explicación podría estar en el modo de vida de estos microorganismos en la naturaleza. Las mixobacterias viven en ambientes de macromoléculas en degradación, muchas de ellas provenientes de la lisis de bacterias y levaduras. Para que una mixobacteria aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Allí difundirán y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado, el cual será digerido. Los nutrientes liberados difundirán desde el punto en que se han producido de manera radial, por lo que no todos llegarán a la mixobacteria en cuestión, sino sólo una pequeña parte, que será insuficiente para mantener el crecimiento de la misma. Por el contrario, si en puntos cercanos existen otras mixobacterias, o sea, se parte de una comunidad, la producción de enzimas será mucho más elevada, con lo cual la degradación de macromoléculas será más rápida y, además, el aprovechamiento de nutrientes será más efectivo, ya que cada mixobacteria tendrá acceso a los nutrientes obtenidos por toda la comunidad, por lo que las pérdidas por difusión serán mínimas.

AUTOLISIS

Como ya se mencionó anteriormente, durante el ciclo de desarrollo, una vez que las células se han agregado y antes de la esporulación, ocurre la lisis del 80% aproximadamente de la población, lo que ayudará a que el 20% supervi-

viente pueda esporular (Wireman y Dworkin, 1975 y 1977). Pero la autólisis en mixobacterias no sólo se da durante el ciclo de desarrollo, sino también, con bastante frecuencia, durante el ciclo vegetativo, en cultivos creciendo de manera dispersa en medio líquido. En estos casos los cultivos presentan una corta fase estacionaria, después de la cual entran en una fase de declive más o menos rápida que termina cuando todas las células se han autolisado. Esto ha sido descrito en M. xanthus (Mason y Powelson, 1958), M. virescens (Haska y Stahl, 1971) y M. coralloides (Fernández-Vivas et al., 1983a). Sobre esta mixobacteria se han realizado la mayoría de los estudios sobre la autólisis durante el crecimiento vegetativo. Se han encontrado evidencias de que la autólisis es disparada por una sustancia, denominada factor activador, que es liberada a los sobrenadantes de cultivo durante la fase de crecimiento exponencial. Esta sustancia, cuando alcanza una determinada concentración, activa los enzimas autolíticos y desencadena la autólisis (Arias et al., 1983). También se ha encontrado que los factores nutricionales del medio ejercen un efecto muy fuerte sobre el proceso autolítico, de manera que al aumentar la concentración de Bacto-casitone, la autólisis se acelera, mientras que al aumentar la concentración de fosfato se retrasa, llegando a inhibirse cuando la concentración de fosfato es 40 mM (Fernández-Vivas et al., 1983 a). También se ha conseguido inducir la lisis mediante el tratamiento con determinados antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas y ARN y con agentes desacopladores, resultados que apuntan en el sentido de que la estabilidad celular está condicionada por una o varias proteínas, y que la autólisis está estrechamente relacionada con el estado energético de la membrana (Fernández-Vivas, 1983; Fernández-

Vivas et al., 1985). Ya que los factores nutricionales, y especialmente el fosfato inorgánico, están relacionados de alguna manera con el fenómeno autolítico, Fernández-Vivas et al. (1983 b) estudiaron si la acumulación de nucleótidos hiperfosforilados desempeñaba algún papel en el proceso; sin embargo, aunque se pudo detectar ppGpp, no se encontró relación entre dicho compuesto y la autólisis.

La autólisis vegetativa no está restringida a las mixobacterias, sino que es un fenómeno relativamente frecuente entre las bacterias.

En el proceso autolítico juegan un papel muy importante unos enzimas capaces de digerir la pared celular, denominados autolisinas o mureinasas. Tanto es así que Stolp y Starr (1965) definieron la autólisis como un proceso lítico causado por las propias mureinasas intracelulares. La actividad enzimática de las autolisinas es muy variada, siendo cinco las actividades mejor conocidas: D-alanina carboxipeptidasa, endopeptidasa, N-acetilmuramidasa, N-acetilglucosaminidasa y N-acetilmuramil-L-alanina amidasa. Todas ellas actúan sobre el mucopéptido, hidrolizándolo, aunque cada una corta un enlace diferente.

Las autolisinas no son enzimas que se encuentran solamente en las bacterias que tienen comportamiento autolítico, sino que se hallan en todas las bacterias, ya que ejercen funciones de gran importancia. Así, por ejemplo, juegan un papel muy importante en la elongación y la división celular (Schwarz et al., 1969). Durante la elongación, al ser el mucopéptido una estructura rígida, es necesario que se produzca previamente la hidrólisis del polímero en aquellos puntos donde se van a incorporar las nuevas subunidades. En el momen-

to de la división celular, al formarse el septo, la actividad autolítica se incrementa ya que se requiere que el "saco" que constituye el mucopéptido sea hidrolizado en la región ecuatorial y se origine una nueva onda de incorporación de subunidades de N-AcMur-(pentapéptido)-N-AcGln en sentido transversal. Esto ha sido estudiado en cultivos sincrónicos de Streptococcus faecium (Hinks et al., 1978 a y b) y de E. coli (Beck y Parck, 1976; Hakenbeck y Hesser, 1977).

Las autolisinas están también relacionadas con la movilidad ya que juegan un papel importante en la penetración del orgánulo basal del flagelo a través de la pared celular. Fein y Rogers (1976) encontraron que mutantes de B. subtilis deficientes en las actividades N-acetilglucosaminidasa y N-acetilmuramil-L-alanina amidasa eran inmóviles, por no tener flagelos, aunque sí sintetizaban flagelina.

Los enzimas autolíticos están también relacionados con el mecanismo de acción de los antibióticos que actúan sobre la pared celular, sobre todo en el caso de los antibióticos con acción bactericida, tales como la penicilina. Se ha visto que mutantes de E. coli deficientes en enzimas autolíticos son resistentes a la acción de dichos antibióticos (Fosberg y Rogers, 1971; Tomasz et al., 1970).

En todos estos procesos existe un equilibrio entre actividad autolítica e incorporación de nuevas subunidades, o bien un control muy acusado de las autolisinas, de manera que sólo pueden actuar en puntos muy concretos.

El mecanismo de regulación de las autolisinas está aún bastante oscuro, aunque en algunas bacterias se han encontrado algunas evidencias sobre cómo se lleva a cabo la regulación. En B. subtilis, Herbold y Glaser (1975 a y b) encontra-

ron una proteína modificada que estimula la actividad N-acetil-muramil-L-alanina amidasa cuando el enzima está unido a los ácidos teicoicos de la pared. Cleveland et al. (1975) observaron inhibición de varios enzimas autolíticos por ácidos lipoteicoicos. Joliffe et al. (1980) observaron que en B. subtilis las proteasas extracelulares actúan también como reguladoras. En las bacterias con comportamiento autolítico, este control se pierde bajo determinadas condiciones y los cultivos se autolisan. Aunque están bastante bien conocidas las condiciones que inducen la autólisis, aún quedan por conocer los pasos que tienen lugar desde que se inicia el proceso hasta que finaliza.

En algunas bacterias en las que se ha observado aclaramiento de los cultivos se han podido detectar partículas de fagos defectivos en los sobrenadantes lisados, siendo dichos fagos los responsables de la lisis (Lewin, 1963; Hodgson y Rao, 1981). En estos casos, si nos atenemos a la definición dada por Stolp y Starr, no podemos hablar de autólisis, ya que la lisis es provocada por los fagos defectivos y no por las propias autolisinas. Sin embargo, al ser la manifestación externa idéntica, a veces pueden confundirse ambos procesos.

BACTERIOFAGOS DEFECTIVOS

Los bacteriófagos defectivos fueron definidos en 1970 por Garro y Marmur como "partículas que contienen todos o algunos de los componentes normales de un fago, pero que no forman placas de lisis sobre ninguno de los huéspedes conocidos, incluso a altas multiplicidades de infección".

Los fagos defectivos, a pesar de estar ampliamente distribuidos, han sido poco estudiados debido a tres razones fundamentalmente: en la mayoría de los casos sólo pueden ser obtenidos en cantidades suficientes por inducción; el análisis genético es difícil; y el principal medio de detección es el microscopio electrónico. Por esto, en muchos casos, los estudios sobre fagos defectivos no han pasado de meras descripciones al microscopio electrónico.

Algunos fagos defectivos son capaces de matar a otras bacterias, siendo la bacteria productora inmune a dicha acción bactericida. Por esta razón, algunos fagos defectivos han sido incluidos durante algún tiempo dentro de las bacteriocinas, bajo la denominación de bacteriocinas de alto peso molecular (Bradley, 1967). Sin embargo, por su complejidad estructural y sus propiedades fisiológicas ocupan una posición intermedia entre fagos moderados y bacteriocinas, estando en la mayoría de los casos más cercanos de los primeros que de las segundas, ya que:

- 1.- Estructuralmente son similares a fagos completos o a partes de fagos.
- 2.- Los acontecimientos líticos que tienen lugar después de la inducción o los que ocurren cuando las células sensibles son expuestas a los fagos defectivos son similares a los de los fagos y no a los de las bacteriocinas.
- 3.- Se adsorben sobre la pared celular, igual que los fagos, y no sobre la membrana como las bacteriocinas.
- 4.- Sus determinantes genéticos están integrados en el cromosoma, al igual que los de los fagos moderados, y no en plásmidos como los de las bacteriocinas.

Bajo el nombre de bacteriófagos defectivos, debido a su definición, se incluyen partículas de morfología, composición y propiedades muy diferentes. Por esto y para facilitar su estudio, Garro y Marmur (1970) dividieron los bacteriófagos defectivos en tres grupos atendiendo a que contengan o no ADN y a la procedencia de dicho ADN. Estos tres grupos son:

- 1.- Partículas de fagos defectivos que contienen ADN específico de la bacteria hospedadora.
- 2.- Partículas de fagos defectivos que contienen ADN específico del fago.
- 3.- Partículas similares a colas de fago.

Existen fagos defectivos que no pueden ser incluidos en ninguno de estos tres grupos por carecerse de los datos necesarios a cerca de ellos. Es el caso de los fagos defectivos de Haemophilus y las micobacterias obtenidos tras la inducción con luz ultravioleta los primeros (Stachura et al., 1969) y bacitracina los segundos (Kieber y Imeda, 1969); y el de los fagos defectivos CG1, CG2 y CGK1 de Corynebacterium glutamicum (Pafek et al., 1985).

Partículas de fagos defectivos que contienen ADN específico de la bacteria hospedadora

A este grupo pertenecen los fagos PBSH, PBSX, PBSY, PBSZ y PBLB de diferentes especies del género Bacillus (Seaman et al., 1964; Haas y Yoshikawa, 1969; Huang y Marmur, 1970; Steensma et al., 1978). Estos fagos se diferencian entre sí en la longitud y el número de estrías de la cola. De todos ellos, el más extensamente estudiado ha sido el fago PBSX.

Este fago posee una cabeza hexagonal y una cola contráctil de gran longitud. Su ADN tiene un peso molecular de 8.35×10^6 daltons, el cual, mediante experiencias de hibridación se ha podido comprobar que es ADN bacteriano (Okamoto et al., 1968a).

Cuando se estudió la proporción de ADN bacteriano que es incorporado en las partículas de fago defectivo después de inducir las células con mitomicina C (Okamoto et al., 1968 b), se encontró que cuando la síntesis de ADN no estaba inhibida, entre un 30-40% del genomio bacteriano previamente marcado era convertido en ADN del fago, mientras que cuando se inhibía la síntesis de ADN la incorporación era del 50-70%. Esta proporción es muy elevada si se compara con otros fagos no defectivos como el P1, en cuyo caso sólo se incorpora una pequeña proporción del ADN bacteriano. Esta proporción tan elevada en el caso del fago PBSX es en parte debida a la manera en que el ADN de la bacteria es convertido en ADN fágico.

La conversión del ADN no se realiza por una serie de cortes al azar en el ADN de la bacteria, lo que conduciría a la aparición de fragmentos de ADN de tamaños muy diversos, entre los que se seleccionarían aquellos cuyo tamaño fuera el apropiado para ser empaquetado en la cabeza del fago, sino que el ADN es cortado en trozos de tamaño homogéneo, con un coeficiente de sedimentación de 22 S, que es el correspondiente al coeficiente del ADN del fago, sin que aparezcan trozos de mayor ni de menor tamaño (Okamoto et al., 1968 b).

Sobre el bacteriófago defectivo PBSX se han realizado gran cantidad de estudios bioquímicos y genéticos (Garro et al., 1976). Dichos estudios han permitido conocer las proteínas que constituyen el fago, su localización concreta en

la partícula y el modo en que son sintetizadas durante la inducción (Thurm y Garro, 1975 a); incluso se ha estudiado la estructura cuaternaria de la vaina (Cremers et al., 1978). Además, el aislamiento de mutantes ha permitido conocer la situación del profago defectivo en el cromosoma bacteriano (Garro et al., 1970; Thurm y Garro, 1975 b).

Muchos de los fagos defectivos de este grupo, aunque no poseen el ciclo de vida de un fago normal, tienen capacidad para matar algunas bacterias. Actualmente se conoce el mecanismo por el que matan algunos fagos defectivos, tales como el PBSZ (Steensma, 1981 a), el PBSH (Yamakawa et al., 1980) y el PBSX. La acción bactericida de este último fago no está relacionada con el ADN que contiene, ya que no es inyectado en la bacteria sensible (Okamoto et al., 1968 a). Steensma (1981 b) encontró que una sola partícula del fago PBSX adsorbida sobre una célula sensible era suficiente para provocar la lisis de la misma. Esto junto con estudios realizados sobre la membrana celular de la bacteria afectada, excluía que la lisis fuera provocada desde fuera por acción de la cola de fago sobre la membrana. Al investigar la causa de la acción matadora de las partículas se encontró que en dicha acción estaba implicada una de las proteínas estructurales del fago. Esta proteína ejercería su acción, bien de manera directa, penetrando en el citoplasma y actuando sobre algunos componentes citoplasmáticos, o bien de manera indirecta, mediante la transmisión de una señal, igual que las hormonas. De cualquier manera, provoca una inhibición prácticamente total de la síntesis de proteínas, ARN y ADN, cinco minutos después de la adsorción.

Steensma et al. (1978), al inducir con mitomicina C 72 razas de 24 especies del género Bacillus encontraron que

muchas de ellas producían fagos defectivos. Esto les llevó a proponer la presencia o ausencia de un determinado fago defectivo como valor taxonómico.

Partículas de fagos defectivos que contienen ADN específico del fago

Los fagos defectivos de los que se dispone de datos suficientes para incluirlos en este grupo son sólo tres: el fago PBLA de Bacillus licheniformis (Huang y Marmur, 1970) y los fagos Ø15A y Ø15B de E. coli 15 (Lee et al., 1970; Ikeda et al., 1970), si se exceptúan aquellos fagos defectivos obtenidos por mutación de fagos no defectivos, tales como λ , P2 y Mu de E. coli, P22 de Salmonella y Ø105 y SP02 de Bacillus (Campbell, 1977). Además de los tres fagos defectivos naturales mencionados, parece ser que la colicina H puede ser incluida en este grupo (Bradley y Dewar, 1966) y que un plásmido de E. coli 15, denominado P15B reúne todas las características necesarias para ser considerado como un fago defectivo (Ikeda et al., 1970). Este plásmido presenta una gran homología con el ADN del fago P1 (el 90% de homología) y no ha sido obtenido artificialmente ni es infeccioso. El profago defectivo o plásmido P15B se diferencia del resto de los fagos defectivos en que es extracromosómico y no produce ninguno de los componentes estructurales de la partícula fágica.

Los fagos defectivos Ø15A y Ø15B se diferencian entre sí en que el primero posee una cola contráctil, mientras que el segundo presenta una cola muy corta no contráctil. La cola es tan corta que, como ambos fagos son producidos por la misma raza de E. coli, en un principio se pensó que las

partículas del fago Ø15B eran las cabezas sin cola del fago Ø15A.

Los fagos de este grupo se diferencian de los del grupo anterior no sólo en la naturaleza de su ADN, sino también en otras propiedades, como la morfología. Los fagos que contienen ADN específico del fago presentan una cabeza de mayor tamaño que los que empaquetan ADN bacteriano. Esta diferencia es especialmente notable cuando se comparan los fagos PBLA y PBLB, ambos producidos por B. licheniformis, pero pertenecientes a grupos diferentes. También se diferencian en que los fagos de este grupo requieren que haya síntesis de ADN durante la inducción para que aparezcan nuevas partículas de fago, mientras que los del grupo anterior producen nuevas partículas después de la inducción aunque la síntesis de ADN esté inhibida (Huang y Marmur, 1970; Menningmann, 1964).

Algunos de los fagos que empaquetan ADN fágico tienen capacidad para matar a otras bacterias. Así, por ejemplo, el fago PBLA puede matar a varias razas del género Bacillus. Su espectro antibacteriano es idéntico al del fago PBLB (Huang y Marmur, 1970). Por lo que respecta a los fagos Ø15A y Ø15B, el primero tiene actividad antibacteriana, por lo que durante algún tiempo se le incluyó dentro de las colicinas, bajo el nombre de colicina 15 (Sandoval et al., 1965), mientras que el segundo no tiene actividad biológica.

Ya que estas partículas de fago defectivo contienen ADN específico del fago, es necesario que durante la inducción el ADN fágico se escinda del ADN bacteriano para poder replicarse (Campbell, 1969). Por esta razón, sería posible obtener una raza curada si tuviese lugar una segregación unilateral en la siguiente división celular, después de la exci-

sión. Ishibashi y Hirota (1965) aislaron una raza de E. coli, denominada E. coli 15T⁻ que no producía partículas del fago Ø15A sometiendo la raza original a pases repetidos de "hambre de timina". Esto hizo pensar que se había conseguido una raza curada. Sin embargo, posteriormente, Yudelevich y Gold (1969) encontraron que E. coli 15T⁻ no producía ADN metilasa, un enzima necesario para la inducción del fago, por lo que hoy se cree que E. coli 15T⁻ no es realmente una raza curada del profago defectivo, sino que contiene un mutante no inducible de dicho profago. De cualquier manera, es el único caso en que se ha conseguido obtener una raza no productora del fago defectivo que contenía. En el caso de los fagos que contienen ADN bacteriano y de las partículas similares a colas de fago, todos los intentos realizados para obtener una raza curada han sido infructuosos. Lo máximo que se ha podido conseguir para estos grupos ha sido una raza de B. subtilis productora de fago PBSX sensible a dicho fago (Seaman et al., 1964),

Partículas similares a colas de fago

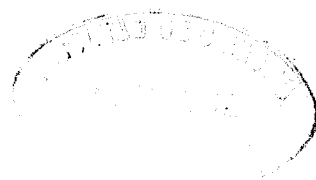
El tercer grupo de fagos defectivos engloba aquellos que presentan sólo la cola del fago. Debido a la ausencia de cabeza no poseen ADN, por lo que el término defectivo cobra aquí todo su significado. Este tipo de fagos defectivos es el que se observa con más frecuencia en los sobrenadantes de cultivos bacterianos inducidos con agentes físicos o químicos.

La morfología de las colas de fago observadas es muy diferente de unas razas bacterianas a otras. Por esta razón, Lotz (1976) dividió este grupo en tres subgrupos:

- 1.- Partículas similares a colas de fago con vaina.
- 2.- Partículas similares a tubos largos.
- 3.- Partículas similares a colas de fago sin vaina.

Fagos defectivos similares a colas de fago con vaina son producidos por Erwinia carotovora (Chapman et al., 1951), Clostridium botulinum (Iida y Inoue, 1968), E. coli (Bradley, 1967), Pseudomonas aeruginosa (Bradley y Dewar, 1966), Pseudomonas fluorescens (Amako et al., 1970), Bacillus brevis (Hodgson y Rao, 1981), Streptomyces coerulescens (Suenaga et al., 1983), Streptoverticillum albireticuli y Streptoverticillum netropsis (Ogata et al., 1983) y un largo, etc... Estas partículas constan de un tubo central rodeado por una vaina contráctil que termina en una placa con seis cortas fibras. El tamaño de las partículas de las diferentes especies varía de unas a otras; así, el diámetro del tubo oscila entre 6-10 nm, el diámetro de la vaina extendida entre 15-20 nm, la longitud de las fibras entre 20-40 nm y la longitud total de las partículas distendidas entre 100-250 nm. Dentro de este grupo, Lotz incluye también los rhabidosomas de Saprospira (Lewin, 1963) y la cianobacteria Spirulina (Chang y Allen, 1974); sin embargo, los rhabidosomas son estructuralmente diferentes del resto de las partículas del grupo, ya que no tienen placa basal y la vaina está siempre en estado contraído. Su tamaño es superior al del resto de las partículas envainadas; oscilando entre 350-450 nm.

Partículas similares a tubos largos son producidas por gran cantidad de especies: Proteus mirabilis y Proteus vulgaris (Yamamoto, 1967), Pseudomonas aeruginosa (Higerd et al., 1967), una raza de Rhizobium (Lotz y Mayer, 1972), Strep-



Staphylococcus faecalis (Bradley, 1967), etc... Los tubos largos pueden ser de dos tipos, con un diámetro similar al de las vainas contraídas, denominados polivainas, o con un diámetro externo similar al de los tubos, denominados politubos. Ambas estructuras tienen un diámetro constante, mientras que su longitud es muy variable. La mayoría de los estudios se han realizado sobre las polivainas, conociéndose poco sobre los politubos. Las polivainas parece ser que se originan por el autoensamblaje ilimitado de subunidades de la vaina o por la unión por los extremos de vainas sencillas, ya que a veces se observan también al final de un proceso de purificación de partículas del grupo anterior, tales como las piocinas R (Higerd et al., 1969). Además, Amako et al. (1970) encontraron que las polivainas de Ps. aeruginosa y las piocinas R eran inmunológicamente iguales.

Entre las especies bacterianas que producen colas de fago sin vaina están Pseudomonas aeruginosa (Takeya et al., 1969), Pseudomonas fluorescens (Yamamoto, 1967), Streptococcus faecalis (Bradley, 1967), etc... Estas estructuras son menos frecuentes que las dos anteriores. Son similares a la cola del fago λ , ya que son flexibles y terminan en una fibra fina. Muchas de ellas tienen un extremo afilado y el otro cuadrado. Sus dimensiones son similares a las de las partículas envainadas.

La composición química de las partículas similares a colas de fago, independientemente del grupo a que pertenecan, es a base, exclusivamente, de proteínas y, en algunos casos, carbohidratos. Así, por ejemplo, la boticina P, una partícula parecida a cola de fago con vaina producida por

Clostridium botulinum, contiene un 98.8% de proteínas y un 0.4% de carbohidratos (Lau et al., 1974). Estos fagos defectivos no contienen ADN ni ARN.

Las vainas de las colas de fago, al ser fácilmente separadas del resto de los componentes de la cola por tratamiento con NaOH 0.1 N, han sido muy extensamente estudiadas. Actualmente se conoce la composición de aminoácidos de las vainas de muchas colas, se conocen también las proteínas que las constituyen, sus pesos moleculares y el número de subunidades de cada proteína por vaina.

En el caso de las bacterias productoras de partículas similares a colas de fago, y al igual que en el de las bacterias productoras de partículas de fagos defectivos que contienen ADN bacteriano, no se ha conseguido obtener una raza curada, a pesar de que lo han intentado muchos investigadores y han sido muchos los agentes y las razas utilizados (Lotz, 1976). Esta resistencia puede ser fácilmente explicada si se asume que el determinante genético que codifica las partículas está localizado en el cromosoma bacteriano. Esto ha sido verificado en el caso de la piocina R2, como ejemplo de partícula similar a una cola de fago (Kageyama, 1970 a y b), mediante estudios de conjugación y transducción.

La producción de partículas similares a colas de fago puede ser inducida mediante tratamiento con mitomicina C y luz ultravioleta. Además de estos dos agentes clásicos, se ha conseguido inducción con otros agentes físicos y químicos, tales como la fleomicina, el ácido nalidíxico, la acriflavina, e incluso se han podido aislar mutantes de Ps. aeruginosa inducibles por la temperatura (Liu et al., 1969). Algunas

razas productoras de colas de fago se inducen espontaneamente. La inducción ocurre cuando los cultivos alcanzan la fase estacionaria temprana (Lewin, 1963; Rucinsky et al., 1972; Rucinsky y Cota-Robles, 1973). En el caso de las piocinas R se conocen los eventos que tienen lugar tras la inducción con mitomicina C. En primer lugar, la síntesis de ADN es fuertemente inhibida, mientras que la de ARN sólo es afectada ligeramente (Liu et al., 1969). A los 10-15 min de la adición de la mitomicina empiezan a sintetizarse proteínas de manera exponencial hasta los 45-50 min. La actividad matadora se empieza a detectar a los 20-30 min., y va aumentando, también exponencialmente, hasta los 55-60 min. (Shinomiya, 1972). El tiempo transcurrido desde que se inicia la síntesis de proteínas hasta que empieza a detectarse actividad es el necesario para que las diferentes proteínas estructurales se ensamblen y aparezcan las partículas de piocina maduras. En la maduración parece ser que juega un papel importante, al menos en Chromobacterium violaceum, la membrana celular, ya que Rucinsky et al. (1972, 1973), estudiando la organización de las colas de fago dentro de las células después de la inducción, encontraron que se asociaban formando agregados, los cuales estaban en íntimo contacto con la membrana citoplásmica.

Gran parte de las partículas similares a colas de fago tienen actividad bactericida. Por esta razón, Bradley (1967) las incluyó dentro del grupo de las bacteriocinas bajo la denominación de bacteriocinas de alto peso molecular. Sin embargo, en 1972 Reeves excluyó del grupo de las bacteriocinas a aquellos agentes antibacterianos que se asemejaban a fagos o a parte de fagos, quedando el término de bacteriocina relegado a las bacteriocinas de bajo peso molecular. No obstante,

algunas partículas siguen denominándose aún con el nombre que se les dio originalmente: piocinas R, boticinas, vibriocinas, etc... La separación de las colas de fago de las bacteriocinas está basada en las diferencias existentes entre ambas, que fueron enumeradas anteriormente.

Para que las partículas parecidas a colas de fago puedan ejercer su acción, en primer lugar tienen que adsorberse sobre la bacteria sensible. Al estudiar donde se situaban los receptores sobre los que se adsorben se encontró que estaban localizados en la pared celular y no en la membrana citoplasmática, ya que los esferoplastos de las razas sensibles a las picinas R eran resistentes a la acción bactericida de estas partículas. Estudios realizados sobre los componentes de la pared que actúan como receptores revelaron que, al menos en el caso de Ps. aeruginosa y Proteus vulgaris, es el lipopolisacárido (Ikeda y Egami, 1969; Ikeda y Nishi, 1973; Smit et al., 1969).

Las razas productoras de colas de fago son resistentes a las partículas que producen. Las razones por las que esto es así no son muy bien conocidas. Garro y Marmur (1970) propusieron dos mecanismos de resistencia, ambos basados en la incapacidad de las partículas para adsorberse sobre las células que las producen. Estos dos mecanismos son los siguientes:

- 1.- La raza productora carece de los receptores específicos.
- 2.- El profago defectivo codifica un componente de la pared celular que previene la unión de las partículas.

Las colas de fago no se unen a los receptores de la pared al azar, sino que lo hacen con una orientación deter-

minada, por la zona de la placa basal, y más concretamente, por las fibras. Una vez adsorbidas se contraen. Para que las partículas sean activas es necesario que se encuentren en estado distendido, ya que si no, no pueden adsorberse. Todos aquellos factores, tales como la congelación, las altas concentraciones salinas, etc..., que contraen la vaina inactivan las partículas (Ikeda y Nishi, 1973; Kageyame et al., 1964; Higerd et al., 1969). Por esta razón se cree que los rhapidosomas de Saprospira grandis no tienen actividad biológica (Delk y Dekker, 1972). En el caso de las partículas sin vaina que tienen actividad biológica se ha observado que la adsorción de las partículas sobre las células sensibles se da siempre por el extremo afilado. En este caso, lógicamente, no se requiere contracción, ya que no tienen vaina (Takeya et al., 1969). El mecanismo de acción de estas partículas ha sido menos estudiado que el de las partículas con vaina.

Después de la adsorción se produce la inactivación de la bacteria. Todo el proceso de inactivación ha sido estudiado en el caso de las piocinas R, fundamentalmente, por lo que nos vamos a referir sólo a ellas. La inactivación es provocada como consecuencia de la inhibición de la síntesis de proteínas, ARN y ADN. El metabolismo energético, por el contrario, no es afectado. La inhibición de la síntesis de ADN no va acompañada de la degradación del ADN, previamente sintetizado, en fragmentos solubles (Kaziro y Tanaka, 1965). También se producen una serie de agujeros en la membrana citoplasmática, lo que provoca una salida del citoplasma al exterior. No está claro si estos agujeros son originados por las propias

partículas o por los enzimas líticos que son sintetizados junto con las partículas durante la inducción.

El mecanismo por el que se producen tales efectos no es conocido. Quizá sea semejante al descrito por Steensma para el fago defectivo PBSX.

Origen y función de los bacteriófagos defectivos

En relación con el origen de los fagos defectivos, varios autores han propuesto que proceden de fagos intactos, por mutación o delección espontánea producida en el profago y que afecta a los genes esenciales para su viabilidad (Bradley, 1967; Garro y Marmur, 1970; Lotz, 1976). El profago defectivo se mantendría en la naturaleza al replicarse como una parte del cromosoma de la bacteria hospedadora.

