

Crecimiento diferencial inducido por el bacteriófago B278 en poblaciones de *Citrobacter intermedius*

por M. C. Fusté, M. Viñas, J. G. Lorén y J. Guinea

Departamento de Microbiología. Facultad de Biología. Universidad de Barcelona

Recibido el 21-X-1980

ABSTRACT

FUSTÉ, M. C., VIÑAS, M., LORÉN, J. G. y GUINEA, J., 1980. — Differential growth induced by bacteriophage B278 infection in *Citrobacter intermedius* populations, *An. Aula Dei*, 15 (1-2): 138-147.

Phage B278 is a double strand DNA bacteriophage that fits Bradley's A group. When phage B278 lysates are assayed for plate forming ability on *Citrobacter intermedius* C3, 3MA2 and 1230 strains, colony-like foci of growth, called «excrescences» of indicator strain appear instead of lytic plaques. These *excrescences* are constituted by bacterial cells showing no morphological differences with the wild type. However the *excrescence* cultures, both in mineral and in nutritive media show higher generation times than the generation times of wild type strains cultures.

An interpretation of the experimental results is suggested. Along the work is also considered the possible use of phage B 278 as a model system for the study of the host cell-virus relationships.

INTRODUCCION

El bacteriófago B278 presenta un comportamiento singular frente a distintas cepas de *Citrobacter intermedius*. Su actividad no queda reflejada con la producción de calvas líticas. En cambio, produce unas

excrecencias muy características, formadas por células bacterianas que se diferencian del resto de la población no infectada por el fago, por un incremento significativo en la velocidad de crecimiento. Este trabajo considera el estudio de las características de las excrecencias, el crecimiento diferencial entre ambas poblaciones y la interpretación de este comportamiento considerando la naturaleza del bacteriófago B278.

MATERIAL Y METODOS

Medios de cultivo

Se ha empleado caldo nutritivo (Standard I Nährbouillon Merck). El agar nutritivo y el agar blando se consiguen por la adición de 14 g/L y 4 g/L de Bacto-agar (Difco) respectivamente.

La composición del medio mineral M1 se describe por PARÉS y GUINEA (1969). Para el desarrollo de las cepas auxotróficas, el medio M1 se suplementa con 20 ug/ml de los L-aminoácidos correspondientes. El tampón para fagos (CLOWES y HAYES, 1968), se emplea para la preparación de suspensiones destinadas a la enumeración de las partículas fágicas.

Cepas bacterianas

Citrobacter intermedius C3, es una bacteria que procede de un aislamiento de aguas blancas de papelera (CLOTET, 1968). *C. intermedius* 1230 (*pro⁻his⁻*) y *C. intermedius* 3MA2 (*pro⁻*), proceden de la cepa salvaje, por tratamiento con N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Sigma Chem. Co). Las técnicas utilizadas en la obtención de estas dos cepas se basan en la metodología descrita por CLOWES y HAYES (1968) para la obtención de mutantes auxotróficos.

Bacteriófago B278. El bacteriófago B278 procede de un aislamiento verificado a partir de una muestra de aguas de depuradora. Su morfología y tipo de ácido nucleico corresponde al grupo A de BRADLEY, familia *Myoviridae* de FENNER (1967), figura 1. Su tamaño de explosión, obtenido sobre *C. freundii* ATCC 10053 es de 63 pfu/bacteria infectada y el tiempo de explosión de 28 minutos. El valor de su densidad en gradiente de densidades de ClCs es de 1,450 g/cm³.

