

**UNIVERSIDAD DE MADRID**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
Sección de Biológicas. inéditas



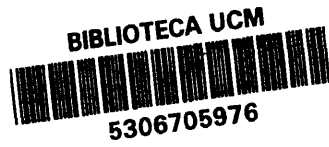
TESIS DOCTORAL

**Estudio sobre transformación y transfección de "Bacillus subtilis" cultivado en quimostato**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR  
PRESENTADA POR

**Alfonso Tapia Álvarez**

Madrid, 2015



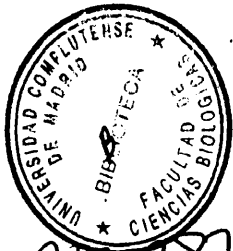
T579.25  
TAP  
est

A handwritten signature, "atapia", enclosed within a hand-drawn circle.

ESTUDIO SOBRE TRANSFORMACION Y TRANS-  
FECCION DE BACILLUS SUBTILIS CULTIVADO  
EN QUIMOSTATO.

Tesis que para aspirar al grado  
de Doctor en Ciencias, presenta,

ALFONSO TAPIA ALVAREZ



R. 25.287

Madrid, Abril 1.973

**A mi padre**

Es mi deseo que las primeras líneas de esta memoria vayan dirigidas al Dr. Rubens López, extraordinario amigo y compañero, quien con sus continuos desvelos y su infinita inquietud durante la preparación y dirección de esta memoria de doctorado, ha sido, en definitiva, su verdadero artífice.

Por otra parte quiero dejar constancia de mi ilimitada gratitud al Prof. Dr. Antonio Portolés director del departamento que ha puesto a mi disposición todo su enorme bagaje científico y toda su profunda categoría humana ayudandonos decisivamente, con su experiencia, a encontrar nuevamente el camino tantas veces como lo perdimos. Sería para mi un motivo de satisfacción grandísima poder tener la ocasión de corresponder a todo lo que el Dr. Portolés ha hecho por mi, sin embargo estoy seguro que comprende estas torpes palabras que significan el cariño que le tengo.

Mi agradecimiento al Instituto "Jaime Ferrán" de Microbiología del C.S.I.C. en la persona de su director Prof. Dr. Lorenzo Vilas, que nos proporcionó los medios materiales para poder realizar este trabajo.

Asimismo quiero expresar al Prof. Dr. Dimas Fernandez Galiano mi reconocimiento por aceptar el patrocinio de esta Memoria.

Hago patente mi agradecimiento al Dr. Thomas A. Trautner del Max Plank Institut de Berlin quien me aceptó en su laboratorio poniendo a mi alcance todos los medios y sus valiosas opiniones y enseñanzas, y al Dr. Hirokawa quien me facilitó una serie de técnicas y una ayuda inestimable.

Finalmente deseo agradecer a todos mis compañeros de laboratorio la ayuda que me han brindado, especialmente a las Srtas. Ma. Luisa del Pozo y Ma. Teresa Alda.

## INTRODUCCION

I. MECANISMOS GENETICOS DE LA VARIABILIDAD BACTERIANA ....	2
1. <u>Mutación genética</u> .....	2
2. <u>Conjugación bacteriana</u> .....	6
3. <u>Transducción</u> .....	9
4. <u>Transformación</u> .....	12
II. TRANSFORMACION BACTERIANA .....	13
1. <u>Definición</u> .....	13
2. <u>La molécula de DNA transformante</u> .....	14
3. <u>Competencia</u> .....	17
a) Definición .....	17
b) Localización de la competencia en las placas del desarrollo .....	20
c) Desarrollo del estado de competencia .....	21
d) Competencia y esporogenesis .....	26
e) Regulación autocatalitica de la competencia: Fac- tor de competencia .....	27
f) Enzima autolitica de la pared celular .....	33
4. <u>Adsorción del DNA</u> .....	37
5. <u>Penetración del DNA</u> .....	41
6. <u>Eclipse</u> .....	44
7. <u>Integración</u> .....	51
8. <u>Expresión</u> .....	56
III. TRANSFECCION .....	60