La aparición de partículas defectivas en lisados de fagos infectivos es bastante frecuente. Así, por ejemplo, en el caso de los fagos P1 (Walker y Anderson, 1970) T4 (Mosisig, 1968) y λ (Campbell, 1969) aparecen partículas que son deficientes en el contenido de ADN. No todas las partículas deficientes en ADN son defectivas. En el fago λ se ha observado que es necesario que se pierda un 17% del ADN del fago para que las partículas sean defectivas. Un mecanismo de este tipo es suficiente para explicar la aparición de fagos defectivos que contienen ADN específico del fago. Sin embargo, la aparición de partículas similares al fago PBSX requiere que la delección sea tan grande que queden casi únicamente los genes responsables de la síntesis de la cabeza, la cola y los que codifican y responden al represor; se requiere también que el mecanismo de excisión del profago se hubiese perdido

o esté dañado o que los genes estén repartidos por todo el cromosoma bacteriano. Esto aseguraría que no apareciera ninguna réplica del ADN del fago para ser empaquetada en la cabeza de las partículas durante la inducción. Para las partículas similares a colas de fago la pérdida de información genética debe ser mucho más grande (Bradley, 1967; Garro y Marmur, 1970; Lotz, 1976).

Estos autores propusieron también que los fagos defectivos podían haber aparecido por la adición progresiva de material genético de fagos. Sin embargo, es más difícil de explicar cómo pudo haber ocurrido el mecanismo de adquisición de material genético.

Ya que la producción de fagos defectivos está tan extendida en la naturaleza y que las razas lisogénicas defectivas no pueden ser curadas del profago que contienen, es lógico pensar que este profago aporte alguna ventaja a la raza portadora. Varios autores han encontrado evidencias que apoyan esta teoría y han otorgado varias funciones a los fagos defectivos. Goldberg y Bryan (1968) encontraron que las razas lisogénicas para el fago PBSX eran resistentes a la infección por algunos fagos virulentos, como el SP10, mientras que si estas razas se exponían a condiciones que inactivaban el represor el profago se volvían sensibles. El fago PBSX está también implicado en el control de la iniciación de la replicación del ADN de Bacillus subtilis (Yoshikawa y Haas, 1968).

En las razas productoras de partículas con actividad bactericida, el estado lisogénico les confiere una ventaja selectiva frente a las razas sensibles para competir en un habitat natural (Reeves, 1972).

Algunos autores (Burchard, 1981), debido a la alta incidencia de fagos defectivos similares a colas de fago en las bacterias deslizantes, han discutido sobre la posibilidad de que estas partículas tengan algún papel en el deslizamiento; sin embargo, es difícil imaginar el tipo de relación que pueda existir entre partículas y movimiento.

No obstante, existen muchos casos de bacterias productoras de fagos defectivos en las que no se ha encontrado que este estado les proporcione ventaja alguna, e incluso se han descrito casos en los que el profago tiene un efecto nocivo sobre la bacteria hospedadora. Lewin (1963) encontró que los cultivos de Saprospira grandis se autolisaban al final de la fase exponencial debido a la inducción espontánea de los rhapsosomas. Otro ejemplo es el de las partículas similares a colas de fago envainadas de Bacillus brevis (Hodgson y Rao, 1981) que no ofrecen ninguna ventaja selectiva a la bacteria sino que la lisan cuando se inducen espontáneamente.

FAGOS Y FAGOS DEFECTIVOS DE MIXOBACTERIAS

Actualmente se conoce que una amplia variedad de mixobacterias producen fagos defectivos de muy diversa morfología.

Los estudios sobre fagos defectivos de mixobacterias se remontan a 1965, cuando Reichenbach halló que Archangium violaceum producía estructuras parecidas a las encontradas por Lewin en Saprospira. Por esta razón él las llamó rhapsosomas; sin embargo, esas estructuras no entran en el

concepto actual de rhabidosomas. Los fagos defectivos de Archangium violaceum son de dos tipos, unos parecidos a colas de fago con vaina y otros similares a polivainas. Ninguna de las dos partículas tenía actividad biológica.

Posteriormente, McCurdy y MacRae (1974) observaron que M. xanthus Fb producía una amplia variedad de partículas semejantes a bacteriófagos o partes de bacteriófagos. Encontraron colas de fago con vaina contraídas, colas de fago con la vaina sin contraer, polivainas e incluso fagos con cabeza y una cola corta (similares a los fagos conocidos como Mx-8 y Mx-9). Sin embargo, los estudios sobre esta amplia diversidad de partículas no pasaron de la mera descripción, ya que los sobrenadantes en los que aparecían tenían actividad biológica y dicha actividad no era debida a ninguno de los fagos defectivos detectados, sino a una bacteriocina particulada, denominada xantacina, parecida a vesículas membranosas de tamaño variable, que era producida junto con los fagos defectivos. Esto hizo que los estudios se desviaran hacia la xantacina y que las partículas de fago quedaran relagadas a un segundo plano.

Unos años más tarde, Brown et al. (1976 a), buscando fagos transductantes para varias razas de M. xanthus, M. fulvus y M. virescens encontraron que todas estas razas producían partículas similares a colas de fago, siendo M. virescens V2 la raza que más variedad de partículas producía y en mayor proporción. Las partículas observadas eran similares al fago Mx-1 o a su cola, excepto una producida por M. virescens V2, que si bien constaba de cabeza y cola, ésta era de mayor longitud que la del fago Mx-1. Algunas de estas partículas de fagos defectivos eran capaces de inhibir el crecimiento de especies muy diferentes entre sí, tales como Salmonella typhimurium,

Cytophaga johnsonae y Pseudomonas fluorescens. En este caso tampoco se hizo un estudio más profundo sobre esos fagos defectivos.

A pesar de los pocos conocimientos sobre los fagos defectivos de mixobacterias, los datos existentes han aportado algunas pruebas sobre el origen de los fagos defectivos en general, ya que Brown et al. (1976 a) consiguieron obtener un fago activo, denominado ϕV , serologicamente relacionado con el Mx-1, a partir de un fago defectivo, irradiando la raza portadora del profago (M. virescens V2) durante nueve veces consecutivas con luz ultravioleta. Esto apoya la teoría de Bradley, Garro y Marmur, y Lotz de que los fagos defectivos se han originado a partir de fagos infectivos por mutación o delección. En este caso se ha conseguido obtener la reversión de un fago defectivo presente en la naturaleza al fago original.

En relación con los fagos infectivos, el primero descrito para una mixobacteria fue aislado en 1955 por Anacker y Ordal, utilizando Chondrococcus columnaris como bacteria hospedadora. Sin embargo, debido a que en los últimos años los estudios realizados sobre mixobacterias se han centrado en M. xanthus, este fago ha sido relegado a un nivel meramente histórico.

Los fagos que han sido aislados utilizando M. xanthus como bacteria hospedadora han sido catalogados en cuatro grupos, atendiendo a características morfológicas y serológicas. Estos 4 grupos son: Mx-1, Mx-4, Mx-8 y Mx-9 (Martin et al., 1978). Los nombres aluden a la denominación que se le dio al primer fago conocido de cada uno de los grupos. La ma-

yoría de estos fagos son capaces de infectar otras mixobacterias además de M. xanthus, e incluso se ha conseguido aislar fagos de la naturaleza relacionados con los de M. xanthus, utilizando otras mixobacterias como indicadoras. Así los fagos de los grupos Mx-1, Mx-4 y Mx-8 son activos también frente a M. virescens y M. fulvus (Tsopanakis y Parish, 1976; Brown et al., 1976 a; Rodrigues et al., 1980). En el caso del fago Mx-9, único en su grupo, no se ha descrito que infecte otras mixobacterias diferentes de M. xanthus, aunque es posible que también lo haga.

El fago Mx-1 ha sido estudiado con bastante detalle, quizá por haber sido el primer fago aislado para M. xanthus (Burchard y Dworkin, 1966 b). Este fago posee una cabeza poliédrica de 75 nm de diámetro y una cola contráctil de 100 nm de longitud, terminada en una placa basal. El fago consta de 23 proteínas estructurales, de las cuales dos son de naturaleza glucooprotéica. Doce de las veintitrés proteínas forman la cabeza y el resto están en la cola (Tsopanakis y Parish, 1976). El fago contiene ADN de cadena doble, de peso molecular $149 (\pm 22) \times 10^6$ daltons y un contenido en G+C de 50-52 moles por ciento. Se ha hecho también un análisis de restricción del ADN con las endonucleasas R.EcoRI, R.EcoRII, HindIII (Brown et al., 1976 b), R.MviV2I y R.MviV2II (Morris y Parish, 1976). Estas dos últimas fueron aisladas a partir de extractos de M. virescens. El fago Mx-1 es virulento y sólo infecta las células vegetativas, ya que no se adsorbe sobre las mixósporas; sin embargo, si se adiciona a cultivos con glicerol antes de que se enmascaren los receptores, se originan mixósporas que contienen el ADN fágico dentro (Burchard y Dworkin, 1966 b), ya que el ADN inyectado es reprimido y mantenido como tal mientras las células se encuentran en estado de mixóspo-

ras. Durante la germinación, bajo determinadas condiciones, el ADN fágico se expresa, se originan nuevas partículas fágicas y las células se lisan, liberando el mismo número de fagos por célula que las células vegetativas (Burchard y Voelz, 1972). La infección de las células vegetativas por el fago Mx-1 lleva consigo una serie de cambios morfológicos: el material nuclear cambia de forma, aparecen en los polos agregados de componentes citoplasmáticos y las células se van acortando hasta llegar a ser esféricas (Voelz y Burchard, 1971).

El fago Mx-4 fue aislado por Campos et al. en 1978. Posteriormente se han podido encontrar otros fagos similares al Mx-4 (Martin et al., 1978; Rodrigues et al., 1980). Los fagos de este grupo, y más concretamente el Mx-4, constan de una cabeza de 66 nm de diámetro y una cola de 100 nm de longitud, más delgada que la del fago Mx-1. Contienen ADN de peso molecular $39 (\pm 2.1) \times 10^6$ daltons, varias veces más pequeño que el del fago Mx-1, y un contenido en G+C de 70 moles por ciento (Geisselsoder et al., 1978). Quizá la característica más sobresaliente de los fagos de este grupo es que son transductantes generalizados, lo que permite utilizarlos como herramientas para el estudio de la genética de las mixobacterias. Sin embargo, los primeros fagos aislados de este grupo (Mx-4, Mx-41 y Mx-43), únicamente pueden ser utilizados en estudios sobre el ciclo vegetativo, ya que sólo infectan mutantes no fructificantes de M. xanthus (Campos et al., 1978; Martin et al., 1978). Sobre las razas salvajes, aunque sí se adsorben, no forman placas de lisis. Este problema está actualmente solucionado, ya que se han obtenido mutantes del fago Mx-4 capaces de infectar razas de M. xanthus con capacidad de fructificación (Wolfner, datos no publicados mencionados en el trabajo de Campos et al., 1978) y se han aislado nuevos fagos de este

grupo activos sobre razas salvajes de M. xanthus, M. fulvus y M. virescens (Rodrigues et al., 1980). Aunque los fagos del grupo Mx-4 posiblemente sean moderados, solamente se ha descrito un caso de lisogenia, a pesar de la intensa búsqueda de este tipo de razas (Rodrigues et al., 1980).

En 1978 Martin et al. encontraron 3 fagos de M. xanthus de morfología diferente a los fagos Mx-1 y Mx-4, ya que tenían una cabeza de 58 nm de diámetro y una cola muy corta, de tan solo 10 nm de longitud. Estos fagos se incluyeron en un nuevo grupo, denominado Mx-8. Dos años más tarde, Rodrigues et al aislaron fagos similares al Mx-8 capaces de infectar a razas de M. fulvus y M. virescens, además de M. xanthus. Los estudios realizados sobre el ADN del fago Mx-8 han revelado que su tamaño es de 51.7 ± 0.6 Kb, que posee un mapa de restricción circular, una redundancia terminal del 8% aproximadamente y un 40% de permutación circular (Stellwag et al., 1985). Los fagos de este grupo son también transductores generalizados. En el caso del fago Mx-8 se han hecho estudios que han revelado de manera clara y contundente que este fago es moderado y que puede iniciar un ciclo lisogénico en el que su ADN es integrado en el cromosoma bacteriano, dando lugar a un profago estable que se mantiene en estado latente durante muchas generaciones, incluso durante el ciclo de desarrollo (Orndorff et al., 1983).

En relación con el grupo Mx-9, sólo se conoce un fago perteneciente a él, aislado por Martin et al. (1978) a partir de razas de M. xanthus portadoras del profago. El fago Mx-9 es morfológicamente muy parecido a los fagos del grupo Mx-8, sin embargo, serológicamente es diferente, por lo que ha sido incluido en un grupo aparte. Se cree que este fago es transductante generalizado, aunque sólo se ha intentado

la transducción de un marcador. De todos los fagos de M. xanthus es el menos estudiado, no conociéndose ni siquiera si puede infectar otras mixobacterias diferentes de M. xanthus.

Además de todos los fagos mencionados anteriormente, específicos del género Myxococcus, se ha encontrado que el colifago P1 es capaz de adsorberse y lisar o inhibir el crecimiento de M. xanthus (Kaiser y Dworkin, 1975), ya que el lipopolisacárido que actúa como receptor de este fago en E. coli es muy similar al de las mixobacterias (Rosenfelder et al., 1974). Aunque el ADN del fago P1 es inyectado en la mixobacteria, no se replica, por lo que no se producen nuevas partículas fágicas ni se establece lisogenia. Estas condiciones facilitan el uso de transposones, ya que solamente es reproducida la secuencia de ADN del transposon (Kuner y Kaiser, 1981). Esta técnica está siendo muy utilizada en el estudio de la genética de las mixobacterias (Kaiser, 1984). El fago P1 ha sido utilizado también para transferir plásmidos de E. coli a M. xanthus (O'Connor y Zusman, 1983). Este fago, a diferencia de los específicos de mixobacterias, permite tanto una transducción generalizada, en el caso de los plásmidos de E. coli, como una transducción especializada, en el caso de los transposones, por lo que actualmente es una de las herramientas de trabajo más utilizada por los mixobacteriólogos.

OBJETO DEL TRABAJO

Desde hace más de cinco años se está estudiando en nuestro laboratorio el comportamiento autolítico que presenta Myxococcus coralloides D cuando es cultivada en medio líquido; sin embargo, aunque hoy se dispone de gran cantidad de datos sobre este proceso, aún queda oculto qué lo desencadena y cómo se produce.

En uno de los estudios realizados se llevó a cabo una observación al microscopio electrónico de los sobrenadantes líticos de esta mixobacteria y se encontraron gran cantidad de estructuras similares a colas de fago. Ya que muchas razas bacterianas productoras de bacteriófagos defectivos se autolisan cuando se induce espontáneamente el profago que contienen, era necesario dilucidar la relación existente entre la autólisis de M. coralloides D y las partículas similares a colas de fago que se observan en los sobrenadantes líticos.

Además de nuestro interés particular por las partículas fágicas en relación con la autólisis de M. coralloides D, estudiar estas colas de fago tenía el atractivo de conocer estas estructuras como tales y obtener algunos datos más acerca de la biología de la mixobacteria productora, ya que los fagos defectivos y las bacterias que los portan han dejado de ser a lo largo de la evolución dos entidades biológicas independientes.

Por otro lado, se intenta abordar en un futuro próximo la genética de M. coralloides D, para lo que se requieren una serie de herramientas de trabajo, entre las que se encuentran los fagos, como vehículos transportadores de material genético entre bacterias. Hasta el momento se desconocía

si alguno de los mixofagos era capaz de infectar a M. coralloi-
des D y no se había intentado el aislamiento de fagos especí-
ficos para esta mixobacteria, lo que hacía necesario abordar
el estudio de los fagos de M. coralloides D.

Todo esto llevó a plantear la realización de una Tesis Doctoral sobre los fagos y las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D; sin embargo, todos los intentos realizados para aislar fagos se vieron frustrados y hubo que desviar el esquema inicial de trabajo hacia la resistencia de M. coralloides D a la infección por fagos. Ya que esta resistencia podía ser debida al estado lisogénico de la mixobacteria o a la existencia de DNasas, el trabajo quedó orientado hacia las partículas fágicas defectivas, en relación con la autólisis y la resistencia a fagos, y las DNasas de M. coralloides D. A pesar de ello, hemos decidi-
do mantener el título "Estudios sobre fagos y partículas similares a colas de fago de Myxococcus coralloides D", ya que consideramos que los estudios realizados sobre DNasas desvelan la resistencia de M. coralloides D a la infección por fagos.

MATERIAL Y METODOS

1.- BACTERIAS Y FAGOS

Myxococcus coralloides D, la raza productora de partículas similares a colas de fago, capaz de crecer de manera dispersa en medio líquido, fue obtenida por Arias y Montoya (1978) sometiendo una raza de M. coralloides salvaje aislada por ellos a varios pases por medios líquidos apropiados.

Myxococcus virescens fue aislada por nosotros a partir de muestras de suelo de los alrededores de Granada. Esta bacteria ha sido utilizada para aislar fagos de la naturaleza y para el ensayo de actividad DNasa.

El resto de las bacterias, varias razas de M. coralloides, M. xanthus, M. virescens y M. fulvus, pertenecientes a la Colección Americana de Cultivos Tipo, a la Colección de Cultivos de Checoslovaquia, a la colección particular de H. Reichenbach (República Federal de Alemania), M. Dworkin (Minnesota, USA) y a la nuestra propia, fueron utilizadas en el ensayo de actividad biológica de las partículas similares a colas de fago.

Los fagos Mv1g1, Mv1g2, Mv8g1 y Mv8g2 fueron aislados en nuestro laboratorio a partir de muestras de suelo de los alrededores de Granada y Jaén, utilizando M. virescens como bacteria hospedadora.

Los fagos Mx1hrv y Mx8cp2 fueron cedidos por Francisco Murillo, de la Universidad de Murcia, y el fago Mx-4 por David R. Zusman, de la Universidad de Berkeley (California, USA).

2.- MEDIOS DE CULTIVO

2.1. Medios sólidos

Agar levadura

Este medio ha sido utilizado en la obtención de cuerpos fructificantes de M. coralloides D y para conservar las diferentes mixobacterias. La composición de este medio es la siguiente:

Levadura prensada de panaderia	10 g
Agar	20 g
Agua	1000 ml
pH	7.2

La levadura se añade después de filtrar el agar fundido, ajustando el pH con una solución de NaOH al 10%. Se esteriliza a 117°C, 20 minutos.

Medio CTA

Se utilizó en todos aquellos casos en que se quiso obtener crecimiento vegetativo de las mixobacterias en medio sólido. Su composición es:

Bacto-Casitone Difco	10 g
Sulfato magnésico	1 g
Agar	18 g
Tampón fosfato potásico 10 mM	1 l
pH	7.2



2.2. Medios líquidos

Medio CT 0.5%

Es el medio en que normalmente es mantenida M. coralloides D. Su composición es la siguiente:

Bacto-Casitone Difco	5 g
Sulfato magnésico	1 g
Tampon fosfato potásico 10 mM	1 l
pH	6.5

Medios CT 1% y CT 2%

Estos dos medios fueron utilizados en los estudios de producción de las partículas similares a colas de fago en medios autolíticos. La composición de ambos es idéntica a la del medio CT 0.5%, excepto en que el medio CT 1% contiene el Bacto-Casitone a una concentración del 1% y el medio CT 2% al 2%.

Medios CT sin fosfato y CTP

La composición de estos dos medios es idéntica a la del CT 0.5%, excepto en que el primero lleva agua destilada en lugar de tampón fosfato y el segundo lleva el tampón a una concentración de 40 mM. El medio CT sin fosfato fue utilizado en los estudios de producción de partículas similares a colas de fago en medios autolíticos y el medio CTP como medio no autolítico.

3. TECNICAS DE CULTIVO

3.1. Mantenimiento y conservación de M. coralloides D

El mantenimiento del crecimiento vegetativo se realizó por transferencias diarias en medio líquido CT 0.5% dada la capacidad de crecer en forma dispersa en medio líquido de esta mixobacteria.

Teniendo en cuenta la rápida autólisis que muestran los cultivos dispersos de M. coralloides D (Arias y Montoya, 1978), para asegurar su conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT adicionado de glicerol 0.5 M, el cual induce la formación de mixósporas.

3.2. Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo para mantener el crecimiento disperso de las células vegetativas en todas las experiencias realizadas fueron: agitación a 200 rpm, mantenida a lo largo de todo el tiempo de incubación en un agitador orbital Gallekamp, y temperatura de 28°C.

4. MEDIDAS DEL CRECIMIENTO BACTERIANO

4.1 Medidas turbidométricas

Se llevaron a cabo a intervalos regulares de tiempo, determinando valores de absorción a 650 nm en un Spectronic 20.

Para efectuar las medidas se emplearon matraces que poseen un tubo lateral para ser introducidos directamente en el espectrofotómetro. Se evita así el tener que transferir con pipeta el medio a los tubos específicos del espectrofotómetro, con el consiguiente peligro de contaminación y errores en las medidas. En aquellos casos en que se utilizaron volúmenes pequeños se utilizaron tubos esterilizables, especiales para el espectrofotómetro, en los que se realizaba la incubación.

5. MÉTODOS UTILIZADOS EN LA PURIFICACION DE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

5.1. Centrifugación diferencial

Con objeto de conocer las condiciones de centrifugación necesarias para sedimentar todas las colas de fago o para que todas quedaran en el sobrenadante se llevaron a cabo una serie de experiencias en las que unicamente se variaba el tiempo de centrifugación. Todas fueron realizadas utilizando

el rotor tipo 30 de Beckman a 54000 g y 4°C. Los tiempos de centrifugación fueron 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 10 y 12 horas. Después de cada experiencia se observaban al microscopio electrónico el sobrenadante y el sedimento recogidos.

Cuando se quería sedimentar las partículas similares a colas de fago, la muestra era colocada sobre 5 ml de sacarosa al 25%. Esta técnica proporcionaba dos ventajas: 1. La capa de sacarosa actuaba como una barrera para aquellas moléculas de densidad inferior a 1.1036 (correspondiente a la sacarosa al 25%), lo que impedía que el material sedimentado entrara en contacto con dichas moléculas y se obtuviera un sedimento más puro. 2.- La sacarosa facilitaba la resuspensión del sedimento. Esto evitaba que muchas partículas se deterioraran o se disociaran en sus proteínas estructurales.

5.2 Concentración por el sistema dextrano sulfato-polietilenglicol (DSNa-PEG)

El sistema DSNa-PEG es un método muy utilizado en la purificación de bacteriófagos y virus en general, ya que permite concentrar estas partículas 100 veces aproximadamente y separarlas de otros materiales.

Cuando se mezcla la solución que contiene las partículas que se quieren concentrar con polietilenglicol 6000 (Merck) y dextrano sulfato sódico (Sigma) en presencia de ClNa (Merck) aparecen tres fases, una superior que contiene el PEG y otra inferior, con el dextrano sulfato 500, separadas por una interfase. Las sustancias de la muestra se distribuyen entre estas tres fases dependiendo de la concentración de los polímeros, fundamentalmente de PEG, y de la concentración de

ClNa. De las tres fases, la interfase y la fase inferior son las que ocupan un menor volumen, por lo que, ya que se pretende concentrar, es necesario elegir las concentraciones de PEG y ClNa adecuadas para que las partículas que nos interesan aparezcan en alguna de estas dos fases.

Para escoger la concentración mínima de PEG 6000 necesaria para que las partículas similares a colas de fago aparecieran en una de las dos fases de menor volumen se prepararon una serie de tubos con sobrenadante lítico de M. coralloides D y se mezclaron con ClNa y DSNa 500, a concentración constante (0.3 M y 0.2%, respectivamente) y PEG 6000 a concentración variable (0, 2, 4, 6, 8, 10, 11 y 12%). Una vez mezclados se dejaron en reposo durante 15 minutos y se centrifugaron a bajas revoluciones para separar perfectamente las tres fases. A continuación se observó al microscopio electrónico la fase superior de cada uno de los tubos.

Con objeto de elegir la concentración mínima óptima de ClNa se realizó una experiencia similar a la anterior en la que se fijó la concentración de PEG 6000 en un 10% y la de DSNa 500 en un 0.2%. Las concentraciones de ClNa ensayadas fueron 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 M.

Una vez conocidas las concentraciones adecuadas de PEG y ClNa fue necesario averiguar en qué fase aparecían las colas de fago. Para ello, debido al pequeño volumen que ocupan la interfase y la fase inferior hubo que partir de un volumen grande. Se siguió un procedimiento similar al descrito por Albertsson (1967) para la purificación del fago T2. Se tomaron 5 l de cultivo lisado de M. coralloides D y se mezclaron con PEG 6000 al 10%, DSNa 500 al 0.2% y ClNa 0.3 M en un matraz aforado. Se dejó reposar durante 48 horas, tiempo necesario para que aparecieran las tres fases, y se extrajo la fase

superior succionando desde arriba. Ya que en la parte inferior del matraz aparece una mezcla de las tres fases, se recogió esa parte en un tubo y se centrifugó durante 15 minutos. Los restos de la fase superior y la fase inferior fueron recogidos con pipeta y la interfase fue resuspendida en 50 ml de DSNa 500 al 1% con sulfato magnésico 2 mM. El dextrano sulfato tenía como objeto facilitar la resuspensión, y el sulfato magnésico evitar la contracción de la vaina de las colas de fago.

Antes de observar las 3 fases al microscopio electrónico fue necesario eliminar el dextrano sulfato de la fase inferior y de la interfase. Para ello se adicionó 0.15 ml de CLK 3 M por cada ml de muestra, se dejó en reposo durante dos horas y se centrifugó.

5.3 Precipitación con sulfato amónico

Se realizó en la forma habitual, empleando sulfato amónico de Meck y operando a temperaturas comprendidas entre 0° y 4°C; entre la adición del sulfato y la recuperación del precipitado se dejaron transcurrir 24 horas. El tanto por ciento de saturación de sulfato amónico utilizado fue del 40%.

El precipitado se separó del sobrenadante por centrifugación a 12000 rpm durante 30 min en un rotor SS-34 de una centrifuga Sorvall y se resuspendió en tampón fosfato potásico 10 mM, pH 6.5 con sulfato magnésico 2 mM, concentrando 50 veces. Ambas fracciones fueron observadas al microscopio electrónico para conocer en cual se encontraban las partículas similares a colas de fago.

5.4 Diálisis

A lo largo de todo el proceso de purificación de las partículas similares a colas de fago ha sido necesario dializar las muestras para eliminar algunas sales o azúcares que estaban a alta concentración en las muestras y podían interferir de alguna manera en los siguientes pasos de purificación.

Los tubos de diálisis, de un tamaño de poro que permitía el paso de moléculas de peso molecular inferior a 12000 daltons, fueron previamente calentados a ebullición en el autoclave durante 10 minutos en 2 litros de tampón Tris-ClH 10 mM, pH 7.6 con EDTA 1 mM y bicarbonato sódico al 2%. A continuación se lavaron con abundante agua destilada y se volvieron a hervir otros 10 minutos en el autoclave, en 2 litros de agua destilada. Este tratamiento permitía abrir los poros de los tubos desecados, por lo que facilita el paso de moléculas a través de él. Los tubos fueron conservados sumergidos en agua destilada a 4°C hasta su uso.

La diálisis era realizada sumergiendo el tubo con la muestra en tampón fosfato potásico, pH 6.5, con sulfato magnésico 2 mM durante 24 o 48, según los casos, en agitación a 4°C. El volumen de tampón era siempre al menos 100 veces superior al de muestra. Cuando la diálisis era mantenida durante 48 horas, a las 24 horas era cambiado el tampón por otro nuevo para acelerar la salida de moléculas del tubo.

5.5 CROMATOGRAFIA EN SEPHAROSE 4B

La sefarosa 4B se suministra ya hinchada, en alcohol para evitar que se contamine, por lo que se puede proceder directamente al montaje de la columna, sin hervir previamente. Para eliminar las burbujas de aire que pudiera haber en la sefarosa y que podrían dar lugar a empaquetamiento y flujo desiguales, se conectó una bomba de vacío al matraz que contenía el gel y se mantuvo así hasta que dejaron de salir burbujas de aire.

• 5.5.1. Montaje y preparación de la columna

Se han empleado columnas de vidrio de Pharmacia Fine Chemicals de 50 x 2.5 cm, con un tubo de teflón en cada extremo que canaliza la entrada y salida de eluyente. La preparación de la columna, así como el proceso cromatográfico completo se llevaron a cabo en cámara fría a 4°C.

Una vez fijado el émbolo inferior de la columna se dispuso ésta verticalmente y se conectó su salida a una bomba peristáltica (Pharmacia Fine Chemicals) para mantener constante el flujo. Se adicionó por el extremo superior agua destilada previamente desgasada hasta llenar la tercera parte del volumen de la columna, procurando que no quede atrapada ninguna burbuja de aire en la placa porosa del émbolo. La columna se dejó drenar a un pequeño flujo (1 ml/5 min) y se fue añadiendo entonces la suspensión de sefarosa, continuándose la adición hasta conseguir la altura deseada. Es muy importante evitar la penetración o formación de burbujas de aire en el interior de la columna, así como procurar un empaquetamiento de la misma

totalmente homogéneo. Una vez alcanzada la altura deseada, se dejó una pequeña capa de agua destilada sobre la parte superior del gel, se cerró la salida inferior y se terminó el montaje introduciendo el émbolo superior hasta que la placa porosa del mismo contactase con la superficie de la sefarosa. Conectada a este émbolo hay una válvula de tres vías. Una vez comprobada la ausencia de burbujas a lo largo de los conductos de entrada se sumergió uno de los extremos en el reservorio de tampón utilizado como eluyente, mientras que el otro extremo, que también debe carecer de burbujas de aire, se empleó para introducir la muestra.