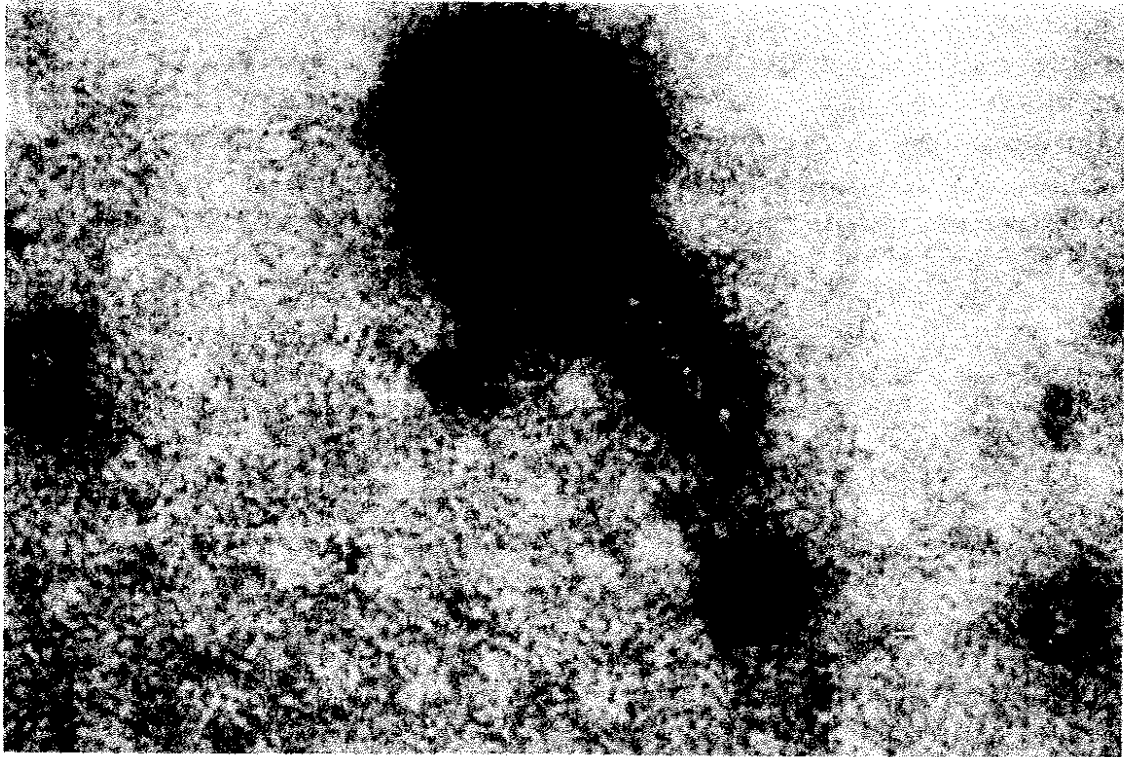


FIG. 1. Micrografía electrónica del bacteriófago B278 ($\times 380.000$).

Métodos

La metodología utilizada para la enumeración del número de partículas fágicas de los lisados del bacteriófago B278 se ajusta a la descrita por ADAMS (1959) y CLOWES y HAYES (1968).

La determinación de las constantes de crecimiento se ha realizado controlando la turbidez del medio espectrofotométricamente (MILLER, 1972).

RESULTADOS EXPERIMENTALES

En la figura 2 se muestra el aspecto macroscópico de las excrecencias producidas al ensayar la actividad del bacteriófago B278 sobre las cepas *C. intermedius* C3, *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2. El tamaño de estas excrecencias varía entre 1 y 2 mm. El número de las excrecencias varía con la dilución del lisado del bacteriófago. Este dato y la distribución de las excrecencias corresponden a las calvas que se formarían si el fago B278 tuviera una respuesta lítica.

