

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA
DEL BACTERIOFAGO ν B-19 ESPECIFICO DE
Bacillus thuringiensis

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER
EL GRADO DE MAESTRIA EN CIENCIAS CON
ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA:

M.V.Z. ALFREDO WONG GONZALEZ

MONTERREY, N. L., MEXICO

DICIEMBRE 1994

TM

Z5320

FCB

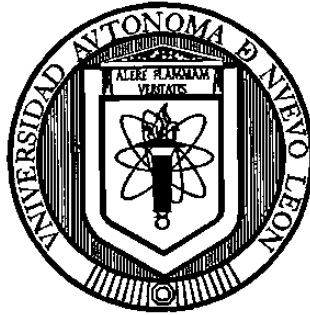
1994

W6



1020091503

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLÓGICA DEL
BACTERIOFAGO $\mu\beta$ -19 ESPECIFICO DE *Bacillus thuringiensis*

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRIA
EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

PRESENTA

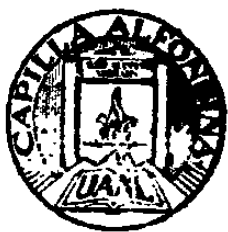


M.V.Z. ALFREDO WONG GONZALEZ

MONTERREY, N.L., MEXICO

DICIEMBRE 1994

TM
25320
FCB
1994
W6

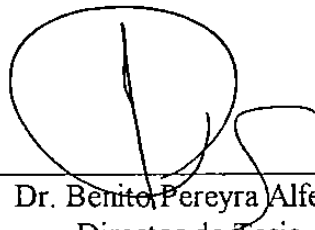


FONDO TESIS

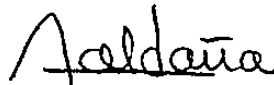
166759

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLOGICA DEL
BACTERIOFAGO μ B-19 ESPECIFICO DE *Bacillus thuringiensis*

Aprobación de Tesis:



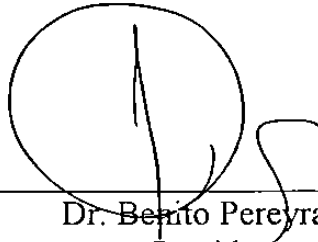
Dr. Benito Pereyra Alferez
Director de Tesis



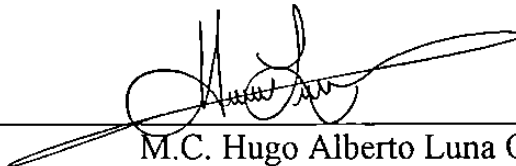
M.C. Jorge M. Saldaña Acosta
Director Externo de Tesis

PURIFICACION Y CARACTERIZACION BIOLOGICA DEL
BACTERIOFAGO $\mu\beta$ -19 ESPECIFICO DE *Bacillus thuringiensis*

Comisión de Tesis:



Dr. Benito Pereyra Alférez.
—Presidente



M.C. Hugo Alberto Luna Olvera.
Secretario



Dr. Luis Jesús Galán Wong.
Vocal

**Todas las cosas brillantes y hermosas,
todas las criaturas, grandes y pequeñas,
todas las cosas sabias y maravillosas,
todas las hizo el Señor Nuestro Dios.**

Cecil Frances Alexander

1818-1895

DEDICATORIA

A MIS PADRES:

Manuel Wong Martínez y Catalina González de Wong.
por todo su apoyo, sacrificios, comprensión y cariño,
quienes con su ejemplo de lucha y servicio en la vida
me educaron, creando en mi un hombre integro y feliz.

A MI ESPOSA:

Ruth
quien con paciencia y amor expresado siempre
me apoyó a conseguir esta meta, en la cual
nos gozamos al compartirla.

i

A MIS HIJOS:

Josué Manuel y Caleb
razón de mi supereración y esfuerzo.

AGRADECIMIENTOS

A Dios: Por las bendiciones y cuidados que me da a cada momento de mi vida. Porque de él, y por él, y para él, son todas las cosas. A él sea la gloria por los siglos

A mis Directores de Tesis:

Dr. Benito Pereyra Alférez y M.C. Jorge Miguel Saldaña Acosta: Por compartir conmigo sus experiencias y enseñanzas en la dirección de este trabajo.

A mi jurado:

M.C. Hugo Alberto Luna Olvera y Dr. Luis Jesús Galán Wong: Por formar parte de la comisión de tesis y su amable colaboración en la revisión de este escrito.

Al M.C. Jorge Hernández P. por su amistad y cortés participación en los estudios de microscopía electrónica.

Al M.V.Z. MCV. Rafael Ramírez Romero y al M.V.Z. Guillermo Dávalos Aranda por su apoyo brindado para la presentación de esta tesis.

A mis amigos:

Pablo Zapata Benavides, Juan José Zárate Ramos y Ramiro Avalos Ramírez por su amistad y apoyo constante durante todo el postgrado.

El presente trabajo se realizó
en el Laboratorio de Genética y
Biología Molecular de Microorganismos
del Departamento de
Microbiología e Inmunología.
Facultad de Ciencias Biológicas U.A.N.L.
bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra A.

NOMENCLATURA

ADN	Acido desoxiribonucleico
ARN	Acido ribonucleico
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
°C	Grados centígrados
g	gramos
I	Susceptibilidad intermedia a antimicrobianos
l	litros
M	Concentración molar
min	minutos
ml	Mililitros
N	Concentración normal
pH	Potencial de Hidrógeno
R	Resistente a antimicrobianos
rpm	Revoluciones por minuto
S	Susceptibilidad a antimicrobianos
s	segundos
UFC	Unidades formadoras de colonia
UFP	Unidades formadoras de placa
UV	Luz ultravioleta
%	Porcentaje

TABLA DE CONTENIDO

	Página
RESUMEN.....	1
Abstract	2
INTRODUCCION.....	3
Hipótesis.....	6
Objetivos del trabajo.....	6
Antecedentes.....	7
MATERIALES Y METODOS.....	18
Cepas de <i>Bt</i> y bacteriófagos.....	18
Purificación del bacteriófago $\mu\beta$ -19.....	18
Propagación de bacteriófagos y determinación del título del lisado fágico.....	19
Morfología al microscopio electrónico.....	20
Espectro de hospedero.....	20
Sensibilidad al cloroformo.....	20
Inactivación de bacteriófagos por agentes quelantes.....	21
Efecto de la luz ultravioleta sobre el bacteriófago $\mu\beta$ -19.	21
Tiempo de adsorción.....	21
Estabilidad al almacenamiento a 4°C.....	22
Termoestabilidad.....	22
Tipo de ácido nucleico.....	22
Evaluación de la capacidad de transducción del bacteriófago $\mu\beta$ -19.....	23
RESULTADOS.....	25
Purificación de bacteriófagos.....	25
Determinación del título del lisado fágico.....	25
Morfología al microscopio electrónico.....	27
Espectro de hospedero.....	28
Sensibilidad al cloroformo.....	29
Determinación de la inactivación por agentes quelantes	29
Efecto de la luz ultravioleta.....	30

	Página
Determinación del tiempo de adsorción.....	31
Determinación de la estabilidad al almacenamiento a 4°C	33
Determinación de la termoestabilidad.....	34
Determinación del tipo de ácido nucleico.....	35
Determinación de la capacidad de transducción.....	36
DISCUSION	38
CONCLUSIONES.....	44
APENDICE	45
Preparación de medios de cultivo.....	45
Preparación de soluciones.....	45
LITERATURA CITADA.....	47

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Patrón de sensibilidad al bacteriófago $\mu\beta$ -19 de algunas serovariedades de la cepa HD de <i>Bacillus thuringiensis</i>	28
2. Patrón de fluorescencia de ácidos nucleicos ADN doble cadena, ARN cadena sencilla, virus vacunal de la rabia y del bacteriófago $\mu\beta$ -19.	35
3. Patrón de susceptibilidad a antimicrobianos de algunas cepas de <i>Bt.</i>	36

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Placas líticas obtenidas por infección del bacteriófago $\mu\beta$ -19 a la cepa indicadora por la técnica de doble capa de agar en estría antes del plaqueado	26
2. Micrografía electrónica del bacteriófago $\mu\beta$ -19 a 28000 aumentos	27
3. Efecto del citrato de sodio sobre el porcentaje de infectividad en el bacteriófago $\mu\beta$ -19	30
4. Efecto de la luz ultravioleta sobre el porcentaje de infectividad en el bacteriófago $\mu\beta$ -19	31
5. Determinación del tiempo de adsorción del bacteriófago $\mu\beta$ -19 sobre la cepa HD-201 de <i>Bt.</i>	32
6. Estabilidad al almacenamiento del bacteriófago $\mu\beta$ -19 a 4° C.	33
7. Determinación de la termoestabilidad del bacteriófago $\mu\beta$ -19	34

RESUMEN

El objetivo de este trabajo es caracterizar el bacteriófago $\mu\beta$ -19, para lograrlo, éste fue purificado a partir de un concentrado fágico por medio de la técnica de estría antes de vaciar en placa, produciendo placas líticas aisladas; el bacteriófago fue propagado por infección de la cepa indicadora (HD-201) en medio líquido YPB (éste rindió 2.5×10^7 ufp/ml). El bacteriófago mostró una ultraestructura característica del grupo B de Bradley (1967) y ADN de doble cadena. Las dimensiones de la cabeza del bacteriófago son 67 nm de diámetro y la cola de 170 nm de longitud. La caracterización físico-química del bacteriófago dió los siguientes resultados: I) Termoestabilidad: se observó que el bacteriófago es termosensible, ya que con 15 minutos de exposición a 50°C , la lisis se redujó 60%, y a temperaturas superiores a 55°C con 5 minutos de exposición fue inactivado. II) Efecto de la Luz Ultravioleta: se encontró que a 90 s, de exposición la infectividad se redujó 40%. III) Almacenamiento a 4°C : La infectividad decayó un logaritmo por mes en su eficiencia de plaqueo, perdiendo hasta un 50% su capacidad de infección después de 6 meses de almacenado. IV) El bacteriófago fue resistente al tratamiento con cloroformo. V) Para su óptima adsorción requiere de cationes divalentes como Mg^{++} y Ca^{++} , ya que los agentes quelantes de estos iones disminuyó su infectividad en un 73% a los 30 minutos de exposición. La caracterización biológica mostró un espectro de hospedero para 11 diferentes subespecies donde sobre salen *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki* y *aizawai*. Además el bacteriófago presentó capacidad de transducción para el marcador de tetraciclina de la cepa donadora HD-324 a la cepa receptora HD-201 con una frecuencia de transducción de 2.5×10^{-4} a una multiplicidad de infección de 0.5.

ABSTRACT

The purpose of this work is to characterize bacteriophage $\mu\beta$ -19. It was purified by selection of lysed plaques after initially streaked on agar before the bacteria were added. The bacteriophage was propagated by infecting the standard strain HD-201 in yeast peptone broth (this gave 2.5×10^7 PFU/ml). The bacteriophage showed an ultrastructure characteristic of the group B of Bradley (1967) and double stranded DNA. The dimensions of the head of the bacteriophage were 67 nm in diameter with a tail 170 nm long. The physical/chemical characterization of the bacteriophage gave the following results: I) Thermostability: the bacteriophage was thermosensitive. A temperature of 50°C for 15 minutes reduced lysis by 60% and temperatures greater than 55°C for 5 minutes caused complete inactivation. II) Effect of UV light: exposure to UV light for 90 seconds reduced infectivity by 40%. III) Storage at 4°C: infectivity decayed logarithmically losing up to 50% of its infectivity after 6 months. IV) The bacteriophage was resistant to treatment with chloroform. V) Optimal adsorption required divalent cations such as Mg^{++} or Ca^{++} since chelating agents of these ions reduced infectivity 73% after exposure for 30 minutes. Biological characterization demonstrated a host spectrum of 11 different subspecies, especially *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki* and *aizawai*. The bacteriophage also was able to transduce the tetracycline marker from the donor strain HD-324 to the recipient strain HD-201 with a transduction frequency of 2.5×10^{-4} at an infection rate of 0.5.