Para estabilizar la columna se hizo pasar, estando la válvula de tres vías en la posición correspondiente, 500 ml del tampón usado como eluyente, en nuestro caso fosfato potásico 10 mM, pH 6.5 con sulfato magnésico 2 mM, previamente desgasado, a un flujo de 1 ml cada 5 min. De esta forma la columna quedó estabilizada y podía recibir la muestra.

5.5.2. Aplicación y elución de la muestra

El extremo correspondiente del tubo superior se introdujo hasta el fondo de una probeta que albergaba un exceso de la muestra que se deseaba pasar por la columna. Mediante la bomba peristáltica y al flujo antes indicado, estando la válvula de tres vías en la posición correspondiente, se hizo pasar la cantidad deseada de muestra, variable según el contenido proteico de la misma. Después se giró la válvula de tres vías y comenzó la elución de la columna con el tampón correspondiente.

Las distintas fracciones eluidas de la columna fueron recogidas utilizando un colector automático de fracciones (LKB Ultrorac). El sistema empleado es el de volumen fijo en un tiempo determinado. Conocido el volumen de eluato que sale de la columna en cada minuto, determinamos el tiempo que tarda en salir la cantidad deseada para cada fracción. En nuestros experimentos hemos recogidos fracciones de 3 ml.

5.5.3. Medida del contenido proteico de las fracciones

El contenido proteico de las fracciones se determinó midiendo su absorción a 280 nm en un espectrofotómetro Hitachi.

Para conocer la fracción en la que aparecían las partículas similares a colas de fago se observaron al microscopio electrónico aquellas fracciones correspondientes a los picos de absorción obtenidos.

5.6. Ultracentrifugación en gradiente de sacarosa

La ultracentrifugación en gradiente de densidad es un método comunmente utilizado para purificar y determinar el coeficiente de sedimentación de macromoléculas, virus, mitocondrias, microsomas y ribosomas. En la purificación de las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D ha sido utilizado un gradiente de sacarosa.

5.6.1. Preparación del gradiente de sacarosa

El gradiente de sacarosa, a diferencia del de cloruro de cesio es necesario fabricarlo antes de la centrifuga-

ción. El gradiente utilizado por nosotros variaba de un 30 a un 50% de sacarosa y fue hecho a mano, colocando capas de soluciones de sacarosa a concentraciones de 50, 45, 40, 35 y 30%. Se empezaba colocando la capa de mayor densidad y sobre ella se colocaba la capa de sacarosa al 45%, dejando resbalar la solución lentamente por los bordes del tubo para evitar que las dos capas se mezclen. Para facilitar la operación se utilizaron pipetas con la punta curva. Sobre la capa de sacarosa 45% se colocó la de 40%, de igual manera que la anterior, y así sucesivamente hasta formar todo el gradiente. La operación se llevó a cabo en baño de hielo y utilizando las soluciones a 4°C, para aumentar la densidad y disminuir el movimiento de las moléculas. De esta manera se evitaba que las diferentes capas se revolvieran.

Una vez formado el gradiente se colocó la muestra, un volumen de 0.5 ml. El volumen total del tubo era de 4.25 ml.

5.6.2 Centrifugación

Los tubos fueron colocados en un rotor basculante SW 65 Ti de Beckman y centrifugados en una centrífuga Beckman L 3-50 a 70000 g durante 3 h a 4°C.

5.6.3. Fraccionamiento de los tubos

Tras la centrifugación, los tubos fueron extraídos del rotor y colocados verticalmente en un dispositivo especial que los mantiene sujetos. Por la parte superior del tubo se introduce un capilar acoplado a una bomba peristáltica.

La introducción del capilar se realiza presionando sobre el tubo de silicona para evitar que penetre líquido por el capilar mientras se introduce. Sólo cuando éste ha llegado completamente al fondo del tubo, dejamos de presionar y el capilar se llena. Mediante una bomba peristáltica que da un flujo de 0.4 ml/min. se extrajo el contenido del tubo, que fue fraccionado en tubos de hemolisis, recogiendo fracciones de 0.5 ml.

La detección de las partículas similares a colas de fago se llevó a cabo mediante observación al microscopio electrónico de cada una de las fracciones.

6. ANALISIS DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

Una vez purificadas las partículas similares a colas de fago se procedió al estudio de su composición química. Se determinó si contenían proteínas, ADN y ARN.

6.1. Determinación de proteínas

La determinación del contenido proteico se llevó a cabo por el método colorimétrico de Lowry et al. (1951). Para conocer la concentración de proteínas de la muestra problema a partir del color que aparece en el tubo después de la adición de los reactivos, era necesario disponer de una curva patrón que nos relacionara dicho color con la concentración de proteínas. Esta curva patrón fue preparada aplicando

el método de Lowry a una serie de soluciones cuya concentración de proteínas era conocida. Estas soluciones se prepararon haciendo diluciones de una solución madre que contenía 400 µg/ml de albúmina bovina (Sigma).

6.2. Determinación de ADN

Aunque es conocido que las partículas similares a colas de fago no contienen ADN (Lotz, 1976), era necesario estudiar si las partículas producidas por M. coralloides D se atenían también a esta regla. En primer lugar se extrajo el posible ADN con formamida (Davis et al., 1980). Una vez disuelto el material precipitado se procedió a determinar si era ADN mediante el método de la difenilamina (Methods in Enzymology, vol. III). Este método fue también empleado en la valoración del ADN digerido por las DNasas.

Al igual que en la determinación de proteínas, al ser este método también colorimétrico, era necesario hacer una curva patrón para conocer la correspondencia entre la intensidad de color, medida a 600 nm, y la concentración de ADN. Las soluciones de concentración conocida se prepararon a partir de una solución madre que contenía 2 mg de ADN de esperma de salmón (Sigma) por mililitro.

6.3. Determinación de ARN

Para determinar si las partículas similares a colas de fago contenían ARN se utilizó el método del orcinol (Methods in Enzymology, vol. III). La intensidad de color era medida a 660 nm. En este caso, al no tener las partículas fágicas defectivas ARN y no utilizarse este método más que para

este tipo de determinación, no se hizo curva patrón.

7. MICROSCOPIA ELECTRONICA

La preparación del material necesario así como la obtención de las muestras y su procesamiento para ser examinadas al microscopio electrónico, se llevaron a cabo siguiendo técnicas generales, modificadas en algunos casos, según se estimó conveniente.

7.1. Preparación del soporte: rejillas con Formvar

Se han utilizado rejillas de cobre de 300-400 mallas, que eran guardadas en una campana de desecación.

Para la película plástica se ha utilizado siempre el Formvar (polivinil-formol), disuelto al 0.3% en cloroformo para espectroscopía (Merck). La solución se guardó también en una campana de desecación hasta el momento de ser utilizada.

El procedimiento seguido para colocar la película plástica sobre las rejillas fue el siguiente:

Se toma un portaobjetos perfectamente limpio y seco y se sumerge en la solución de Formvar, retirándolo inmediatamente y dejándolo escurrir y secar sobre la solución, en posición vertical; de esta forma se evita que durante el secado absorba humedad y se formen agujeros en la película.

Seguidamente se cortan los bordes de la película, raspando los bordes del portaobjetos con una cuchilla. Esta

operación debe realizarse lo más cuidadosamente posible para evitar que la película se ensucie con partículas de vidrio.

A continuación se pasa a desprender la película del portaobjetos, haciéndola flotar sobre agua destilada. Para ello, se introduce el portaobjetos por su borde de menor longitud, muy lentamente en el agua, vigilando si la película se desprende uniformemente.

Una vez que se tiene la película flotando sobre el agua, se disponen las rejillas sobre ella, más o menos ordenadamente y con la superficie mate en contacto con la película. Finalmente, para extraer la película con las rejillas adheridas, se deposita un trozo de papel de filtro sobre la citada película, dejándolo estar hasta que el agua lo empapa totalmente, y en este momento se saca, depositándolo en una placa de Petri que se deja secar a temperatura ambiente.

7.2. Tinciones

Se han utilizado las tinciones clásicas a base de sales pesadas, como el fosfotungstato potásico, el acetato de uranilo y el oxalato de uranilo.

Acido fosfotúngstico (PTA)

Se prepara en agua destilada al 2%, ajustando el pH con una solución de KOH al 20% entre 6.5 y 8.

Las soluciones de PTK pueden enturbiarse, bien durante su preparación bien con el transcurso del tiempo, por lo que es conveniente utilizarlas inmediatamente después de ser preparadas o bien filtrarlas a través de una membrana de Millipore de 0.2 micras, lo que permite su conservación durante bastante tiempo.

Acetato de uranilo (AU)

Se prepara en agua destilada o en alcohol-agua al 50%, a concentraciones desde 1 al 2%. En teoría, el AU es mucho más adecuado que el PTK para su utilización como tinción negativa, pero también presenta el inconveniente de que si las muestras no están adecuadamente purificadas, todos los contaminantes resultan teñidos, obteniéndose de hecho, preparaciones poco contrastadas, es decir, preparaciones en las que los especímenes destacan pobremente sobre el "background".

Por otra parte, el AU se utiliza a pH 4.5-5, lo que, en algunos casos, podría alterar la morfología de las estructuras que se vayan a visualizar, o crear artefactos que dificultan la observación de las primeras.

Por estas razones, esta tinción fue poco utilizada para teñir las partículas similares a colas de fago.

Oxalato de uranilo (OU).

Se obtiene mezclando AU y ácido oxálico en agua destilada en la siguiente proporción:

Acido oxálico	0.15 g
Acetato de uranilo	0.50 g
Agua destilada	100 ml

(Mercer y Berbeck, 1974).

Es ligeramente más activo y estable que el AU, conservándose durante bastante tiempo a temperatura ambiente. Por lo demás, se utiliza como el AU, a pH entre 4.5-5, que se ajusta con amoníaco.

De todas las tinciones, la más frecuentemente utilizada fue la primera, ya que ofrecía un mejor contraste, lo que facilitaba la observación.

7.3. Montaje de las muestras en las rejillas y tinción

El procedimiento más comunmente utilizado consistió en depositar gotas de las suspensiones sobre las rejillas, dejándolas estar durante 2 minutos y retirando a continuación el exceso de líquido con un papel de filtro. De esta forma queda sobre la rejilla una fina película de la suspensión. que se deja secar al aire, protegida del polvo.

La tinción se realizó de la misma forma que el montaje de la muestra, es decir, se coloca una gota de la solución empleada, que se retira con ayuda de papel de filtro, colocando a continuación una nueva gota, que se retira del mismo modo y, por último, se coloca una tercera gota de la que sólo se retira el exceso, dejando una capa fina de líquido que se deja secar al aire.

Todas las observaciones se realizaron en un microscopio electrónico "Phillips", mod. EM-300. Conviene hacer notar que es imprescindible que las rejillas estén perfectamente secas antes de ser introducidas en la columna del microscopio, pues de no ser así, dicha columna resulta rapidamente contaminada, al tiempo que la preparación sobre la rejilla "evapora" y se estropea irremediabilmente.

8. OBTENCION DE EXTRACTOS SONICADOS DE MIXOBACTERIAS

Para la realización de algunos ensayos sobre DNAsas fue necesario partir de extractos sonicados de la bacteria a estudiar. Para ello se recogieron por centrifugación las células de cultivos en fase exponencial de la bacteria

en cuestión, se resuspendieron en un tampón adecuado y se rompieron en un sonicador Sonifer B-12 a una potencia de 40 W durante 15 minutos en circuito refrigerado.

La cantidad de células de la que se partía, el tampón utilizado y el volumen de tampón adicionado por cada gramo de células era diferente en cada tipo de ensayo, por lo que estos detalles se darán en los apartados correspondientes.

9. BUSQUEDA DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN

El método utilizado en la búsqueda de endonucleasas de restricción de M. coralloides D ha sido el descrito por Schleif (1980), que incluye algunos pasos de purificación, lo que permite eliminar otras nucleasas que puedan enmascarar la actividad de nucleasas específicas.

9.1. Preparación del polímero concentrado

En 25 ml de agua a punto de ebullición se disolvieron 3.2 g de dextrano T500. A continuación se adicionaron 12.8 g de polietilenglicol 6000 y una vez disuelto se adicionó agua hasta un volumen final de 45 ml.

El polímero concentrado se conservó a 4°C. Antes de su uso, y para conseguir una mezcla homogénea, se calentó a 65°C y se dejó enfriar a temperatura ambiente.

9.2. Preparación de los extractos de M. coralloides D

Se partió de 5 g de células, que fueron resuspendidas en 10 ml de tampón Tris-ClH, pH 7.9 con 2-mercaptoetanol 0.01 M, y rotas por sonicación. A continuación se prepararon 10 tubos, en los que se pusieron 1 ml de extracto sonicado, 0.5 ml de agua, 0.5 ml de polímero concentrado y ClNa, un volumen diferente en cada uno de los tubos: 0.002, 0.005, 0.01, 0.02, 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 0.64 y 1.2 ml de una solución 4 M. Una vez adicionados todos los componentes, los tubos fueron agitados en un mixo-tub durante 5 min. consecutivos, y centrifugados a bajas revoluciones durante 10 min. Al igual que en el sistema dextrano sulfato-polietilenglicol, aparecen dos fases separadas por una interfase. La distribución de las sustancias del extracto sonicado entre las tres fracciones dependía de la concentración de ClNa. Para el ensayo de endonucleasas era utilizada únicamente la fase superior.

9.3. Ensayo de endonucleasas de restricción

Para el ensayo se tomaban 2 μ l de la fase superior de cada uno de los tubos y eran incubados durante 1 hora a 37°C junto con 1 μ l de ADN del fago λ y 2 μ l de tampón Tris-ClH 0.015 M, pH 7.4 con cloruro magnésico 0.015 M y 2-mercaptoetanol 0.015 M. Transcurrido el tiempo de digestión, la reacción era detenida calentando la muestra a 65°C durante 5 min.

9.4 Electroforesis en gel de agarosa

Para la resolución de las bandas de ADN que hubieran podido aparecer después de la digestión, se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 0.7%. Para ello, 1.4 g de agarosa fueron adicionados a 200 ml de tampón Tris-ClH 0.04

M, acetato sódico 5 mM y EDTA 1 mM, ajustado a pH 7.9 con ácido acético. Una vez fundida la agarosa en el autoclave, se dejó enfriar hasta 45°C y se vertió sobre una placa de electroforesis en la que se había colocado un accesorio de plástico en forma de peine para excavar los pocillos donde se depositarían las muestras. El grosor de la capa de gel era de 2-3 mm. La placa con el gel fue colocada en una cubeta de electroforesis y sumergida en el mismo tampón en que se había preparado la agarosa. A continuación se colocaron las muestras, a las que se les había adicionado 5 µl de una solución con azul de bromofenol al 0.02% y glicerol al 10%, en los pocillos correspondientes. La electroforesis se realizó a 35 voltios, a voltaje constante, y se dejó correr hasta que el azul de bromofenol alcanzara el final de la placa.

Para comprobar si había bandas de ADN se sumergió el gel en una solución de bromuro de etidio a 1 µg/ml durante 10 min. y se observó bajo una lámpara de luz U.V.

10. EXTRACCION DE DNAsas DEL ESPACIO PERIPLASMICO

Para extraer material periplásmico se utilizó el procedimiento descrito por Mayer y Reichenbach (1978). Se partió de un cultivo de mixobacteria (bien de M. coralloides D o bien de M. virescens) en crecimiento exponencial, se centrifugó a bajas revoluciones y se resuspendieron las células sedimentadas (2.61 g) en 12 ml de tampón fosfato potásico 10 mM, pH 7.5 con Tritón X-100 0.01%, 2-mercaptoetanol 7 mM y EDTA 1 mM. Una vez resuspendidas las células, fueron homogenizadas,

dándole dos pases de 15 seg. cada uno en un homogenizador a 2000 rpm, en baño de hielo. Esta acción conjunta, física y química, permite disolver y romper la membrana externa de la pared y liberar el contenido del espacio periplásmico. Este material fue posteriormente separado de las células por centrifugación a 40000 g durante 15 min a 2°C.

11. ENSAYO DE ACTIVIDAD DNasa

El ensayo de actividad DNasa se realizó utilizando sobrenadantes de cultivo, material periplásmico y extractos sonicados, tanto de M. coralloides D como de M. virescens. Los sobrenadantes de cultivo fueron obtenidos centrifugando cultivos en fase exponencial a 15000 rpm durante 30 min. en un rotor SS-34 de una centrifuga Sorvall. El material periplásmico fue extraído por el procedimiento descrito en el apartado anterior. Y los extractos sonicados sometiendo a ultrasonido 2.61 g de células de la mixobacteria en cuestión, resuspendidas en 12 ml de tampón Tris-ClH 10 mM, pH 8 con cloruro magnésico 10 mM. Los restos celulares fueron retirados por centrifugación a 40000 g durante 15 min. a 2°C.

Para el ensayo se mezclaba 1 ml de cualquiera de los extractos con 1 ml de tampón Tris-ClH, pH 8 con cloruro magnésico 10 mM y 1 ml de una solución de ADN que contenía 2 mg/ml, y se incubaba a 37°C. Ya que para cada extracto se utilizó más de un tiempo de incubación, en cada experiencia se prepararon varios tubos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación deseado para cada uno de los tubos, se detenía la digestión y se precipitaba el ADN no digerido adicionando 1 ml de ácido tricloroacético 3 M y se mantenía el tubo en

hielo durante 15 min. El material precipitado era separado por centrifugación a bajas revoluciones, y el ADN digerido, que quedaba en el sobrenadante, era valorado por el método de la difenilamina.

RESULTADOS

DETECCION DE PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

Cuando M. coralloides D crece en CT 0.5% muestra una intensa actividad autolítica, de manera que, tras una corta fase estacionaria, los cultivos entran en una rápida autólisis que lleva al aclaramiento de los mismos.

Desde hace algún tiempo se viene estudiando en nuestro laboratorio el proceso autolítico de M. coralloides D, habiéndose encontrado que este proceso está influenciado por la concentración de los factores nutricionales del medio (Fernandez-Vivas et al., 1983a). Esto llevó a buscar algún tipo de relación entre la respuesta estricta, uno de los mecanismos reguladores por el que las bacterias pueden responder a la deficiencia nutricional, y la autólisis; sin embargo, aunque se detectó guanosina 5'-difosfato-3'-difosfato, no se halló ninguna relación entre dicho compuesto y la autólisis (Fernandez-Vivas et al., 1983 b). Se han encontrado evidencias de un factor activador relacionado con la autólisis (Arias et al., 1983). A pesar de todos los estudios realizados, aún es desconocido el mecanismo que desencadena la autólisis.

La observación al microscopio electrónico de sobrenadantes de cultivos líticos de M. coralloides D reveló la presencia de partículas parecidas a colas de fago. Esto nos llevó a pensar en una posible relación entre la autólisis y dichas colas de fago.

Las colas de fago producidas por M. coralloides D son similares a las colas de los fagos T4 de E. coli. Presentan una placa basal terminada en 6 fibras, un tubo y una vaina contráctil (Figura 1). La contracción de la vaina es prevenida por la adición de magnesio, de manera que cuando las colas

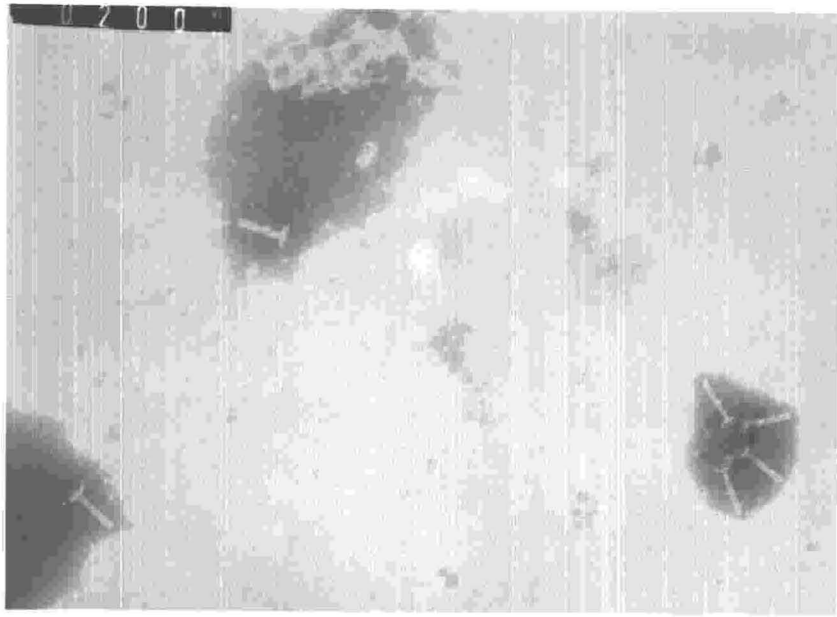


FIGURA 1.- Partículas similares a colas de fago distendidas.PTA.
106.000x.

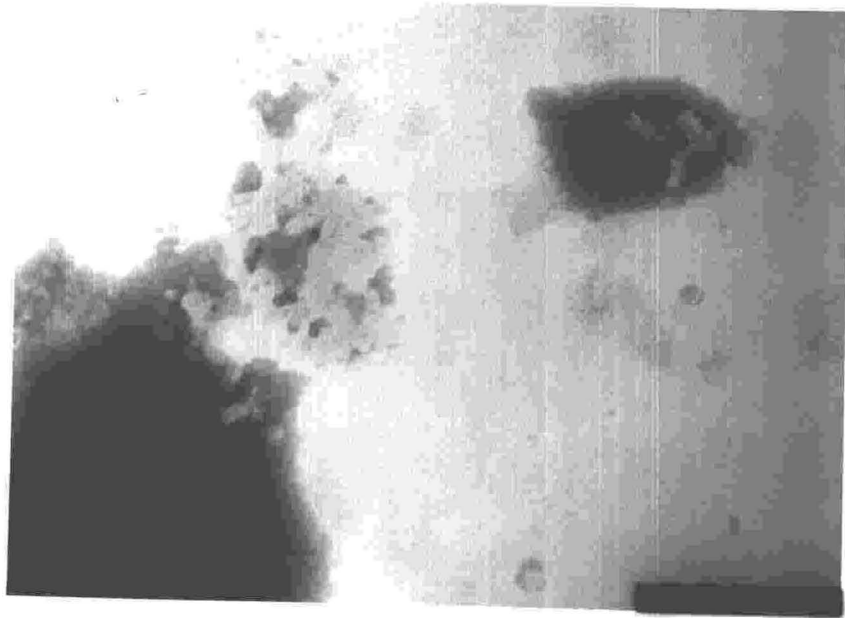


FIGURA 2.- Partículas similares a colas de fago contraídas.PTA.
180.000x.



se resuspenden en un medio sin magnesio, la vaina se contrae y se hace más corta y más gruesa, quedando el tubo visible (Figura 2).

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO EN MEDIOS LIQUIDOS

Producción en medios autolíticos

Para estudiar la producción de las colas de fago en medios autolíticos eran inoculados matraces con 100 ml de los cuatro medios líquidos autolíticos (CT 0.5%, CT 1%, CT 2% y CT sin fosfato) con M. coralloides D e incubados a 28°C en agitación. Cada cierto tiempo se tomaban muestras, a las cuales se les medía la densidad óptica para conocer el estado fisiológico de los cultivos, y se centrifugaban. Los sobrenadantes obtenidos eran observados al microscopio electrónico para saber cuando empezaban a liberarse las colas de fago a los medios de cultivo.

Los resultados obtenidos revelaron que en los cuatro medios, las colas de fago empezaban a detectarse cuando los cultivos iniciaban la autólisis (Figura 3) y que su número iba aumentando hasta que todas las células se habían lisado.

Paralelamente se hizo otra experiencia en la cual las muestras eran tratadas con cloroformo al 5% con objeto de lisar las células y liberar su contenido. Transcurrida una hora de reposo se tomaban unos pocos mililitros de la parte superior, evitando coger cloroformo, se centrifugaban y se observaban al microscopio electrónico. En este caso, se empezaban a detectar partículas en las muestras de los cultivos re-

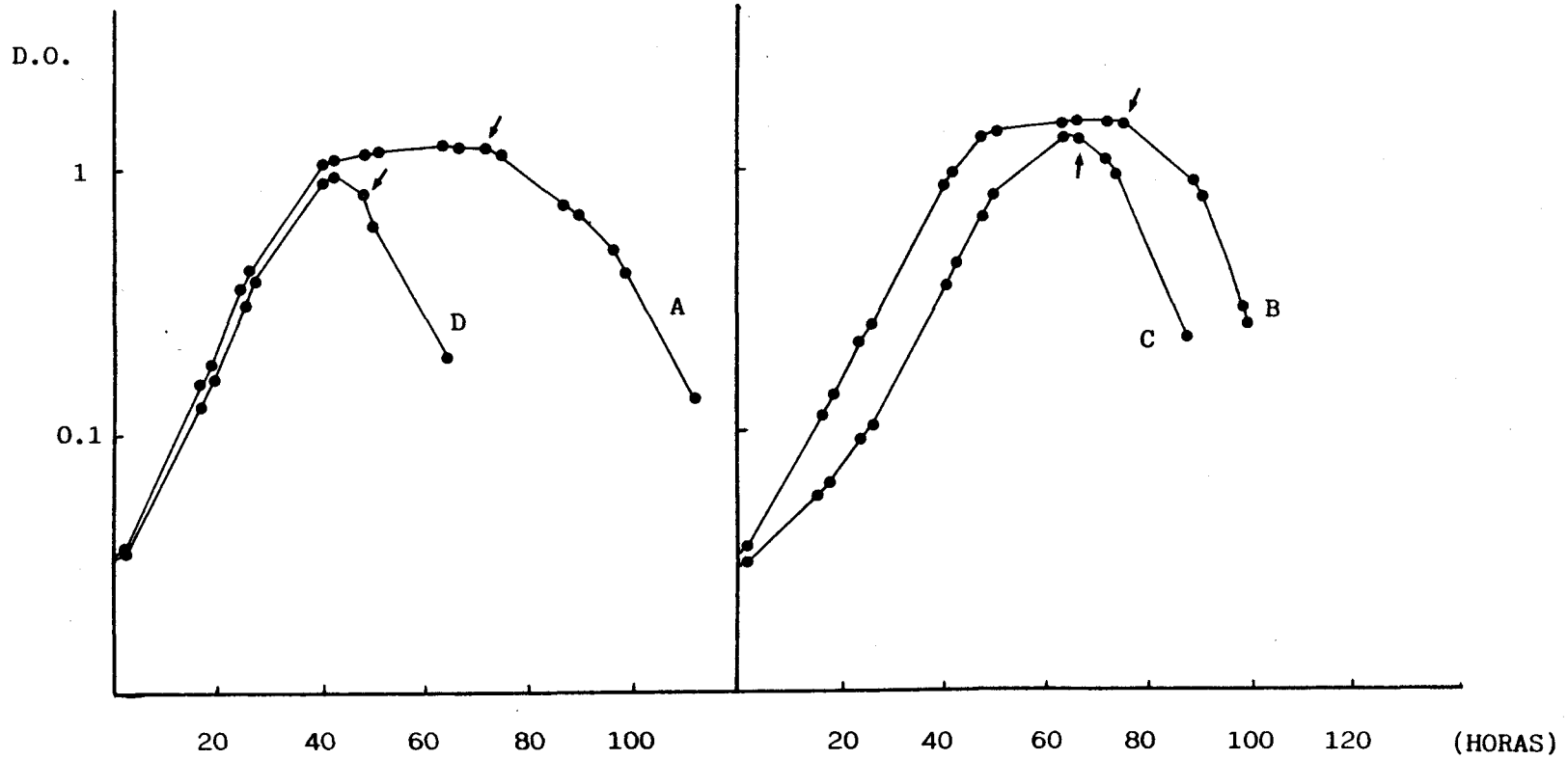


FIGURA 3.- Curvas de crecimiento de M. coralloides D en diferentes medios de cultivo. A. CT 0.5% B. CT 1% C. CT 2% D. CT sin fosfato. Las flechas indican la aparición de partículas similares a colas de fago en los sobrenadantes de cultivo.