IV. EL CULTIVO CONTINUO EN EL ANALISIS DE FUNCIONES CELULARES .....	62
1. <u>Clasificación de los sistemas de cultivo continuo.</u>	
a) Sistemas de flujo simple (single-stream) .....	63
b) Sistemas de flujo multiple (Multi-stream) .....	64
c) Sistemas de flujo multiple con feedback .....	65
2. <u>Teoria de los sistemas de flujo simple</u> .....	65
3. <u>Esporulación en cultivo continuo</u> .....	73

PARTE EXPERIMENTAL

I. INTRODUCCION: ESQUEMA EXPERIMENTAL .....	74
II. MATERIAL Y METODOS .....	77
1. <u>Estripes bacterianas</u> .....	77
2. <u>Bacteriofagos</u> .....	77
3. <u>Medios de Cultivo</u> .....	77
4. <u>Preparación de Desoxirribonucleasa + Mg<sup>++</sup></u> .....	82
5. <u>Purificación del bacteriófago SPP1</u> .....	82
6. <u>Purificación del bacteriofago Ø-29</u> .....	83
7. <u>Métodos de extracción y purificación de DNA bac-</u> <u>teriano</u> .....	86
a) Método de Marmur .....	88
b) Método de Kirby .....	88
8. <u>Métodos de extracción y purificación de DNA fágico</u>	
a) DNA del fago SPP1 .....	88
b) DNA del fago Ø-29 .....	89
9. <u>Valoración del DNA</u> .....	90
a) Método de la difenilamina .....	90
b) Método de medida espectrofotometrica directa ..	90

10. <u>Origen comercial de los reactivos</u> .....	92
11. <u>Incubaciones</u> .....	94
12. <u>Determinación de la densidad de un cultivo por medio de la transmitancia óptica</u> .....	94
13. <u>Desarrollo de la competencia en cultivos ordinarios</u> .....	95
14. <u>Desarrollo de la competencia en cultivo continuo</u> ....	97
15. <u>Procedimiento de transformación</u> .....	101
16. <u>Procedimiento de transfección</u> .....	102
17. <u>Estimación del número de esporas refractiles</u> .....	104
III. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA EN CULTIVOS ORDINARIOS.....	105
1. <u>Curva de saturación de DNA por transformación y transfección</u> .....	106
a) <u>Transformación</u> .....	106
b) <u>Transfección</u> .....	106
2. <u>Curva de tiempo de exposición del DNA a las células competentes por transformación y transfección</u> ....	109
A) <u>Transformación</u> .....	109
b) <u>Transfección</u> .....	109
3. <u>Influencia de la agitación sobre la transfectabilidad</u> .....	109
4. <u>Desarrollo de la competencia según el método de Bott y Wilson o de Anagnostopoulos y Spizizen para diferentes estirpes bacterianas</u> ./././.....	112
5. <u>Elección de las condiciones de transfectabilidad</u> ....	113
IV. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA EN CULTIVO CONTINUO .....	118
1. <u>Calculo del factor limitante</u> .....	118
2. <u>Competencia y tasa de multiplicación analizado por transformación y transfección</u> .....	122
a) <u>Transformación</u> .....	122
b) <u>Transfección</u> .....	125

3. <u>Competencia y esporulación en cultivo continuo</u> ....	128
V. INFLUENCIA DE LOS AMINOACIDOS INHIBIDORES Y ESTIMULANTES SOBRE EL DESARROLLO DE LA COMPETENCIA EN CULTIVO CONTINUO .....	130
VI. REGULACION DE LA COMPETENCIA POR EL ACIDO L-GLUTAMICO Y LA L-ARGININA .....	139
VII. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS RESULTADOS .....	146
1. <u>Condiciones optimas para el desarrollo de la competencia</u> .....	146
2. <u>Tiempo de duplicación y competencia</u> .....	155
3. <u>El estado de competencia y su regulación</u> .....	159
VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES .....	165
IX. BIBLIOGRAFIA .....	171

## INTRODUCCION

Al dirigir nuestra atención hacia el vasto mundo bacteriano nos sentimos atraídos por la gran variabilidad, tanto morfológica como funcional, de que pueden hacer gala estos microorganismos. No deja de ser sorprendente el que entidades vitales microscópicas con marcada similitud estructural puedan presentar tan gran diversificación en cuanto a sus manifestaciones biológicas todo lo cual ha dado lugar a ese cambiante y vasto campo de estudio que es la Biología Microbiana.