INTRODUCCION

Los virus bacterianos o bacteriófagos, también llamados fagos son un grupo de virus específicos de bacterias y más estrechamente relacionados a los virus de los animales que a los virus de las plantas tanto químicamente como físicamente (3,34,46).

Los bacteriófagos típicos morfológicamente tienen forma de renacuajo (4), es decir consta de una cabeza y una cauda. La cabeza presenta un denso paquete central de ácido nucleico rodeado por una cubierta de proteína o cápside. La cápside esta formada por subunidades idénticas, agrupadas para formar una estructura geométrica, generalmente hexagonal en sección transversal. La cauda de los bacteriófagos varía grandemente en complejidad de un tipo a otro. Las caudas más complejas constan por lo menos de tres partes que son : un tallo central hueco, una vaina contráctil y una placa basal terminal, de forma hexagonal, en la cual pueden estar implantadas púas y/o fibras caudales. Los bacteriófagos también varían con respecto a la estructura terminal de la cauda; unos tienen placas basales, otros botones y algunos otros carecen de estructuras terminales específicas (25,27).

La cauda es el órgano de adsorción (27,51) este se adhiere a los receptores de la superficie bacteriana, siendo específicos estos para cada tipo de fago. A través de la cauda, el bacteriófago inyecta el ácido nucleico al interior de la célula hospedera (4,39) quedando en el exterior de la célula la cubierta proteínica que forma la cápsula de la cabeza y la estructura de la cola (39). Inmediatamente después de la inyección del ácido nucleico (denominado bacteriófago vegetativo) a la célula hospedera, el virus bacteriano emplea la maquinaria metabólica del

hospedero para la construcción de sus macromoléculas, al inicio de la infección (período de eclipse), se sintetizan numerosas proteínas (proteínas tempranas). Entre estas se incluyen ciertas enzimas necesarias para la síntesis del ácido nucleico del bacteriófago. Posteriormente aparecen proteínas tardías, las cuales incluyen subunidades de la cabeza y cola del bacteriófago, así como una lisozima que degrada la capa de peptidoglicana de la pared celular del hospedero y así liberar la progenie de bacteriófagos. Todas las enzimas, proteínas tempranas y tardías del bacteriófago son sintetizadas por la célula bacteriana utilizando la información genética proporcionada por el ácido nucleico del fago. Posteriormente continúa el período de maduración que consiste en la combinación irreversible del ADN del bacteriófago con una cubierta proteínica. La partícula madura es, desde un punto de vista morfológico, un virus infeccioso típico y no se reproduce más en la célula en la cuál se originó (27).

Finalmente, la célula hospedera se lisa debido a la presión osmótica sobre la pared celular debilitada por una proteína tardía, la lisozima, liberando los viriones infecciosos (4).

Debido a la facilidad con la cual ellos y sus hospederos pueden crecer y ser estudiados así como, la alta precisión con la cual los bacteriófagos pueden ser ensayados, además una sola célula hospedera infectada puede ser fácilmente aislada y observada en la ausencia de la interacción con otras células, los virus bacterianos se han convertido en modelos de investigación de la relación virus-hospederos y en el estudio de morfogénesis y diferenciación celular.

Los virus bacterianos también han sido usados como herramientas para el estudio de la síntesis de proteínas y ácidos nucleicos de células infectadas, como

un sistema de prueba en contra de las enfermedades virales en la búsqueda de la posible quimioterapia e investigación sobre agentes antibióticos, así como en el estudio del fenómeno de interferencia viral, y en la acción de ciertos agentes físicos como la luz ultravioleta y los rayos X sobre los mismos virus, además de aplicarse en el estudio de modelos mutantes de virus y bacterias y en la movilización de genes (3,39).

Los bacteriófagos de *Bacillus thuringiensis* han sido utilizados en la identificación de esta bacteria (42) y representan una herramienta importante en el estudio de la distribución y la genética de esta bacteria entomocida sobre todo en nuevos aislados de cepas de la región, por lo cual, es muy importante la correcta caracterización físico-química y biológica de estos virus bacterianos.

A la fecha no se ha llevado a cabo ningún estudio de caracterización de bacteriófagos de *Bt* que incluyan bacteriófagos específicos a cepas HD de nuestra colección internacional, por lo cual, nos propusimos realizarlo.

HIPOTESIS

- 1.- La caracterización del bacteriófago $\mu\beta$ -19 puede lograrse con un adecuado estudio de los rasgos fisicoquímicos y biológicos.
- 2.- La caracterización del bacteriófago $\mu\beta$ -19 es el instrumento que permite elegir las condiciones adecuadas para evaluar la capacidad de transducción de este bacteriófago en cepas de *Bt*.

OBJETIVOS

- 1.- Purificación y caracterización biológica del bacteriófago $\mu\beta$ -19 específico de *Bacillus thuringiensis*.
- 2.- Evaluación de la capacidad de transducción del bacteriófago $\mu\beta$ -19.

ANTECEDENTES

El descubrimiento de los bacteriófagos se acredita a Federick W. Twort en Inglaterra (1915) y a Félix d'Herrelle en el Instituto Pasteur de París (1917), quienes independientemente observaron los efectos de estos agentes filtrables sobre las bacteria que infectaban (21,39). Twort describió una enfermedad infecciosa aguda de *Staphylococcus* que producía marcados cambios a la morfología colonial. El agente infeccioso filtrable, podía pasar indefinidamente de una serie de cultivo a otro. Por otro lado, d'Herrelle reportó e interpretó correctamente muchos de los aspectos significativos de la acción de los fagos y denominó bacteriófago a la sustancia bacteriolítica que aisló de las heces, considerando que el agente filtrable sería un microbio vivo invisible, parásito de las bacterias y lo nombró *Bacteriophagium intestinalle* que significa Bacteria Comedora Intestinal, y se refería a la capacidad de los fagos de causar lisis a las colonias bacterianas en crecimiento, también observó la evidencia de que la lisis era acompañada de la producción de más fagos; el agente lítico es transmitido en serie de un cultivo a otro de bacterias susceptibles (3,36,39).

La importancia del papel de los bacteriófagos en el control natural de enfermedades infecciosas, no han sido asentadas hasta hoy, no obstante, una gran cantidad de investigaciones fue dedicada a la posible aplicación terapéutica de los fagos entre 1920 y 1940. Las primeras esperanzas de su uso médico efectivo, estimuló a muchos investigadores a realizar valiosos trabajos sobre el espectro de hospedero, propiedades inmunológicas, estabilidad, variación y otras características de los bacteriófagos.

Los bacteriófagos no han sido usados con éxito en la terapéutica; sin embargo, debido a la similitud físico-química y propiedades biológicas que presentan con otros virus han sido usados como modelos para estudiar virus animales (3,27). Gracias a la especificidad que presentan los bacteriófagos sobre las diferentes especies de bacterias, ha permitido aplicarlos en la identificación y/o clasificación de las mismas (42).

Por medio de los bacteriófagos específicos Félix en 1955 fué capaz de diferenciar algunas especies de *Salmonella* de otras enterobacterias (22). El espectro de hospedero es una característica útil para la identificación de cepas de bacteriófagos (3); y dado que cada bacteriófago presenta un espectro de hospedero particular permite aplicarlos en taxonomía bacteriana, y además como un marcador de selección.

Para realizar la caracterización físico-química de un virus este debe de estar aislado y purificado en la cantidad adecuada para ese propósito. Por lo general, es difícil obtener mas de 10^{10} partículas de bacteriófagos por ml. en preparaciones concentradas de lisados a gran escala. Sin embargo, lisados de los llamados bacteriófagos T son ahora fácilmente obtenidos con títulos superiores a 5×10^{11} por ml. La primera purificación con éxito de bacteriófagos fue llevada a cabo por Schlesinger en 1933 usando colifagos WLL relacionados a el T2, del grupo serológico C11. La bacteria hospedadora fue desarrollada en un medio químicamente definido para evitar contaminación a base de productos de peptona y proteínas como material inicial. La bacteria hospedadora y las grandes partículas de desecho fueron removidas con filtros bacteriológicos. Los bacteriófagos fueron concentrados por medio de membranas coloidales de poro suficientemente pequeño para retener a los bacteriófagos (28). El concentrado

fágico fue purificado en gradientes a alta velocidad (3). Northrop (1938) concentró y purificó bacteriófagos de *Staphylococcus* utilizando con éxito la técnica de purificación con enzimas. El líquido sobrenadante era concentrado *in vacuo* a 1/20 de su volumen y digerido con tripsina, la cual no daña a los bacteriófagos (38).

Hershey, Kalmanson y Bronfenbrenner en 1949 prepararon altas concentraciones de suspensiones fágicas por medio de un simple lavado de bacteriófagos de la superficie de placas de agar sobre las cuales habían sido lisadas grandes cantidades de bacterias obtenidas de esta forma de 10^{11} a 10^{12} partículas de bacteriófagos por ml (3). Este método también fue desarrollado y aplicado por Swantrom y Adams en 1951 para 7 colifagos de la serie T , resultando con una concentración fágica de cerca de 10 veces más alta que la obtenida en lisados en caldo. Este método también fue aplicado por Cohen y Arbogast en 1950 y por Marshak en 1951 (15,35,47).

Observaciones directas al Microscopio Electrónico, pueden detectar un conjunto de bacteriófagos y también partículas contaminantes con propiedades de sedimentación similares a aquellas partículas fágicas. Históricamente, el desarrollo tecnológico del microscopio electrónico y el conocimiento científico de la estructura de los bacteriófagos han estado estrechamente relacionado (52).

La primera aplicación del microscopio electrónico al estudio de los bacteriófagos fue realizada por Ruska en 1940, donde publicó la primera fotografía de una bacteria infectada por bacteriófagos (3,52) e hizo posible determinar la morfología de los virus bacterianos y condujo también a un

conocimiento mas completo de las características de todos los virus (18,39). Los bacteriófagos, manifestaron rápidamente que tenían una forma particularmente notable (3). Un curso acerca de bacteriófagos fue instituido en 1949 en el Laboratorio de Cold Spring Harbor. El desarrollo de la nueva Biología Molecular, fue altamente adeudada a la investigación de bacteriófagos (12).

El primer estudio de descripción morfológica de bacteriófagos fue publicado en 1969, en donde los bacteriófagos eran enlistados por el nombre, especie hospedera, dimensiones y referencia. Este estudio incluía 111 virus, 99 de los cuales presentaban cauda y eran cúbicos o filamentosos. Un estudio similar que apareció en 1968 incluía 298 bacteriófagos. Estos listados tan detallados eran muy imprácticos debido a el enorme número de referencias involucradas. Subsecuentemente, los bacteriófagos fueron enlistados por morfotipo y el género de su hospedero o simplemente de acuerdo a una morfología más general y a un grupo mayor de géneros (1).

Los bacteriófagos presentan seis tipos morfológicos según David E. Bradley, 1967 (10).

- A. Los más complejos tienen una cabeza hexagonal, cola rígida con vaina contráctil y fibras caudales.
- B. Similares a los primeros, excepto que carecen de vaina contráctil; su cola es flexible y tienen o no apéndices terminales.
- C. Se caracterizan por tener cabeza hexagonal y cola más corta que la cabeza; la cola no es contráctil y puede o no tener apéndices.
- D. Hexagonales con capsómeros grandes en cada vertice del hexágono; no tienen cola.
- E. Un hexágono simple sin los grandes capsómeros que poseen los cuatro grupos

anteriores.

F. Un filamento sencillo y largo sin cabeza ú otra estructura característica de la mayor parte de los bacteriófagos.

Otro estudio detallado incluye 2857 bacteriófagos de entre 90 géneros bacterianos. De esos bacteriófagos, 2721 presentaban cauda y sólo 136 eran cúbicos, filamentosos o pleomórficos. Desde entonces, muchos bacteriófagos han sido descritos y la taxonomía bacteriana a sufrido cambios importantes (1).