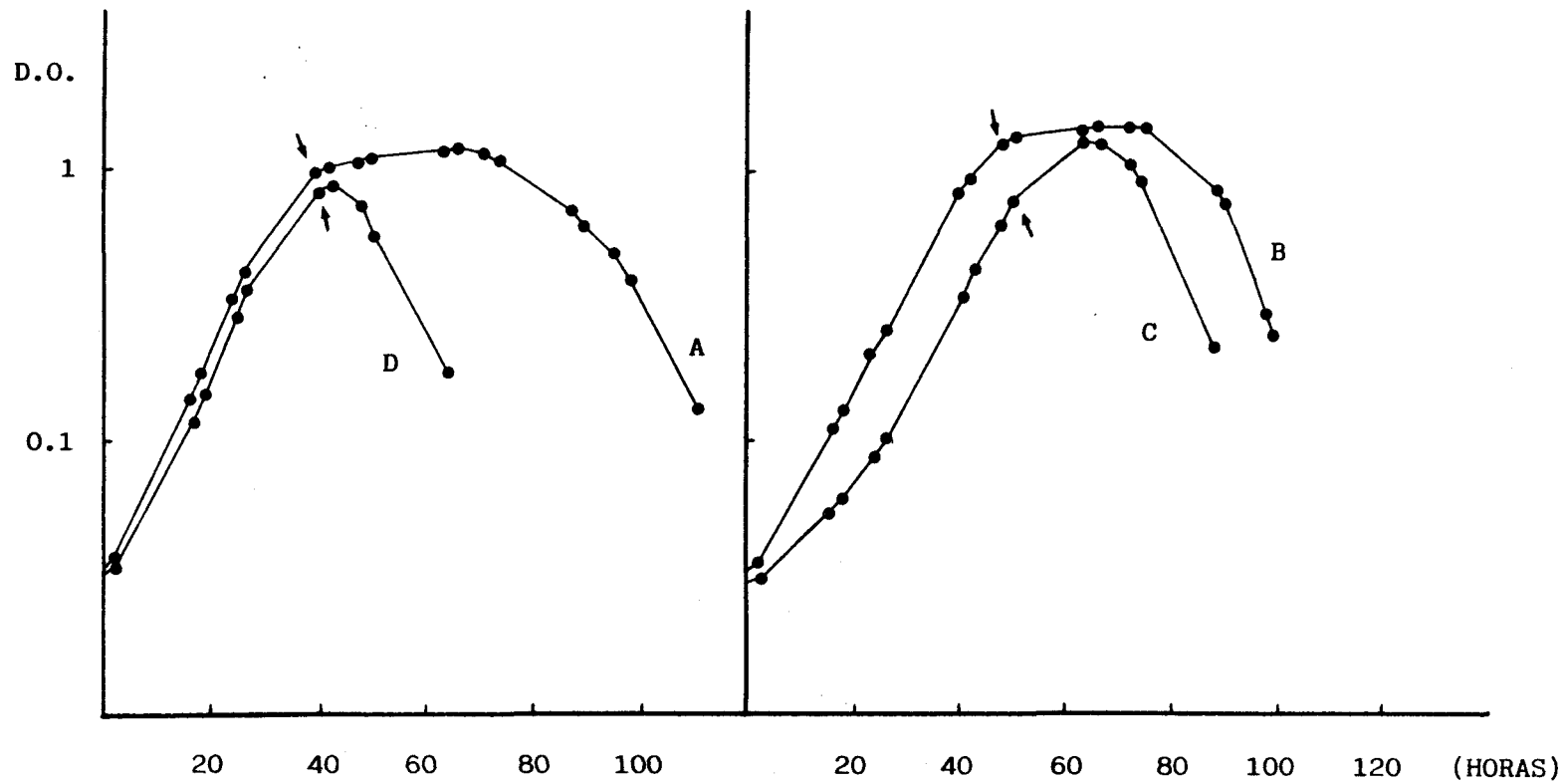


FIGURA 4.- Curva de crecimiento de M. coralloides D en diferentes medios de cultivo. A, CT 0.5%. B, CT 1%. C, CT 2%. D, CT sin fosfato. Las flechas indican la aparición de partículas similares a colas de fago en los sobrenadantes de los cultivos tratados con cloroformo.

cién entrados en la fase estacionaria y se obtenía el número máximo justo antes de que se iniciara la autólisis (Figura 4).

En ningún caso se pudieron observar colas de fago durante la fase exponencial.

Producción en medio CTP

CTP es el único medio líquido conocido en el cual M. coralloides D no muestra comportamiento autolítico. La principal diferencia de este medio con el resto de los medios líquidos está en la concentración de fosfato, que en este caso es 40 mM (ver Material y Métodos).

Cuando se utilizó este medio para realizar las mismas experiencias descritas en el apartado anterior se obtuvieron unos resultados sorprendentes. En aquellos casos en los que las células no eran lisadas con cloroformo se detectaban partículas, pero únicamente en los sobrenadantes de los cultivos que llevaban al menos 50 horas en fase estacionaria, cuando la densidad celular había empezado a decaer ligeramente (Figura 5).

Por el contrario, cuando las muestras eran tratadas con cloroformo al 5%, se empezaban a observar colas de fago cuando los cultivos entraban en la fase estacionaria, igual que en el caso de medios autolíticos (Figura 6). El número máximo de partículas era observado transcurridas 30 horas en fase estacionaria. Por lo tanto, el patrón de producción de partículas fágicas era idéntico en todos los medios líquidos, independientemente de que en ellos ocurriera o no autólisis.

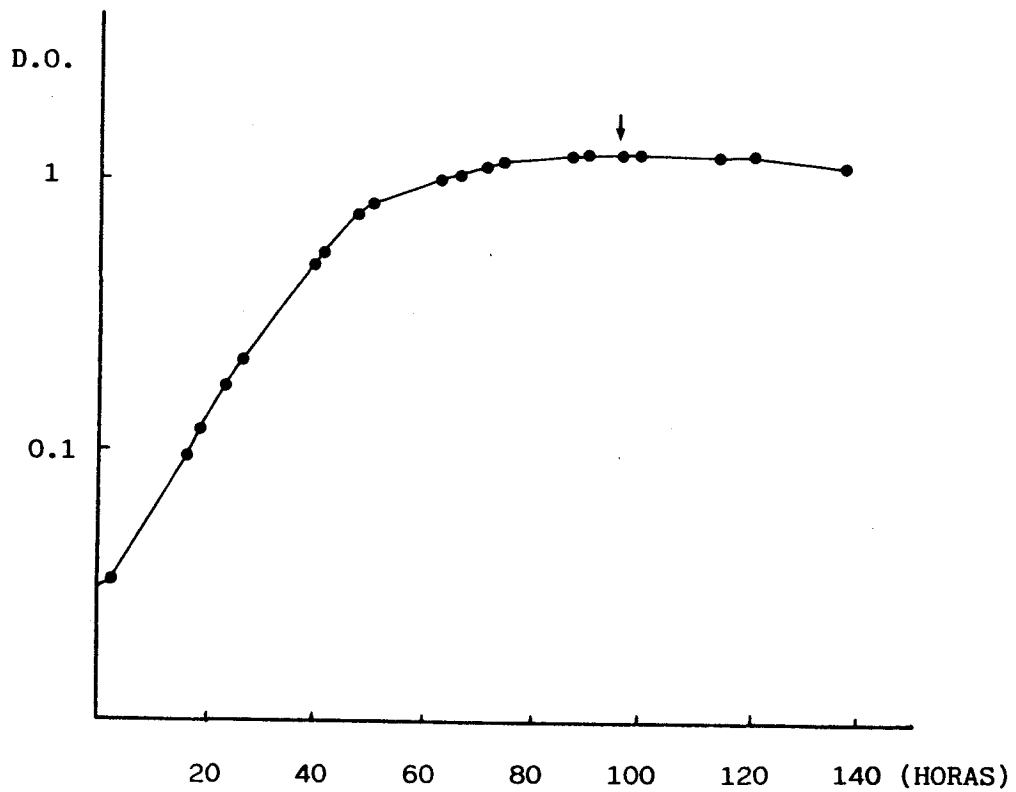


FIGURA 5.- Curva de crecimiento de M. coralloides D en medio CTP. La flecha indica la aparición de partículas similares a colas de fago en los sobrenadantes de cultivo.

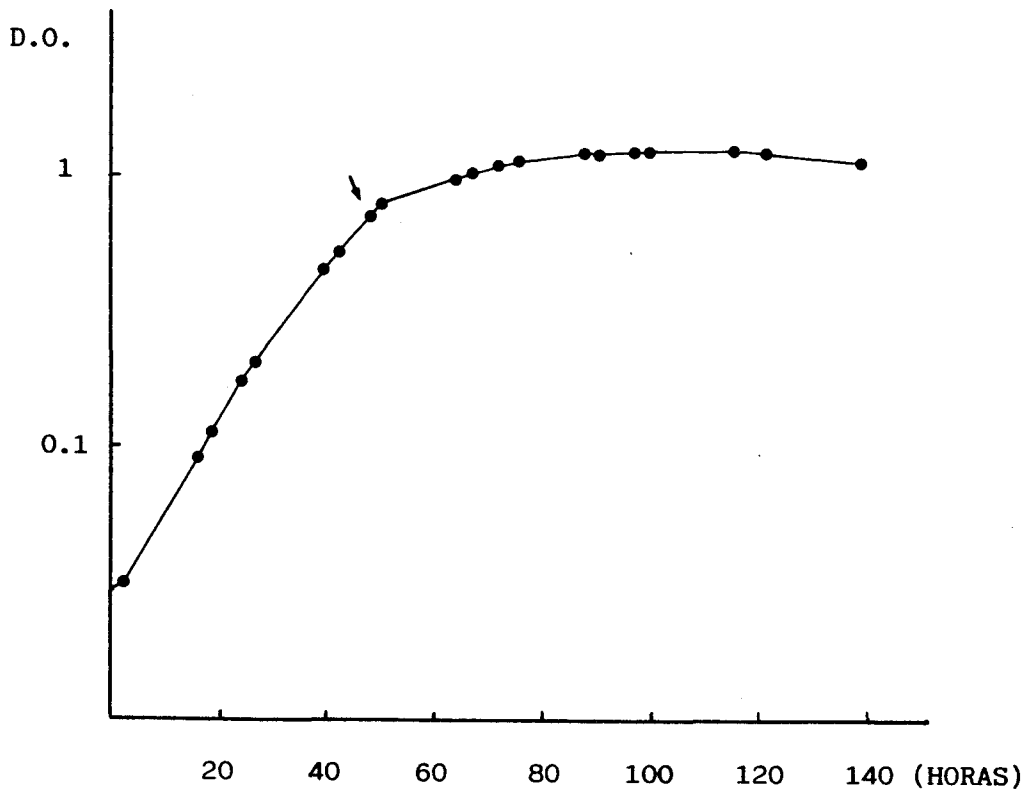


FIGURA 6.- Curva de crecimiento de M. coralloides D en medio CTP. La flecha señala la aparición de partículas similares a colas de fago en los sobrenadantes de los cultivos tratados con cloroformo.

ESTUDIOS SOBRE PRODUCCION DE COLAS DE FAGO EN MEDIOS SOLIDOS

Producción en medio CTA

Para estas experiencias fueron sembradas 9 placas de Petri con 20 ml de medio CTA con M. coralloides D e incubadas a 28°C. A los dos días, tiempo necesario para que se observara crecimiento, se tomaban las células de una placa y se hacía una suspensión espesa (5×10^8 cel/ml aproximadamente) en tampón fosfato, y se trataba con cloroformo al 5%, agitando fuertemente. Después se centrifugaba y se recogía el sobrenadante para observarlo al microscopio electrónico.

Al tercer día de incubación se tomaba otra placa y se procedía como en el caso anterior; al cuarto día otra, y así sucesivamente hasta el décimo día.

Cuando se observaron los sobrenadante, en ningún caso se pudieron detectar partículas similares a colas de fago.

Producción en agar levadura

Cuando las mixobacterias crecen en agar levadura, a diferencia de otros medios sólidos como CTA donde se sigue el ciclo de vida vegetativo, forman cuerpos fructificantes y las células sufren una serie de cambios que conducen a la formación de mixósporas.

Con objeto de conocer si M. coralloides D producía colas de fago durante el ciclo de desarrollo, se sembraron 6 placas de Petri con 20 ml de agar levadura y se incubaron a 28°C. Posteriormente, cada día se hacía una suspensión de bacterias de una de las placas por raspado de las mismas en

tampón fosfato y se trataba con cloroformo, después se centrifugaba y se observaban los sobrenadantes al microscopio electrónico. En el caso de M. coralloides, los cuerpos fructificantes empiezan a aparecer al tercer día de incubación, y al sexto día toda la placa aparece llena de estas estructuras.

En este caso, el tratamiento con cloroformo no era muy necesario ya que las mixósporas son resistentes a este disolvente orgánico y no se lisan. Además, ya que durante la formación de los cuerpos fructificantes el 80% de la población vegetativa se autolisa (Wireman y Dworkin, 1975 y 1977), las colas de fago se liberarían en caso de que hubieran sido producidas y serían arrastradas al raspar la superficie del agar. No obstante se siguió utilizando el tratamiento con cloroformo ya que en los dos primeros días de incubación sólo hay células vegetativas y en los cuatro siguientes, aunque empiezan a aparecer mixósporas, sigue habiendo bacilos, los cuales sí son lisados por el cloroformo. Sólo al sexto día se observan únicamente mixósporas al microscopio óptico.

La observación al microscopio electrónico de los sobrenadantes recogidos reveló que, al igual que en CTA, no se producían colas de fago.

A la vista de estos resultados podemos concluir que M. coralloides sólo produce colas de fago cuando crece en medio líquido, independientemente de que se autolise o no; y nunca las produce en medios sólidos, ni durante el ciclo vegetativo ni durante el ciclo de desarrollo.

INDUCCION CON LUZ ULTRAVIOLETA

Curva de inactivación de *M. coralloides* D por la luz U.V.

Antes de estudiar si las colas de fago eran inducidas con luz ultravioleta, se realizaron una serie de experiencias para conocer la sensibilidad de *M. coralloides* D a este agente físico. Para ello se tomaban cultivos en crecimiento exponencial y, previamente a la irradiación, eran centrifugados dos veces y resuspendidos en sulfato magnésico 0.1 M, con objeto de eliminar las sustancias orgánicas del medio, las cuales absorben la luz ultravioleta. Para obtener una mayor superficie de exposición, se tomaban 5 ml de las muestras lavadas y se colocaban en una placa de Petri de 5 cm de diámetro. La irradiación era llevada a cabo con una lámpara Sylvania de 16 W de potencia, cuya fluencia era de $0.15 \text{ J} \cdot \text{m}^{-2}$ por segundo. Durante el tiempo de tratamiento los cultivos eran mantenidos en agitación a fin de conseguir que todas las bacterias recibieran la misma dosis. Una vez transcurrido el tiempo de irradiación se hacían las diluciones correspondientes y se sembraban placas de Petri con medio CTA. Pasados 4 días de incubación a 28°C se contaban las colonias.

Los resultados están representados en la Tabla 1 y en la Figura 7. Como puede observarse, cuando el tanto por uno de supervivencia se representa frente a la dosis se obtiene una curva de inactivación de doble pendiente. Este comportamiento es característico de una población bacteriana no homogénea en lo que respecta a sensibilidad a luz U.V. Las dos poblaciones celulares pudieron separarse y se obtuvo la curva de inactivación de cada una de ellas por separado (Figura 8 y Tabla 1).

TABLA 1.- Inactivación de M. coralloides D por la luz ultravioleta

	DOSIS DE IRRADIACION (J/m ²)						
	0	30	60	90	120	150	180
<u>Raza original</u>							
nº de células supervivientes	5.6x10 ⁸	4.2x10 ⁷	1.9x10 ⁶	5.0x10 ⁵	3.0x10 ⁵	1.9x10 ⁵	1.2x10 ⁵
% supervivencia	100	7.5	0.34	0.09	0.05	0.03	0.02
<u>Raza 1</u>							
nº de células supervivientes	5.4x10 ⁸	3.2x10 ⁸	8.7x10 ⁷	2.1x10 ⁷	8.1x10 ⁶	1.8x10 ⁶	7.0x10 ⁵
% supervivencia	100	60	16	4	1.5	0.33	0.13
<u>Raza 2</u>							
nº de células supervivientes	5.7x10 ⁸	4.1x10 ⁷	1.6x10 ⁶	5.7x10 ⁴	2.3x10 ³		
% supervivencia	100	7.2	0.28	0.01	0.0		

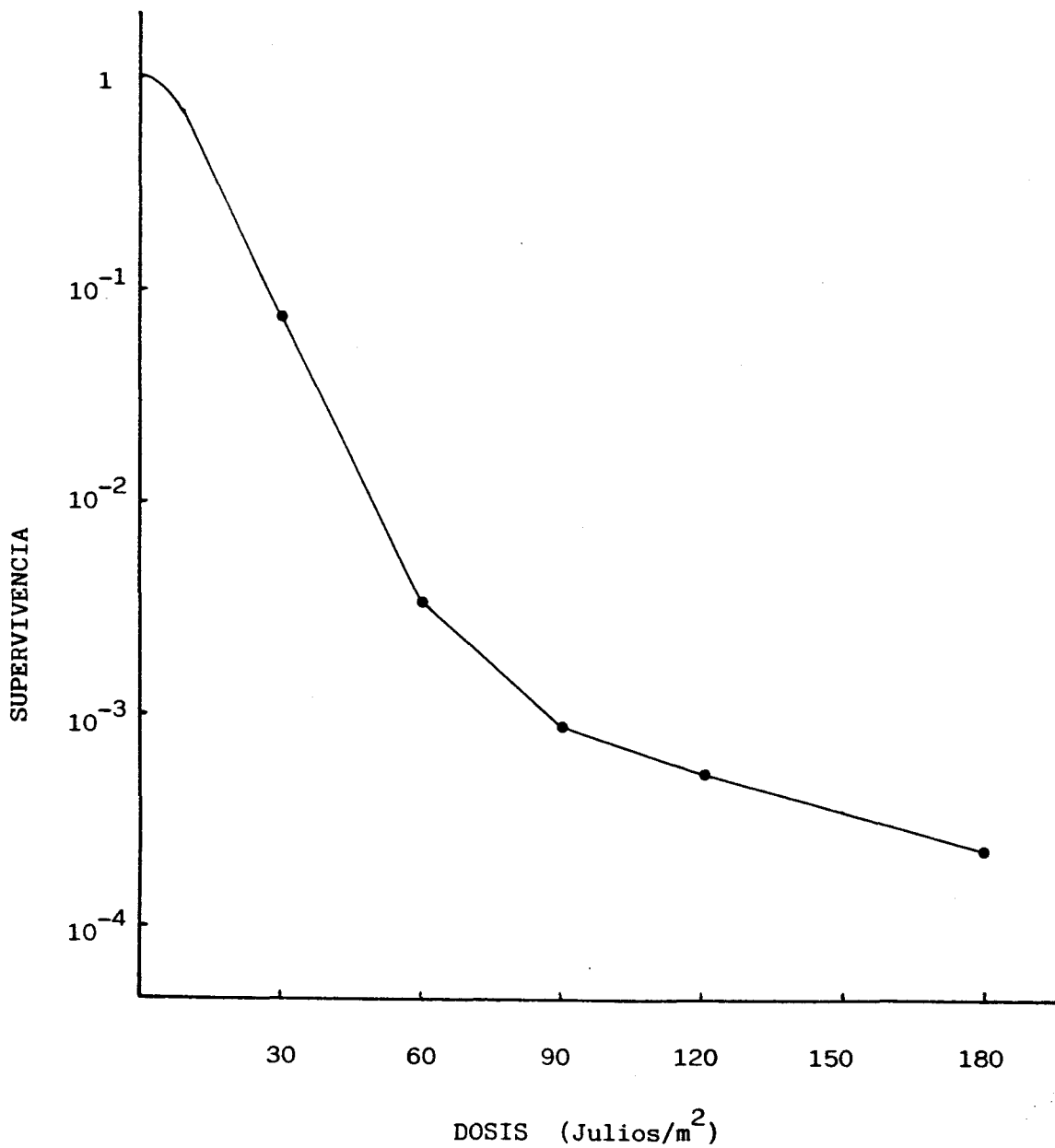


FIGURA 7.- Curva de inactivación de M. coralloides D por la luz U.V.

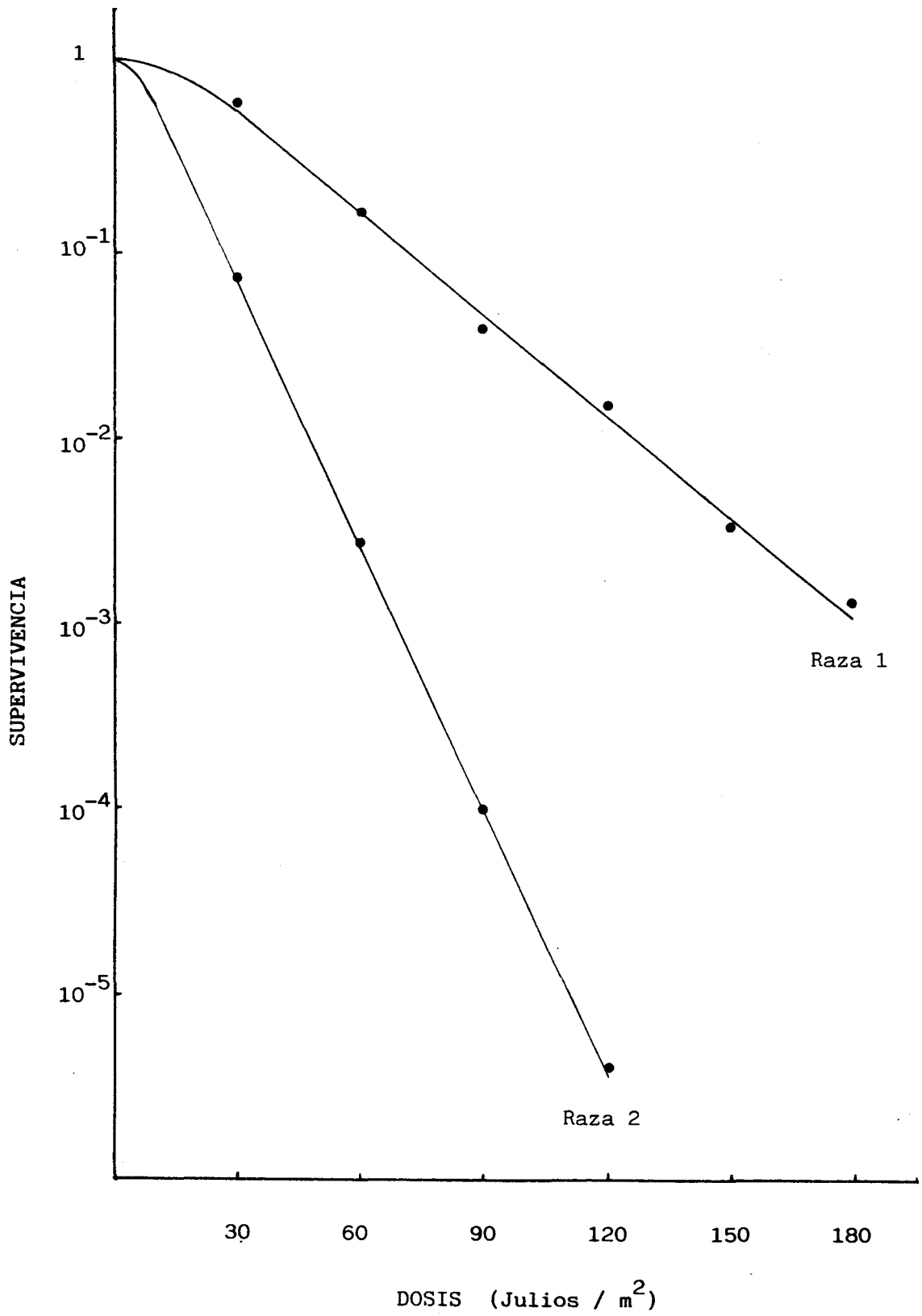


FIGURA 8.- Curvas de inactivación por luz U.V. de las dos poblaciones celulares obtenidas a partir de la raza original de M. coralloides D.

A parte de la diferente sensibilidad a la luz U.V. no se ha podido detectar ninguna otra diferencia entre estas dos poblaciones. Así, por ejemplo, ambas presentan una misma curva de crecimiento, con idéntico comportamiento autolítico y producen colas de fago. Por esta razón, el resto de las experiencias se llevaron a cabo con la raza original, mezcla de las dos poblaciones.

Inducción con luz U.V.

Cultivos en crecimiento exponencial de M. coralloides D eran expuesto a la luz U.V. durante 4 tiempos diferentes, con objeto de obtener un tiempo de irradiación óptimo. Estos tiempos nos proporcionaban una dosis de irradiación de 45, 90, 135 y 180 $J.m^{-2}$. Además se utilizaba un cultivo control, que era sometido al mismo tratamiento que los demás cultivos, y que no era irradiado.

Al igual que en el caso de la obtención de la curva de inactivación, los cultivos eran previamente lavados y resuspendidos en sulfato magnésico 0.1 M.

Una vez acabado el tratamiento, los cultivos eran centrifugados nuevamente, resuspendidos en CT 0.5% e incubados en oscuridad a 28°C en agitación. Cada cierto tiempo se les medía la densidad óptica para conocer su evolución. Los resultados obtenidos están representados en la Figura 9. Como puede verse, a una dosis de 45 $J.m^{-2}$ el cultivo crecía normalmente, aunque la densidad óptica era siempre inferior a la del testigo, debido a que el número de células supervivientes no era del 100%. A partir de 90 $J.m^{-2}$ los cultivos empezaban a crecer durante un tiempo corto, que disminuía y llegaba a desaparecer a medida que aumentaba la dosis, y después la densidad óptica

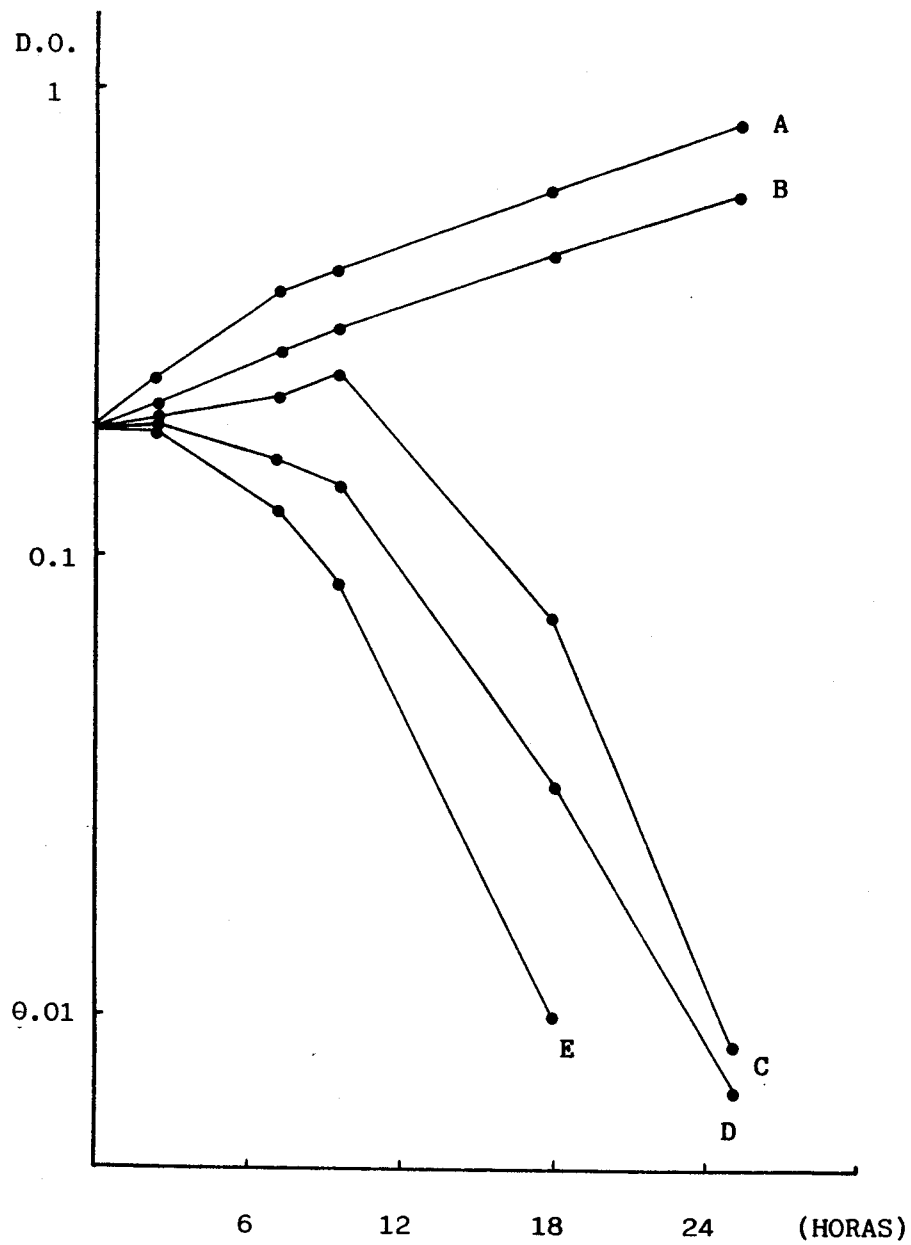


FIGURA 9.- Evolución de la D.O. de los cultivos de M. coralloides D irradiados con luz U.V.
 A. Control; B, 45 J/m²; C, 90 J/m²; D, 135 J/m²; E, 180 J/m².

empezaba a disminuir.

Sin embargo, cuando se observaban los cultivos al microscopio óptico encontramos que esa caída de la densidad óptica no era debida a lisis, sino a que las células se agrupaban, dando lugar a grumos que iban aumentando de tamaño con el tiempo. Además, las células que aparecían aisladas no presentaban un tamaño normal, sino que eran 4-5 veces más largas que los bacilos normales.

Pasadas 24 h. de incubación, los cultivos eran centrifugados y los sobrenadantes se observaban al microscopio electrónico para ver si se habían inducido las colas de fago. Los resultados obtenidos fueron poco satisfactorios, ya que, si bien podían detectarse algunas partículas, el número era tan bajo que no podía hablarse de inducción.