De los distintos aspectos que en ella cabe estudiar, deseamos centrar nuestro interés en el por qué de la diversificación bacteriana, en los mecanismos evolutivos condicionantes de tales cambios (mutación, conjugación, transducción y transformación) tratando de aportar, con nuestro modesto trabajo, algo que ayude a esclarecer en alguna medida una de las causas que producen estas variaciones: La TRANSFORMACION BACTERIANA. Ello constituirá nuestra línea futura de investigación que puede considerarse iniciada con esta Memoria de Tesis Doctoral.

## I. MECANISMOS GENETICOS DE LA VARIABILIDAD BACTERIANA

Son muy distintas las circunstancias condicionantes de la variabilidad bacteriana, pero las unicas capaces de perdurar son aquellas que estan determinadas por modificaciones en el genoma. Como apuntamos en nuestra introducción son cuatro los mecanismos evolutivos que determinan la variabilidad bacteriana -mutación, conjugación, transducción y transformación- y de ellos, en la primera parte de esta Memoria, daremos una breve idea que sirva de base a nuestro estudio bibliográfico del problema.

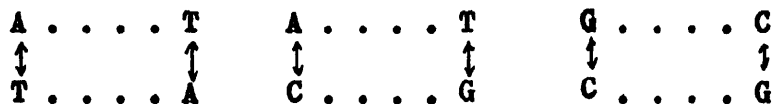
1. Mutación genética. Según es sabido, las mutaciones genéticas, en su mas estricto sentido, se definen como "alteraciones hereditarias del ácido desoxirribonucleico (DNA) no causadas por interacción con otro DNA". Pueden originarse por delección de bases del DNA, por inserción de nuevas bases entre las ya existentes, por inversión de grupos de bases, y, finalmente, por sustitución de una base por otra. La sustitución es susceptible todavia de subdividirse en dos tipos distintos, si una base púrica (Adenina o Guanina) es sustituida en una cadena de DNA por otra base también púrica (Guanina-

na o Adenina) o una base pirimidinica (Timina o Citosina) por otra pirimidinica (Citosina o Timina); entonces estamos en presencia de lo que se ha llamado TRANSICION:

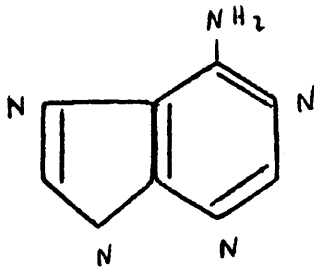


Evidentemente si en una cadena del DNA la Adenina (que estaba apareada con la Timina) es sustituida por la Guanina, al replicarse el DNA el par A - T quedará sustituido por el par G - C provocando el consiguiente cambio genético o mutación.

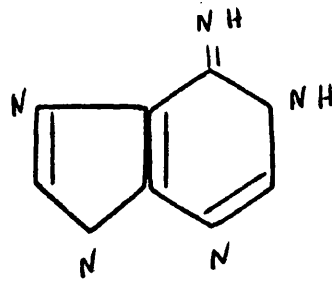
Si por el contrario una base púrica se sustituye por una primidinica la sustitución se conoce como TRANSVERSION:



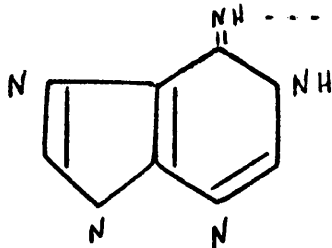
WATSON y CRICK en 1953 sugieren que los tautomerismos (desplazamientos de átomos de H de un punto a otro de la estructura de la molécula) podían ser también causa de mutaciones genéticas por establecerse puentes de H entre bases erradas. Por ejemplo, un tautomerismo es la causa de que la Adenina pase del estado normal a un estado anómalo, que le permite aparearse mediante puentes de H con la Citosina en lugar de con la Timina que es su base complementaria natural:



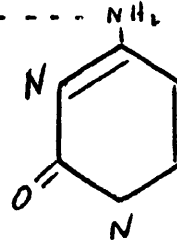
ADENINA EN ESTADO NORMAL



ADENINA EN ESTADO ANOMALO



ADENINA EN ESTADO ANOMALO



CITOSINA EN ESTADO NORMAL

En la siguiente replicación la citosina se aparearía normalmente con la Guanina, y el resultado final sería la conversión de par inicial A . . . T por el G . . . C en aquel punto de la cadena del DNA.