En 1992, Ackerman enlistó a los bacteriófagos por morfotipos y géneros de las bacterias hospedadoras. Encontró que, al menos 4007 bacteriófagos que han sido descritos pertenecen a 13 familias de virus. Cerca de 3850 bacteriófagos (96%) tienen cauda y 154 bacteriofagos (4%) son cúbicos, filamentosos ó pleomórficos. *Siphoviridae* ó bacteriófagos con grandes caudas no contráctiles constituyen el 60% de bacteriófagos con cola. Los bacteriófagos son encontrados en más de 100 géneros bacterianos incluyendo archaeobacteria y rickettsiae (1).

Los diversos tipos morfológicos de bacteriófagos se caracterizan también por tener diferentes tipos de ácido nucleico. Los tipos A, B, y C de Bradley tienen morfología exclusiva de los bacteriófagos y presentan ADN de doble cadena, los tipos morfológicos D y F presentan un tipo de ácido nucleico ADN de cadena sencilla y el grupo E un ácido nucleico ARN de cadena sencilla (10,39).

La tinción de ácidos nucleicos virales con naranja de acridina y su subsecuente examinación bajo el microscopio de fluorescencia permite determinar el tipo de ácido nucleico que poseen los bacteriófagos. Con esta técnica es posible por

medio de diferencias en color distinguir entre un ADN de doble cadena por un lado y un ADN de cadena sencilla ó ARN de cadena sencilla por el otro (9).

La adsorción del bacteriófago a la célula hospedera es la etapa en el ciclo de infección más fácilmente accesible para su estudio en el laboratorio y por lo tanto mejor conocido. La adsorción puede ser definida como la unión de las partículas fágicas a la superficie bacteriana . Si la adsorción es evitada, el proceso de infección no puede llevarse a cabo y la célula hospedera continúa multiplicandose como si el bacteriófago no estuviera presente. Un factor crucial en la adsorción es el medio ambiente iónico, así que una de las primeras cosas a considerar en el estudio de cualquier nuevo sistema fago-bacteria es el efecto de la variabilidad de la concentración de sal y/o iones en el medio de cultivo. Una desfavorable concentración de sal puede evitar la adsorción de bacteriófagos. También es probable que un anticuerpo contra el bacteriófago actúe en parte por interferencia con la adsorción, y el anticuerpo contra la bacteria pueda también prevenir la adsorción a través de la envoltura de los sitios receptores de la bacteria. La especificidad de la relación fago-bacteria es en la mayoría de los casos determinada por el proceso de adsorción. La adsorción es un proceso específicamente notable. Una sola mutación sobre alguna parte de una célula hospedera resulta en la perdida de la habilidad para adsorber un bacteriófago en particular, sin la perdida de la susceptibilidad para otros bacteriófagos estrechamente relacionados. Por otra parte, los bacteriófagos por una mutación simple pueden ganar la habilidad para adsorber a un hospedero en particular sin otro cambio notable detectable en las propiedades virales (3).

Los bacteriófagos comúnmente estudiados son extraordinariamente estables bajo condiciones apropiadas. El título de infección puede bajar a una velocidad

de uno por ciento por día, ó frecuentemente mucho menos. La estabilidad depende de muchos factores del medio ambiente, algunos de los cuales actúan diferente sobre la diversidad de bacteriófagos. Los bacteriófagos son generalmente estables en sus propios lisados siempre y cuando contengan electrolitos apropiados y esten libres de agentes específicos de inactivación (sustancias receptoras) derivados de el lisado de bacterias. Los bacteriófagos purificados son generalmente estables en soluciones neutras, buffer preparado con agua destilada-glass, conteniendo 0.1 M de cloruro de sodio y 0.001 M de cloruro de magnesio.

Por otra parte, Lark y Adams en 1953 encontraron que el Citrato, Etilenodiaminotetracetato y trifosfato aceleraba la inactivación del bacteriófago T5 a bajas concentraciones de sal. Esas sustancias pueden actuar por formación de un complejo con algún catión unido al bacteriófago. Concentrados líticos de bacteriófagos T5 son heterógenos con respecto a la susceptibilidad de la acción de los agentes quelantes, donde las curvas de inactivación no son exponenciales con respecto a el tiempo(24). Otro tipo de sustancias químicas utilizadas en la caracterización biológica de bacteriófagos son el cloroformo y el timol usadas en la preservación de los bacteriófagos (3,24).

D'Herrelle en 1926 notó que varios bacteriófagos eran inactivados por calor a 75° C por 30 minutos, pero algunos sobrevivían después de calentarlos a 70° C. Observaciones de este tipo permiten notar una característica definida de temperatura de inactivación, característica para cada bacteriófago, análogo al punto de muerte termica usado para reportar el resultado similar con bacterias. Tal información cualitativa es suficiente para los propósitos prácticos, y así permitir el uso de tratamiento de calor en lugar de filtración para eliminar

bacterias de las preparaciones de los bacteriófagos. Estudios cualitativos de los efectos de la temperatura muestran que los bacteriófagos son inactivados de acuerdo a una cinética del primer orden. El coeficiente de temperatura de inactivación es muy alta, la constante de Arrhenius va de el orden de 100 kilocalorías. El sólo conocer la reacción con ese coeficiente alto de temperatura de laboratorio muestra la desnaturalización térmica (3).

La luz UV produce importantes efectos fisiológicos y genéticos, tal como inducir a los bacteriófagos a desarrollarse en bacterias lisogénicas, causando una demora en la producción de los fagos que sobreviven a la irradiación, estimulando la recombinación genética, y ejerciendo una acción mutagénica. Algunos de los efectos de la luz UV son reversibles bajo condiciones apropiadas. La luz UV ha sido usada para el estudio del desarrollo intracelular de bacteriófagos.

Repetidas observaciones del efecto letal de la luz UV han sido hechas desde 1922. El primer estudio cualitativo parece ser llevado a cabo por Baker y Nannavutty en 1929. Esos investigadores encontraron que la inactivación de el fago shiga esta en función exponencial a la dosis de la luz UV hasta una sobrevivencia de 10^{-5} . Con el uso de filtros fue posible determinar que los bacteriófagos a una longitud de onda arriba de 300 nm son inocuos y que la longitud de onda de máximo efecto es por abajo de 265 nm. Gates en 1934, usando un filtro monocromático para el aislamiento de emisión de líneas simples, estudió la inactivación de fagos de *Staphylococcus* y encontró que la cinética de inactivación seguida de un exponencial simple para todas las longitudes de onda estudiadas eran de 230 a 297 nm. La energía total de onda por medio de un termofilo, que permitiera un determinado espectro de acción para la inactivación ultravioleta de este bacteriófago. Encontró que la energía incidente requerida para

inactivar a una fracción de la población de bacteriófagos decrece continuamente entre 295 y 260 nm., luego incrementa a un punto máximo de 240 nm. y finalmente decrece otra vez hacia 230 nm (3).

Northrop en 1938 determinó el espectro de adsorción de la luz ultravioleta para los fagos purificados de *Staphylococcus* y encontró que eran muy similar al espectro de acción informado por Gates. Investigadores análogos llevaron a cabo subsecuentemente la determinación del espectro de acción de la inactivación de luz ultravioleta para los fagos T1, T2 y el M5 de *Bacillus megaterium* y el espectro de absorción ultravioleta de suspensiones purificadas de T6, T2 y T7, mostrando que en todos los casos que tanto el espectro de acción como el de absorción son muy similares para el espectro de absorción típico de ácidos nucleicos purificados, la cual manifiesta un máximo de absorción cercano a 260 nm de longitud de onda (3).

Ciertas cepas de bacteriófagos temperados son capaces de llevarse una parte del material genético de una bacteria donadora sobre la cual los bacteriófagos se han multiplicado, a una bacteria receptora a la cual infectaron posteriormente, a este mecanismo de transferencia de genes se llama transducción (3,40,45,46). Entre las células receptoras que sobrevivieron a la infección, algunas adquieren nuevas propiedades genéticas que originalmente eran observadas en las bacterias donadoras. En muchos de los casos la transducción no es específica se ha observado en *Salmonella* y en *E. coli* y entre *Bt* y *B. cereus*. Cuando los caracteres están estrechamente unidos, estos pueden ser transducidos juntos y esta posibilidad ha sido usada sistemáticamente para análisis genéticos de segmentos pequeños de cromosomas bacterianos.

Entre los caracteres que pueden ser transducidos de una bacteria donadora a una receptora están los caracteres lisogenicos propios de ellos. Los bacteriófagos actúan como vectores y pueden llevar, en adición a su propio material genético, un segmento del cromosoma bacteriano acarreado uno o más profagos no relacionado. En otras palabras un bacteriófago envuelto puede contener la información necesaria para la síntesis de dos o tres bacteriófagos diferentes (3).

Thome C.B. en 1978 realizó un trabajo de transducción con los bacteriófagos CP-51 y CP-54 de *B. cereus* en cepas auxótrofas de *Bt* hacia prototrofia (48).

Landén R. y colaboradores en 1981 aislaron del suelo un bacteriófago al que denominaron 063, el cuál podía transducir cuatro genes para la resistencia de antibióticos, empleando para ello mutantes auxótrofos de subespecies de *B. thuringiensis* (29).

Desde 1960, los bacteriófagos de *Bacillus thuringiensis* han sido conocidos, sin embargo solamente existen dos informes sobre su posible aplicación en la clasificación de de esta bacteria (7,53).

En 1969, Colasito y Rogoff caracterizaron un grupo de 6 bacteriófagos líticos de *Bacillus thuringiensis* (32). Como base para establecer una caracterización más completa del bacteriófago se tomaron los estudios realizados por otros investigadores (2,4,16,20) tanto de purificación, determinación del espectro de hospedero, espectro de adsorción y de microscopía electrónica.

La importancia del trabajo es la aplicación del bacteriófago caracterizado como modelo en la identificación y clasificación de nuevos aislados de *Bacillus thuringiensis*, así como también en el estudio de su biología y en estudios de genética microbiana.

MATERIALES Y METODOS

I

Cepas de *Bt* y bacteriófagos

Se utilizaron 22 cepas HD de *Bacillus thuringiensis* de la clave HD, provenientes de la Colección Internacional de Bacilos Entomopatogenos. Catálogo de *Bacillus thuringiensis*, Aislados y Extractos. Clasificación por Antígeno H, 1992 del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Se empleó el Bacteriófago $\mu\beta$ -19 específico de *Bacillus thuringiensis* obtenido de la colección del Laboratorio de Genética y Bioquímica Microbiana del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L.

Purificación del bacteriófago $\mu\beta$ -19

En cajas petri de 15 x 115 mm con 20 ml de medio YPA se propagaron los bacteriófagos del concentrado fágico por estría sobre un tapiz de la cepa indicadora. Posteriormente se usaron dos técnicas diferentes para la purificación y propagación.

Purificación por estría antes de plaquear: Se picó una sola placa líticas aislada con un palillo estéril y se inoculó por estría al centro de una caja petri con agar YPA, sobre está se sembró por vaciado 0.2 ml de la cepa indicadora con 3 ml de agar suave y se incubaron 12 horas a temperatura ambiente, este procedimiento se repitió al menos 25 veces.

Purificación en estría después de plaquear: Sobre cajas petri con agar 20 ml de YPA se inoculó por vaciado 2 ml de agar suave con 0.2 ml de la bacteria indicadora posteriormente se picó con un palillo esteril una placa lítica aislada tomada del aislamiento inmediato anterior y se hizo una estría al centro de la placa; las cajas se incubaron 12 horas a temperatura ambiente.