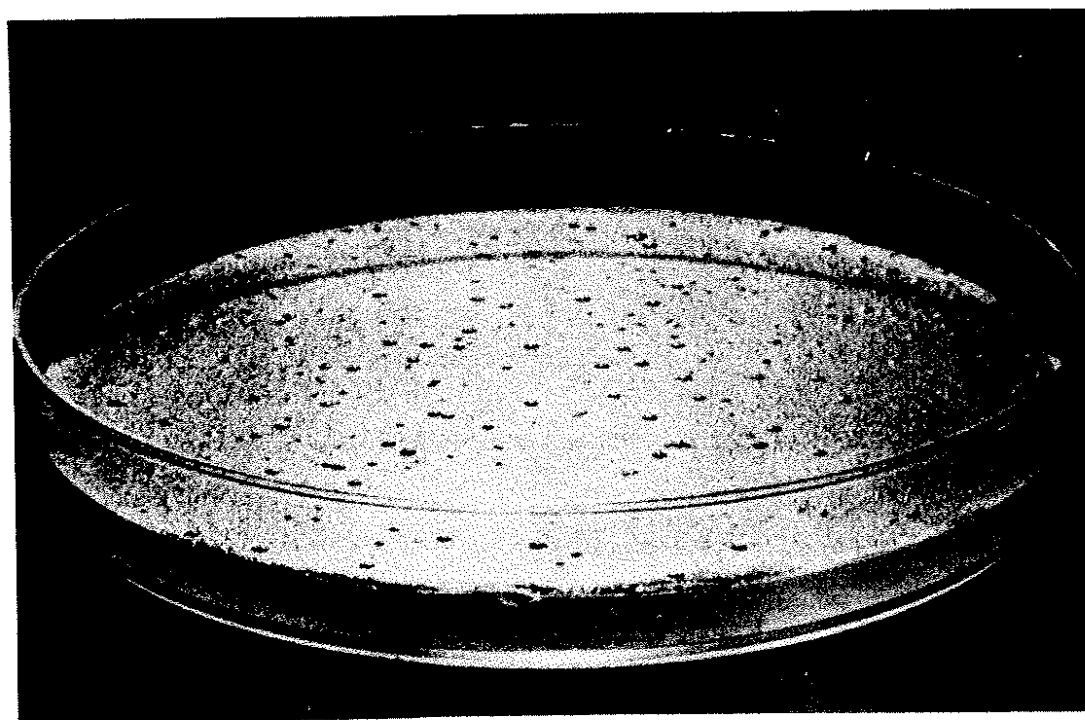


FIG. 2. Aspecto macroscópico de las excrecencias inducidas por el bacteriófago B278 sobre *C. intermedius* 1230.

Cuando las diluciones de los lisados del bacteriófago B278 se tratan con suero anti-B278 no se produce la formación de las excrecencias por la cepa indicadora.

Morfológicamente la población constituyente de las excrecencias no presenta diferencia alguna con las cepas de las que procedía. Esta verificación se basa en las técnicas de tinciones de Gram, microscopía óptica de contraste de fases de suspensiones de células vivas y microscopía electrónica de transmisión con tinción negativa.

Una variable que muestra diferencias significativas entre la población que constituye la excrecencia y la población salvaje de la que deriva es el tiempo de generación de ambas poblaciones bacterianas. Las figuras 3 y 4 muestran las curvas de crecimiento de las poblaciones de *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2 y las excrecencias derivadas de ellas por infección con el bacteriófago B278, en medio mineral y medio nutritivo respectivamente. Como puede observarse, en todos los casos las poblaciones constituyentes de las excrecencias muestran una mayor velocidad de crecimiento. Los tiempos de generación de las poblaciones estudiadas se han calculado a partir de las gráficas representadas en las figuras 3 y 4. Los resultados obtenidos se expresan en el cuadro 1. En este cuadro se pone de manifiesto que en medio nutritivo el tiempo de generación de las excrecencias es aproximada-