Existe un gran número de sustancias químicas, conocidas como agentes mutagénicos, que bien por modificar la molécula de las bases púricas o pirimidínicas o bien por tener una extraordinaria semejanza estructural con ellas y ser incorporadas al DNA en su lugar, ocasionan sustituciones de las que acabamos de mencionar, entre ellas está la Hidroxil-amina ( $\text{NH}_2\text{OH}$ ), 2 Aminopurina (AP), 5 Bromo-uracilo (5-BU), ácido nitroso ( $\text{HNO}_2$ ), etil etano sulfonato (EES) etc. cuyo modo de acción puede ser resumido en el siguiente cuadro:

CUADRO 1.- Acción de distintos agentes mutagénicos.

Mutaciones inducidas por:	Fracción de los mutantes que revertirán por la acción de:			Sustitución ocurrida en los pares de bases		
	5-BU	AP	HNO <sub>2</sub>	NH <sub>2</sub> OH	EES	
5 - BU	m	T	T	O	O	G . . . . C A . . . . T
AP	T	m	T	M	M	A . . . . T G . . . . C
HNO <sub>2</sub>	M	M	T			A . . . . T G . . . . C
NH <sub>2</sub> OH	M	T		O		G . . . . C A . . . . T
EES	M	M			m	G . . . . C A . . . . T G . . . . C C . . . . G G . . . . C T . . . . A

T: todos o casi todos; M: Mayoria; m: minoria; O: Ninguno o casi ninguno

Existen, naturalmente, otros muchos agentes de mutación con mecanismos de acción a nivel molecular conocidos entre los cuales citaremos por ejemplo el bajo pH o las altas temperaturas que parecen causar despurinización, esto es, una pérdida completa de A y de G, reemplazándose subsiguientemente por cualquiera de las cuatro bases; la proflavina y las acridinas que causan mutación por inserción o eliminación de una base (LUZZATTI y cols. 1961); las radiaciones UV que producen dimerización de bases pirimidínicas, estableciendo uniones covalentes entre T - T, C - C ó U- U, los dímeros de timina pueden ser escindidos por una enzima que sólo actúa en presencia de la luz, o en otros organismos, por una enzima que actúa en la oscuridad (Reparación sin luz) pudiendo los dímeros escindidos ser aislados por centrifugación (SETLOW y CARRIER, 1964).

**2. Conjugación Bacteriana.** Otro sistema de trascendental importancia en la variabilidad bacteriana es un tipo especial de "Reproducción sexual" descubierto en 1946 por LEDERBERG y TATUM y conocido con el nombre de CONJUGACION.

Este fenómeno biológico consiste en que al ponerse en contacto dos bacterias de "sexo" diferente, se forma entre ellas un "tubo de conjugación" a través del cual pasa una molécula de DNA, o parte de ella, desde la célula llamada masculina o macho a la femenina o hembra y nunca en sentido inverso. Lo que determina que una bacteria sea macho o hembra es la presencia o la ausencia de un episoma en estado autónomo o bien integrado en el cromosoma de

la bacteria que se denomina factor sexual, factor de fertilidad o factor F. Las células que llevan el factor F en estado autónomo se denominan  $F^+$ , mientras que aquellas que lo poseen incorporado al cromosoma se han llamado Hfr funcionando ambas como machos aunque no exactamente del mismo modo.

Las bacterias que no poseen el factor de fertilidad F se conocen como  $F^-$  comportándose como hembras, es decir como receptoras en la conjugación.

La pared celular de las bacterias masculinas son físico-químicamente diferentes de las femeninas provocando la atracción mutua que conduce a la conjugación. Estas diferencias físico-químicas son debidas a la presencia en las células masculinas de determinadas sustancias cuya síntesis está controlada por el factor F.