Propagación de bacteriófagos y determinación del título del lisado fágico:

Para obtener suficiente material biológico que nos permitiera llevar a cabo la caracterización del fago se realizaron las siguientes técnicas :

Propagación de bacteriófagos en medio líquido: En un matraz Erlen Meyer de 125 ml con 10 ml de caldo YPB fue inoculado 0.1 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora *Bt* HD-201 y 0.1 ml del lisado fágico, se agitó 8 horas a 100 rpm. Posteriormente se le añadió 0.1 ml de cloroformo y la mezcla fue centrifugada a 10,000 rpm durante 25 min, se colectó el sobrenadante y se conservó a 4° C en la oscuridad hasta su uso.

Determinación del título del lisado fágico : Para determinar el título del lisado fágico obtenido, se realizó la técnica de vaciado en placa. En un tubo de ensaye 13 x 100 con 3 ml de medio de cultivo YPA suave, se mezcló 0.1 ml de un cultivo bacteriano de toda la noche (aproximadamente 4×10^4 bac/ml) y 0.1 ml de una serie de diluciones decimales del lisado fágico, esta suspensión se sembró por vaciado en placa, incubandose 12 horas a 35°C, se contó el número de unidades formadoras de placas por mililitro de lisado fágico (ufp/ml).

Morfología al microscopio electrónico

Para observar la morfología del bacteriófago a caracterizar se utilizó la técnica de tinción negativa por flotación; una gota de lisado fágico, con un título mayor de 2×10^7 UFP/ ml, se dejó absorber por 1 min sobre una rejilla de cobre, posteriormente se lavó con Acetato de Amonio 10^{-1} M pH 7 por 4 min, se tiñó con Acetato de Uranilo al 2% pH 4.5 por un min, se eliminó el exceso de colorante con Acetato de Amonio 10^{-1} M pH 7 y se observó al Microscopio Electrónico Zeiss, Modelo EM-9 a 28,000 aumentos.

Espectro de hospedero

En placas de petri con 20 ml de YPA se espatularon 0.15 ml del lisado fágico concentrado. Se inocularon por parchado las diferentes cepas de *Bt*, las cajas sembradas se incubaron por 12 horas a 35°C. También se utilizó el método doble capa de agar para determinar la sensibilidad de las cepas probadas ante el bacteriófago en estudio, en tubos de ensaye 13 x 100 con 3 ml de agar suave YPA se les agregó 0.1 ml de cada una de las cepas y se vaciaron en una caja petri con medio YPA respectivamente, finalmente se les añadió 0.15 ml del lisado fágico, se incubaron por 24 horas a 35 °C y se observó el resultado.

Sensibilidad al cloroformo

En un tubo eppendorff con 0.1 ml de cloroformo puro se sirvieron 0.5 ml del lisado claro del bacteriófago con un título de 6×10^3 ufp/ml, se agitó por 10 min a temperatura ambiente, se centrifugó a 12,000 rpm por 5 min posteriormente se determinó el título de los sobrenadantes de acuerdo a la metodología descrita.

Como control en lugar de cloroformo a la suspensión de fagos se agregó solución salina al 0.85% estéril.

Inactivación de bacteriófagos por agentes quelantes

La suspensión fágica se diluyó a 1×10^{-2} UFP/ml en Citrato sódico 10^{-2} M pH 8.5. Se incubó 1 ml de esta suspensión a 37°C durante 40 min, se tomaron muestras de 0.1 ml cada 5 min la reacción se detuvo por la adición de 2 ml de TMG. Posteriormente se determinó el título fágico de acuerdo a la metodología antes descrita.

Efecto de la luz ultravioleta sobre el bacteriófago $\mu\beta$ -19

En una placa de dilución se colocaron 0.2 ml del lisado fágico con un título de 2×10^5 UFP/ml estos se expusieron a una lámpara de luz UV (onda corta), por diferentes intervalos de tiempo (10, 20, 40, 60 y 90 s) a una distancia de 20 cm, y se determinó la infectividad del bacteriófago así tratado sobre la cepa indicadora.

Tiempo de adsorción

En un tubo eppendorff estéril se sirvieron 0.1 ml de un cultivo de toda la noche de la cepa indicadora se tomó y 0.1 ml de una dilución 6×10^{-5} UFP/ml del lisado fágico, a diferentes intervalos de tiempo desde 0, 5, 10, 15 y 20 min, estas mezclas fueron vaciadas en placas con medio YPA e incubados durante 12 horas a 34°C y se determinó el título fágico a los diferentes tiempos de adsorción.

Estabilidad al almacenamiento a 4°C

El lisado fágico concentrado se almacenó a una temperatura de 4° C en obscuridad durante 6 meses, se probó su capacidad de infectividad y título a diferentes tiempos sobre la cepa indicadora HD-201 de *Bt* de acuerdo a la metodología ya descrita.

Termoestabilidad

Se probó la estabilidad térmica del bacteriófago a 45, 50, 55, 60, 70°C. El fago fue diluido a 2×10^5 ufp/ml en medio YPB, cada una de las diluciones se incubó a la temperatura deseada durante un tiempo total de 30 min tomándose muestras alícuotas de 0.1 ml a intervalos de 5 min y se determinó su título fágico.

Tipo de ácido nucleico del bacteriófago

Con el asa bacteriológica se sirvió en el centro de un portaobjetos excavado una gota del lisado fágico se dejó secar, la preparación fue fijada por 5 min con la solución de Carnoy. Posteriormente fue sumergida por 1 min en una serie de diluciones de etanol al 100, 90 y 80% respectivamente y enjuagados con agua destilada. Las laminillas así tratadas fueron cubiertas con solución Mc Ilvaine (ácido cítrico + buffer fosfato a pH 4.0) por 10 min. Finalmente los portaobjetos excavados fueron teñidos con una solución acuosa de naranja de acridina al 0.01% por 5-10 min. Las preparaciones teñidas fueron examinadas en un microscopio de epifluorescencia Zeiss.

Propagación de la cepa HD- 201 receptora : La cepa HD -201 receptora se incubó a 34°C por 18 horas en caldo YPB. Del cultivo así crecido se transfirió 1 ml y se centrifugó a 3000 rpm por 5 min se desecho el sobrenadante y la pastilla celular se resuspendió en 1 ml de caldo YPB.

Ensayo de transducción : Los bacteriófagos transductantes se diluyeron a 10^{-1} en caldo YPB, de esta dilución se tomó 0.1 ml y se sirvió en un tubo eppendorff con 1 ml de la suspensión de la cepa HD-201 receptora. La mezcla de transducción se incubó a 35°C durante 30 minutos, pasando el período de incubación, se sembró por espatulado 0.1 ml de la mezcla de transducción en cajas de petri con medio YPA + tetraciclina a una concentración de 50 μ g; y en medio YPA sin antibiótico. Las placas sembradas se incubaron a 34°C por 48 horas, al termino del período de incubación se examinaron y contaron las colonias desarrolladas. Estas colonias de transductantes se resembraron por estría en otras cajas de petri que contenían el mismo medio de selección, se realizaron 3 pases para confirmar su estabilidad de carácter. Las colonias obtenidas se resembraron en medio YPA inclinado e incubó a 34°C por 24 horas y se almacenó a 4°C. Como control la cepa receptora se sembró en medio con el antibiótico y asimismo el lisado fágico.

Evaluación de la capacidad de transducción del bacteriófago $\mu\beta$ -19

Para establecer la capacidad de transducción del bacteriófago $\mu\beta$ -19 se seleccionaron marcadores de resistencia a antibióticos en las cepas donadoras de *Bacillus thuringiensis* y su contraparte (sensibilidad) en las receptoras. Una vez seleccionada la cepa receptora y donadora, se obtuvieron bacteriófagos transductantes sobre la cepa donadora y con ellos se infectó a la cepa receptora y se evaluó su capacidad de transducción.

Determinación del patrón de sensibilidad o resistencia a antibióticos: Las cepas de *Bt* sensibles al bacteriófago fueron sembradas por espatulado sobre agar de Mueller-Hinton en cajas de petri, sobre el tapiz de bacterias se colocó un multidisco para gram positivos y se incubó a 35°C por 24 horas finalmente se midieron los diámetros de los halos de inhibición alrededor del crecimiento de cada antibiótico seleccionado así la sensibilidad ó resistencia de cada cepa. En base a este patrón se seleccionó el antibiótico y las cepas a utilizar.

Obtención de bacteriófagos transductantes : Los bacteriófagos transductantes fueron obtenidos por infección de un cultivo de toda la noche (8×10^4 UFC/ml) de la bacteria donadora *Bt* cepa HD-324 más 0.2 ml del lisado fágico concentrado del $\mu\beta$ -19 con un título 1×10^7 UFP/ml, en un matraz Earlen Meyer de 125 ml con 10 ml de caldo YPB, se incubó a temperatura ambiente en agitación rotatoria a 200 rpm por 6 horas, luego el contenido del matraz fue colocado en un tubo de ensayo 18 x 150 mm estéril y centrifugado a 2500 rpm/ 15 min. El sobrenadante se pasó a tubo de ensayo con tapón de rosca estéril el cual se título y conservó a 4°C en la oscuridad hasta su uso.

RESULTADOS

Purificación de bacteriófagos

Para llevar a cabo la caracterización del bacteriófago $\mu\beta$ -19 fue necesario comprobar la pureza de los lisados fágicos empleados como fuente de material biológico. Al sembrar por vaciado en placa estos lisados sobre la cepa indicadora se obtuvieron tres diferentes tamaños de placas líticas.

De las dos técnicas de purificación empleadas. La más eficaz fue la de estría antes del vaciado en placa, que mostró una mayor y mejor distribución de bacteriófagos sobre el tapiz bacteriano, con la obtención de placas líticas completamente aisladas (Fig.1), mientras que en la de estría después de sembrar en placa, solo se presentaron halos de lisis a lo largo de la estría. La técnica de estría antes de plaquear se reprodujo 25 veces hasta obtener la misma morfología de placa sobre el tapiz de la cepa indicadora.

Determinación del título de lisado fágico :

Para efectuar la caracterización biológica del bacteriófago $\mu\beta$ -19 fue necesario poseer un lisado fágico con un alto título de unidades formadoras de placas por mililitro (ufp/ml) para lo cual el bacteriófago purificado fue propagado en medio líquido por infección de la cepa indicadora en caldo YPB, la propagación en medio líquido dió el rendimiento adecuado para los objetivos planteados.

La propagación del bacteriófago $\mu\beta$ -19 en caldo YPB rindió un concentrado de lisado fágico con un título de 2.5×10^7 UFP/ml.



Figura 1. Placas líticas obtenidas por la infección del bacteriófago $\mu\beta$ -19 a la cepa indicadora de *Bt* por medio de la técnica de doble capa de agar en estría antes del vaciado en placa.

Morfología al microscopio electrónico

La Figura 2 muestra la ultraestructura del bacteriófago $\mu\beta$ -19, donde se puede observar un solo tipo de morfología de bacteriófagos, estos mostraron ultraestructura de cabeza hexagonal y cola, además de una placa basal; esta morfología es característica del grupo B de la clasificación propuesta por Bradley en 1967. La cabeza del bacteriófago midió 67 nm de diámetro y la cola 170 nm de largo.