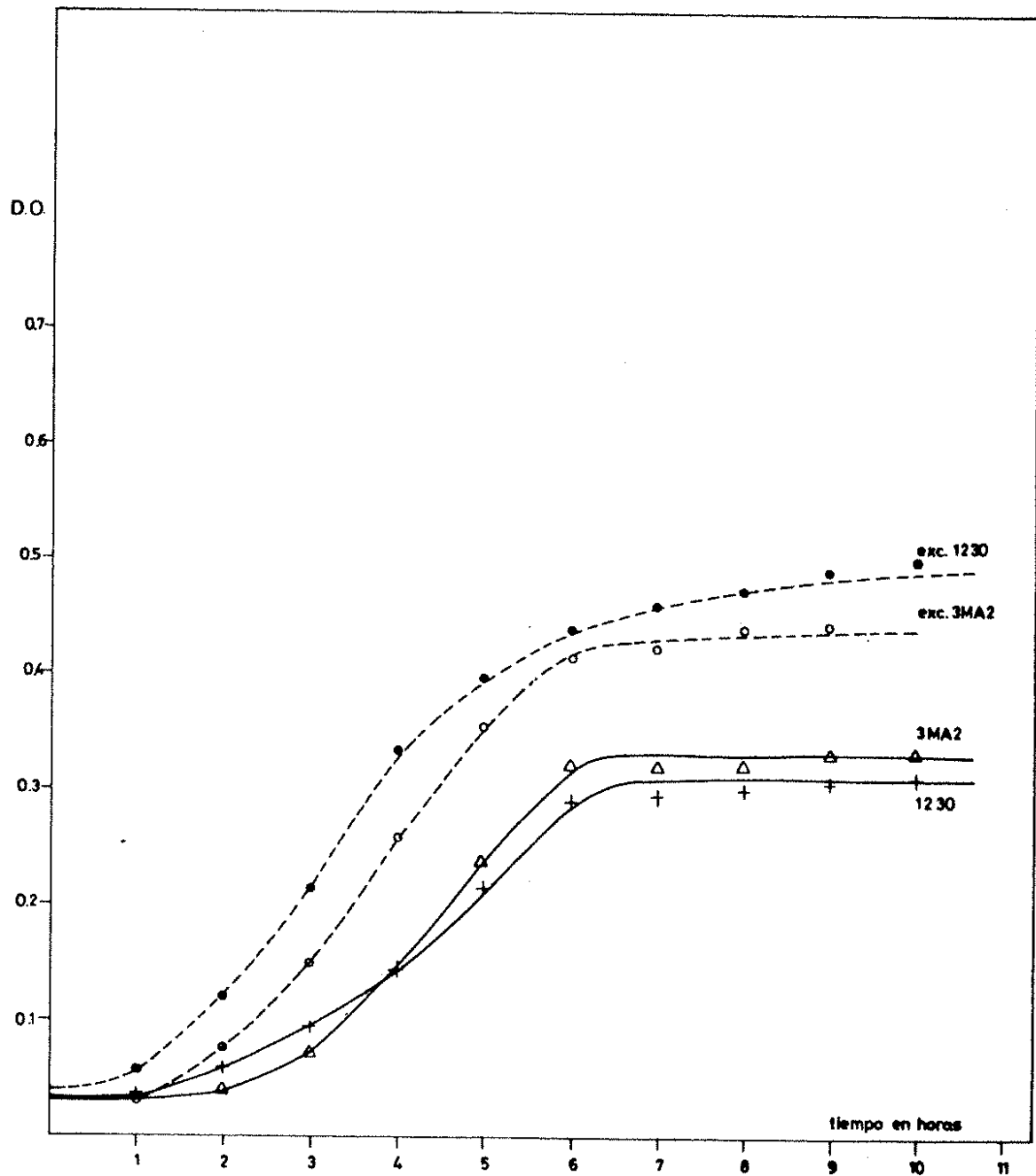


FIG. 3. Curvas de crecimiento de las cepas 1230 y 3MA2 y las poblaciones derivadas de las excrecencias. Medio nutritivo.