Recientemente parece haberse identificado la estructura de la pared de las células masculinas responsables de la conjugación. Se comprobó, de hecho, que la presencia del factor F determina la formación en la superficie celular de unos filamentos especiales denominados "F-pili". Su composición es proteica e idéntica a la del antígeno de las células masculinas. Asimismo ha sido comprobado que los F-pili constituyen el lugar de adsorción de los fagos y son necesarios para que se verifique el contacto conjugador entre las células; por todo ello se consideran los pili como las estructuras que funcionan de tubo de conjugación. (ARCHER, 1970)

En cuanto al significado evolutivo de la conjugación y peculiaridades del fenómeno en las distintas escalas biológicas, se ve que en los animales y plantas superiores, la conjugación de los gametos comprende la citogamia (fusión de las dos células y de sus citoplasmas) seguida de la cariogamia (fusión de los dos núcleos en uno solo) sin que se de inmediatamente la cromosogamia (emparejamiento o fusión de los cromosomas). De hecho, en el cigoto de los diplontes y de los haplodiplontes coexisten los cromosomas del gameto masculino y los del femenino, pero estos cromosomas, se dividen y se segregan por mitosis sucesivas sin entrar en contacto los unos con los otros. Solamente mas tarde, en la zigotena de la meiosis es cuando los cromosomas de origen paterno entra en contacto y recombinación con sus homólogos de origen materno (cromosogamia).

A medida que descendemos en la escala evolutiva, desde los diplontes hasta la haplontes a través de los haplodiplontes, la cromosogamia va apareciendo cada vez mas próxima de la cariogamia y de la citogamia. En los verdaderos haplontes, la citogamia y la cariogamia van seguidas inmediatamente de la cromosogamia meiótica.

En la base de la escala evolutiva encontramos a las bacterias en las que la conjugación está reducida a la cromosogamia sin citogamia ni meiosis, el cromosoma es uno solo y está constituido por una sola molécula del DNA que no contiene ni protaminas ni histonas.

La conjugación de las bacterias es, por ello, un fenómeno molecular. En la presencia de los factores sexuales autónomos  $F^+$ ,  $F'$ ... etc ... podemos ver la tendencia evolutiva, ya incipiente en las bacterias de poseer varios cromosomas diferentes y de alcanzar una fase diploide. En realidad cada vez más debe considerarse a los episomas como fragmentos del cromosoma que se convierten en un replicón independiente y que, por diferentes alteraciones tenderían a establecerse como un nuevo cromosoma.

3. Transducción. En las páginas precedentes hemos considerado al factor  $F$ , un episoma, determinante de estructuras proteicas especializadas ( $F$ -pili) en la superficie exterior de las bacterias huésped. Imaginemos ahora que esas estructuras proteicas se modifican y se acumulan no en el exterior de la bacteria sino en torno al propio episoma, que las determina, y que la replicación autónoma de este se libera del control que confiere al huésped la inmunidad a la superinfección. Estaremos entonces próximos a lo que llamamos fagos. Algunos fagos (los llamados "temperados") son todavía verdaderos episomas, puesto que su DNA alterna, según las circunstancias, del estado integrado al estado autónomo.

En este último estado, los fagos temperados son capaces de matar a las bacterias en cuyo seno se multiplican activamente. Por el contrario, en el estado integrado (también llamado estado de "profago"), el DNA fágico está reprimido en su actividad virulenta y se mantiene enteramente sometido a la replicación y al me-

tabolismo de la bacteria, que transurre con absoluta normalidad. Las células que contienen un profago, se denominan lisogénicas. Ciertos agentes, como por ejemplo los rayos ultravioleta (llamados agentes de inducción) ocasionan la derrepresión del profago que entonces pasa de nuevo al estado autónomo.

Los fagos temperados son por lo tanto, verdaderos episomas algo más evolucionados que parecen ser los precursores de los "fagos virulentos" que han perdido la capacidad de lisogenia (integración) consiguiendo el estado autónomo definitivamente y sin alternativas.

Al igual que sucede en los episomas, en el caso de los fagos temperados, la inducción del profago se da a veces de modo que una pequeña región del DNA bacteriano -en el que el profago estaba integrado- es arrastrada y llevada en el DNA del nuevo fago que se libera. Al infectar una nueva bacteria, este fago (llamado, ahora, partícula transductora) podrá transferir esa región del DNA bacteriano al nuevo huésped.