Inducción con luz U.V. y lisis con cloroformo

En los resultados anteriores hemos podido ver que después de la irradiación con luz U.V. los cultivos no se lisaban y que, aunque en muy poca cantidad, aparecían colas de fago en los sobrenadantes. Sin embargo, en el tubo control no se podía detectar ninguna partícula, hecho que, además, era conocido, ya que sólo son producidas cuando los cultivos entran en fase estacionaria. Esto nos hizo pensar que podría haber ocurrido inducción y que, al no lisarse las células, las partículas no habrían podido liberarse, igual que sucedía en medio CTP, por lo que no podrían ser detectadas en los sobrenadantes. Las pocas partículas observadas habrían sido liberadas por la lisis esporádica de algunas de las células inducidas.



Para verificar esta hipótesis se realizó la siguiente experiencia: 25 ml de cultivo de M. coralloides D en crecimiento exponencial, previamente lavados y resuspendidos en sulfato magnésico, eran irradiados a una dosis de 90 J.m^{-2} . A continuación era eliminado el sulfato magnésico por centrifugación y las células resuspendidas en medio CT 0.5% nuevo. A las 2, 4, 8, 10 y 12 h. de incubación se tomaba una muestra de 4 ml, la cual era tratada con cloroformo al 5% y centrifugada.

La observación al microscopio electrónico de los sobrenadantes reveló que a las 4 horas de incubación empezaban a observarse colas de fago y a las 10 h se obtenía el número máximo.

Este resultado confirmaba nuestra hipótesis de que había inducción. Sin embargo, el número final de partículas obtenido seguía siendo inferior al de un sobrenadante lítico (aproximadamente la mitad).

Inducción con mitomicina C

A cultivos en crecimiento exponencial de M. coralloides D se les adicionaba mitomicina C a concentraciones finales de 0.2, 0.5, 0.8, 1, 2 y 3 $\mu\text{g/ml}$. Además se incluía un testigo, al que no se le adicionaba mitomicina C. Los cultivos eran incubados a 28°C en agitación y oscuridad, para evitar la inactivación del agente inductor por la luz. Cada cierto tiempo se les medía la densidad óptica para conocer su evolución. Los resultados obtenidos están representados en la Figura 10. Como puede verse, al igual que ocurría con la luz U.V., los cultivos tratados con mitomicina C crecían ligera-

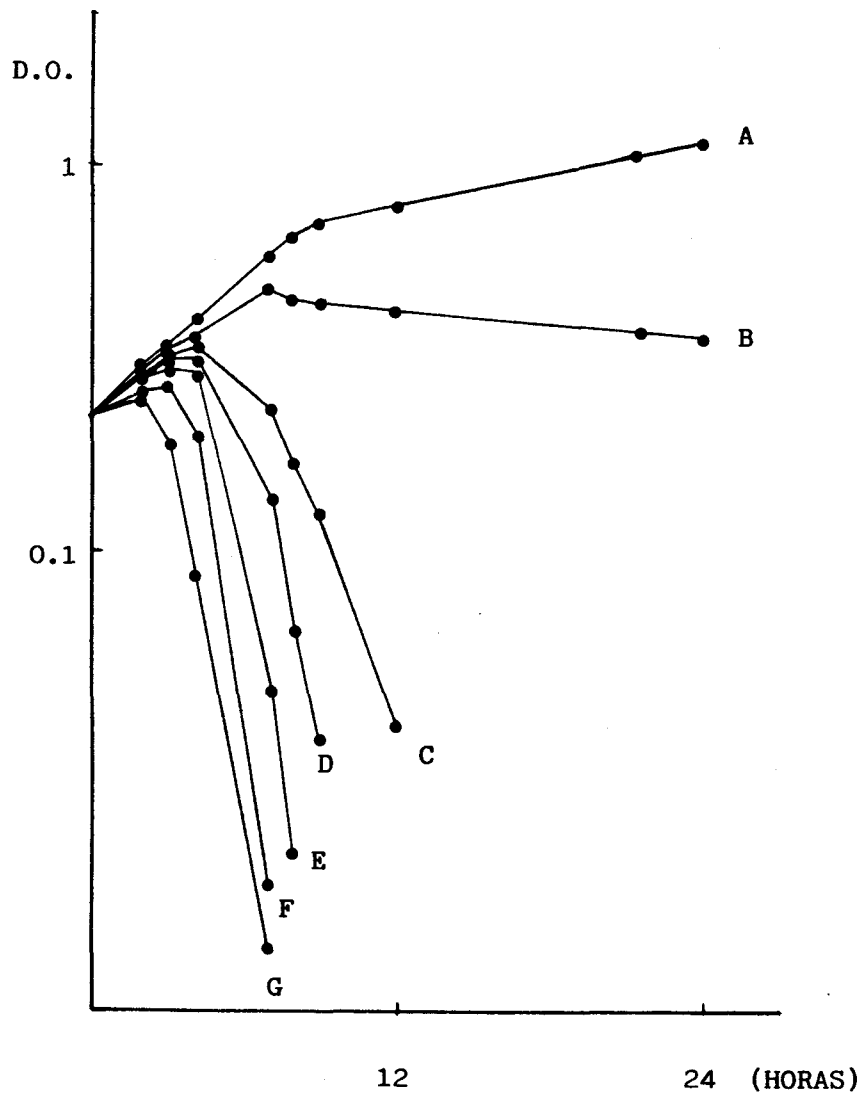


FIGURA 10.- Evolución de la D.O. de los cultivos de M. coralloides D tratados con mitomicina C.
 A, Control; B, 0.2 µg/ml; C, 0.5 µg/ml;
 D, 0.8 µg/ml; E, 1 µg/ml; F, 2 µg/ml;
 G, 3 µg/ml.

mente durante las primeras horas de incubación y después la densidad óptica caía rápidamente. Esta caída tampoco era debida a lisis, sino a agrupamiento y elongación de las células, como pudo comprobarse al microscopio óptico.

Pasadas 24 h de incubación, los cultivos eran centrifugados y observados al microscopio electrónico. Los resultados eran idénticos a los obtenidos tras el tratamiento con luz U.V.: en los cultivos tratados se observaban algunas partículas, mientras que en el control no aparecía ninguna.

Esto nos condujo a hacer una experiencia similar a la realizada con luz U.V. en la cual se adicionaba mitomicina C a los cultivos a una concentración de 1 $\mu\text{g/ml}$. Pasadas 1, 2, 4, 6, 8 y 10 h de incubación se extraían 4 ml de cultivo y se lisaban con cloroformo. Los resultados obtenidos revelaron que a las 2 h empezaban a detectarse partículas parecidas a colas de fago y a las 8 h se obtenía el número máximo, el cual también era inferior al de un sobrenadante lítico.

En base a estos resultados, al obtener partículas para la purificación no se utilizó la inducción con luz U.V. ni con mitomicina C, ya que en un sobrenadante lítico se obtenía más cantidad y de manera más fácil y económica.

TRATAMIENTO DE M. coralloides D CON ANTIBIOTICOS QUE INDUCEN LISIS

Hasta ahora nos hemos encontrado con una serie de casos (cultivos en CTP y cultivos tratados con mitomicina C y luz U.V.) en los cuales las células contenían partículas similares a colas de fago en su interior, sin que los cultivos llegaran a lisarse. Esto podía ser suficiente para considerar

la autólisis y la producción de partículas como dos procesos independientes. No obstante, era necesario encontrar algún caso en el que ocurriera autólisis y no se produjeran partículas para poder descartar con toda certeza cualquier tipo de relación entre ambos procesos.

Fernandez-Vivas (1983) al estudiar la autólisis de M. coralloides D había encontrado que el tratamiento de los cultivos de esta mixobacteria con inhibidores de la síntesis de macromoléculas y con agentes desacopladores inducía el proceso autolítico.

Basándonos en estos resultados se hicieron una serie de experiencias en las que se inducía la lisis de los cultivos mediante alguno de los agentes utilizados por Fernandez-Vivas y se observaban al microscopio electrónico los sobrenadantes líticos resultantes de la acción de tales agentes. Para ello, a cultivos de M. coralloides D en crecimiento exponencial se les adicionó cloranfenicol, tetraciclina (antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas) y rifampicina (que inhibe la biosíntesis de ARN), a concentraciones de 3, 2 y 1 µg/ml, respectivamente, y se incubaron durante 2 h los dos primeros y 3 h el último. Estos tiempos eran suficientes para que tuviera lugar un aclaramiento completo de los caldos de cultivo. Una vez lisados, los cultivos se centrifugaban y se observaban los sobrenadantes al microscopio electrónico. En ninguno de los tres casos pudieron detectarse partículas similares a colas de fago.

Con estas experiencias dimos por terminado el estudio de la relación causa-efecto entre autólisis y partículas de fago defectivo, llegando a la conclusión de que son dos procesos completamente independientes, a pesar de que en los

medios normales de resiembra se den simultaneamente.

PURIFICACION DE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

En primer lugar, para facilitar la comprensión del proceso de purificación, describimos los resultados obtenidos con determinados métodos, y, a continuación comentaremos el proceso de purificación utilizado completo.

Centrifugación diferencial

Cuando se centrifugaban muestras con colas de fago a 54000 g y un tiempo máximo de 1 h no aparecía ninguna partícula en el sedimento, tal como pudo comprobarse al observar al microscopio electrónico preparaciones de las dos fracciones obtenidas por este procedimiento. Sin embargo, si el tiempo de centrifugación era superior, empezaban a detectarse colas de fago en el sedimento, no observándose ninguna en el sobrenadante después de 10 h de centrifugación.

Por esta razón se eligió 1 h. como tiempo máximo de centrifugación para sedimentar restos desechables, y 10 h. como tiempo mínimo para sedimentar las colas de fago.

Sistema polietilenglicol-dextrano sulfato sódico (PEG-DSNa)

La observación al microscopio electrónico de las fases superiores obtenidas tras el tratamiento de los sobrenadantes líticos de M. coralloides D con concentraciones variables de PEG 6000 y ClNa (ver Material y Métodos) reveló que la concentración óptima de estos compuestos para que dejaran

de aparecer partículas similares a colas de fago en dicha fase eran de un 10% de PEG 6000 y una molaridad de 0.3 para el ClNa. La concentración de DSNa se mantuvo a 0.2%.

Al utilizar estas concentraciones y observar las tres fases aparecidas se encontró que las partículas similares a colas de fago aparecían concentradas en la interfase, lo que permitía concentrarlas un gran número de veces.

Este método resultó muy útil en la purificación, ya que además de concentrar 100 veces aproximadamente, nos permitía obtener las colas de fago sin deteriorar y sin contraer; esto último era posiblemente debido a que eran resuspendidas en presencia de sulfato magnésico 2 mM.

Precipitación con sulfato amónico

Los resultados obtenidos por observación al microscopio electrónico del precipitado y del sobrenadante obtenidos tras la adición de sulfato amónico al 40% de saturación, revelaron que las partículas similares a colas de fago aparecían en la primera fracción. Sin embargo, este método resultó menos ventajoso que la concentración por el sistema PEG-DSNa, ya que, por un lado, la concentración conseguida era inferior, y, por otro lado, las partículas aparecían contraídas y sin placa basal, posiblemente por efecto de la fuerza iónica. Esto nos hizo descartar este procedimiento de purificación y concentración.

Diálisis

La observación al microscopio electrónico del contenido de los tubos de diálisis que habían sido sumergidos en tampón durante 48 h. reveló que las colas de fago, que quedaban dentro de los tubos, presentaban un aspecto idéntico al de las muestras no dializadas, y en igual número. Esto era de esperar ya que estas partículas tienen un peso molecular superior a 12000 daltons; no obstante, podrían haberse contraído o haber perdido algunas de sus partes.

Este método ha sido utilizado varias veces a lo largo de todo el proceso de purificación para eliminar sustancias iónicas, como el ClK, o no iónicas, como la sacarosa.

Adsorción sobre carbón activado

A sobrenadantes líticos de M. coralloides D se les adicionó carbón activado de Merck al 3% y la mezcla se mantuvo en agitación durante 10 min. a temperatura ambiente. A continuación se filtró por papel de filtro. Al observar el filtrado al microscopio electrónico no se pudieron detectar colas de fago, por lo que desechamos esta técnica como método de purificación.

Esquema del proceso de purificación de las partículas similares a colas de fago

De acuerdo con todos los datos suministrados por el empleo de las técnicas anteriormente descritas se elaboró un plan de purificación, que aparece esquematizado en la Figu-

ra 11 y que vamos a comentar a continuación.

Se partía de 5 l de cultivo de M. coralloides D en medio CT 0.5%. Los matraces eran incubados en agitación a 28°C hasta que los cultivos se autolisaban. Una vez lisados se centrifugaban a 54000 g durante 30 min a 4°C. El objeto de centrifugar a tan altas revoluciones era sedimentar los restos de membranas, los cuales, al adicionar el PEG 6000 daban estructuras de mayor tamaño, debido a la capacidad del PEG de fusionar membranas (Ahkong et al., 1975). Estas estructuras membranosas, en muchos casos, envolvían a colas de fago, lo que dificultaba el proceso de purificación.

Una vez centrifugados los cultivos, a los sobrenadantes se les adicionaba PEG 6000 al 10%, dextrano sulfato sódico 500 al 0.2% y ClNa 0.3 M, se dejaban en reposo hasta la separación de las tres fases. La interfase era resuspendida en 50 ml de dextrano sulfato sódico al 1% en tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 6.5 y sulfato magnésico 2 mM, con lo cual se concentraba 100 veces.

El dextrano sulfato en el que se había resuspendido la interfase (cuyo objeto era únicamente facilitar la resuspensión y evitar el deterioro de las colas de fago) era posteriormente precipitado adicionando 0.15 ml de ClK 3 M por cada mililitro de solución. Una vez mezclados se dejaba en reposo durante dos horas, pasadas las cuales se centrifugaba a baja revoluciones durante 10 min. Esto permitía separar el dextrano sulfato sódico precipitado de las colas de fago, que permanecían en el sobrenadante.

A continuación se dializaba durante 24 horas frente a 5 l de tampón fosfato potásico con sulfato magnésico para eliminar el ClK.

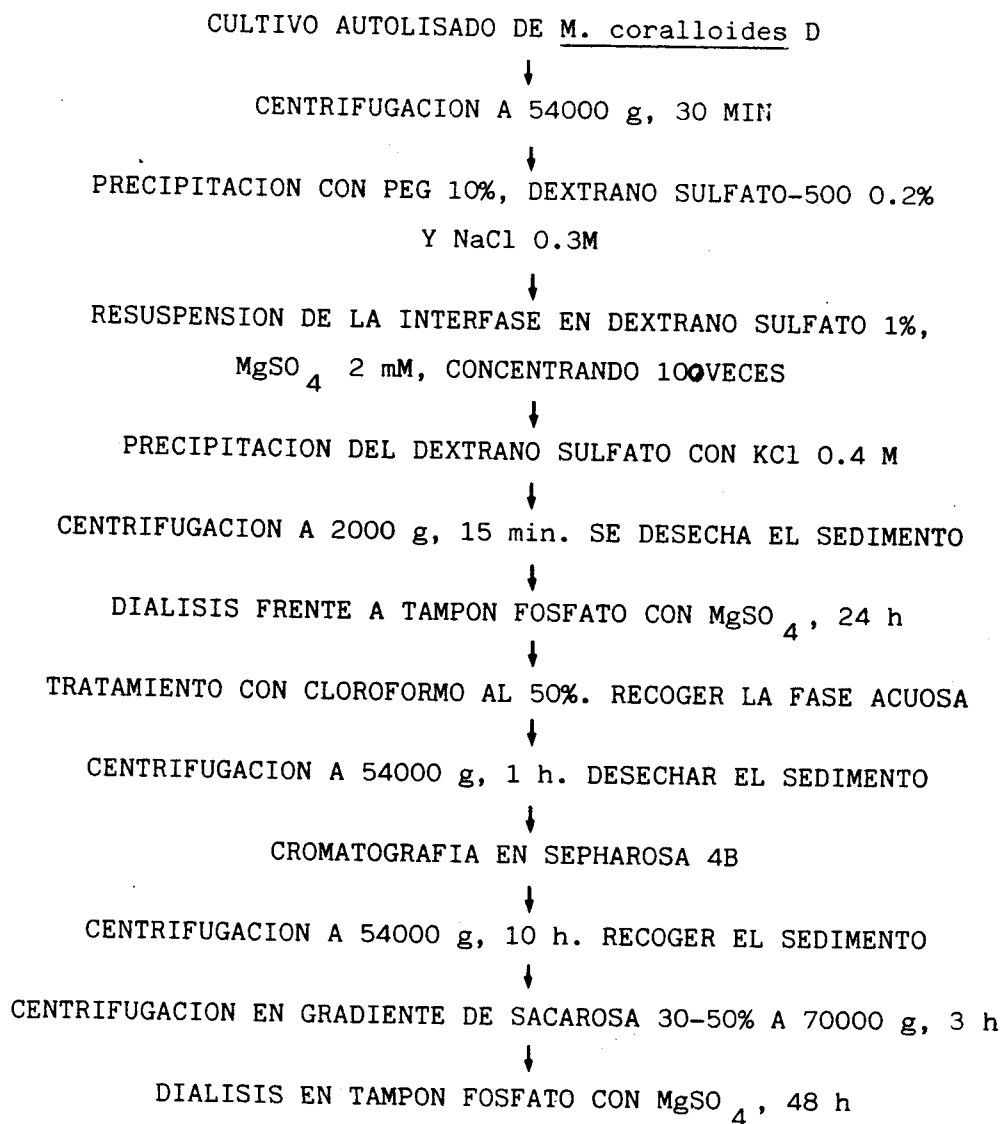
El dializado era entonces tratado con cloroformo al 50%, agitando durante 30 seg. y centrifugando a continuación a 8000 g durante 10 min. para separar las dos fases. Las colas de fago, tal como se observó al microscopio electrónico, quedaban en la fase acuosa, la cual era recogida por pipeteo.

El sobrenadante obtenido era filtrado a través de una columna de Sepharose 4B, la cual era eluida con tampón fosfato potásico con sulfato magnésico. A las fracciones recogidas, que contenían 3 ml, se les medía la absorción a 280 nm y se observaban al microscopio electrónico para ver donde aparecían las colas de fago. En la Figura 12 está representado el diagrama de elución obtenido en la cromatografía. La observación al microscopio electrónico reveló que las colas de fago estaban en el frente, fundamentalmente en las fracciones 23, 24, 25, 26 y 27. En las fracciones inmediatamente anteriores y posteriores (21, 22, 28 y 29) también se podían observar algunas partículas, pero en número muy bajo, por lo que se prefirió desecharlos para evitar la contaminación con otras sustancias.

El hecho de que las colas aparecieran en el frente era de esperar, ya que la sefarosa 4B permite la separación de sustancias cuyo peso molecular está en un rango de peso molecular de 6×10^4 a 20×10^6 , y las colas de fago deben tener un peso molecular superior.

Después de la cromatografía en Sepharose 4B, las colas de fago se habían diluido, ya que el volumen de muestra que se pasaba cada vez era de 5 ml, y al final mezclábamos el contenido de 5 tubos, o sea, recogíamos 15 ml. Por ello, el paso siguiente consistía en una centrifugación a altas revoluciones para sedimentar y concentrar las colas de fago (los

FIGURA 11.- Esquema del proceso de purificación de las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D.



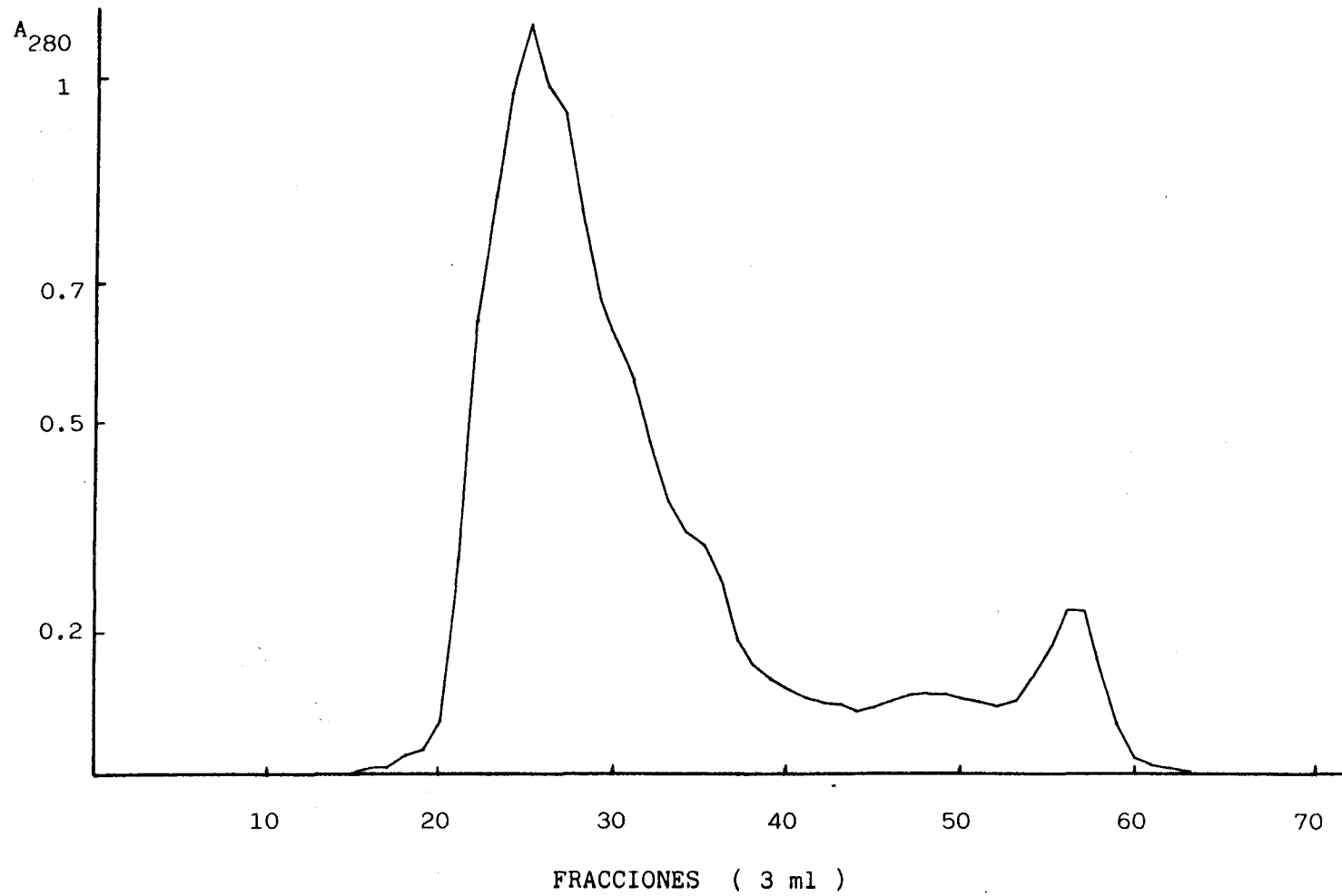


FIGURA 12.- Diagrama de elución obtenido al filtrar las partículas similares a colas de fago por Sepharosa 4B.

50 ml de muestra obtenida tras el tratamiento con PEG-DSNa eran resuspendidos en 5 ml). Antes de la centrifugación, 25 ml de muestra con colas de fago eran colocados en tubos de centrífuga sobre 5 ml de sacarosa al 25%. La centrifugación era realizada a 54000 g durante 10 h a 4°C. El sedimento era resuspendido en en tampón fosfato con sulfato magnésico.

Por último, se preparaba un gradiente de sacarosa entre el 30-50% en un tubo de centrífuga y sobre él se colocaban 0.5 ml de la muestra con las colas de fago concentradas. La centrifugación era realizada en un rotor basculante a 70000 g durante 3 h a 4°C. Una vez finalizada la centrifugación se recogían las diferentes capas y se observaban al microscopio electrónico, encontrándose que las colas de fago aparecían en la capa correspondiente al 40% de sacarosa.

Para eliminar la sacarosa se hacía una diálisis frente a tampón fosfato con sulfato magnésico durante 48 h.

Una vez purificadas las partículas similares a colas de fago se procedió al estudio de la composición química y actividad.

ANALISIS DE LA COMPOSICION QUIMICA DE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

Una vez terminado el proceso de purificación descrito se procedió al estudio de la composición química de las colas de fago.

Determinación de proteínas

La determinación del contenido proteico de las muestras purificadas se realizó por el método colorimétrico de Lowry. La absorbancia de las muestras, leída a 630 nm, era de 0.516. Este valor de absorbancia se correspondía con una concentración de proteínas de 182 $\mu\text{g/ml}$, el cual fue obtenido a partir de una curva patrón obtenida con albúmina.

Determinación de ADN

Antes de estudiar si las colas de fago contenían ADN se trataron con formamida para extraer el posible ácido nucleico.

La determinación de ADN por el método de la difenilamina dio resultado negativo. Esto era de esperar, debido a la ausencia de cabezas.

Determinación de ARN

La determinación de ARN se realizó aplicando el método del orcinol a muestras de colas de fago purificadas y a muestras tratadas con formamida. En ambos casos, las medidas de absorbancia de la muestra fueron nulas.

EFFECTO DE LOS AGENTES FISICOS Y QUIMICOS SOBRE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO

Estabilidad frente al calor

Para ensayar la estabilidad de las colas de fago frente al calor, muestras de partículas fueron sometidas durante 15 y 30 min. a temperaturas de 50, 75 y 100°C. Para el ensayo del efecto de las bajas temperaturas y de la congelación, se dejó una muestra a 4°C durante una semana y 48 h. a -18°C, respectivamente. Una vez alcanzada nuevamente la temperatura ambiente, se prepararon rejillas de todas las muestras y se observaron al microscopio electrónico.

Los resultados obtenidos, que aparecen en la Tabla 2, muestran que 50° durante 30 min. no tenían prácticamente ningún efecto, solamente algunas partículas se contraían (Figura 13). Sin embargo, a 75°C durante 15 min., el tubo se disociaba en sus proteínas estructurales, quedando unicamente la vaina contraída unida a la placa basal (Figura 14). Las muestras mantenidas a 100°C durante 15 no contenían ninguna cola de fago.

Las bajas temperaturas, e incluso la congelación, no tenían ningún efecto sobre las colas de fago, por lo que pueden ser conservadas perfectamente congeladas o en el frigorífico durante bastante tiempo.

Estabilidad frente al pH

Para este ensayo, muestras de partículas en tampón fosfato pH 6.5 fueron llevadas a pH 2 y 10 adicionando ClH

TABLA 2.- Efecto del calor sobre las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D.

Tratamiento	partículas distendidas	partículas contraídas
Congelación (-18°C)	+	-
4°C, 1 semana	+	-
50°C, 15 min.	+	+
50°C, 30 min	+	+
75°C, 15 min	-	+
75°C, 30 min	-	+
100°C, 15 min	-	-
100°C, 30 min	-	-

+ , indica que se observan partículas

- , indica que no se observan partículas



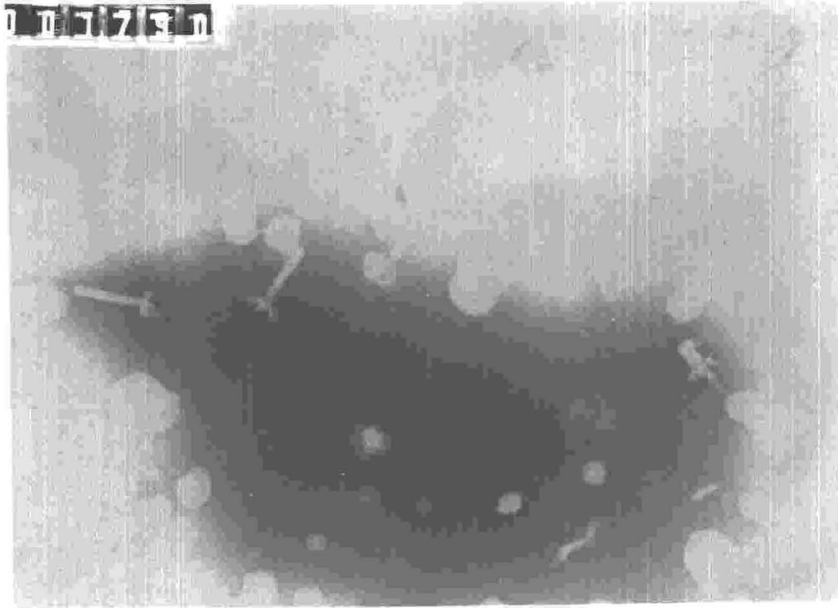


FIGURA 13.- Partículas similares a colas de fago contraídas y distendidas aparecidas tras el tratamiento a 50°C. PTA. 180.000x.

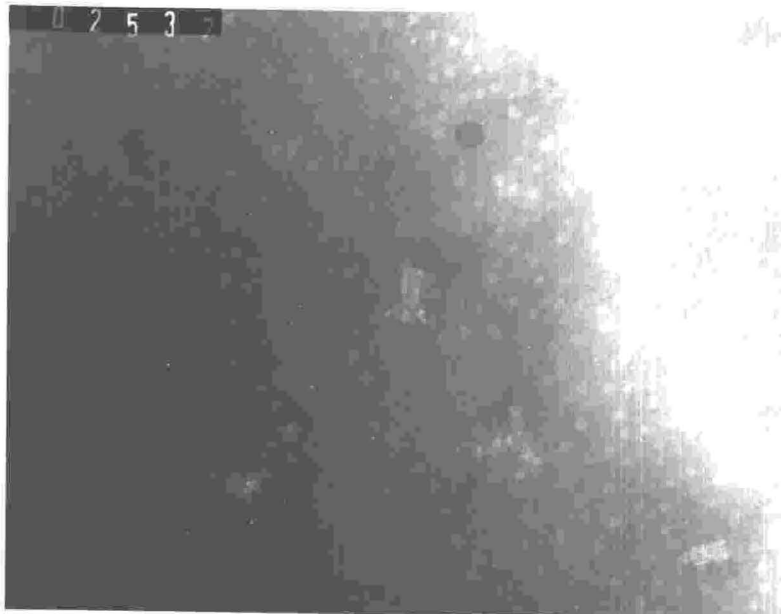


FIGURA 14.- Partículas similares a colas de fago que han perdido el tubo por acción de la temperatura. PTA. 220.000x.