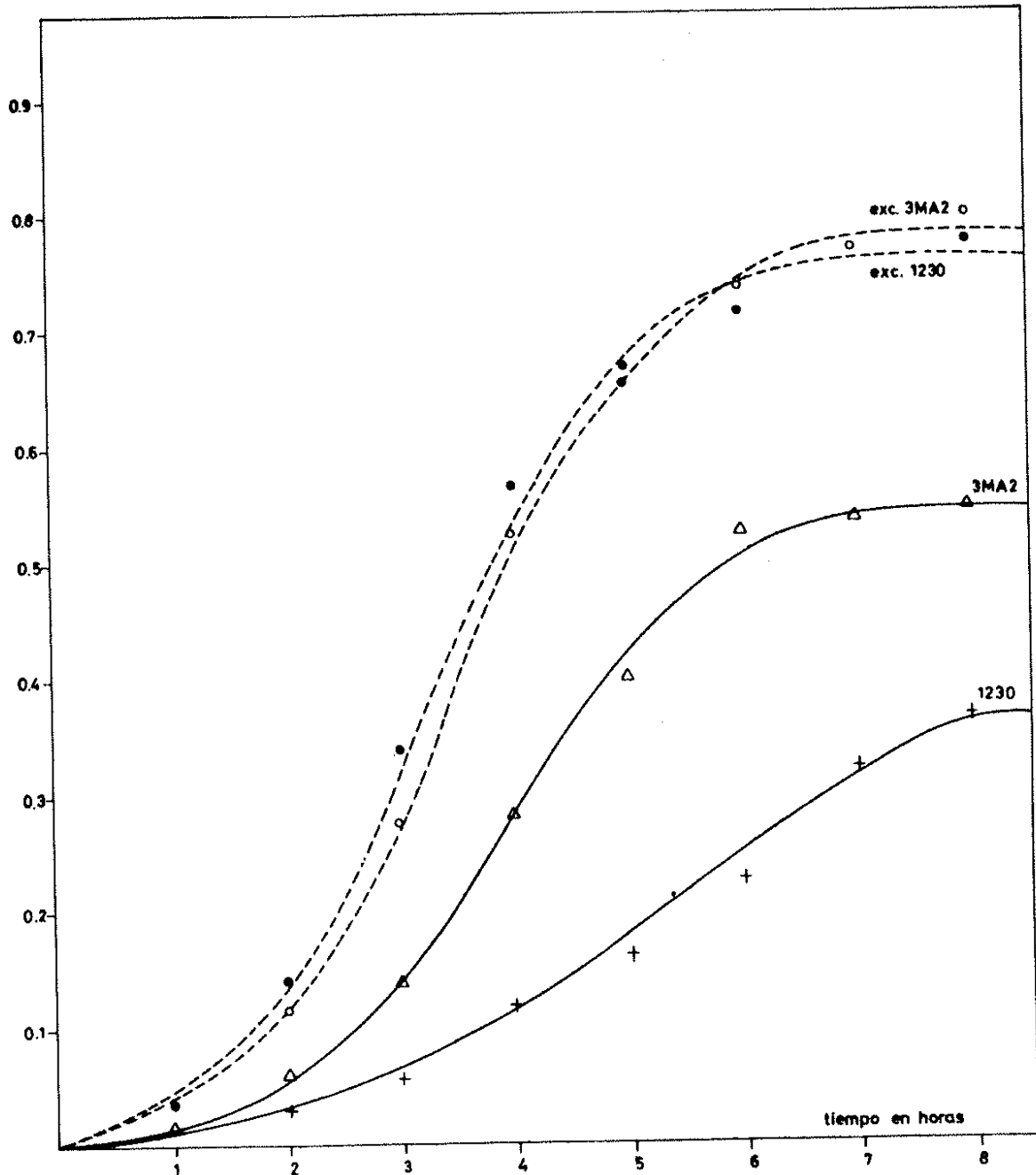


FIG. 4. Curvas de crecimiento de las cepas 1230 y 3MA2 y las poblaciones derivadas de las excrecencias. Medio mínimo.