Este proceso de transferencia de DNA de una bacteria a otra por medio de un fago temperado se denomina TRANSDUCCION y fue descubierta en 1952 por un estudiante universitario llamado N.D. ZINDER. Cuando la transducción se realiza por el mecanismo que acabamos de resumir muy similar al sistema F' de la conjugación, se denomina "transducción especializada". Un proceso dife-

rente caracterizado por el hecho de transferir practicamente cualquier marcador genético del cromosoma bacteriano ha sido llamado "transducción generalizada".

Durante mucho tiempo se pensó que la formación de las partículas transductoras se realizaba, en la transducción generalizada, por un mecanismo semejante al de la transducción especializada. Fueron IKEDA y TOMIZAWA en 1965 quienes demostraron que las partículas transductoras que llevan a cabo la transducción generalizada no contienen DNA fágico sino tan solo fragmentos de DNA bacteriano. En este tipo de transducción, la producción de partículas transductoras se realiza del modo siguiente: Un fago infecta una célula, inyectando en el interior de ella su DNA. Este se replica repetidas veces, comenzando después a sintetizarse las cabezas de los futuros fagos. En un paso sucesivo, el DNA recientemente sintetizado emigra hacia estas cabezas (inicialmente vacias) y comienza la síntesis de las colas, y de otras estructuras; esto lleva a la formación de las verdaderas partículas fágicas que son finalmente liberadas de la bacteria. Sucede, sin embargo, que a un pequeño número de cabezas fágicas, en lugar de emigrar el DNA fágico, emigra exclusivamente el DNA de la bacteria. Ese pequeño porcentaje de partículas fágicas con DNA de bacteria son las partículas transductoras de la transducción generalizada, las cuales irán a infectar otras bacterias y a transferir su DNA bacteriano.

En los últimos años se han hecho numerosos experimentos usando técnicas que incluían el empleo de isotopos radiactivos o pesados para observar el destino de los DNAs fágico o cromosómico sintetizados antes o durante la infección; se llegó a la conclusión de que el destino del DNA transductor, cualquiera que sea su origen, es variable y ha de ser considerado separadamente en los diferentes tipos de transducción.

4. Transformación. Dado que nuestro trabajo experimental ha versado íntegramente sobre el proceso de transformación bacteriana, creemos imprescindible el llevar a cabo una revisión bibliográfica más profunda sobre este tema, de aquí que dediquemos capítulo aparte a este mecanismo de variabilidad bacteriana.

## II. TRANSFORMACION BACTERIANA

Los pasos que comprende la transformación bacteriana pueden dividirse en 2 categorías principales aquellos que conducen a la yuxtaposición o sinapsis de los genes donadores y receptores y los implicados en el proceso de recombinación subsiguiente. La explicación del mecanismo por el cual se verifica el último paso es de importancia general en el campo de la genética ya que mecanismos similares podían ser responsables de las reacciones de intercambio genético en todos los sistemas vivientes.

Las primeras investigaciones realizadas en el campo de la transformación fueron llevadas a cabo, en su mayor parte, con dos organismos: Diplococcus pneumoniae y Haemophilus influenzae. De estos estudios surgió una visión generalizada del proceso de transformación que podía ser aplicada a otras especies bacterianas transformables.

1. Definición. La transformación bacteriana es un proceso de transferencia intercelular de información en el cual una molécula de DNA extracelular, producida por procedimientos naturales

(secreción o lisis) o bien por extracción química, puede unirse a las células receptoras, atravesar las capas de la superficie de esas células y reemplazar físicamente una región del genoma receptor (BRAUN, 1965).

2. La molécula de DNA transformante. La transformación bacteriana difiere de los otros mecanismos de transmisión conocidos por el hecho de que el DNA purificado puede actuar como el vector en la transferencia de información.

El DNA extracelular puede resultar de una extracción y purificación química, de lisis celular (OTTOLENGHI y HOTCHKISS, 1962; TAKAHASI, 1962) o liberarse de células en multiplicación activa (EPHRATI-ELIZUR, 1968). Este DNA extracelular, no importa de que manera alcance el entorno exocelular, está sujeto a fuerzas de degradación. Las nucleasas que están presentes de una manera natural, atacan al DNA que se libera de la célula o mientras está suspendido en el medio o bien durante los procedimientos de purificación. El DNA transformante es también degradado, en el curso de la purificación y manipulación, por fuerzas hidrodinámicas generadas durante la homogenización y pipeteo (LEVINTHAL y DAVISON, 1961). Esta degradación redistribuye el genoma en un gran número de fragmentos de DNA mas pequeños. Si estas roturas en la doble hélice sucediesen al azar a lo largo del genoma bacteriano, entonces el número posible de moléculas de DNA diferentes en una preparación de DNA puede ser extremadamente grande y los datos de recombinación obtenidos usando la