TABLA 3.- Efecto del pH sobre las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D .

Tratamiento	Partículas distendidas	Partículas contraídas
pH 2	-	-
pH 6.5	+	-
pH 10	-	+

+ , indica que se observan partículas

- , indica que no se observan partículas

y KOH, respectivamente, y se dejaron en reposo durante 4 h. En el caso del pH 2 aparecían gran cantidad de materiales precipitados, que eran retirados por centrifugación.

La observación al microscopio electrónico reveló que las partículas eran estables a pH 6.5; se dissociaban a pH ácido; y a pH básico, la mayoría perdía el tubo y la placa basal, quedando únicamente la vaina contraída (Tabla 3).

Efecto de los enzimas proteolíticos

En este ensayo, a muestras con partículas fágicas defectivas se les adicionó pronasa (Calbiochem), proteasa (Sigma) y tripsina (Merck), a concentración de 1 mg/ml, y se incu-

baron durante 4 h. a 28°C el primero y 37°C los dos últimos. Tras dicho tiempo de incubación, se prepararon rejillas y se observaron al microscopio electrónico.

Los resultados obtenidos revelaron que las partículas fágicas defectivas eran resistentes a la acción de estos tres enzimas proteolíticos.

Efecto de la fuerza iónica

Para este ensayo se ha utilizado ClK, que produce, según su concentración, diferente fuerza iónica sin modificar el pH. El experimento se realizó adicionando a la muestra ClK hasta conseguir concentraciones de 0.1, 0.25, 0.5, 0.75 y 1M.

Los resultados obtenidos por observación al microscopio electrónico reveló que la fuerza iónica correspondiente a 0.1 M y 0.25 M de ClK no afectaba para nada a las partículas. Con ClK 0.5 M se contraía la mayoría y a 0.75 y 1 M se contraían todas (Tabla 4). En ningún caso se observaron partículas sin tubo o sin placa basal.

Efecto de los agentes desnaturizantes

La observación al microscopio electrónico de muestras tratadas con urea a concentraciones de 1, 2 y 4 M reveló que este agente desnaturizante tenía un efecto similar al del pH básico: las partículas se contraían, incluso con la concentración más baja y aparecían bastantes sin tubo ni placa basal, sólo la vaina contraída.

TABLA 4.- Efecto de la fuerza iónica sobre las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D .

Tratamiento	Partículas distendidas	Partículas contraídas
KCl 0.1M	+	-
KCl 0.25M	+	-
KCl 0.5M	+	+
KCl 0.75M	-	+
KCl 1M	-	+
sin KCl	+	-

+ , indica que se observan partículas

- , indica que no se observan partículas.

Efecto de los agentes quelantes

El efecto del EDTA era independiente de la concentración de este agente utilizado (1, 2, 5 y 10 mM). En todos los casos se producía la contracción de la mayoría de las partículas, y algunas perdían la placa basal, pero no el tubo (Figura 15). Este efecto debe estar relacionado con la sustracción de Mg por el EDTA.

Efecto de los detergentes

Para este ensayo se utilizó Tritón X-100 (Sigma) y lauril sulfato sódico (Sigma), a concentraciones de 0.01, 0.1 y 1%.

Los resultados obtenidos al microscopio electrónico revelaron que las partículas similares a colas de fago son muy sensibles a ambos detergentes, ya que no se pudieron detectar ni en aquellos tubos en los que se había puesto la concentración más baja.

En la Tabla 5 aparece un resumen del efecto de los diferentes agentes físicos y químicos ensayados.

ENSAYO DE ACTIVIDAD DE LAS PARTICULAS SIMILARES A COLAS DE FAGO FRENTE A OTRAS MIXOBACTERIAS

Como ya se mencionó en el capítulo de Introducción, algunos fagos defectivos con morfología parecida a colas de fago tienen actividad biológica, siendo el caso más conocido el de las piocinas R producidas por Pseudomonas aeruginosa. Por esta razón, era obligado estudiar si las partículas simila-

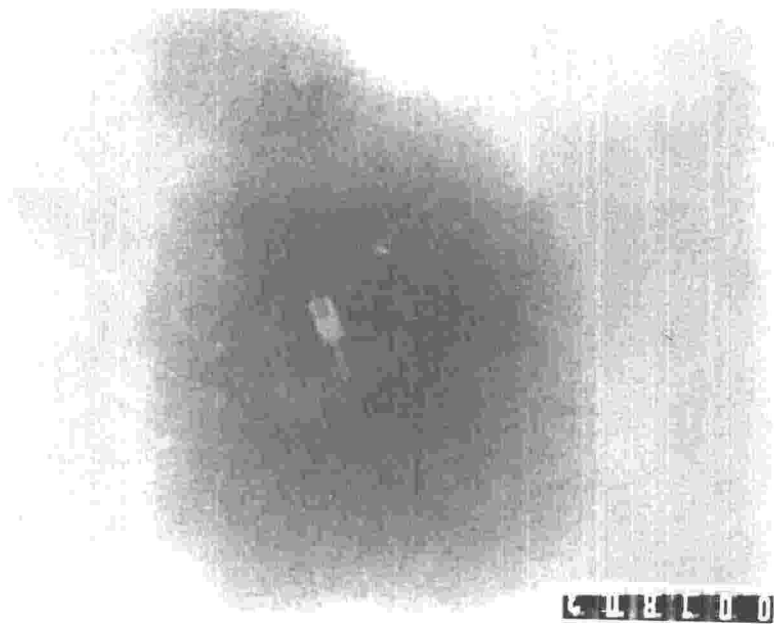


FIGURA 15.- Partículas similares a colas de fago contraídas que han perdido la placa basal por efecto del EDTA. PTA. 220.000x.

TABLA 5.- Efecto de los diferentes agentes físicos y químicos sobre las partículas similares a colas de fagos.

Tratamiento	Efecto
Congelación	+
4°C	+
50°C	+
75°C	+
100°C	-
pH 2	-
pH 6.5	+
pH 10	+
Enzimas proteolíticos	+
Fuerza iónica (KCl)	+
Agentes desnaturalizantes	+
Agentes quelantes	+
Detergentes	-

+ , indica que las partículas similares a colas de fago o alguno de sus componentes soportan el tratamiento.

- , indica que las partículas son sensibles a ese tratamiento.

TABLA 6.- Espectro de actividad de las partículas similares a colas de fago sobre otras mixobacterias.

Bacteria	Razas ensayadas	sensibles	resistentes
<u>M. coralloides</u>	2	1	1
<u>M. xanthus</u>	3	2	1
<u>M. virescens</u>	2	1	1
<u>M. fulvus</u>	1	1	0

res a colas de fago producidas por M. coralloides D tenían actividad biológica.

Las pruebas de actividad se realizaron poniendo gotas de 5 μ l de suspensión purificada de colas de fago sobre placas de Petri que llevaban una doble capa de agar inoculada con las bacterias a ensayar. Las placas eran incubadas a 28°C y a los dos días podían leerse los resultados.

En el ensayo se utilizaron razas pertenecientes a las especies M. coralloides, M. xanthus, M. virescens y M. fulvus. Los resultados obtenidos aparecen en la Tabla 6, en la que se observa que las partículas similares a colas de fago son capaces de inhibir el crecimiento de varias de las razas

probadas.

Para comprobar si las partículas similares a colas de fago se habían multiplicado sobre alguna de las bacterias sensibles, se picó de los halos de inhibición del crecimiento con un asa de platino y se pasó a cultivos en crecimiento exponencial de las bacterias inhibidas. Las medidas de D.O. de los cultivos tratados y de los controles correspondientes revelaron que no existían diferencias apreciables entre unos cultivos y otros. Pasadas 24 h. de incubación se centrifugaron todos los tubos y se ensayó la actividad de los sobrenadantes sobre las mismas bacterias de las que se habían obtenido. Después de dos días de incubación se observó que dichos sobrenadantes no inhibían el crecimiento de la mixobacteria en cuestión.

Esta prueba permitía incluir las partículas producidas por M. coralloides D dentro de los bacteriófagos defectivos, ya que no pueden multiplicarse sobre ninguna de las bacterias sensibles.

INMUNIDAD DE M. coralloides D A LAS PARTICULAS FAGICAS DEFECTIVAS QUE PRODUCE

Cuando la prueba de actividad biológica de las partículas similares a colas de fago se realizó utilizando M. coralloides D como bacteria de prueba, se obtuvo que la mixobacteria era resistente a las partículas que produce.

INTENTOS DE AISLAMIENTO DE FAGOS ESPECIFICOS PARA M. coralloides

Los intentos de aislamiento de fagos para M. coralloides D se realizaron utilizando dos métodos de enriquecimiento, uno en medio líquido y otro en medio sólido.

Enriquecimiento en medio líquido

El aislamiento de fagos para M. coralloides D ha sido intentado a partir de muestras de suelos de cultivo abonados y de suelos cercanos a estiércol y otros materiales en descomposición, recogidas en diferentes puntos de las provincias de Granada y Jaén.

Las muestras eran trituradas en un mortero, adicionando tampón fosfato potásico 0.01 M, pH 6.5 con cloruro cálcico 5 mM y sulfato magnésico 8 mM, hasta obtener una mezcla homogénea bastante líquida, que era dejada en reposo durante 4-5 h. para que sedimentaran los materiales más pesados. El líquido en exceso, decantado, centrifugado y filtrado, era utilizado para el enriquecimiento.

A cultivos de M. coralloides D en crecimiento exponencial se les adicionaban los diferentes filtrados de suelo en proporción 1:1 y se incubaban en agitación durante 48 h a 28°C para que los fagos pudieran multiplicarse. Pasado el tiempo de incubación, los cultivos eran tratados con cloroformo al 10% y centrifugados.

Para comprobar si había tenido lugar enriquecimiento se pusieron gotas de 5 µl de los diferentes sobrenadantes obtenidos sobre placas de Petri inoculadas con M. coralloides D. Las placas eran incubadas a 28°C durante dos días.

Los resultados obtenidos fueron negativos para todas las muestras de suelo recogidas, ya que no sólo no se pudo detectar inhibición del crecimiento de M. coralloides D, sino que, en aquellos puntos donde se habían colocado las gotas, se observaba un mayor crecimiento de la mixobacteria. Esto posiblemente sea debido a alguna sustancia presente en el extracto de suelo que favorece el crecimiento de M. coralloides D.

Esta misma experiencia de enriquecimiento de las muestras de suelo fue realizada utilizando otra mixobacteria, una raza de M. virescens aislada en nuestro laboratorio. En este caso, cuando gotas de los extractos enriquecidos sobre M. virescens fueron colocadas sobre placas inoculadas con dicha mixobacteria, sí pudo observarse inhibición del crecimiento a los días de incubación. La inhibición del crecimiento era debida a la presencia de fagos virulentos y moderados, los cuales pudieron ser aislados posteriormente a partir de los extractos de suelo.

Enriquecimiento en medio sólido

Ya que son bastantes los casos conocidos de fagos que no pueden enriquecerse, o lo hacen mal, cuando la bacteria crece en medio líquido, debido a que no se adsorben, se pensó que en el caso de M. coralloides D podría suceder algo parecido y que por eso en la experiencia descrita anteriormente no pudieron detectarse halos de inhibición. Esto nos llevó a realizar otra experiencia, en la que el enriquecimiento se hacía en medio sólido.

En este caso se adicionaban los cultivos de M. coralloides D a las muestras de suelo, tal como se habían recogido de la tierra, e incubaban a 28°C durante 48 h. Pasado este tiempo se trituraban las muestras con tampón fosfato, cloruro cálcico y sulfato magnésico, igual que en el caso anterior, y se recogían los sobrenadantes.

Cuando los distintos sobrenadantes se ensayaron sobre M. coralloides D se obtuvieron los mismos resultados que en el enriquecimiento en medio líquido. Por tanto, no ha sido posible aislar fagos para M. coralloides D.

Este mismo procedimiento se utilizó con M. virescens para comprobar la efectividad del método. Los resultados fueron también los mismos que en el caso anterior, o sea, aparecían halos de inhibición que eran producidos por fagos líticos y lisogénicos.

EFFECTO DE LOS FAGOS DE OTRAS MIXOBACTERIAS SOBRE M. coralloides

Es conocido que los fagos aislados para algunas mixobacterias pueden multiplicarse sobre mixobacterias de especies diferentes (Ver Introducción). Es, por ejemplo, el caso del fago Mx-1 de M. xanthus (Tsopanakis y Parish, 1976) y el del fago ØV, aislado a partir de M. virescens V2 tras exponer la bacteria 9 veces consecutivas a la luz ultravioleta (Brown et al., 1976 a).

Esto nos llevó a probar si los fagos de otras mixobacterias podían multiplicarse sobre M. coralloides D. Los fagos ensayados fueron: Mx1hrv, Mx8cp2, Mx-4 y cuatro fagos de M. virescens aislados por nosotros mediante los procedimientos descritos en los dos apartados anteriores. Estos fagos los hemos denominado Mv1g1, Mv1g2, Mv8g1 y Mv8g2, siguiendo una terminología similar a los de M. xanthus.

En el ensayo se ponian gotas de 5 μ l de los diferentes fagos, cuyo título oscilaba entre 10^{10} - 10^{11} unidades formadoras de placas por mililitro, sobre placas de Petri con una doble capa de agar inoculada con M. coralloides D.

En este caso tampoco se pudo detectar inhibición del crecimiento de M. coralloides D por ninguno de los siete fagos ensayados.

ADSORCION DE LOS FAGOS DE M. virescens SOBRE M. coralloides D

A pesar de los resultados negativos obtenidos en las anteriores experiencias, nos resistiamos a creer que no existieran fagos para M. coralloides D. Y en caso de que así fuera ¿qué características especiales posee M. coralloides D para no tener fagos específicos? ¿Estaria el problema a nivel de los receptores? ¿seria debido a enzimas de restricción? ¿Le confiere lalisogenia con un fago defectivo inmunidad a la infección por otros fagos?. Para resolver estas preguntas, en primer lugar, se utilizaron los fagos de M. virescens aislados, por nosotros, para hacer pruebas de adsorción sobre M. coralloides D.

Para ello se adicionaron los fagos de M. virescens a cultivos de M. coralloides, en proporción de un fago por cada diez bacterias aproximadamente, y se incubaron a 28°C en agitación, durante 30 min. Transcurrido este tiempo los cultivos eran tratados con cloroformo al 10% y centrifugados. Los sobrenadantes recogidos erantitulados para conocer el número de fagos no adsorbidos y, a partir de este dato, el tanto por ciento de adsorción. Como testigos se utilizaron tubos con medio de cultivo a los cuales se les adicionaba la misma cantidad de fago y se les daba el mismo tratamiento que al resto.

TABLA 7.- Adsorción de los fagos de M. virescens sobre M. coralloides D .

	Mv1g1	Mv1g2	Mv8g1	Mv8g2
Título de fagos adicionados	1.14×10^7	4.0×10^7	6.0×10^7	2.46×10^7
Título de fagos no adsorbidos	1.0×10^7	3.5×10^7	2.9×10^7	2.5×10^7
Título de fagos adsorbidos	1.0×10^6	5.0×10^6	3.2×10^7	1.0×10^4
% de adsorción	9.2	12.5	52.36	0.04

Título expresado como nº de fagos / ml

TABLA 8.- Adsorción de los fagos aislados para M. virescens sobre esta mixobacteria.

	Mv1g1	Mv1g2	Mv8g1	Mv8g2
Título de fagos adicionados	1.14×10^7	4.0×10^7	6.0×10^7	2.46×10^7
Título de fagos no adsorbidos	1.31×10^6	2.1×10^6	9.57×10^5	5.6×10^6
Título de fagos adsorbidos	1.0×10^7	3.79×10^7	5.11×10^7	1.9×10^7
% de adsorción	88.5	94.75	84.23	77.24

Título expresado como nº de fagos / ml

Paralelamente se hizo la misma experiencia con M. virescens para conocer el tanto por ciento de adsorción de esos fagos sobre esta bacteria y, poder así, comparar con la adsorción obtenida sobre M. coralloides D. Los resultados de la adsorción de fagos sobre M. coralloides D están indicados en la Tabla 7. Como puede verse, de los cuatro fagos, el Mv8g1 presenta un 50% de adsorción; el Mv1g1 y el Mv1g2 tienen una adsorción del 10% aproximadamente; el Mv8g2, muestra un tanto por ciento de adsorción despreciable. Sobre M. virescens por el contrario, todos tienen una adsorción superior al 75% (Tabla 8).

A la vista de estos resultados podemos afirmar que la incapacidad para aislar fagos de M. coralloides D no se debe a un problema de receptores, ya que, de cuatro fagos probados, uno presenta una adsorción del 50%. Había que pensar, por tanto, en endonucleasas de restricción u otro tipo de DNAsas, o en inmunidad conferida por el estado lisogénico en que se encuentra M. coralloides D. Este último punto resultó particularmente atractivo ya que el fago Mv8g1 produce placas turbias sobre M. virescens .

BUSQUEDA DE RAZAS DE M. coralloides D NO PRODUCTORAS DE COLAS DE FAGO

Para poder comprobar si el estado lisogénico en que se encuentra M. coralloides D le confiere inmunidad a la infección por otros fagos se intentó obtener una raza que no produjera colas de fago, lo que permitiría realizar estudios comparativos entre ella y la raza original. Con este fin se utilizaron los dos procedimientos que se describen a continuación.

Tratamiento de M. coralloides D con anaranjado de acridina

A un cultivo de M. coralloides D en crecimiento exponencial se le adicionó naranja de acridina a una concentración de 25 $\mu\text{g/ml}$ y se incubó en agitación a 28°C durante 1 hora. A continuación se centrifugó y se resuspendieron las células en medio nuevo para eliminar el anaranjado de acridina. A partir de este cultivo se hicieron diluciones y se sembraron placas de Petri, que fueron incubadas a 28°C durante dos días. Para conocer si se había conseguido obtener alguna raza no productora de colas de fago se picaron 20 colonias y se pasaron a medio líquido. A los veinte cultivos se les midió la densidad óptica para conocer si existía alguna diferencia en el comportamiento autolítico de alguna de las razas respecto de la original y, una vez lisados, se recogieron los sobrenadantes y se observaron al microscopio electrónico.

Los resultados obtenidos revelaron que las 20 razas presentaban una curva de crecimiento idéntica a la de la raza original, y que en todos los sobrenadantes había partículas similares a colas de fago.

Pases repetidos por CTP

Dado que, cuando M. coralloides D crece en medio líquido (CTP, con 40 mM de fosfato) no se autolisa pero produce partículas similares a colas de fago cuando entra en fase estacionaria, se pensó que quizás podría obtenerse una raza que no produjera colas de fago dándole pases sucesivos a la mixobacteria en este medio, tomando como inóculo un cultivo que llevara dos días en fase estacionaria.

El número de pases efectuados no pudo ser superior a seis ya que en cada nueva resiembra el crecimiento de M.

coralloides D era cada vez más lento y en la séptima dejaba de crecer. Esto posiblemente fuera debido a un envejecimiento progresivo de los cultivos.

Por esta razón, una vez crecido a la mitad de la fase exponencial el cultivo correspondiente a la sexta resiembra, se hicieron diluciones a partir de él y se sembraron placa de Petri, de las cuales se picaron veinte colonias, que fueron pasadas a medio líquido. La observación al microscopio electrónico de los veinte sobrenadantes reveló que en todos había partículas similares a colas de fago.

El hecho de no haber conseguido una raza productora de colas de fago nos impidió confirmar o desechar la hipótesis de la inmunidad conferida por la lisogenia defectiva a M. coralloides D frente a la infección por otros fagos. Se podría pensar que los intentos realizados eran insuficientes, sin embargo, se prefirió no insistir más ya que ninguno de los autores que habían trabajado con fagos defectivos, y habían intentado obtener una raza curada, lo había conseguido (Garro y Marmur, 1970; Hodgson y Rao, 1981) y, además, ya que el único medio de detectar una raza no productora era mediante observación al microscopio electrónico, suponía un trabajo bastante tedioso y caro.

BUSQUEDA DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN DE M. coralloides D

Desde hace algún tiempo es conocido que determinadas razas bacterianas son resistentes a la infección por fagos debido a fenómenos de restricción. En mixobacterias, Morris y Parish (1976) al ensayar el fago Mx1 sobre varias razas de M. xanthus y M. virescens encontraron que la eficacia en la

formación de placas líticas de M. virescens V2 era muy inferior a la de otras razas probadas y que, esta diferencia, era debida a la existencia de dos endonucleasas de restricción que cortaban el ADN del fago Mx1 en varios puntos. Esto nos llevó a estudiar si M. coralloides D poseía enzimas de restricción y si estos jugaban algún papel en la resistencia de esta bacteria a los fagos.

Se partió del sobrenadante de un extracto sonificado de M. coralloides D y se procedió como se indicó en Material y Métodos. Los resultados obtenidos revelaron que en todos los casos, excepto en el testigo, el ADN de λ había sido digerido en su totalidad, independientemente de la concentración de NaCl adicionado. Por tanto en los extractos deben haber DNAsas inespecíficas, capaces de digerir el ADN de λ por completo. No se podía desechar la existencia de endonucleasas de restricción, ya que las nucleasas inespecíficas enmascararían su actividad. Sería necesario realizar algunos pasos de purificación más, para poder confirmar o desechar si existen endonucleasas de restricción.

De cualquier manera se había podido detectar actividad DNasa, que podía tener relación con la resistencia a los fagos mostrada por el M. coralloides D.

ACTIVIDAD DNasa EN M. coralloides D

Para valorar la actividad desoxirribonucleásica total que posee M. coralloides D se tomó el sobrenadante de un extracto sonificado de M. coralloides D, que había sido obtenido resuspendiendo 2.61 g de células (peso húmedo) en 12 ml de tampón Tris-HCl 10 mM, MgCl₂ 10 mM, pH 8.

El ensayo de DNasa se realizó por el procedimiento

TABLA 9.- Actividad DNasa de los extractos de M. coralloides D
obtenidos por sonicación.

Tiempo de incubación	mg de ADN digerido
5	1.92
10	1.98
15	2.012
20	2.004
25	2.008
30	1.996
35	1.996
40	2.0
45	1.984
50	1.988
55	1.984
60	2.016

descrito en Material y Métodos, y tomando como tiempos de incubación 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos.

Los resultados obtenidos al valorar el ADN digerido por el método de la difenilamina se expresan en la Tabla 9. Como puede observarse, en cinco minutos es digerido prácticamente todo el ADN que había sido puesto (2 mg).

ACTIVIDAD DNasa EN EL ESPACIO PERIPLASMICO DE *M. coralloides* D

Ya que en mixobacterias las DNasas (al menos las endonucleasas de restricción) se encuentran localizadas en el espacio periplásmico (Mayer y Reichenbach, 1978) se procedió a estudiar si las DNasas de *M. coralloides* D presentaban también esta localización.

Para ello se utilizó el método de Mayer y Reichenbach (1978), que se describió en Material y Métodos, el cual permite disolver la membrana externa de la mixobacteria mediante tratamiento con Tritón X-100, 2-mercaptoetanol y EDTA, y posterior homogenización, liberándose el material del espacio periplásmico.

En este caso, y con objeto de poder comparar los resultados que se obtuvieran con los ya disponibles e indicados en el apartado anterior, se partió también de 2.61 g de células y se resuspendieron en 12 ml de tampón con Tritón, EDTA y mercaptoetanol. La valoración de DNasas se realizó de la misma manera que en el caso anterior. Los resultados obtenidos están expuestos en la Tabla 10. Como puede observarse, en los primeros cinco minutos son digeridos 1.15 mg de ADN, lo que supone el 60%, aproximadamente, de la cantidad digerida por los extractos obtenidos por sonicación.

TABLA 10.- Actividad DNasa del material periplásmico de
M. coralloides D .

Tiempo de incubación	µg de ADN digerido
5	1150
10	1442
15	1766
20	1868
25	2008
30	2020
35	2020
40	1988
45	2000
50	2008
55	2012
60	2004

Ya que cinco minutos son suficientes para digerir más de la mitad del ADN que se había puesto, podría esperarse que en 10 minutos hubiera sido digerido todo el ADN; sin embargo, son necesarios entre 20 y 25 minutos para que esto ocurra. Esta diferencia puede atribuirse a la existencia de más de un tipo de DNasa y al método de valoración. Si suponemos que en el extracto hay exonucleasas y endonucleasas, en los primeros momentos de contacto entre enzimas y ADN aparecerían tres tipos de productos: nucleótidos aislados, trozos de ADN de pequeño tamaño y trozos de ADN de gran tamaño. Antes de valorar el ADN digerido se trata con ácido tricloroacético, el cual solamente precipita los trozos de ADN grandes, pero no los pequeños. Por tanto, cuando valoramos el ADN digerido, como el método de la difenilamina lo que determina es la cantidad de desoxirribosa, se están valorando tanto los trozos de ADN pequeños como los nucleótidos libres. Cuando el tiempo de contacto se prolonga, parte de los enzimas (preferentemente las exonucleasas) actuarán sobre los trozos de ADN pequeño dando nucleótidos libres. En la siguiente valoración ésta acción quedaría enmascarada ya que en la anterior valoración esos trozos pequeños de ADN habían sido considerados como digeridos totalmente.

ACTIVIDAD DNasa EXTRACELULAR DE *M. coralloides* D

Se estudió, además, si el *M. coralloides* D libera DNasas a los sobrenadantes de cultivo. Esto nos permitiría conocer mejor las ventajas que proporcionan las DNasas a *M. coralloides* D. Si las nucleasas están solamente ligadas a las células sería necesario que el ADN entrara en contacto con las bacterias para que las DNasas ejercieran su acción. Sin

embargo, si hubiese además DNasas extracelulares, M. coralloi- loides D podría obtener un mayor provecho, ya que su capacidad de digerir ADN tendría un radio de acción mucho más extenso.

Con este objeto se hizo un ensayo de DNasas, igual que en los dos casos anteriores, utilizando los sobrenadantes de cultivos en crecimiento exponencial de M. coralloides D. Los resultados obtenidos fueron negativos, incluso después de un tiempo de incubación de 60 minutos.

ACTIVIDAD DNasa DE M. virescens

Para poder afirmar que la actividad DNasa detectada en M. coralloides D era la responsable de la incapacidad de aislar fagos específicos para esta mixobacteria, era necesario conocer la actividad DNasa que podía ser detectada en los sobrenadantes, espacio periplásmico y extractos sonicados de alguna mixobacteria sensible a los fagos.

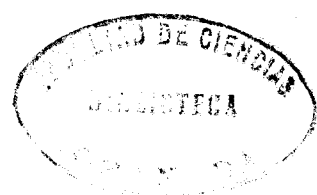
Para ello se determinó la actividad DNasa extracelular, periplásmica y total de la raza de M. virescens frente a la que se habían podido aislar fagos de la naturaleza. Los resultados obtenidos revelaron que no existía ninguna actividad en los sobrenadantes de cultivo ni en el espacio periplásmico. En los extractos sonicados, por el contrario, sí se detectaba una ligera actividad (Tabla 11). Sin embargo, era muy inferior a la de M. coralloides D.

Esto apoyaba nuestra hipótesis sobre la relación entre fagos y actividad DNasa.

TABLA 11.- Actividad DNasa de los extractos de M. virescens
obtenidos por sonicación.

Tiempo de incubación	mg de ADN digerido
15	0.085
30	0.12
45	0.14
60	0.16

DISCUSION



En el capítulo anterior se han expuesto los resultados obtenidos durante la realización de este trabajo y, al mismo tiempo, han sido comentados más o menos extensamente, por lo que en este apartado de Discusión sólo vamos a hacer un repaso breve de dichos resultados, intentando hacerlos más homogéneos.

En primer lugar, como hecho más sobresaliente, está la aparición de partículas de un fago defectivo en los sobrenadantes de cultivos lisados de M. coralloides D. Estas partículas, al no tener ADN ni cabeza, pueden ser incluidas en el grupo III de la clasificación de los bacteriófagos defectivos propuesta por Garro y Marmur (1970), que recoge a las partículas similares a colas de fago; y dentro de éstas, al grupo I de la clasificación de Lotz (1976), que engloba a las partículas similares a colas de fago con vaina.

Cuando se estudió la producción de las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D en medio CT 0.5%, medio en el que normalmente es mantenida esta mixobacteria, se encontró que la inducción espontánea del profago tenía lugar cuando los cultivos alcanzaban la fase estacionaria y que se liberaban a los sobrenadantes cuando las células se autolisaban. Debido a que la fase estacionaria es bastante corta, se pensó que quizá existiera algún tipo de relación entre producción de partículas y autólisis. Las colas de fago podrían ser las causantes de la lisis de los cultivos, hecho que ha sido descrito en otras especies productoras de fagos defectivos, o bien podría ser que la inducción de las partículas ocurriera como una consecuencia más de todo el proceso autolítico, sin que fueran las responsables directas de la

lisis.