CUADRO 1. — *Tiempos de generación de las poblaciones derivadas de las excrecencias y de las cepas C3, 1230 y 3MA2 de C. intermedius.*

Cepa	Medio	Tiempo de generación en minutos (t)	t exc. / t w. ^(a)
3MA2	M1	234	
exc. 3MA2	M1	180	1,3
1230	M1	252	
exc. 1230	M1	168	1,5
C3	M1	132	
3MA2	CN.	180	
exc. 3MA2	CN.	84	2,1
1230	CN.	223	
exc. 1230	CN.	84	2,6
C3	CN.	120	

(a) Se expresa el cociente entre el tiempo de generación de la población derivada de la excrecencia (t exc.) y el tiempo de generación de la cepa de origen (t w.).

mente el doble que el de la población salvaje; en medio mínimo estas diferencias son menores. Es interesante señalar que mientras que las cepas *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2 presentan diferencias en sus tiempos de generación, tanto en medio nutritivo como en medio mínimo, las poblaciones constituyentes de las excrecencias derivadas de ellas muestran invariablemente el mismo tiempo de generación.

Cuando se resiembran sobre medio mínimo no suplementado las poblaciones constituyentes de las excrecencias derivadas de *C. intermedius* 1230 (*pro*⁻ *his*⁻) y *C. intermedius* 3MA2 (*pro*⁻); se comprueba que una fracción de esta población es capaz de formar colonias en dicho medio.

No se ha detectado la presencia de fagos libres en el sobrenadante de los cultivos de las poblaciones derivadas de las excrecencias. Este resultado no se ha visto modificado al utilizar las técnicas de inducción con u.v. y Mitomicina C.

DISCUSION

En este trabajo se describe una nueva interacción fago-bacteria. Entre otras características, el bacteriófago B278 sobresale por su peculiar escala de huéspedes (FUSTE *et al.*, en prensa). Por una parte, frente a *Escherichia*, *C. freundii* y *Salmonella*, forma calvas líticas, fenómeno esperable en una interacción fago-bacteria. Sin embargo,

debemos constatar un acontecimiento excepcional al detectarse de un modo experimental, absolutamente controlado, la aparición de excrecencias como consecuencia de la interacción fago B278 *C. intermedius* C3 y mutantes derivadas. En este sentido, sólo existen referencias bibliográficas de conversión lisogénica que afectan de algún modo a los tiempos de generación (IONESCO, 1953), de morfología colonial (JONES y WHITE, 1968) y componentes antigénicos (JONES y BEAM, 1969). En la literatura estudiada no aparece ningún caso en el que se señale de una manera crítica un cambio que afecte al aumento de tiempo de generación.

Otro aspecto ligado a la biología del sistema B278-célula hospedante consiste en la clara interacción genética del mismo (FUSTÉ, 1980). Una prueba de ello es la que está relacionada con la aparición en las excrecencias de *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2 de un número elevado de células revertientes. Estas interacciones no cursan si las experiencias se realizan en presencia de un antisuero específico.

Con los datos experimentales que disponemos parece razonable pensar que la formación de las excrecencias sería un fenómeno semejante a la formación de un efecto citopático por virus animales en los cultivos de tejidos y no debido a un fenómeno de transducción, que se descarta por el paralelismo existente entre el título de un lisado y el número de excrecencias que produce sobre *C. intermedius* C3, *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2.

La discusión referente a las posibilidades que presenta el bacteriofago B278 como nuevo modelo de comportamiento biológico no tiene antecedentes. Sin embargo, algunos aspectos de la biología del bacteriófago B278, como su morfología, densidad en gradiente de densidades de ClCs, escala de huéspedes, capacidad mutagenizadora y capacidad transductora, son coincidentes con los establecidos para el bacteriófago Mu (HOWE y BADE, 1975; BUCKHARI, 1976).

Finalmente, respecto a las peculiaridades de la célula huésped en el sistema fago-bacteria estudiado en este trabajo, es interesante señalar que *C. intermedius* C3 presenta unas características genéticas distintivas. En efecto, las poblaciones de *C. intermedius* C3 poseen un factor extracromosómico que le confiere estas características descritas en publicaciones anteriores (PARÉS *et al.*, 1974). La interacción de este sistema genético con el no menos interesante sistema B278, que conduce a la formación de las excrecencias, podría constituir un modelo interesantísimo para el estudio de las interacciones virus-célula huésped que represente en un sistema procariota la compleja interacción de virus como el SV40 en las células eucariotas.