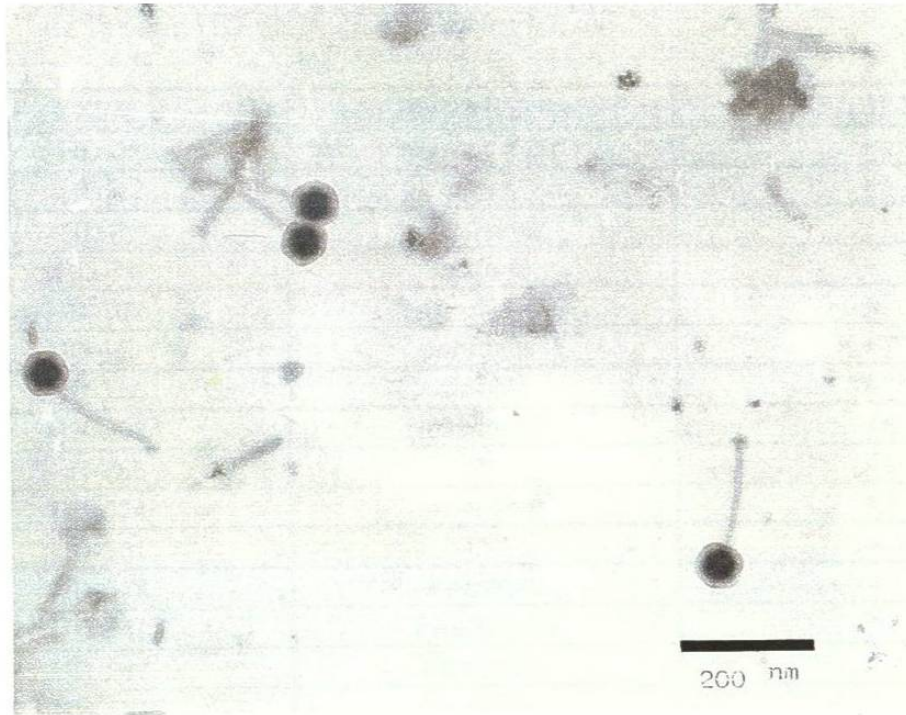


Figura 2. Micrografía electrónica del bacteriófago $\mu\beta$ -19 infeccioso de *Bacillus thuringiensis* a 28,000 aumentos.

Espectro de hospedero

Para precisar la especificidad y espectro de hospederos del bacteriófago $\mu\beta$ -19 se infectaron varias subespecies de *Bt* de la serie HD (tabla 1).

La técnica de vaciado en placa dió mejor resultado para este tipo de análisis que el método de parchado; de la 22 cepas probadas, 14 resultaron sensibles a la infección por el bacteriófago $\mu\beta$ -19 y las 8 restantes fueron resistentes.

Tabla 1.- Patrón de sensibilidad al bacteriófago $\mu\beta$ -19 de algunas serovariedades de la cepa HD de *Bacillus thuringiensis*.

CEPA	SEROVARIEDAD	SENSIBILIDAD
HD-2	<i>thuringiensis</i>	+
HD-4	<i>alesti</i>	+
HD-7	<i>dendrolus</i>	-
HD-73	<i>kurstaki</i>	+
HD-109	*	+
HD-121	<i>tolworthi</i>	+
HD-126	<i>aizawai</i>	+
HD-201	<i>toumanoffi</i>	+
HD-266	*	-
HD-324	<i>morrisoni</i>	+
HD-501	*	+
HD-518	<i>morrisoni</i>	-
HD-541	<i>kyoshuensis</i>	+
HD-542	<i>thompsoni</i>	-
HD-553	<i>canadiensis</i>	-
HD-567	<i>israelensis</i>	+
HD-650	*	-
HD-847	<i>colmeri</i>	-
HD-866	<i>tohokuensis</i>	+
HD-867	*	+
HD-869	*	+
HD-930	<i>sotto</i>	-

+, positivo; -, negativo; *, no determinada.

Sensibilidad al cloroformo

Una de las formas más usadas para la conservación de los lisados fágicos es en presencia de cloroformo, ya que este sirve impide la contaminación microbiana de los lisados fágicos; pero se sabe que algunos bacteriófagos son sensibles a este reactivo. Los resultados revelaron que el bacteriófago $\mu\beta$ -19 es resistente al cloroformo ya que no mostró modificación en su capacidad de infección y viabilidad después de la exposición a este agente. Al determinar el título de la dilución del lisado fágico expuesta al cloroformo, así como el control sin cloroformo, ambos dieron como resultado el mismo número de ufp/ml (6×10^3).

Determinación de la inactivación por agentes quelantes

Efecto del citrato de sodio sobre el bacteriófago $\mu\beta$ -19:

Con el propósito de determinar la necesidad de un ambiente iónico específico ó el requerimiento de iones divalentes como Mg^{++} y/o Ca^{++} . Se probó la acción del citrato de sodio 10^{-2} M sobre la infectividad del bacteriófago en la cepa indicadora.

Por los resultados obtenidos se pudo observar que el bacteriófago requiere de los iones divalentes Ca^{++} y Mg^{++} a una concentración de .001M para una mejor adsorción. Con un tiempo de exposición de 10 min el efecto del citrato de sodio 10^{-2} M no reveló cambio alguno en la eficiencia de plaqueo, a los 20 min se observó solo una reducción del 8%, pero a los 30 min de exposición al agente quelante se observó una disminución considerable en la eficiencia de plaqueo (73%) en comparación con el control. Tiempos de incubación mayores no mostraron ya efecto significativo. A tiempos de 35 y 40 minutos la infectividad

mostraron ya efecto significativo. A tiempos de 35 y 40 minutos la infectividad mostró ya solo ser de un 23% con respecto al control (figura 3).

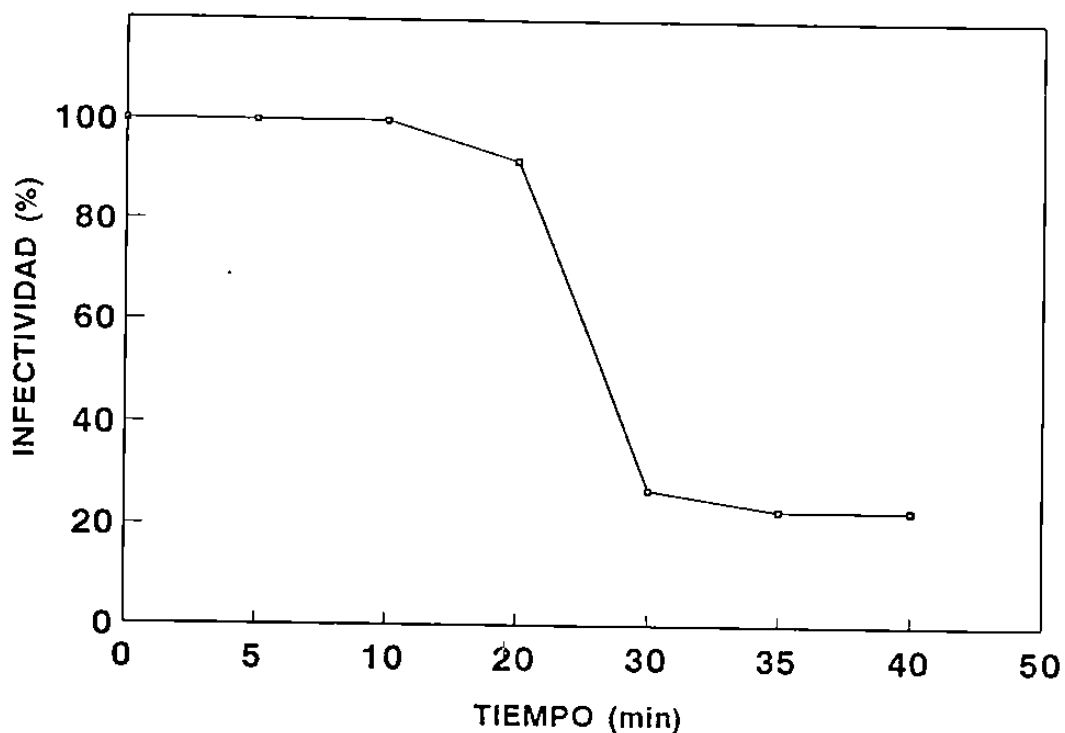


Figura 3.- Efecto del citrato de sodio sobre el porcentaje de infectividad en el bacteriófago $\mu\beta$ -19

Efecto de la luz ultravioleta

Al evaluar el efecto de la luz UV sobre el % de infectividad, se encontró que el bacteriófago es sensible a ésta, ya que su infectividad disminuyó 30% a tan solo 40 s de exposición. A un tiempo de exposición de 90 s la infectividad se redujó hasta en un 60% (figura 4).

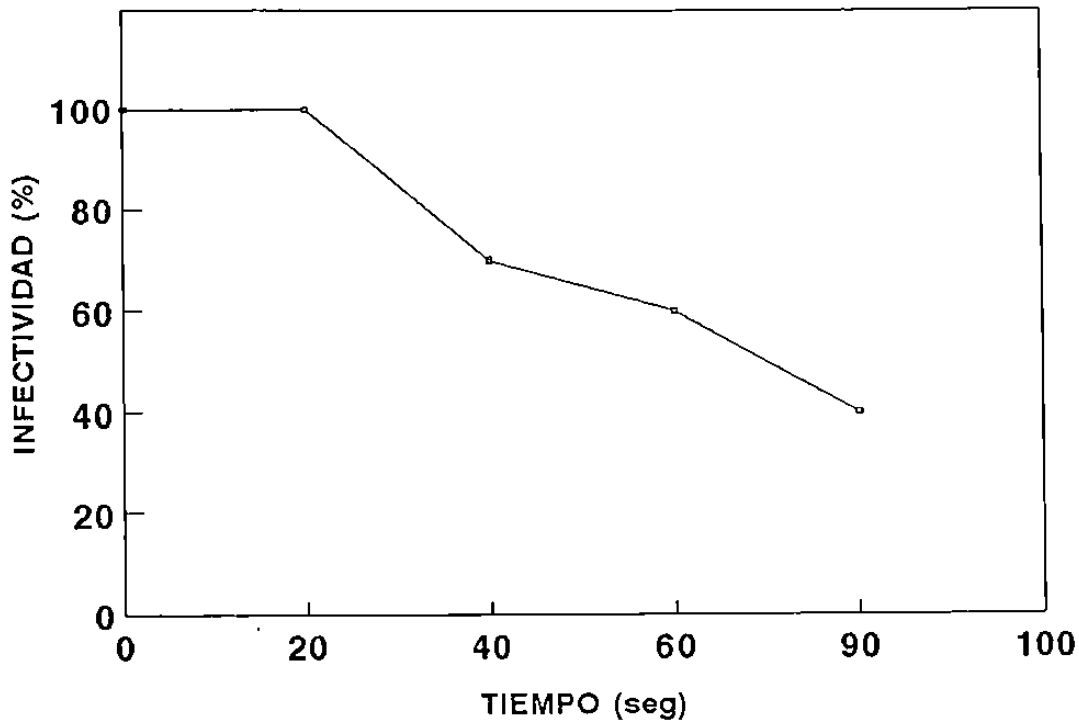


Figura 4.- Efecto de la luz ultravioleta sobre el porcentaje de infectividad en el bacteriófago $\mu\beta$ -19.

Determinación del tiempo de adsorción

La determinación del tiempo de adsorción es un paso importante en la caracterización de los bacteriófagos, ya que este es el primer paso en el ciclo de infección de la partícula fágica a la célula hospedera. Si la adsorción es evitada, el proceso de infección no puede llevarse a cabo y la célula hospedera continúa multiplicándose como si el fago no se encontrara.

Los resultados obtenidos en el ensayo de tiempo de adsorción son mostrados en la figura 5: Con 5 minutos de incubación de la mezcla fago-bacteria se encontró un 41% de infectividad, a los 10 min la eficiencia se incremento a un 95% en tanto que a los 15 min llegó al 100%; tiempos mayores de incubación mostraron nuevamente el 100% de infectividad. No se encontró diferencia significativa en la eficiencia de infección entre los tiempos de incubación de 10, 15 y 20 min.