Para dilucidar esta relación se estudió la producción de partículas en otros medios de cultivo, tales como CT 1%, CT 2%, CT sin fosfato y CTP. En los tres primeros medios, los resultados obtenidos fueron los mismos que en CT 0.5%, lo que apoyaba la hipótesis de una relación entre lisis y partículas, ya que M. coralloides presenta en estos medios una fase estacionaria aún más corta que en CT 0.5%. Sin embargo, los estudios realizados sobre producción en CTP, medio en el que M. coralloides muestra una fase estacionaria muy larga, revelaron que las partículas eran producidas cuando los cultivos entraban en la fase estacionaria, como sucedía en los demás medios líquidos. Por tanto, las partículas similares a colas de fago no serían la causa de la autólisis, ya que si esto fuera así, en medio CTP debería ocurrir lisis, hecho que no sucede. Tampoco la inducción del profago sería una consecuencia del fenómeno autolítico, ya que este fenómeno no tiene lugar en CTP y el profago se induce.

Los resultados obtenidos en CTP eran lo suficientemente concluyentes como para considerar la inducción de las partículas fágicas y la autólisis como dos procesos completamente independientes. Sin embargo, creimos necesario comprobar si en aquellos casos en que se inducía la lisis se producían paralelamente partículas similares a colas de fago. Fernandez-Vivas (1983) encontró que los cultivos en fase exponencial de M. coralloides D se lisaban cuando eran tratados con antibióticos que inhiben la síntesis de proteínas y ARN. Ya que en los sobrenadantes lisados por estos antibióticos no se observaban colas de fago, consideramos descartada la hipótesis inicial de nuestro esquema de trabajo que relacionaba las par-

tículas fágicas defectivas con el proceso autolítico.

Estudios realizados en nuestro laboratorio sobre la autólisis a la misma vez que este trabajo de investigación, han proporcionado algunas evidencias sobre las causas que desencadenan este proceso. Los resultados obtenidos por Fernández-Vivas et al., 1985 parecen indicar que la estabilidad celular está condicionada por la síntesis de una o varias proteínas y que el estado energético de la membrana está relacionado con el control de la autólisis.

Los factores que desencadenan la inducción de las partículas similares a colas de fago no son conocidos. Se podría pensar, ya que en medios líquidos la inducción se produce cuando se alcanza la fase estacionaria, que es una consecuencia del agotamiento de los nutrientes. Sin embargo, en medios sólidos no se producen nunca, aún cuando en agar levadura se forman cuerpos fructificantes, para lo que es necesario que las células se encuentren en estado de inanición. Parece ser que la inducción espontánea es algo más específico del crecimiento disperso vegetativo. En la bibliografía no aparecen datos que expliquen el mecanismo de la inducción espontánea de los bacteriófagos defectivos. Además, las condiciones en que han de encontrarse los cultivos para que esto ocurra son muy variadas. En Saprospira (Lewin, 1963) la inducción ocurre antes de que los cultivos alcancen la fase estacionaria. En el caso de Bacillus brevis (Hodgson y Rao, 1981), la inducción se produce sólo en mutantes auxotróficos para varios aminoácidos al crecer en un quimiostato. Otras razas las producen en medio sólido (Ozeki, 1968).

La producción de partículas similares a colas de fago de M. coralloides puede ser también inducida tratando

los cultivos de esta mixobacteria con luz U.V. o mitomicina C, al igual que otros fagos defectivos, bacteriocinas y fagos lisogénicos. Sin embargo, para poder poner de manifiesto la inducción, es necesario lisar las células artificialmente, ya que los fagos no las lisan. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos en medio CTP y confirman la no relación entre lisis e inducción de partículas similares a colas de fago.

La cantidad de partículas que aparece en los cultivos tratados con luz U.V. o mitomicina después de lisar las células con cloroformo es inferior a la que aparece en un sobrenadante lítico normal. Esto puede ser atribuido a tres razones: 1.- En la inducción con luz U.V. y mitomicina C se parte de cultivos al inicio de la fase exponencial de crecimiento, mientras que la inducción espontánea ocurre cuando se alcanza la fase estacionaria, por lo que el número de células en el primer caso es muy inferior al del segundo. 2.- Debido a la formación de grumos, el cloroformo no consigue lisar todas las células del cultivo, por lo que no liberarán todas las células las partículas que contienen. 3.- El tanto por ciento de supervivencia no es del 100%. En el caso de la luz U.V., a 90 J.m^{-2} sólo sobreviven el 0.09% de las células irradiadas.

El tratamiento de los cultivos de M. coralloides D con luz U.V. o mitomicina presenta una serie de particularidades. Cuando los cultivos tratados se incuban en medio líquido, las células se agrupan, originando agregados que pueden observarse a simple vista y las células que aparecen aisladas tienen una longitud 4-5 veces superior a la de las células de los cultivos no tratados. La explicación del primer fenómeno puede estar en el modo de vida de las mixobacterias. Estos

microorganismos suelen vivir en comunidad, íntimamente relacionados entre sí, por lo que a veces es difícil conseguir que crezcan de forma dispersa. Quizá la luz U.V. y la mitomicina induzcan algún mecanismo de conexión celular que estuviera inhibido en la raza de crecimiento disperso. En relación con la elongación de las células, en E. coli es conocido que los agentes que dañan el ADN o que interfieren con la replicación inducen una serie de respuestas fisiológicas, denominadas respuesta SOS, entre las que se encuentran la filamentación, debido a la inhibición de los genes responsables de la formación del septo (Walker, 1985). Esto nos ha llevado a pensar que quizá en M. coralloides D se induzca también esta respuesta SOS, desencadenada por los daños ocasionados por la luz U.V. y la mitomicina.

Las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D han sido purificadas utilizando un procedimiento similar al seguido en el caso de otros fagos y fagos defectivos (Hodgson y Rao, 1981; Maniatis et al., 1982). La precipitación con polietilenglicol es un método ampliamente utilizado en la purificación de fagos y fagos defectivos, ya que permite concentrar 100 veces aproximadamente y obtener precipitados muy libres de impurezas, ya que la mayoría de las sustancias de la muestra no precipitan. El fundamento de la precipitación con PEG no está aclarado. Yamamoto et al. (1970), al estudiar la precipitación de varios fagos utilizando diferentes concentraciones de los diferentes tipos de PEG a concentración variable de ClNa, encontraron que el PEG 6000 era el más efectivo para purificar fagos y que las partículas asimétricas eran más susceptibles a la acción de este agente que las simétricas, por lo que parece ser que en el mecanismo de precipita-

ción juega un papel muy importante la forma de la partícula a precipitar.

Del resto de los métodos empleado en la purificación, centrifugación diferencial, centrifugación en gradiente de sacarosa, cromatografía en Sepharose 4B, diálisis, etc., no hay nada especial que sea objeto de discusión.

El estudio de la composición química de las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D reveló que estaban constituidas solamente por proteínas, no habiendo podido detectarse ni ADN ni ARN. Estos resultados eran de esperar, ya que las partículas similares a colas de fago, al carecer de cabeza, no contienen ácido nucleico (Lotz, 1976). Algunos autores han descrito o especulado sobre la existencia de ADN o ARN en partículas similares a colas de fago. Bradley y Dewar (1966), creían que las partículas con vaina distendidas contenían algún trozo de ácido nucleico, ya que al microscopio electrónico la parte de la cola cercana a la placa basal no se teñía. Sin embargo, Simon y Anderson (1967), estudiando la placa basal de los fagos T2 y T4 encontraron que las colas de los fagos estaban taponadas por ese extremo. Esto hace que en las partículas similares a colas de fago, la solución utilizada en la tinción sólo pueda penetrar por uno de los extremos, y al difundir mal, se queda la zona opuesta al punto de entrada sin teñir. En las colas contraídas, todo el interior aparece teñido porque durante la contracción se libera el tapón y el colorante puede penetrar por ambos extremos. Correl y Lewin en 1964 describieron que los rhapsosomas de Saprospira grandis contenían un 70% de proteínas y un 30% de ARN. Sin embargo, Delk y Dekker (1972) encontraron que la proporción de ARN detectada era debida a que las partículas no estaban

suficientemente purificadas. En preparaciones completamente puras no se detectaba ARN.

Respecto a las propiedades físicas y químicas de las partículas similares a colas de fago, son bastante parecidas a las que muestran otras colas de fago y fagos, en general. Quizá el hecho más significativo en relación con los agentes físicos y químicos sea que, aunque la mayoría de ellos no disocian las partículas en sus proteínas estructurales, gran parte de ellos, incluso a concentraciones muy bajas, provocan la contracción de la vaina. Otra peculiaridad es que no todos los componentes de las partículas, vaina, tubo y placa basal, son igualmente sensibles a un mismo agente. Las estructuras más sensibles son el tubo y la placa basal; las vainas son más resistentes. Por ejemplo, el tubo es especialmente sensible a la temperatura, de manera que a 75°C durante 15 min. se desnaturaliza, mientras que la vaina y la placa basal no son afectadas, si se exceptúa que la vaina se contrae. La placa basal, por su parte, es el componente de las colas de fago más sensible a la acción de los agentes quelantes. El tubo y la placa basal son igualmente sensibles a la acción del pH básico y de los agentes desnaturalizantes. Estas diferencias en sensibilidad deben estar relacionadas con el tipo de enlaces que se establecen entre las diferentes proteínas estructurales que constituyen cada una de esas estructuras. En el caso de las vainas, los enlaces deben ser más fuertes que en el tubo y la placa basal.

Otra propiedad de las partículas similares a colas de fago producidas por M. coralloides D es que son capaces de matar a otras razas de mixobacterias. Esta característica, como ya se mencionó en el capítulo de Introducción, está bastante generalizada entre las partículas similares a colas de

fago y los bacteriófagos defectivos en general. Sobre las razas sensibles, las partículas no se multiplican, característica que permite considerarlas como un bacteriófago defectivo.

A pesar de que las partículas similares a colas de fago de M. coralloides D tienen actividad biológica, no deben ser consideradas como bacteriocinas, sino como bacteriófagos defectivos con actividad biológica, ya que, como se dijo en el apartado de Introducción, los bacteriófagos defectivos ocupan una posición intermedia entre fagos moderados y bacteriocinas, estando más cerca de los primeros que de las segundas.

A lo largo de este trabajo de investigación, el ensayo de actividad ha sido poco utilizado para conocer si una fracción determinada contenía o no partículas similares a colas de fago, ya que la mayoría de los estudios, tales como producción, inducción, etc... eran realizados con sobrenadantes de cultivos crudos de M. coralloides D y en estos, junto con las colas de fago, hay una bacteriocina de bajo peso molecular (Muñoz et al., 1984), de espectro de acción muy parecido al del bacteriófago defectivo, que impedía distinguir si la inhibición del crecimiento de la mixobacteria era ocasionado por la bacteriocina o por las partículas fágicas defectivas. Este tipo de ensayo sólo se utilizó cuando se disponía de extractos purificados de partículas. En los demás casos, la detección se llevó a cabo mediante microscopía electrónica. En el estudio de las propiedades fisico-químicas se prefirió utilizar también ésta última técnica, ya que las partículas suelen inactivarse al contraerse o al perder alguno de sus componentes (Higerd et al., 1969). El estudio al microscopio electrónico de estas propiedades nos ha permitido conocer la sensibili-

dad de cada una de las estructuras componentes de la cola a los diferentes agentes físicos y químicos, datos que no nos hubieran sido facilitados en el ensayo de actividad biológica.

La bacteriocina producida por M. coralloides D puede ser fácilmente diferenciada de las partículas similares a colas de fago, ya que

- 1.- La bacteriocina tiene un peso molecular inferior a 12000 ya que se sale de los tubos de diálisis. Las partículas similares a colas de fago, debido a su gran tamaño, no dializan.
- 2.- La bacteriocina es producida durante la fase exponencial, obteniéndose el máximo de actividad al final de la fase estacionaria. Las partículas similares a colas de fago, por el contrario, sólo son detectadas al iniciarse la fase estacionaria.
- 3.- La bacteriocina es estable a 100° durante 10 min., mientras que las partículas similares a colas de fago no.
- 4.- La observación al microscopio electrónico de las muestras purificadas de bacteriocina no reveló la presencia de partículas.

Ya que las partículas similares a colas de fago tienen actividad bactericida sobre otras mixobacterias, han de reportar algún tipo de ventaja selectiva a M. coralloides D; sin embargo, teniendo en cuenta que la inducción espontánea sólo ocurre cuando la mixobacteria crece en un medio líquido, (hecho que no ocurre en un hábitat natural) al final de la fase exponencial, y que las partículas inducidas no pueden lisis la célula productora, por lo que no se liberarían más que en aquellos casos en que tuviera lugar simultáneamente la lisis de las células por alguna causa ajena a la inducción de las partículas, es difícil imaginar el tipo de ventaja selectiva que pueden proporcionar las colas de fago a la bacteria

productora.

En el caso de la bacteriocina es diferente, ya que va siendo producida a lo largo de todo el crecimiento y a la vez va siendo liberada a los sobrendantes. De cualquier manera, M. coralloides tiene varios mecanismos que le proporcionan ventajas para competir con otras bacterias en la naturaleza, ya que produce, además de las partículas similares a colas de fago, una bacteriocina, activa frente a otras mixobacterias, y un antibiótico, activo frente a bacterias Gram-positivas (Arias et al., 1979).

La otra parte del trabajo a realizar en esta Tesis Doctoral consistía en buscar fagos capaces de multiplicarse sobre M. coralloides D. A pesar de haberse intentado numerosas veces el aislamiento de fagos del suelo específicos para esta mixobacteria, ha sido imposible detectar inhibición del crecimiento de M. coralloides en placas sembradas con esta mixobacteria en las que se colocaban gotas de sobrenadantes de cultivos con mixobacteria y extractos de suelo que habían sido incubados durante 48 h.

Por otro lado, los fagos de mixobacterias (de M. xanthus y de M. virescens, los de esta última, aislados por nosotros utilizando los mismos procedimientos de enriquecimiento que para M. coralloides D) tampoco podían multiplicarse sobre M. coralloides D. Sin embargo, al menos uno era capaz de adsorberse sobre esta bacteria. Esto nos llevó a estudiar la resistencia de M. coralloides D a la infección por fagos. Se barajaron varias posibilidades, de las cuales, dos resultaron especialmente atrayentes. Estas dos posibilidades, ya citadas en el capítulo de Resultados, eran:- El estado lisogénico de M. coralloides D por un fago defectivo.- Enzimas de res-

tricción.

Para dilucidar si el profago defectivo confería a M. coralloides D inmunidad frente a otros fagos no defectivos era necesario conseguir una raza de esta mixobacteria no productora de partículas fágicas defectivas. Aunque se empezó a buscar una raza con dicha particularidad, se abandonó bastante pronto la búsqueda, ya que el método de detección (microscopía electrónica) era bastante lento, complicado y caro. Además, desde hace bastante tiempo, varios autores, utilizando diferentes bacterias y fagos defectivos de varios tipos, habían intentado obtener razas no productoras, y no lo habían conseguido. Por último, debido a la lentitud del proceso de detección, se inició la búsqueda de enzimas de restricción en M. coralloides D y se obtuvieron resultados concluyentes, que podían justificar la resistencia de M. coralloides a los mixofagos.

Los resultados obtenidos en la búsqueda de nucleasas han sido bastante satisfactorios. Inicialmente se empezó buscando endonucleasas de restricción, pero al observar los geles de electroforesis de ADN del fago λ tratado con extractos de M. coralloides D, no se pudieron detectar bandas de restricción, ya que todo el ADN había sido digerido. Resultados parecidos a los nuestros ya habían sido descritos para otras bacterias deslizantes. Mayer y Reichenbach (1978), buscando enzimas de restricción en 45 razas del orden Cytophagales no pudieron detectar endonucleasas específicas en ninguna de ellas debido a la alta concentración de nucleasas inespecíficas que degradaban todo el ADN utilizado en los ensayos.

La valoración de las DNasas totales de los extractos de M. coralloides D puso de manifiesto la existencia de

una alta actividad DNasa en dichos extractos, capaz de digerir 2 mg de ADN en 5 min. de incubación. Gran parte de esta actividad (el 60%) está localizada en el espacio periplásmico, como revelaron los ensayos realizados con extractos de este compartimento, obtenidos mediante un procedimiento que permite disolver la membrana externa por la acción combinada de agentes físicos y químicos. Esta localización es bastante frecuente en las mixobacterias y las bacterias Gram-negativas en general en las que se han encontrado nucleasas (Mayer y Reichenbach, 1978).

La digestión del ADN creemos que es producida por más de un tipo de actividad DNasa, ya que en los primeros cinco minutos de incubación se digería gran cantidad de dicho ADN y al aumentar el tiempo de incubación la digestión se ralentizaba (ver Resultados). En estudios posteriores sobre las DNasas de M. coralloides D, no incluidos en esta Tesis, se ha encontrado que al fraccionar el material periplásmico por una columna de Sephadex G-200, aparecen dos picos de actividad DNasa, lo que confirma nuestra hipótesis sobre más de un tipo de actividad.

Ya que las DNasas nos interesaban, en principio, desde el punto de vista de la resistencia de M. coralloides D a la infección por fagos, para poder dilucidar el papel de dichas DNasas en esta resistencia, se hicieron una serie de ensayos de DNasa, utilizando extractos sonicados y del espacio periplásmico de M. virescens, bacteria frente a la que se aislan fagos con bastante facilidad a partir de muestras de suelo. Los resultados obtenidos revelaron que esta mixobacteria tiene una actividad DNasa prácticamente nula; sólo se pudo detectar alguna en los extractos sonicados.

En vista de estos resultados podemos afirmar que la resistencia de M. coralloides D a la infección por mixofagos es debida, al menos en gran medida, a la fuerte actividad DNasa de su espacio periplásmico.

Antes de conocer la actividad DNasa del espacio periplásmico de M. coralloides, en nuestro laboratorio se habían intentado experiencias de transferencia de material genético en esta mixobacteria. Para ello, se utilizaron los plásmidos conjugativos RP4 y R6845, así como los fagos P1::Tn5 y P1::Tn5-132. Todos los intentos realizados hasta el momento han sido negativos. Probablemente, esto pueda estar relacionado con las DNasas de la bacteria.

De otra parte, los esfuerzos encaminados a la obtención de mutantes resistentes a antibióticos y mutantes con alteraciones en alguna de las etapas de los ciclos de vida de esta mixobacteria, también han sido infructuosos, ya que los pocos mutantes obtenidos eran muy inestables, manteniéndose sólo durante muy pocas generaciones.

Este hecho, unido a que no se dispone de un medio de composición definida donde pueda crecer M. coralloides D, dificulta en gran medida el estudio de la genética de esta mixobacteria.

CONCLUSIONES

- 1.- Myxococcus coralloides D produce partículas similares a colas de fago cuando crece en medio líquido, pero no cuando crece en medio sólido.
- 2.- La inducción espontánea del profago defectivo tiene lugar cuando la mixobacteria alcanza la fase estacionaria.
- 3.- El tratamiento de los cultivos de M. coralloides D en fase de crecimiento exponencial con luz ultravioleta y mitomicina C induce la producción de las partículas fágicas defectivas.
- 4.- No existe ningún tipo de relación entre la autólisis que muestra M. coralloides D y la inducción de las partículas similares a colas de fago.
- 5.- Se ha desarrollado un método de purificación para estas partículas mediante precipitación con polietilenglicol-dextrano sulfato sódico, centrifugación diferencial, cromatografía en Sepharose 4B, tratamiento con cloroformo al 50%, diálisis y centrifugación en gradiente de sacarosa.
- 6.- Las partículas similares a colas de fago o algunos de sus componentes soportan la congelación, las bajas temperaturas, los pHs básico y neutro, los enzimas proteolíticos, la fuerza iónica y los agentes desnaturalizantes y quelantes ensayados. Y son sensibles a las altas temperaturas (100°), el pH ácido y los detergentes ensayados.
- 7.- Las partículas muestran actividad bactericida sobre otras mixobacterias, siendo la raza productora inmune a dicha acción.

8.- Myxococcus coralloides D es resistente a la infección por los mixofagos Mxlhrv, Mx8cp2, Mx4, Mv1g1, Mv1g2, Mv8g1 y Mv8g2.

9.- Se ha encontrado una fuerte actividad DNasa en el espacio periplásmico de Myxococcus coralloides D.

BIBLIOGRAFIA

- Ahkong, Q.F.; Fischer, D.; Tampson, W.; Lucy, J.A. 1975. Mechanism of cell fusion. *Nature (London)* 253 : 194-195.
- Albertsson, P.A. 1967. Two-phase separation of viruses. In "Methods in Virology", ed. K. Maramorosch and H. Kapowski. Academic Press. New York. vol. II, pp. 303-321.
- Amako, K.; Yasunaka, K.; Takaya, K. 1970. Relationship between rhabdosome pyocin in *Pseudomonas fluorescens*. *J. Gen. Microbiol.* 62 : 107✓
- Anacker, R.L.; Ordal, E.J. 1955. Study of a bacteriophage infecting the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. *J. Bacteriol.* 70 : 738-741.
- Arias, J.M.; Rodríguez, C.; Montoya, E. 1979. Purification and partial characterization of an antibiotic produced by *Myxococcus coralloides*. *J. Antibiot. (Tokio)*. 32 : 205-211.
- Arias, J.M.; Montoya, E. 1982. Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides*. *Microbiología Española* 35 : 13-20.
- Arias, J.M.; Montoya, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides* D. *Microbios Letters* 5 : 81-84.
- Arias, J.M.; Fernández Vivas, A.; Montoya, E. 1983. Evidence for an activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D. *Arch. Microbiol.* 134 : 164-166.

- Bacon, K.; Rosenberg, E. 1967. Ribonucleic acid synthesis during morphogenesis in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 94 : 1883-1889.
- Beck, B.D.; Parck, J.T. 1976. Activity of three murein hydrolases during the cell division cycle of E. coli K12 as measured in toluene-treated cells. J. Bacteriol. 126 : 1250-1260.
- Behki, R.M.; Lesley, S.M. 1972. Deoxyribonucleic acid degradation and the lethal effect by myxin in E. coli. J. Bacteriol. 109 : 666-672.
- Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8ª edición. 1974. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Bradley, D.E.; Dewar, C.A. 1966. The structure of phage-like objects associated with non induced bacteriocinogenic bacteria. J. Gen. Microbiol. 45 : 399-408.
- Bradley, D.E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31 : 230-314.
- Bretscher, A.P.; Kaiser, D. 1978. Nutrition of Myxococcus xanthus, a fruiting myxobacterium. J. Bacteriol. 133 : 763-768.
- Brown, N.L.; Burchard, R.P.; Morris, D.W.; Parish, J.H.; Stow, N.D.; Tsopanakis, C. 1976a. Phage and defective phages of strains of Myxococcus. Arch. Microbiol. 108 : 271-279.
- Brown, N.L.; Morris, D.W.; Parish, J.H. 1976b. DNA of Myxococcus bacteriophage Mx-1: Macromolecular properties and restric-

- tion fragments. Arch. Microbiol. 108 : 221-226.
- Burchard, R.P.; Dworkin, M. 1966a. Light induced lysis and carotenogenesis in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 91 : 535-545.
- Burchard, R.P.; Dworkin, M. 1966b. A bacteriophage for Myxococcus xanthus: Isolation, characterization and relation of infectivity to host morphogenesis. J. Bacteriol. 91 : 1305-1313.
- Burchard, R.P.; Voelz, H. 1972. Bacteriophage infection of Myxococcus xanthus during cellular differentiation and vegetative growth. Virology 48 : 555-566.
- Burchard, A.C.; Burchard, R.P.; Kloetzel, J.A. 1977. Intracellular, periodic structures in the gliding bacterium Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 132 : 666-672.
- Burchard, R.P. 1981. Gliding motility of prokaryotes: Ultrastructure, physiology and genetics. Ann. Rev. Microbiol. 35 : 497-529.
- Burchard, R.P. 1984. Gliding motility and taxes. In "Myxobacteria Development and cell interactions", ed. E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York. pg. 139-161.
- Campbell, A.M. 1969. Episomes. Harper and Row. New York.
- Campbell, A. 1977. Defective bacteriophages and incomplete prophages. In "Comprehensive Virology", ed. H. Fraenkel-Conrat

- y R.R. Wagner. Plenum Publ. Corp. pp. 259-328.
- Campos, J.M.; Geisselsoder, J.; Zusman, D.R. 1978. Isolation of bacteriophage Mx4, a generalized transducing phage for Myxococcus xanthus. J. Mol. Biol. 119 : 167-178.
- Chang, H.Y.Y.; Allen, M.M. 1974. The isolation of rhabidosome from the blue-green alga Spirulina. J. Gen. Microbiol. 18 : 121.
- Chapman, G.; Hillier, J.; Johnson, F.H. 1951. Observations on the bacteriophagy of Erwinia carotovora. J. Bacteriol. 61 : 261.
- Cleveland, R.F.; Holtje, D.J.; Wicken, A.J.; Tomasz, A.; Daneo-Moore, L.; Shockman, G.D. 1975. Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. Biochem. Biophys. Res. Commun. 67 : 1128-1135.
- Correll, A.L.; Lewin, R.A. 1964. Rod-shaped ribonucleoprotein particles from Saprospira. Can. J. Microbiol. 10 : 63-74.
- Cremers, A.F.; Steensma, H.Y.; Mellema, J.E. 1978. The quaternary structure of the sheaths of defective phages similar to PBSX. Eur. J. Biochem. 89 : 389-395.
- Cumsky, M.; Zusman, D.R. 1979. Myxobacterial hemagglutinin, a development-specific lectin of Myxococcus xanthus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 76 : 5505-5509.
- Delk, A.S.; Dekker, C.A. 1972. Characterization of rhabidosomes

- of Saprospira grandis. J. Mol. Biol. 64: 287-295.
- Dworkin, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 84: 250-257.
- Dworkin, M.; Gibson, S.M. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: Rapid formation of microcysts in Myxococcus xanthus. Science. 146: 243-244.
- Dworkin, M. 1973. Cell-cell interactions in the myxobacteria.
In "Microbial Differentiation", ed. J.M. Ashworth, J.E. Smith. Soc. Gen. Microbiol. Symp. Cambridge Univ. Press. Cambridge. vol. 23, pp. 125-142.
- Fautz, E.; Rosenfelder, G.; Grotjahn, L. 1979. Iso-branched 2 and 3-hydroxy fatty acids as characteristic lipid constituents of some gliding bacteria. J. Bacteriol. 140: 852-858.
- Fautz, E.; Grotjahn, L.; Reichenbach, H. 1981. 2 and 3-hydroxy fatty acids as valuable chemosystematic markers in gliding bacteria. In "The Flavobacterium-Cytophaga Group", ed. H. Reichenbach, D.B. Weeks. Weinheim Verlag Chemie. pp. 127-133.
- Fein J.E.; Rogers, H.J. 1976. Autolytic enzyme-deficient mutants of Bacillus subtilis 168. J. Bacteriol. 127: 1427-1442.
- Fernández-Vivas, A. 1983. Aportaciones al estudio de la autólisis en Myxococcus coralloides D. Tesis Doctoral. Univ. Granada.

- Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M.; Montoya, E. 1983 a. Autolysis in Myxococcus coralloides D. FEMS Microbiol. Letters. 20: 97-101.
- Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M.; Montoya, E. 1983 b. Detection of guanosine 5'-diphosphate-3'-diphosphate in Myxococcus coralloides D vegetative cells. FEMS Microbiol. Letters. 20: 17-22.
- Fernández-Vivas, A.; Arias, J.M.; Montoya, E. 1985. Lysis induced by uncoupling agents in Myxococcus coralloides D. FEMS Microbiol. Letters. 27: 99-102.
- Fluegel, W. 1963. Fruiting chemotaxis in Myxococcus fulvus (Myxobacterales). Proc. Minn. Acad. Sci. 32: 120-123.
- Forsberg, C.W.; Rogers, H.J. 1971. Autolytic enzymes in growth of bacteria. Nature (London). 229: 272-273.
- Garro, A.J.; Marmur, J. 1970. Defective bacteriophages. J. Cell. Physiol. 76: 253-264.
- Garro, A.J.; Leffert, H.; Marmur, J. 1970. Genetic mapping of a defective bacteriophage on the chromosome of Bacillus subtilis 168. J. Virol. 6: 340-343.
- Garro, A.J.; Hammer, P.; Recht, B. 1976. Biochemical and genetic analysis of the defective Bacillus subtilis bacteriophage PBSX. In "Microbiology 1976", ed. R. Schlessinger. American Society for Microbiology. Washington. pp. 340-349.

- Geisselsoder, J.; Campos, J.M.; Zusman, D.R. 1978. Physical characterization of bacteriophage Mx4, a generalized transducing phage for Myxococcus xanthus. J. Mol. Biol. 119 : 179-189.
- Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Trowitzsch, W. 1980. Myxothiazol, an antibiotic from Myxococcus fulvus (Myxobacteriales). I. Cultivation, isolation, physico-chemical and biological properties. J. Antibiot. (Tokyo). 33 : 1474-1479.
- Gerth, K.; Trowitzsch, W.; Wray, V.; Höfle, G.; Irschik, H.; Reichenbach, H. 1982. Pyrrolnitrin from M. fulvus (Myxobacteriales). J. Antibiot. (Tokyo). 35 : 1101-1103.
- Gerth, K.; Irschik, H.; Reichenbach, H.; Trowitzsch, W. 1982. The myxovirescins, a family of antibiotics from M. virescens (Myxobacteriales). J. Antibiot. (Tokyo). 35 : 1454-1459.
- Gillespie, D.C.; Cook, F.D. 1965. Extracellular enzymes from strains of Sorangium. Can. J. Microbiol. 11 : 109-118
- Gnospeilius, G. 1978a. Purification and preparations of an extracellular protease from M. virescens. J. Bacteriol. 133 : 17-25.
- Gnospeilius, G. 1978b. Myxobacterial slime and proteolytic activity. Arch. Microbiol. 116 : 51-59.
- Goldberg, I.D.; Bryan, T. 1968. Productive infection of Bacillus subtilis 168, with bacteriophage SP10, dependent upon inducing treatments. J. Virol. 2 : 805-812.