RESUMEN

En este trabajo se estudia un aspecto peculiar de la interacción del bacteriófago B278 sobre *C. intermedius* C3, *C. intermedius* 1230 y *C. intermedius* 3MA2. El bacteriófago B278 induce, cuando infecta en las condiciones que se describen en el trabajo, a las cepas antes citadas la formación de unas excrecencias. Estas excrecencias formadas por poblaciones de la cepa indicadora presentan un tiempo de generación netamente superior. Asimismo, una fracción de la población de las excrecencias pierde los marcadores auxotróficos que llevaba la cepa salvaje, recuperando su capacidad de formar colonias en medio mínimo.

En el trabajo se analizan los resultados experimentales obtenidos planteando la posibilidad de una hipótesis de trabajo que permita el análisis de este curioso aspecto de la interacción fago-bacteria.

REFERENCIAS

- ADAMS, M. H.
1959 Bacteriophages, *Interscience Publishers, New York, London.*
- BRUNNER, R., VINOGRAD, J.
1965 The evaluation of standard sedimentation coefficients of sodium RNA and sodium DNA from sedimentation velocity data in concentrated NaCl and Cs Cl solutions, *Biochim. Biophys. Acta*, **108**: 18-29.
- BUCKHARI, A. I.
1976 Bacteriophage Mu as a transposition element., *Annu. Rev. Genet.*, **10**: 389-412.
- CLOTET, R.
1968 Producción directa de alanina por *Citrobacter intermedius* C3, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Madrid.
- CLOWES, R. C., HAYES, W.
1968 Experiments in Microbial Genetics, Blackwell, Oxford.
- FENNER, F.
1967 The classification and nomenclature of viruses, *J. Gen. Virol.*, **31**: 463-70.
- FUSTÉ, M. C.
1980 Variabilidad conferida por dos elementos genéticos en poblaciones de *Citrobacter* y *Escherichia*, Tesis Doctoral, facultad de Ciencias, Barcelona.
- FUSTÉ, M. C., VIÑAS, M., LOREN, J. G., GUINEA, J., PARÉS, R.
1980 Variabilidad genética conferida por el nuevo bacteriófago transductor B278. *Genética Ibérica* (en prensa).
- HOWE, M. M., BADE, E. G.
1975 Molecular biology of bacteriophage Mu, *Science*, **190**: 624-32.

IONESCO, H.

- 1953 Sur une propriété de *B. megatherium* liée à la présence d'un bacteriophage, *C. R. Seanc. Soc. Biol.*, **237**: 1.794-5.

JONES, W. D. Jr., WHITE, A.

- 1968 Lysogeny in mycobacteria. I. Conversion of colony morphology, nitrate reductase activity, and tween hidrolisis of *Mycobacterium* sp. ATCC 607 associated with lysogeny, *Can. J. Microbiol.*, **14**: 551-5.

JONES, W. D. Jr., BEAM, R. E.

- 1969 Lysogeny in the mycobacteria. II. Alterations of bacterial antigens mediated by mycobacteriophage, *Can. J. Microbiol.*; **15**: 1.112-4.

MILLER, J. H.

- 1972 Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor, New York.

PARÉS, R., GUINEA, J.

- 1969 Transferencia interespecífica del factor extracromosómico que condiciona la segregación de glutamato en *Citrobacter intermedius* C3, *An. Estac. Exp. Aula Dei*, **9**: 287-96.

PARÉS, R., GUINEA, J., HERNÁNDEZ, J., VALOIX, S., JOFRE, J.

- 1974 A new episomic element controlling fermentative metabolism and the excretion of aminoacids in *Citrobacter intermedius* C3, *J. Bacteriol.*, **119**: 9-14.