transformación como sistema analítico serian relativamente exactos. Por otro lado si existen puntos de rotura preferenciales, los datos para la construcción de mapas genéticos basados en la transformación serian poco concluyentes. Así el término "ligados" (linkage) cuando se aplica a transformación bacteriana está mejor definido como la probabilidad de que dos loci genéticos diferentes se situen en el mismo fragmento de DNA después de su liberación espontánea o purificación química (KENT y HOTCHKISS, 1964) y los mapas de marcadores ligados del genoma bacteriano completo, utilizando los resultados obtenidos por transformación, no pueden ser verdaderas representaciones de la secuencia de los cistrones en la estructura intacta.

Las dimensiones de la molécula de DNA transformante y del genoma total pueden ser usados para calcular algunos datos de mucho interés en transformación. El tamaño del genoma puede ser calculado bien por medidas físicas directas o por cálculos basados en la masa de un genoma simple, no replicante; sin embargo ambos métodos han dado origen a resultados dispares. Medidas físicas a través de autoradiografías han demostrado la existencia de estructuras que varían en longitud desde 700  $\mu$  (GANESAN, 1967) a 1300  $\mu$  (DENNIS y WAKE, 1968) mientras que químicamente se ha podido demostrar que el DNA posee un peso molecular que fluctúa entre  $1.2 \times 10^9$  daltons (correspondiente a una longitud aproximada de 700  $\mu$ ) (GANESAN, 1967) a  $3.9 \times 10^9$  daltons (correspondiente a una longitud aproximada de 2000  $\mu$ ) (EBERLE y LARK, 1967).

9765079085

DENNIS y WAKE (1968), quienes consideraron que una espora de *B. subtilis* posee un genoma simple y han determinado el contenido en DNA de esporas de varias cepas de *B. subtilis* y llegaron a la conclusión de que el peso molecular de un genoma completo, es de  $3.3 \times 10^9$  daltons lo cual equivale a una longitud de alrededor de 1700  $\mu$ .

Sin embargo, estos datos tropiezan con el inconveniente de que YOSHIKAWA (1968) ha presentado evidencias de que cada espora de *B. subtilis* contiene dos genomas completos, cada uno con un peso molecular de  $2.7 \times 10^9$  daltons.

BODMER (1966) ha sometido una preparación de DNA transformante, extraído por el método de MARMUR (1961), a centrifugación zonal y ha determinado que el peso molecular medio de las moléculas bicatenarias de DNA era de  $2.1 \times 10^7$  daltons. Esto significa que el genoma de *B. subtilis* se rompe en unos 160 fragmentos con una longitud media de 10  $\mu$ . La célula de *B. subtilis* receptora del DNA (célula competente) es mas pequeña que la célula vegetativa media teniendo una longitud de aproximadamente 1.4  $\mu$  (JAVOR y TOMASZ, 1968), de estos datos se deduce que en la reacción inicial del proceso transformante se tiene a la célula receptora y a una molécula de DNA lineal de aproximadamente 7 veces su longitud.

El hecho de que pueda haber 160 fragmentos de DNA/genoma establece un limite en el número de transformantes para un marcador

específico si el número de sitios de penetración en cada célula receptora, es significativamente menor de 160. Por ejemplo, si suponemos que una vez que la molécula donadora ha atravesado las capas de la superficie de la célula receptora la probabilidad de integración para cada marcador es  $\frac{1}{32}$ , que existen 32 sitios activos por célula competente según han calculado FOX y HOTCHKISS (1957) en *Pneumococcus*, entonces solamente el 20% de las células receptoras se transformarán como media, para ese marcador específico. El calculo es muy similar para el caso de B. subtilis ya que recientemente SINGH (1972) ha calculado que existen entre 20 y 50 sitios activos por célula competente.