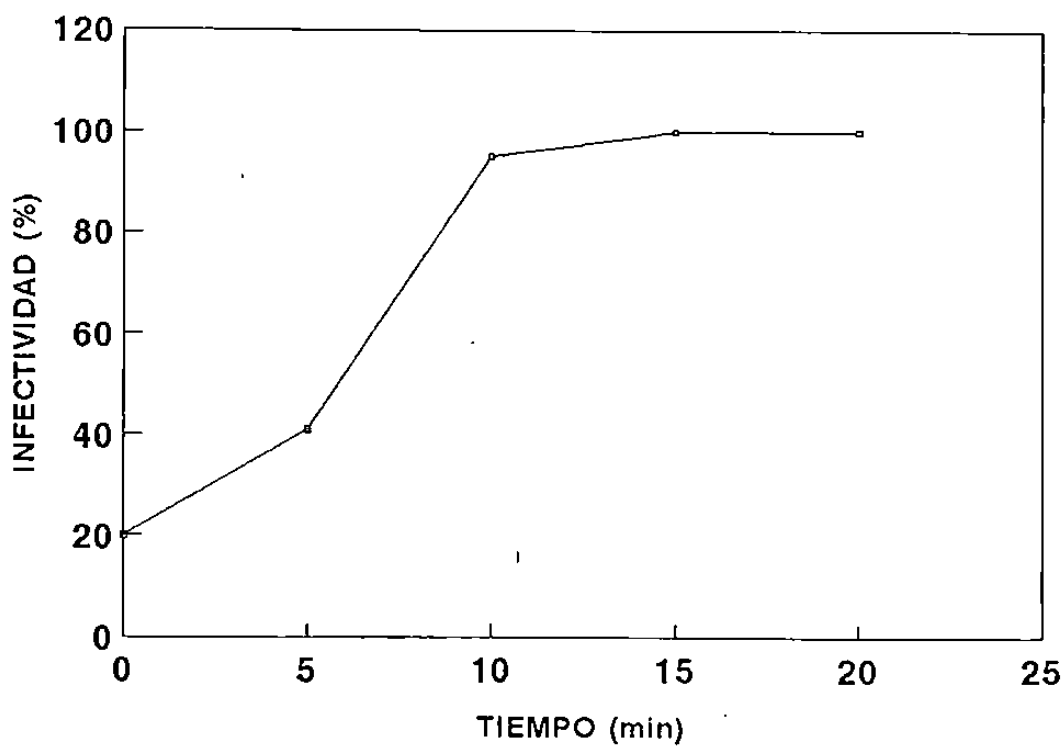


Figura 5.- Determinación del tiempo de adsorción del fago $\mu\beta$ -19 sobre la cepa HD-201 de Bt.

Determinación de la estabilidad al almacenamiento a 4° C

En los ensayos de caracterización de los bacteriófagos es ideal contar con material biológico estable al almacenamiento, ya que esto permite tener el material disponible para los ensayos y de un mismo lote de producción. La viabilidad del bacteriófago $\mu\beta$ -19 mostró una dependencia lineal de pendiente negativa al tiempo de almacenamiento a 4°C. El bacteriófago $\mu\beta$ -19 fue inestable al almacenamiento a 4°C ya que tuvo una caída en un logaritmo por mes en su eficiencia de plaqueo perdiendo hasta un 50% su capacidad de infección en seis meses (figura 6).

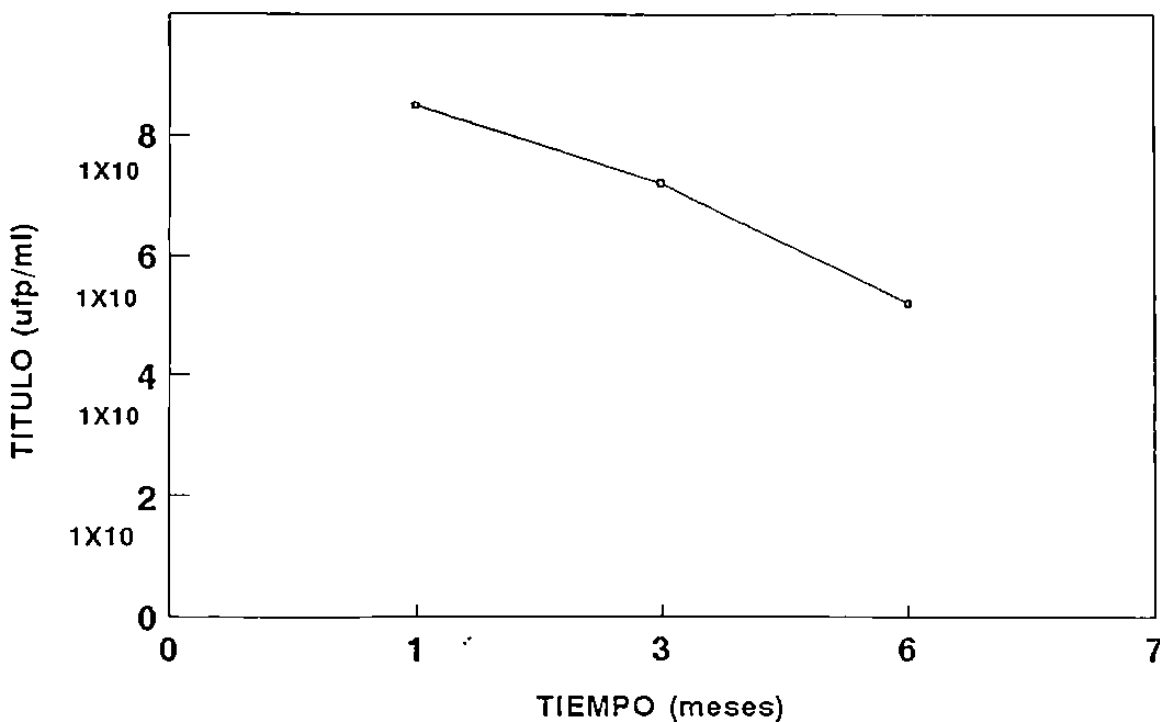


Figura 6.- Estabilidad al almacenamiento del bacteriófago $\mu\beta$ -19 a 4° C.

Determinación de la termoestabilidad

La termoestabilidad es otro parámetro de caracterización de los bacteriófagos el cual es utilizado en el estudio comparativo de los mismos.

Se observó que el bacteriófago es sensible a temperaturas altas ya que a 55, 60 y 70°C en tan solo 5 min de exposición fue inactivado. La incubación del bacteriófago a 45 y 50°C por 5 min disminuyó en solo 2 y 3% su infectividad respectivamente. Con 15 min de incubación a 45°C su capacidad de infección disminuyó en un 30%, a los 20 min en un 50% y a los 30 min hasta un 63%. Mayores tiempos de incubación a la temperatura de 50°C afectaron más drásticamente su infectividad, con 15 min de incubación, la eficiencia de plaqueo cayó en un 57%, a los 20 min el porcentaje de infectividad se vió reducido en un 60% y a los 30 min en un 67% (figura 7).

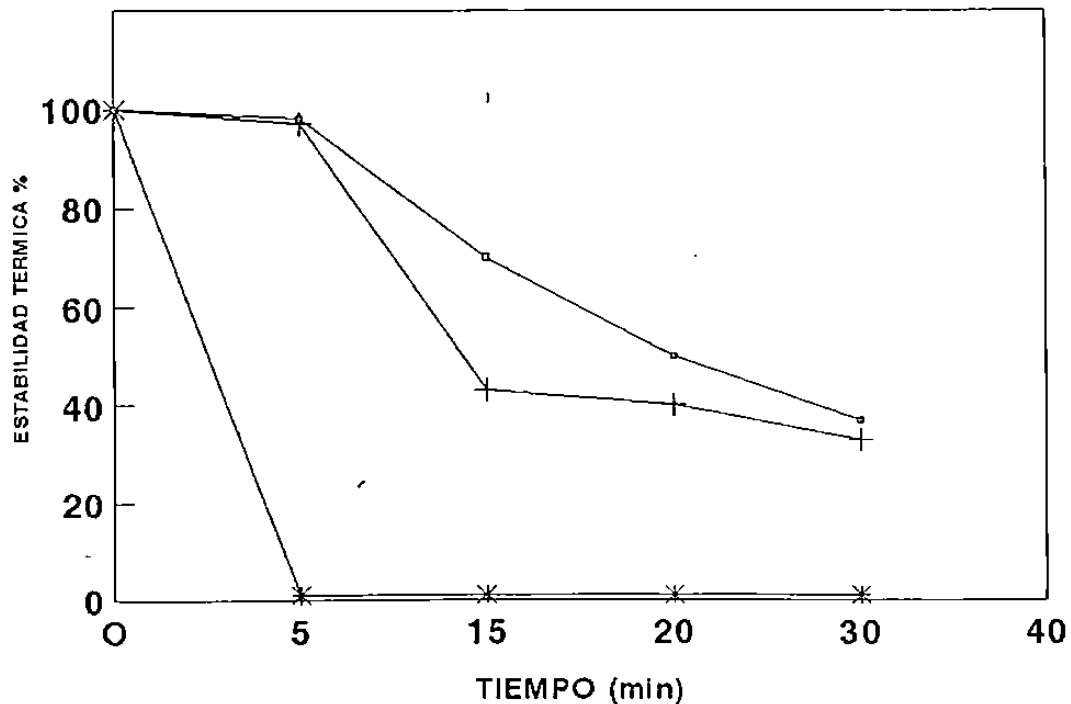


Figura 7.- Determinación de la termoestabilidad del fago $\mu\beta$ -19.

○ 45° C + 50° C * 55° C

Determinación del tipo de ácido nucleico

Los ácidos nucleicos ADN ó ARN tienen la capacidad de reaccionar con ciertos colorantes fluorescentes y según sean de doble cadena o cadena sencilla, al ser irradiados con UV emiten fluorescencia característica. Este principio fue aplicado para establecer el tipo de ácido nucleico presente en el $\mu\beta$ -19.

La observación al microscopio de epifluorescencia Carl Zeiss de frotis del lisado fágico teñidos con naranja de acridina y lavados con fosfatos mostraron una fluorescencia verde amarillenta la cual es característica del ácido nucleico ADN de doble cadena; por lo que el bacteriófago $\mu\beta$ -19 posee ADN doble cadena.

Tabla 2.- Patrón de fluorescencia de ácidos nucleicos ADNdc, ARNcs, virus vacunal de la rabia y del bacteriófago $\mu\beta$ -19.

MATERIAL BIOLÓGICO	FLOURESCENCIA
ADN doble cadena	verde-amarillento
ARN cadena sencilla	rojo
Bacteriófago $\mu\beta$ -19	verde amarillento
Virus vacunal Rabia (ARN)	rojo

Determinación de la capacidad de transducción :

Determinación del patrón de susceptibilidad a antibióticos:

En los ensayos de transducción es necesario contar con caracteres marcadores de selección y/o contraselección para lo cual se han utilizado marcadores de resistencia a antibióticos de auxotrofia o resistencia a los fagos entre otros. En este caso se empleó marcadores de resistencia a antibióticos. El patrón de sensibilidad o resistencia de las cepas HD de *Bt* sensibles al bacteriófago $\mu\beta$ -19 frente a distintos antimicrobianos, permitió seleccionar a la cepa donadora (HD-324) resistente a tetraciclina y a la cepa receptora (HD-201) sensible a tetraciclina.

Tabla 3.- Patrón de susceptibilidad a antimicrobianos de algunas cepas de *Bt*.

CEPAS HD de <i>Bacillus thuringiensis</i>												
ANTIBIOTICO	2	4	109	12	126	201	324	541	567	866	867	869
CEFALOSPORINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
PENICILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
ERITROMICINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
CEFOTAXIMA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
AMPICILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
TETRACICLINA	R	R	I	S	S	S	R	I	S	I	S	R
CLOXACILINA	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
KANAMICINA	R	I	I	S	S	S	I	S	S	S	I	R
ESTREPTOMICINA	I	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
SULFAMETOXASOL-TRIMETROPIM	R	R	R	S	R	S	S	R	R	S	R	S
GENTAMICINA	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
LINCOMICINA	S	R	S	S	R	S	I	S	I	S	R	S

R= resistente

I= intermedio

S= susceptible

Obtención de bacteriófagos transductantes

Para lograr obtener un lisado fágico con bacteriófagos transductantes se utilizó como donadora a la cepa HD-324 de la subespecie *thuringiensis* con lo que se obtuvo un título de 2×10^7 UFP/ml.