- Gräf, W. 1965. Bewegungsorganellen bei Myxobakterien. Arch. Hyg. 149 : 518.
- Haas, M.; Yoshikawa, H. 1969. Defective bacteriophage PBSH in Bacillus subtilis. I. Induction, purification and physical properties of the bacteriophage and its deoxyribonucleic acid. J. Virol. 3 : 233-247.
- Hakenbeck, R.; Hesser, W. 1977. Activity of murein hydrolases in synchronized cultures of E. coli. J. Bacteriol. 129 : 1239-1244.
- Harcke, E.; Hüttermann, A.; Kühlwein, H. 1971. Studies on lytic activities of Chondrococcus coralloides (Myxobacterales). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. Arch. Microbiol. 77 : 86-95.
- Harcke, E.; Hüttermann, A.; Kühlwein, H. 1972. Studies on lytic activities of Chondrococcus coralloides (Myxobacterales). II. Identification of the bacteriolytic enzyme as a muramidase. Arch. Microbiol. 85 : 6-12.
- Hart, B.A.; Zahler, S.A. 1966. Lytic enzymes produced by Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 92 : 1632-1637.
- Haskå, G.; Stahl, S. 1971. Variants of Myxococcus virescens exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime. Physiol. Plant. 24 : 136-142.
- Haskå, G.; Norén, B.; Odham, G. 1972. Effect of fatty acids on the activity of bacteriolytic enzymes. Physiol. Plant. 27

187-194.

- Haskå, G. 1974. Extracellular lytic enzymes of Myxococcus virescens. IV. Purification and characterization of a D-alanyl- ϵ -N-lysine endopeptidase. *Physiol. Plant.* 31 : 251-256.
- Hemphill, H.E.; Zahler, S.A. 1968. Nutrition of Myxococcus xanthus FBa and some of its auxotrophic mutants. *J. Bacteriol.* 95 : 1011-1017.
- Herbold, D.; Glaser, L. 1975a. Bacillus subtilis N-acetylmuramic acid L-alanine amidase. *J. Biol. Chem.* 250 : 1676-1682.
- Herbold, D.; Glaser, L. 1975b. Interaction of N-acetylmuramic acid L-alanine amidase with cell wall polymers. *J. Biol. Chem.* 250 : 7231-7238.
- Higerd, T.B.; Baechler, C.A.; Berk, R.S. 1967. In vitro and in vivo characterization of pyocin. *J. Bacteriol.* 93 : 1976-1986
- Higerd, T.B.; Baechler, C.A.; Berk, R.S. 1969. Morphological studies on relaxed and contracted forms of purified pyocin particles. *J. Bacteriol.* 98 : 1378-1389.
- Hinks, R.P.; Daneo-Moore, L.; Shockman, G.D. 1978a. Cellular autolytic activity in synchronized populations of Streptococcus faecium *J. Bacteriol.* 133 : 822-829.
- Hinks, R.P.; Daneo-Moore, L.; Shockman, G.D. 1978b. Relationship between cellular autolytic activity, peptidoglycan synthesis, separation and the cell cycle in synchronized popula-

- tions of Streptococcus faecium. J. Bacteriol. 134 : 1074-1080
- Hirsch, H.J. 1977. Bacteriocins from M. fulvus (Myxobacterales). Arch. Microbiol. 115 : 45-49
- Hodgkin, J.; Kaiser, D. 1979a. Genetics of gliding motility in Myxococcus xanthus (Myxobacterales): genes controlling movements of single cells. Mol. Gen. Genet. 171 : 167-176.
- Hodgkin, J.; Kaiser, D. 1979b. Genetics of gliding motility in Myxococcus xanthus (Myxobacterales): two gene systems control movement. Mol. Gen. Genet. 171 : 177-191.
- Hodgson, B.; Rao, A.S. 1981. Some properties of a defective bacteriophage of Bacillus brevis. Can. J. Microbiol. 27 : 57-64.
- Höfle, G.; Kunze, B.; Zorzin, C.; Reichenbach, H. 1984. Stigmatellin A und B - zwei neue Antibiotika aus Stigmatella aurantiaca (Myxobacterales). Liebigs Ann. Chem. pp. 1883-1904
- Huang, W.M.; Marmur, J. 1970. Characterization of inducible phages in Bacillus licheniformis. J. Virol. 5 : 237-246.
- Iida, H.; Inoue, K. 1968. Rhabidosomes of Clostridium botulinum type ϵ . Japan J. Microbiol. 12 : 353.
- Ikeda, K.; Egami, F. 1969. Receptor substance for pyocin R. I. Partial purification and chemical properties. J. Biochem. (Tokyo) 65 : 603-609.

- Ikeda, H.; Inuzuka, M.; Tomizawa, J. 1979. P1-like plasmid in Escherichia coli 15. J. Mol. Biol. 50 : 457-470.
- Ikeda, K.; Nishi, Y. 1973. Interactions between pyocin R and pyocin R receptor. J. Gen. Appl. Microbiol. 19 : 209.
- Inouye, M.; Inouye, S.; Zusman, D.R. 1979. Gene expression during development of Myxococcus xanthus: Patterns of protein synthesis. Dev. Biol. 68 : 579-591.
- Inouye, S.; Thomas, R.; Inouye, M. 1985. Microtubulin-like organelle from Myxococcus xanthus. 12th Int. Conf. Biol. Myxobacteria. California. pp. 50.
- Irschik, H.; Gerth, K.; Kemmer, T.; Steinmetz, H.; Reichenbach, H. 1983. The myxovalgins, new peptide antibiotics from M. fulvus (Myxobacteriales). J. Antibiotics 36 : 6-12
- Jackson, R.L.; Wolfe, R.S. 1968. Composition, properties and substrate specificities of myxobacter AL-1 protease. J. Biol Chem. 243 : 870-888.
- Jahn, E. 1924. Beitrage zur Botanischer Protistologie. I. Die Polyangiden. Leipzig Gebr. Borntraeger. pp. 107.
- Joliffe, L.K.; Doyle, R.J.; Streips, U.W. 1980. Extracellular proteases modify cell wall turnover in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 141 : 1199-1208.
- Jurasek, L.; Whitaker, D.R. 1965. Lytic enzymes of Sorangium sp. A comparison of some physical properties of the a and b ly-

- tyc proteases. *Can. J. Microbiol.* 43 : 1955-1960.
- Kageyama, M.; Ikeda, K.; Egami, F. 1964. Studies of a pyocin. III. Biological properties of the pyocin. *J. Biochem. (Tokyo)*. 55 : 59-64.
- Kageyama, M. 1970a. Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in *Pseudomonas aeruginosa*. I. Mapping of pyocin R2 factor by conjugation. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16 : 523-530.
- Kageyama, M. 1970b. Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in *Pseudomonas aeruginosa*. II. Mapping of pyocin R2 factor by transduction with phage F116. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 16 : 531.
- Kaiser, D.; Dworkin, M. 1975. Gene transfer to a myxobacterium by *Escherichia coli* phage P1. *Science*. 187 : 653-654.
- Kaiser, D.; Manoil, C.; Dworkin, M. 1979. Myxobacteria: cell interactions, genetics and development. *Ann. Rev. Microbiol.* 33 : 595-639.
- Kaiser, D. 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 76 : 5952-5956.
- Kaiser, D.; Crosby, C. 1983. Cell movement and its coordination in swarms of *Myxococcus xanthus*. *Cell Motility* 3 : 227-245.
- Kaiser, D. 1984. Genetics of myxobacteria. In "Myxobacteria, development and cell interactions", ed. H. Rosenberg. Sprin-

- ger Verlag. New York. pp. 163-184.
- Katz, W.; Strominger, J.L. 1967. Structure of the cell wall of M. lysodeikticus. II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the myxobacterium enzyme. Biochemistry 6 : 930-937.
- Kaziro, Y.; Tanaka, M. 1965 . Studies on the mode of action of pyocin. I. Inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells. J. Biochem. (Tokyo). 57 : 689 - 694.
- Keller, K.H.; Grady, M.; Dworkin, M. 1983. Surface tension gradients: feasible model for gliding motility in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 155 : 1358-1366.
- Kleinig, H.; 1972. Membranes from Myxococcus fulvus (Myxobacterales) containing carotenoid glucosides. I. Isolation and composition. Biochimica Biophysica Acta. 274 : 489-498.
- Kleinig, H.; Reichenbach, H.; Theobald, N.; Achenbach, H. 1974. Flexibacter elegans and Myxococcus fulvus: aerobic Gram-negative bacteria containing menaquinones as the only isoprenoid quinones. Arch. Microbiol. 101 : 91-93.
- Komano, I.; Inouye, S.; Inouye, M. 1980. Patterns of protein production in Myxococcus xanthus during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide and phenethyl alcohol. J. Bacteriol. 144 : 1076-1082.
- Kuner, J.M.; Kaiser, D. 1981. Introduction of transposon Tn5 into Myxococcus for analysis of developmental and other non

- selectable mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 : 425-429.
- Kuner, J.M.; Kaiser, D. 1982. Fruiting body morphogenesis in submerged cultures of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 151 : 458-461.
- Kunze, B.; Reichenbach, H.; Augustiniak, H.; Höfle, G. 1982. Isolation and identification of althiomycin from Cystobacter fuscus (Myxobacteriales). J. Antibiot. (Tokyo). 35 : 635-636.
- La Rossa, R.; Kuner, J.; Hagen, D.; Manoil, C.; Kaiser, D. 1983. Developmental cell interactions of Myxococcus xanthus. Analysis of mutants. J. Bacteriol. 153 : 1394-1404.
- Lau, AHS.; Hawriko, R.Z.; Chow, C.T. 1974. Purification and properties of boticin P produced by Clostridium botulinum. Can. J. Microbiol. 20 : 385-391.
- Lee, C.S.; Davis, W.; Davidson, N. 1970. A physical study by electron microscopy of the terminally repetitive, circularly permuted DNA from the coliphage particles of Escherichia coli 15. J. Mol. Biol. 48 : 1-22.
- Lewin, R.A. 1963. Rod-shaped particles in Saprospira. Nature. 198 : 103.
- Liu, H.J.; Kaziro, Y.; Horiuchi, T. 1969. A temperature-sensitive induction of pyocin R synthesis in a mutant strain of Pseudomonas aeruginosa R. Japan. J. Exp. Med. 39 : 371.
- Lotz, W. 1976. Defective bacteriophages: The phage tail-like

- particles. Prog. Mol. Subcell. Biol. 4 : 53-102.
- Lotz, W.; Mayer, F. 1972. Isolation and characterization of bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of Rhizobium. J. Virol. 9 : 160.
- Lowry, O.H.; Rosenbrough, N.J.; Farr, A.L.; Randall, R.J. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193 : 265-275.
- Ludwig, W.; Schleifer, K.H.; Reichenbach, H.; Stackebrandt, E. 1983. A phylogenetic analysis of the myxobacteria Myxococcus fulvus, Stigmatella aurantiaca, Cystobacter fuscus, Sorangium cellulosum and Nannocystis exodens. Arch. Microbiol. 135 : 58-62.
- MacRae, T.H.; McCurdy, H.D. 1976. The isolation and characterization of gliding motility mutants in Myxococcus xanthus. Can. J. Microbiol. 23 : 1096-1108.
- Mandel, M.; Leadbetter, E.R. 1965. Deoxyribonucleic acid base composition of myxobacteria. J. Bacteriol. 90 : 1795-1796.
- Mandel, M.; Lewin, R.A. 1969. Deoxyribonucleic acid base composition of flexibacteria. J. Gen. Microbiol. 58 : 171-178.
- Maniatis, T.; Fritsch, E.F.; Sambrock, J. 1972. Purification of bacteriophage lambda. In "Molecular Cloning, a laboratory manual". Cold Spring Harbor Lab. pp. 80-84.
- Manoil, C.; Kaiser, D. 1980. Accumulation of guanosine tetra-

- phosphate and guanosine pentaphosphate during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* 141 : 297-304.
- Martin, S.; Sodergren, E.; Masuda, T.; Kaiser, D. 1978. Systematic isolation of transducing phages for Myxococcus xanthus. *Virology* 88 : 44-93.
- Mason, D.J.; Powelson, D. 1958. Lysis of Myxococcus xanthus. *J. Gen. Microbiol.* 19 : 65-70.
- Mayer, H.; Reichenbach, H. 1978. Restriction endonucleases: General survey procedure and survey of gliding bacteria. *J. Bacteriol.* 136 : 708-713.
- McCurdy, H.D.; Wolf, S. 1967. Deoxyribonucleic acid base composition of fruiting myxobacterales. *Can. J. Microbiol.* 13 : 1707-1708.
- McCurdy, H.D.; MacRae, T.H. 1974. Xanthacin, a bacteriocin of Myxococcus xanthus fb. *Can. J. Microbiol.* 20 : 131-135.
- Menningmann, H.D. 1964. Induction in Escherichia coli 15 of the colicinogenic factor by tyamine-less death. *Biochem. Biophys Res. Comm.* 16 : 373-378.
- Mercer, E.H.; Birbeck, M.S.C. 1974. Manual de microscopía electrónica para biólogos. Ed. Blume. Barcelona.
- Morris, D.W.; Parish, J.M. 1976. Restriction in Myxococcus virescens. *Arch. Microbiol.* 108 : 227-230.

- Morrison, C.E.; Zusman, D.R. 1979. Myxococcus xanthus mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: Evidence for independent pathways in development. J. Bacteriol. 140 : 1036-1042.
- Mosig, G. 1968. A map of distances along the DNA molecule of phage T4. Genetics 2 : 245-278.
- Muñoz, J.; Arias, J.M.; Montoya, E. 1984. Production and properties of a bacteriocin from Myxococcus coralloides D. J. Appl Bacteriol. 57 : 69-74.
- Norén, B. 1953. On the production of antibiotics by myxobacteria. Sv. Bot. Tidskr. 47 : 402-410.
- Norén, B.; Raper, K.B. 1962. Antibiotic activity of myxobacteria in relation to their bacteriolytic capacity. J. Bacteriol. 84 : 157-162.
- Nomura, M. 1967. Colicins and related bacteriocins. Ann. Rev. Microbiol. 41 : 257-284.
- O'Connor, K.A.; Zusman, D.R. 1983. Coliphage P1 mediated transduction of cloned DNA from Escherichia coli to Myxococcus xanthus: Use for complementation and recombination analysis. J. Bacteriol. 155 : 317-329.
- Ogata, S.; Suenaga, H.; Hayashida, S.; Seino, A. 1983. Phage tail-like particles of Streptoverticillium albireticuli and Streptoverticillium netropsis. J. Gen. Appl. Microbiol. 29 : 239-241.

- Okamoto, K.; Mudd, J.A.; Mangan, J.; Huang, W.M.; Subbaiah, T. V.; Marmur, J. 1968a. Properties of the defective phage of Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 34 : 413-428.
- Okamoto, K.; Mudd, J.A.; Marmur, J. 1968b. Conversion of Bacillus subtilis DNA to phage DNA following mitomycin C induction. J. Mol. Biol. 34 : 429-437.
- Orndorff, P.F. Dworkin, M. 1980. Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of vegetative cells of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 141 : 914-927.
- Orndorff, P.; Stellwag, C.; Starich, T.; Dworkin, M.; Zissler, J. 1983. Genetic and physical characterization of lysogeny by bacteriophage Mx8 in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 154 : 772-779.
- Oxford, A.E. 1947. Observations concerning the growth and metabolic activities of myxococci in a simple protein-free medium. J. Bacteriol. 53 : 129-138.
- Ozeki, H. 1968. Methods for the study of colicines and colicinogeny. In "Methods in Virology", ed. K. Maramorosch y H. Karpowski. Academic Press. New York. vol. IV, pp. 565-595.
- Pátek, M.; Ludvík, J.; Benada, O.; Hochmannová, J.; Wesucra, J.; Krumphanzl, V.; Bucko, M. 1985. New bacteriophage-like particles in Corynebacterium glutamicum. Virology. 140 : 360-363.
- Pérez López, J.A.; Rodríguez, C.; Montoya, E. 1978. Repression

- of proteolytic enzymatic system in Myxococcus xanthus. Microbios Letters 6 : 27-31.
- Peterson, E.A.; Gillespie, D.C.; Cook, F.D. 1966. A wide-spectrum antibiotic produced by a specie of Sorangium. Can. J. Microbiol. 12 : 221-230.
- Reeves, P. 1972. The bacteriocins. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics Series, vol. 11. Springer Verlag. Berlin.
- Reichenbach, H. 1965. Rhapidosomen bei Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. 50 : 246-255.
- Reichenbach, H.; Dworkin, M. 1981. Introduction to the gliding bacteria. In "The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria", ed. M.P. Starr , H. Stolp, H.G. Truper, A. Balows, H.G. Schlegel. Springer Verlag. Berlin. Vol. 1, pp. 315-327.
- Reichenbach, H. 1981. Taxonomy of the gliding bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 35 : 339-364.
- Reichenbach, H. 1984. Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes. In "Myxobacteria: development and cell interactions", ed. H. Rosenberg. Springer Verlag. New York. pp. 1-50.
- Rieber, M.; Imaeda, T. 1969. Production of tubules and bacteriophage-like particles in mycobacteria after bacitracin treatment. J. Bacteriol. 98 : 821-823.

- Ringel, S.M.; Greenough, R.C.; Roemer, S.; Connor, D.; von Strandtman, A. 1977. Ambruticin (V-I 7783), a new antifungal antibiotic. *J. Antibiot. (Tokyo)*. 30 : 371-375.
- Rosenberg, E.; Vaks, B.; Zuckerberg, A.; 1973. Bactericidal action of an antibiotic produced by M. xanthus. *Antimicrob. Agents Chemother.* 4 : 507-513.
- Rosenberg, E.; Varon, M. 1984. Antibiotics and lytic enzymes. In "Myxobacteria: development and cell interactions", ed. E. Rosenberg. Springer Verlag. New York. pp. 109-125.
- Rosenfelder, G.; Luderitz, D.; Westphal, O. 1974. Composition of lipopolysaccharides from Myxococcus fulvus and other fruiting and non-fruiting myxobacteria. *Eur. J. Biochem.* 44 : 411-420.
- Rodríguez, C.; Montoya, E. 1980. Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos producidos por Myxococcus xanthus. *Anales de Edafología y Agrobiología*. XXXIX (1-2) : 169-176.
- Rodrigues, F.K.; Virrankoski-Castrodeza, V.; Parish, J.H.; Grim, K. 1980. Isolation and characterization of new bacteriophages for Myxococcus xanthus. *Arch. Microbiol.* 126 : 175-180.
- Rucinsky, T.E.; Gregory, J.P.; Cota-Robles, E.H. 1972. Organization of bacteriophage tail-like particles in cells of Chromobacterium violaceum. *J. Bacteriol.* 110 : 754.
- Rucinsky, T.E.; Cota-Robles, C.H. 1973. The intracellular organization of bacteriophage tail-like particles in cells of

- Chromobacterium violaceum following mitomycin C treatment. J. Ultrastruct. Res. 43 : 260.
- Ruiz Rodríguez, C. 1980. Enzimas lipásicos de Myxococcus xanthus MD4. Tesina de Licenciatura. Fac. de Farmacia. Univ. de Granada.
- Sandoval, H.K.; Reilly, H.C.; Tandler, B. 1965. Colicin 15: possibly a defective bacteriophage. Nature. 205 : 522-523.
- Schleif, R. 1980. Assaying of organisms for the presence of restriction endonucleases. In "Methods in Enzymology", ed. H. Kaplan. Academic Press. London. Vol. 65, pp. 19-23.
- Schmidt-Lorenz, W.; Kühlwein, H. 1968. Intracelluläre Bewegungsorganellen der Myxobakterien. Arch. Mikrobiol. 60 : 95-98.
- Schröder, J.; Reichenbach, H. 1970. The fatty acid composition of vegetative cells and myxospores of Stigmatella aurantiaca (Myxobacteriales). Arch. Mikrobiol. 71 : 384-390.
- Schwarz, U.; Asmus, A.; Frank, M. 1969. Autolytic enzymes and cell division in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 41 : 419-429.
- Seaman, E.; Tarmy, E.; Marmur, J. 1964. Inducible phages of Bacillus subtilis. Biochemistry. 3 : 607-613.
- Shilo, M. 1970. Lysis of blue-green algae by myxobacteria. J. Bacteriol. 104 : 453-461.

- Shimkets, L.J.; Dworkin, M. 1981. Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in Myxococcus xanthus. Dev. Biol. 84 : 51-60.
- Shimkets, L.J.; Kaiser, D. 1982. Induction of coordinated cell movement in Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 152 : 451-461.
- Shinomiya, T. 1972. Studies on biosynthesis and morphogenesis of R-type pyocins of Pseudomonas aeruginosa. II. Biosynthesis of antigenic proteins and their assembly into pyocin particles in mitomycin C-induced cells. J. Biochem. (Tokyo). 72 : 39.
- Simon, L.O.; Anderson, T.F. 1967. The infection of Escherichia coli by T2 and T4 bacteriophages as seen in the electron microscope. II. Structure and function of the baseplate. Virology. 32 : 298.
- Smit, J.A.; Hugo, W.; De Klerk, H.C. 1969. A receptor for a Proteus vulgaris bacteriocin. J. Gen. Virol. 5 : 33.
- Sørhaug, T. 1974. Glycerol ester hydrolase, lipase of Myxococcus xanthus Fb. Can. J. Microbiol. 20 : 611-615
- Soriano, S. 1947. The Flexibacterales and their systematic position. Antonie van Leeuwenhoek 12 : 215- 222
- Soriano, S. 1973. Flexibacteria. Ann. Rev. Microbiol. 27 : 155-170.
- Stachura, I.; McKinley, F.W.; Leidy, G.; Alexander, H.E. 1969.

- Incomplete bacteriophage tail-like particles in ultraviolet-irradiated Haemophilus. J. Bacteriol. 98 : 818-820.
- Steensma, H.Y.; Robertson, L.A.; von Elsas, J.D. 1978. The occurrence and taxonomic value of PBS-X like defective phages in the genus Bacillus. Antonie van Leeuwenhoek. 43 : 305-316.
- Steensma, H.Y. 1981a. Adsorption of the defective phage PBSZ1 to Bacillus subtilis 168 Wt. J. Gen. Virol. 52 : 93-101.
- Steensma, H.Y. 1981b. Effect of defective phages on the cell membrane of Bacillus subtilis and partial characterization of a phage protein induced in killing. J. Gen. Virol. 56 : 275-286.
- Stellwag, E.; Fink, J.M.; Zissler, J. 1985. Physical characterization of the genome of the Myxococcus xanthus bacteriophage Mx8. Mol. Gen. Genet. 199 : 123-132.
- Sudo, S.Z.; Dworkin, M. 1972. Bacteriolytic enzymes produced by Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 110 : 236-245.
- Suenaga, H.; Ogata, S.; Hayashida, S. 1983. Phage tail-like particles found in the pocks of Streptomyces coerulescens. Agr. Biol. Chem. 47 : 2651-2652.
- Sutherland, I.W.; Smith, M.L. 1973. The lipopolysaccharides of fruiting and non fruiting myxobacteria. J. Gen. Microbiol. 74 : 259-266.

- Sutherland, I.W.; Thomsom, S. 1975. Comparison of polysaccharides produced by Myxococcus strains. J. Gen. Microbiol. 89 : 124-132.
- Swenson, P.A.; Setlow, R.B. 1966. Effects of ultraviolet radiation on macromolecular synthesis in Escherichia coli. J. Mol. Biol. 15 : 201-219.
- Takeya, K.; Minamishima, Y.; Onishi, Y.; Amako, K. 1969. Rod-shaped pyocin 28. J. Gen. Virol. 4 : 145-149.
- Thurm, P.; Garro, A.J. 1975a. Bacteriophage specific protein synthesis during induction of the defective Bacillus subtilis bacteriophage PBSX. J. Virol. 16 : 179-183.
- Thurm, P.; Garro, A.J. 1975b. Isolation and characterization of prophage mutants of the defective Bacillus subtilis bacteriophage PBSX. J. Virol. 16 : 184-191.
- Tipper, D.J.; Strominger, J.L.; Ensign, J.C. 1967. Structure of the cell wall of S. aureus, strain Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides. Biochemistry. 6 : 906-920.
- Tomasz, A.; Albino, A.; Zanati, E. 1970. Multiple antibiotic resistance in a bacterium with suppressed autolytic system. Nature (London) 277 :138-140.
- Tsai, C.S.; Whitaker, D.R.; Jurasek, K.; Gillespie, D.C. 1965. Lytic enzymes of Sorangium sp. Action of the α and β -lytic

proteases on two bacterial mucopeptides. *Can. J. Biochem.* 43: 1971-1983.

Tsopanakis, C.; Parish, J.H. 1976. Bacteriophage Mx-1. Properties of the phage and its structural proteins. *J. Gen. Virol.* 30: 99-112.

Voelz, H.; Burchard, R.P. 1971. Fine structure of bacteriophage infected Myxococcus xanthus. I. The lytic cycle in vegetative cells. *Virology.* 43: 243-259.

Voelz, H.G.; Dworkin, M. 1962. Fine structure of Myxococcus xanthus during morphogenesis. *J. Bacteriol.* 84: 943-952.

Walker, G.C. 1985. Inducible DNA repair systems. *Ann. Rev. Biochem.* 54: 425-457.

Walker, D.H.; Anderson, T.F. 1970. Morphological variants of coliphage P1. *J. Virol.* 5: 765-782.

Wallace, D.C.; Morowitz, H.J. 1973. Genome size and evolution. *Chromosoma.* 40: 121-126.

Ware, J.C.; Dworkin, M. 1973. Fatty acids of Myxococcus xanthus. *J. Bacteriol.* 115: 253-261.

Watson, B.F.; Dworkin, M. 1968. Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of Myxococcus xanthus. *J. Bacteriol.* 96: 1456-1473.

- Whitaker, R.C. 1965. Lytic enzymes of Sorangium sp. Isolation and enzymatic properties of the α and β -lytic proteases. Can. J. Biochem. 43; 1935-1954.
- White, D. 1975. Myxospores of Myxococcus xanthus. In: Spores VI. Ed. by P. Gerhardt; H.L. Sadoff; R.M. Costilow. Washington, D.C. American Society for Microbiology pp. 44-51.
- White, D. 1984. Structure and function of Myxobacteria cells and fruiting bodies. In Myxobacteria development and cell interaction. Edited by E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York, pp 51-67.
- White, D.; Dworkin, M.; Tipper, D.F. 1968. peptidoglycan of Myxococcus xanthus: structure and relation to morphogenesis. J. Bacteriol. 95; 2186-2197.
- Wingard, M.; Matsueda, G.; Wolfe, R.S. 1972. Myxobacter AL-1 protease II: specific peptide bond cleavage on the amino side of lysin. J. Bacteriol. 112; 940-949.
- Wireman, J.W. 1979. Developmental induction of Myxococcus xanthus myxospores. J. Bacteriol. 140; 147-153.
- Wireman, J.W.; Dworkin, M. 1975. Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria. Science. 189, 516-522.
- Wireman, J.W.; Dworkin, M. 1977. developmentally induced autolysis during fruiting body formation by Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 129; 796-802.

- Yamakawa, T.; Toyoda, H.; Yamada-Yamaguchi, C.; Watanabe, T. 1980. Biological properties of a Bacillus subtilis defective phage PBSH and its complementary deoxyribonucleic acid strands. *J. Gen. App. Microbiol.* 26; 255-263.
- Yamamoto, T. 1967. Presence of rhabdosomes in various species of bacteria and their morphological characteristics. *J. Bacteriol.* 94; 1746-1755.
- Yamamoto, K.R.; Alberts, B.M.; Benzinger, R.; Lawhorne, L.; Treiber, G. 1970. Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethyleneglycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40; 734-744.
- Yee, T.; Inouye, M. 1981. Reexamination of the genome size of myxobacteria including the use of a new method for genome size analysis. *J. Bacteriol.* 145; 1257-1265.
- Yee, T.; Inouye, M. 1982. Two-dimensional DNA electrophoresis applied to the study of DNA methylation and the analysis of genome size in Myxococcus xanthus. *J. Mol. Biol.* 154; 181-196
- Yee, T.; Inouye, M. 1984. Genome of Myxococcus xanthus. In: *Myxobacteria, development and cell interactions*. Ed. by E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York. pp 69-90.
- Yoshikawa, H.; Haas, M. 1968. On the regulation of the initiation of DNA replication of bacteria. Cold Spring Harbor. *Symp. Quant. Biol.* 33; 843-855.

Yudelevich, A.; Gold, M. 1969. A specific DNA methylatise induced by bacteriophage 15. J. Mol. Biol. 40; 77-91.

Zusman, D.R. 1982. "Frizzy" mutants a new class of aggregation defective developmental mutants of Myxococcus xanthus. J. Bacteriol. 150; 1430-1437.

Zusman, D.R. 1984. Developmental program of Myxococcus xanthus. In: Myxobacteria, developmental and cell interactions. Ed. by E. Rosenberg, Springer-Verlag, New York, pp 185-213.