Ensayo de transducción

Se empleó el concentrado fágico de transductantes producidos en la cepa HD-324. Se probaron diferentes multiplicidad de infección (menores de uno, de uno y mayores de uno); a una multiplicidad de infección de 0.5 se obtuvieron cepas HD-201 resistentes a la tetraciclina ($50 \mu\text{g/ml}$), por lo se logró establecer el proceso de transducción con una frecuencia de 2.5×10^{-4} . Las colonias transductantes obtenidas mantuvieron la característica de resistencia al antibiótico en los siguientes pases en medios con el antimicrobiano. Por otra parte, para confirmar la pureza del lisado fágico, éste se espatuló sobre el medio YPA + tetraciclina ($50 \mu\text{g/ml}$) y YPA sin tetraciclina, donde no mostró crecimiento bacteriano, así también para confirmar la viabilidad de la cepa receptora HD-201 se inoculó sobre el medio YPA sin antibiótico donde manifestó una buena proliferación de colonias típicas y para descartar la presencia de mutantes espontáneas en el cultivo de la cepa receptora se espatuló sobre el medio YPA + tetraciclina donde no pudo desarrollarse puesto que era susceptible al antimicrobiano.

DISCUSION

En este trabajo, reportamos la purificación y caracterización físico-química y biológica del bacteriófago $\mu\beta$ -19 específico de *Bt*; así como también la utilización de este para realizar transducción generalizada, para el marcador de resistencia al antibiótico tetraciclina.

La purificación del bacteriófago $\mu\beta$ -19 se llevó a cabo por el método en doble capa de agar en estría antes de plaqueado, el cual resultó un método sencillo y práctico y se manifiesta su resultado con la obtención de placas líticas aisladas de tamaño homogéneo, el reaislamiento por estría a partir de una sola placa de lisis aislada en forma secuencial por 25 veces proporcionó una distribución de placas de lisis de características morfológicas semejantes sobre el tapiz de la cepa indicadora HD-201, con lo cual se aseguró la calidad de la pureza del bacteriófago y obtención de resultados confiables sobre su caracterización biológica, este resultado es comparable con los obtenidos por Foldes quien aisló y caracterizó algunos nuevos bacteriófagos aislados de *B. cereus* (23), por Chow quien reporta el aislamiento y caracterización parcial de dos bacteriófagos de *Aeromonas hydrophila* (14), Bhimani que reporta el aislamiento y caracterización de fagos de *Streptococcus lactic ssp. diacetylactis* (8), Tiraby quien aisló y describió algunas propiedades de bacteriófagos *pneumococcal* (49), Anaya-Elizalde (4), quien logró aislar y purificar 4 fagos de *Rhizobium* empleando la misma técnica y resultados similares a Quiroz (41), quien aisló y purificó un fago de *Rhizobium*. En contraste con la técnica de estría donde después de plaquear solo se presentaron halos de lisis a lo largo de la estría y en donde no se pudo seleccionar "calvas" de lisis.

La propagación del bacteriófago en caldo YPB rindió un concentrado de lisado fágico (2.5×10^7 ufp/ml) adecuado para cumplir los objetivos de este trabajo. Estos resultados son similares a los reportados por Anaya-Elizalde (5), Ley (33) y Foldes (23), quienes obtuvieron los mejores títulos de propagación en medio líquido, y son contrarios a los reportados por Quiroz, quien no logró obtener resultados satisfactorios con esta técnica (41).

Por observaciones al microscopio electrónico, se comprobó la pureza del bacteriófago $\mu\beta$ -19 y por la ultraestructura observada se encontró que corresponde al grupo B de la clasificación propuesta por Bradley (10), además que por su morfología se asumió que el tipo de ácido nucleico que posee es ADNdc, lo cual fue comprobado mediante la tinción fluorescente del ADN del bacteriófago en estudio (1,27, 35,52). Obteniéndose en los frotis una fluorescencia el verde amarillento al igual que el control ADNdc en contraste con los controles ARN de ARNcs y el virus vacunal contra la rabia que mostraron fluorescencia roja. Nuestros resultados son comparados a los obtenidos por Bradley para los diversos fagos T4 y E1 ADNdc y ADN de hígado de ratón y el bacteriófago 7s de *Pseudomonas aeruginosa* y VMT ARNcs (9).

La determinación del espectro de hospedero permitió conocer las subespecies de *Bt* de la cepa HD susceptibles a la infección por el bacteriófago $\mu\beta$ -19, los resultados mostrados en la Tabla I, nos indica que varias subespecies como *thuringiensis*, *alesti*, *kurstaki* son sensibles al bacteriófago en estudio y algunas serovariedades del mismo grupo sensible resultaron resistentes, lo que demuestra que el bacteriófago tiene baja especificidad por subespecies, este resultado es similar al reportado por Thorne con el fago CP-51 (48) y comparado a los bacteriófagos GV1 al GV5 estudiados por Colasito (16).

Al probar la sensibilidad del cloroformo sobre la viabilidad del fago y comparándolo con el control sin cloroformo de acuerdo con los resultados obtenidos se observó que el cloroformo no inactiva a el $\mu\beta$ -19 y sí actúa contra bacterias contaminantes del concentrado fágico por lo cual es recomendable agregar cloroformo a los lisados fágicos a fin de evitar contaminación bacteriana. La estabilidad frente al cloroformo del $\mu\beta$ -19 no es rara ya que una gran cantidad de bacteriófagos posee tal carácter, nuestros resultados concuerdan con lo reportado por Colasito para los bacteriófagos GV 1 al 5 de *Bt* y el bacteriófago Ach2 de *Aeromonas hydrophila* contrarios para el GV6 (16), Ach1 (14), MP13 (50) y el j2 (37).

Al determinar el efecto del citrato de sodio como agente quelante sobre el bacteriófago $\mu\beta$ -19, mostró que éste requiere de los iones divalentes Ca^{++} y Mg^{++} para una mejor adsorción, con respecto al control la eficiencia de infectividad mostró una disminución considerable del 73% a los 30 min y hasta de un 77% a los 40 min de incubación, demostrando así la necesidad de un ambiente iónico específico para la infección, estos resultados son similares a los obtenidos por Chow para los bacteriófagos Ach1 y Ach2 de *Aeromonas hydrophila* (14).

En los experimentos sobre tiempo de adsorción se observó que a los 15 min de incubación de la mezcla fago-bacteria el porcentaje de infectividad alcanzaba el 100%. Sin embargo, la infectividad encontrada a los 10 min no mostró diferencia significativa contra la obtenida a los 15 min. Se sabe que una gran cantidad de bacteriófagos alcanzan su máxima infectividad a los 10 min estos resultados concuerdan con lo reportado por Lecadet para el bacteriófago CP-54Ber (31) y por Colasito en bacteriófagos GV-1 al GV-5 de *Bt* y son contrarios a lo encontrado por el mismo autor para el GV-6 de *Bt* (16).

Se determinó el efecto de la luz UV sobre la viabilidad del bacteriófago purificado, observando que el $\mu\beta$ -19 fue sensible a la luz UV, ya que a un tiempo de exposición de 90 s su infectividad se redujo en un 60%. Los resultados obtenidos concuerdan con los reportados por Anaya-Elizalde (5) y Dhar (19) donde este último clasificó a los bacteriófagos en sensibles y medianamente resistentes bajo las mismas condiciones de nuestros experimentos, colocándose este fago en el primer grupo. El dato logrado de porcentaje de infectividad se puede utilizar para aumentar la frecuencia de transducción ya que atenúa a los bacteriófagos virulentos y protege a los posibles transductantes (11,44), aunque en este trabajo no fue necesario utilizar la luz UV para los ensayos de transducción.

Al probar el efecto de la temperatura sobre la infectividad del bacteriófago $\mu\beta$ -19, se observó que incubado a 45°C hasta por 30 min este mostró una disminución progresiva en su infectividad en relación con el tiempo de incubación (fig.7) ; similares resultados se obtuvieron al incubarlo a 50°C ; en contraste a temperaturas más altas de 55, 60 y 70°C donde el efecto fue mucho mayor aún en el mínimo de tiempo de incubación de 5 min la acción inhibitoria fue muy notable ya que el bacteriófago fue inactivado. Nuestros resultados concuerdan con los encontrados para el fago RJ-9 de *Rhizobium* (5) y para los fagos GV y CP-54Ber de *Bt* (16,31).

La propagación de los bacteriófagos en medio líquido YPB de acuerdo a la metodología previamente descrita, proporcionó lisados fágicos claros con un título adecuado de (2×10^7 UFP/ml) obteniéndose así el material biológico para efectuar los ensayos de transducción. Estos resultados concuerdan con lo reportado por Ley (33), quien obtuvo los mejores títulos por propagación en

medio líquido igual que lo reportado previamente (17,54) y son contrarios a lo reportado por Quiroz (41), quien no logró resultados satisfactorios con esta técnica, pero sí obtuvo buenos resultados con el método de doble capa de agar (3). La preparación de los lisados con bacteriófagos transductantes por multiplicación de los bacteriófagos sobre la cepa donadora HD-324 (resistente a 50 µg de tetraciclina) de *Bt* en medio líquido nos proporcionó los bacteriófagos deseados. Esto no es raro ya que en toda multiplicación de bacteriófagos sobre sus hospederos genera partículas transductoras aplicables a estudios de transducción generalizada de acuerdo a lo expuesto por otros investigadores (6,26,45).

Empleando una multiplicidad de infección de 0.5 y tiempos de incubación de 30 min a 35°C de la mezcla fago-bacteria nos permitió establecer el proceso de transducción del marcador de tetraciclina por el bacteriófago µβ-19. Estos resultados concuerdan por lo reportado para fagos de *Rhizobium* y M1 de *Rhizobium japonicum* (5,43) y son contrarios por lo reportado para el bacteriófago SPP1 de *B. subtilis* (32), el DF 2 de *Rhizobium meliloti* (13) y el CP-54Ber infectivo de *Bt* (31).

La frecuencia de transducción de 2.5×10^{-4} concuerda con la frecuencia de transducción encontrada para los bacteriófagos RP-23 de *Rhizobium* (5), el MP13 de *Bacillus megaterium* (50) y el CP-51 (48).

Estos resultados confirman la capacidad del bacteriófago $\mu\beta$ -19 para efectuar transducción lo cual nos permitirá aplicarlo en posteriores estudios de movilización de genes con el objeto de caracterizar nuevos aislados de *Bt* y otros estudios de caracterización del cristal entomicida.

CONCLUSIONES

- 1.-La ultraestructura del bacteriófago $\mu\beta$ -19 es característica del grupo B de Bradley. Con una cabeza de 67 nm de diámetro y una cola de 170 nm de longitud.
- 2.- El bacteriófago posee ADN de doble cadena.
- 3.- El bacteriófago es sensible a temperaturas superiores a 50° C ya que la infección se vió reducida en 57% con 15 min de incubación y a temperaturas de 55, 60 y 70°C en 5 min se inactivó.
- 4.- El bacteriófago es resistente al tratamiento con cloroformo.
- 5.- La adsorción del bacteriófago requiere de cationes divalentes Mg^{++} y Ca^{++} a una concentración de 10^{-2} M.
- 6.- El $\mu\beta$ -19 es sensible a la luz ultravioleta.
- 7.- Es inestable al almacenamiento a 4° C ya que perdió hasta un 50% su capacidad de infección en 6 meses.
- 8.- Posee un amplio espectro de hospedero.
- 9.- El bacteriófago $\mu\beta$ -19 tiene capacidad de transducción para el marcador de tetraciclina de la cepa donadora HD-324 a la cepa receptora HD-201 con una frecuencia de 2.5×10^{-4} a una multiplicidad de infección de 0.5.

APENDICE

Preparación de medios de cultivo

Medio YPA : Peptona 10 g; NaCl 5 g; Extracto de Levadura 1g, CaCl_2 10^{-3} M, 1 l de Agua destilada, se ajusta el pH a 6.8- 7.0 con NaOH 0.1 N, finalmente se agrega 12 g de agar bacteriológico. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) por 15 min.

Agar suave : Peptona 10 g, NaCl 5 g, Extracto de Levadura 1 gr, CaCl_2 10^{-3} M, 1 l de agua destilada, se ajusta el pH a 6.8-7.0 con NaOH 0.1 N, finalmente se agrega 6 g de agar bacteriológico. Esterilizar a 121°C (15 libras de presión) por 15 min.

Caldo YPB : Se prepara de igual manera al Medio YPA a excepción de que no se le agrega el agar.

Agar Muller-Hinton: Suspender 38 g del polvo en un l de agua destilada. Mezclar bien, calentar agitando frecuentemente y hervir alrededor de un minuto. Esterilizar en autoclave a 121°C (15 libras de presión) por 15 min. Enfriar a 45°C . Servir 20 ml en cajas petri esteril.

Preparación de soluciones

Solución amortiguadora de citratos 10^{-2} M : $\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.258 gr, disolver en 70 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 8.5 con NaOH 0.1 N.

Solución amortiguadora de Tris-HCl : Trizma-HCl 1.58 g, disolver en agua se ajusta el pH a 7.5 con NaOH 0.1 N.

Solución de sulfato de magnesio : MgSO_4 0.3 g, se afora a 100 ml con agua destilada.

Acetato de Uranilo al 2 % : acetato de uranilo 1 g, se afora a 50 ml con agua destilada, se ajusta el pH a 4.5 con NaOH 0.1 N.

Solución de Acetato de Amonio : $\text{CH}_3\text{COONH}_3$ 0.77 g, disolver en 70 ml de agua destilada, se ajusta el pH a 7.0 con HCl 0.1 N.

Solución de Carnoy : 1 parte de ácido acético glacial; 3 partes de cloroformo; 6 de etanol absoluto.

Solución McIlvaine : ácido cítrico+buffer fosfato, pH 3.8: ácido cítrico 0.1 M 6.0 ml; Na_2HPO_4 , 0.15 M 4.0 ml.

Naranja de Acridina 0.01 (w/v) en buffer : 1% (w/v) solución de naranja de acridina 0.1 ml; Solución de McIlvaine, 10 ml.

TMG : 10^{-1} M Tris-HCl pH 7.5 + 10^{-1} M de MgSO_4 .

LITERATURA CITADA

- 1.- **Ackermann, H. W.** 1992. Frequency of morphological phage descriptions. Arch. Virol. 124:201-209
- 2.- **Ackerman H.W., A. Auduruer, L. Berthiaume, L.A. Jones y J.A. Mayo.** 1978. Guidelines for bacteriophage characterization. Ad-Virus-Resch. 23: 1-24.
- 3.- **Adams, M.H.** 1966. Bacteriophages. Second printing. Interscience Publishers New York. N.Y. U.S.A. pp 1, 2, 6, 122, 444.
- 4.- **Anaya-Elizalde, R.** 1985. Aislamiento de bacteriófagos en cepas de *Rhizobium*. Tesis de Licenciatura Inédita. FCB-U.A.N.L. México.
- 5.- **Anaya-Elizalde, R.** 1992. Transducción generalizada en cepas *Rhizobium spp.* Tesis de Maestría. FCB-UANL. México.
- 6.- **Avers, Ch.** 1984. Genetics. Ed. Willard Grant press. Boston. pp. 197-201.
- 7.- **Barjac, H. de, J. Sisman y V.C. Cosmoo-Dummnadir.** 1974. Description of 12 bacteriophages isolates of *Bacillus thuringiensis*. Comptes Rendus Hebdomdaries des Seances des Sciences. 279:198-200.
- 8.- **Bhimani, R.S. y Y.M. Freitas.** 1991. Isolation and characterization of the bacteriophages of *lactic Streptococci*. J. Dairy Sci. 74:1465-1471.
- 9.- **Bradley, D.E.** 1966. The fluorescent staining of bacteriophage nucleic acid. J. Gen. Microbiol. 44:383-391.
- 10.- **Bradley, D.E.** 1967. Ultrastructures of bacteriophages and bacteriocins. Bacteriol. Rev. 31:230-314.
- 11.- **Buchanan-Wallaston, V.** 1979. Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 112:135-142.

- 12.-Cairns, J., G.S. Stent y J.D. Watson. 1966. Phage and the origins of molecular biology. Cold Spring Harbor Laboratory.Cold Spring Harbor. U.S.A.
- 13.-Casadeus J. y J. Olivares. 1979. General transduction in *Rhizobium leguminosarum*. J. Gen. Microbiol. 112: 135-142.
- 14.-Chow M.S. y M.A. Rouf. 1983. Isolation and partial characterization of two *Aeromonas hydrophila* bacteriophages. Appl. Environ. Microbiol. 48:1670-1676.
- 15.-Cohen, S. S. y R. Arbogast. 1950. Inmunochemical studies on the purity of concentrates of varius bacterial viruses prepared by differential centrifugation procudures. J. Exptl. Med. 91:607.
- 16.-Colasito D. J. y M. H. Rogoff. 1969. Characterization of lytic bacteriophages of *Bacillus thuringiensis*. J. Gen. Virol. 5: 267-274.
- 17.- Dallman, G. y G. Laslo-Oroz. 1979. Restriction mapping of temperate *Rhizobium meliloti* phage 16-3: comparation of genetic and physical maps indicates a long, genetically silent chromosomal arm. Mol. Gen. 176: 439-448.
- 18.- Dalton, A.J. y F. Haguenu. 1973. Ultraestructure of animal viruses and bacteriophages: an atlas. Ed. Academic Press.Londres. pp. 347-365.
- 19.- Dhar B.D. y K. Ramkishna. 1987. Morphology and general characteristics of phages of chickpea *Rhizobia*. Archa. Microbio. 147: 121-125.
- 20.- Donadio S., P. Renato, C. Italo, S. Piero, S. Werner y I. Maurizio. 1986. Characterization of bacteriophages infecting *Streptomyces erythreus* and properties of phages resistant mutants. J. Bacteriol.166:1055-1060.
- 21.- Duckworth, D. H. 1976. Who discovered bacteriophage?. Bacter. Rev. 40:793-802.

- 22.-Félix, A. 1955. World survey of typhoid and paratyphoid-B phage type. Bull. Wld. Hlth. Org. 13:109-170.
- 23.- Foldes, J., G. Vera y J. Molnar. 1970. Isolation and characterization of some newly isolated *B. cereus* phage. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 17:49-61.
- 24.- Frédéricq, P. 1952. Emploi du chloroforme pour mesurer le taux de fixation des entérobacteriophages par les bactéries vivantes. Compt. Rend. Soc. Biol. 146:327.
- 25.- Hayes, W. 1968. The Genetics of bacteria and their viruses. 2^{da}. Edición. Blackwell scientific publications. Oxford. London. pp. 409-479.
- 26.- Herkowitz, I. 1987. Principios de Genética. 1^a. Edición. Editorial Continental. México D.F. pp.177.
- 27.- Jawetz, E., J.L. Melnick y E.A. Adelberg. 1987. Microbiología Médica. 12^a Edición. Editorial El Manual Moderno, S.A. de C.V. México pp.122-129.
- 28.- Kalmanson, G. y J. Bronfenbrenner. 1939. Studies on purification of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 23:203.
- 29.- Landén, R., A. Heierson y H.G. Boman. 1981. A phage for generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* and mapping of four genes for antibiotic resistance. J. Gen Microbiol. 123:49-59.
- 30.- Lark, K.G. y M.H. Adams. 1953. The stability of phage as function of the ionic environment. Cold Spring Harbor Symposia. Quant. Biol. 18:171.
- 31.- Lecadet, M., O. Blodel y J. Ribier. 1980. Generalized transduction in *Bacillus thuringiensis* var. *bereliner* 1715 using bacteriophage CP-54Ber. J. Gen. Microbiol. 121: 203-212.
- 32.- Lencastre, H. y L.J. Archer. 1980. Characterization of bacteriophage SPP1 transducing particles. J. Gen. Microbiol. 117: 347-355.
- 33.- Ley, A. N. 1972. Virulent Bacteriophage infection of *Rhizobium leguminosarum*. Can. J. Microbiol. 18: 375-384.

- 34.- **Luria, S. E y T. F. Anderson.** 1942. The identification and characterization of bacteriophage with the electron microscope. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 28:127-130.
- 35.- **Marshak, A.** 1951. Absence of cytosine in bacteriophage T2. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 37:299.
- 36.- **Merchant, I. A. y R. A. Packer.** 1975. Bacteriología y Virología Veterinarias. 3ª Edición. Editorial Acribia. Zaragoza, España. pp. 759-762.
- 37.- **Mise, K., M. Kawai, Y. Yoshida y A. Nakamura.** 1981. Characterization of bacteriophage j2 of *Salmonella typhi* as a generalized transducing phage closely related to coliphage P1. J. Gen. Microb. 126: 321-326.
- 38.- **Northrop, J.H.** 1938. Concentration and purification of bacteriophage. J. Gen. Physiol. 21:335.
- 39.- **Pelczar, M.J., R.D. Reid y E.C.S. Chan.** 1981. Microbiología 2ª Edición. Editorial Libros McGraw Hill de México, S.A. de C.V. México. pp.334-343.
- 40.- **Puertas-Gallego, M.J.** 1992. Genética: fundamentos y perspectivas. 1ª Edición. Editorial McGraw Hill, Interamericana de España. pp.441-467.
- 41.- **Quiroz, E.** 1980. Aislamiento de Rhizobiófagos. Tesis Doctoral. ENCB-IPN, México.
- 42.- **Saldaña-Acosta, J.M. y J. Paz.** 1989. Diseño de una técnica rápida y sencilla para determinar la presencia de *Bacillus thuringiensis* en muestras de suelo. Publ. Biol. F. C. B., U.A.N.L. México. 3:16-19.
- 43.- **Shah-Ketan, I.** 1982. Linkage Mapping of *Rhizobium japonicum* D-2111 by phage M-1 mediated transduction. Can. J. Microbiol. 29: 33-38.
- 44.- **Shah-Ketan, I.** 1981. Studies of transduction phage M1 for *Rhizobium japonicum* D 211. Arch. Microbiol. 130: 262-266.
- 45.- **Smith-Keary, P.F.** 1979. Genética, estructura y función. 1ª Edición. Publicaciones Cultural, S.A. México 13 D.F. pp.441-468.

- 46.- Suzuki, D.T., A.J.F. Griffiths, J.H. Miller y R. C. Lewontin. 1992. Introducción al análisis genético. 1ª. Edición. Editorial Mc Graw Hill. Interamericana de España, S.A. España. pp 227.
- 47.- Swanstrom, M. y M. H. Adams. 1951. Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 78:372.
- 48.- Thorne, C.B. 1978. Transduction in *Bacillus thuringiensis*. Appl. Environ. Microbiol. 35:1109-1115.
- 49.- Tiraby, J.C., E. Tiraby y M.S. Fox. 1975. Pneumococcal bacteriophages. Virology. 68:566-569..
- 50.-Vary, P. S., J. C. Garbe, M. Franzen y E. W. Frampton. 1982. MP1 a generalized transducing bacteriophage for *Bacillus megaterium*. J. Bacteriol. 149:1112-1119.
- 51.-Volk, W.A., D. Benjamin y R. Kader. 1988. Microbiología Médica. 3ª Edición. Editorial Interamericana, S.A. de C.V. México D.F. pp. 334-343.
- 52.-Wurtz, M. 1992. Bacteriophage structure. Electron Microsc. Rev. 5: 283-309.
- 53.-Yoder, P.E. y E.L. Nelson. 1960. Bacteriophages for *Bacillus thuringiensis* Berlinder and *Bacillus anthracis*. Cohn. J. Invertebr. Pathol. 2:198-200.
- 54.-Zelazna-Kowalska A. y W. Zurkowaski. 1974. Transformation of effectiveness in *Rhizobium japonicum*. Act. Microbiol. Polon.4 : 319-325.