La molécula de DNA transformante debe también poseer ciertos atributos biofísicos y bioquímicos para ser biológicamente activa en la reacción de transformación. Los mas importantes son:

- 1) Un peso molecular superior a una magnitud mínima, variando esta magnitud desde  $2 \times 10^5$  daltons (CATO y GUILD, 1968) a  $10 \times 10^6$  daltons (SZYBALSKI y OPARA-KUBINSKA, 1966);
- 2) Una configuración bicatenaria nativa; y
- 3) proceder de una especie o género relacionado con el de la cepa receptora.

### 3. Competencia

#### a) Definición

Ya desde los primeros estudios realizados sobre transformación se sabe que ésta solo se verifica cuando las células se en-

cuentran en un estado fisiológico característico que las vuelve receptoras en relación con el DNA que se les suministra (McCARTY, TAYLOR y AVERY, 1946). Durante este estado las células se denominan COMPETENTES.

El significado preciso de este término varía con los distintos autores. Para algunos, la célula competente es aquella cuya pared celular permite que penetre DNA exógeno (YOUNG, 1966; RANHAND y HERRIOT, 1966, SPIZIZEN et al. 1966). Para otros, competente es la célula capaz de "absorber" y de "integrar" en su genoma el DNA transformador (NESTER, 1964). Otros, finalmente, definen la competencia como la capacidad por parte de la célula de absorber una molécula de DNA donador y de ser transformada por ella (HAYES, 1964; SPARLING, 1966; McCARTY y NESTER, 1967), significando, por lo tanto, lo mismo que TRANSFORMABILIDAD (TOMASZ, 1966; PERRY y SLADE, 1966).

Estas tres definiciones de competencia eran prácticamente idénticas desde el momento en que se juzgaba que el número de transformantes obtenidos era siempre estrictamente proporcional a la cantidad de DNA que había penetrado en las células de un cultivo (ZAMENHOF, 1957; GOODGAL y HERRIOTT, 1957; LERMAN y TOLMACH, 1957; FOX, 1957; HOTCHKISS, 1957; SCHAEFFER, 1958 b). Mas tarde sin embargo, se descubrió que esto no se cumplía siempre. Una fragmentación excesiva del DNA donador, por ejemplo, causa una disminución en el número de transformantes con respecto a la cantidad de DNA capaz de penetrar en las células (LERMAN y TOLMACH, 1959); asimismo, la relación

entre el DNA que penetra en las células y el número de transformantes, se altera por incubación en medios altamente nutritivos, por variaciones del pH, de la temperatura o de la concentración iónica (YOUNG y SPIZIZEN, 1961). Por otra parte, a bajo pH, tanto células íntegras como esferoplastos de Haemophilus y de B. subtilis absorben DNA en cadenas simples en cantidades relativamente elevadas, pero el número de transformantes obtenidos es muy bajo o nulo (POSTEL y GOODGAL, 1966; TICHY y LANDMAN, 1969); finalmente, en varias estirpes en las que no se obtienen transformantes, se consigue penetración del DNA donador en cantidades apreciables (FOL-SOME, 1968; GERMAINE y ANDERSON, 1966; PERRY y SLADE, 1962). En conclusión no siempre la cantidad de DNA donador que penetra en las células del cultivo receptor es una medida válida de su integración en el genoma huésped, ni el grado de esa integración es una medida válida de su expresión. Este hecho se debe a que cada una de las sucesivas fases del fenómeno de la transformación tiene exigencias diferentes en lo que respecta, por ejemplo, a la presencia de iones o moléculas específicas, temperatura, pH y actividad metabólica. En el estado actual de nuestros conocimientos, las definiciones de competencia presentadas anteriormente no son, por lo tanto, concluyentes.

Puesto que en la mayoría de los trabajos, hasta ahora publicados, se mide la competencia por el número de transformantes obtenidos, nosotros preferimos definir la competencia como TRANSFORMABILIDAD. En este sentido lato, la competencia es el resultado final de todas las fases de transformación.

b) Localización de la competencia en las fases del desarrollo

En especies de los géneros Neisseria (CATLIN, 1960 b) y Streptococcus (PERRY y SLADE, 1962) el estado fisiológico de la competencia surge y alcanza su máximo durante la fase exponencial. En el caso de Pseudomonas (HOTCHKISS, 1954), Haemophilus influenzae (GOODGAL y HERRIOTT, 1961), Bordetella pertussis (BRANEFORS, 1964), B. licheniformis (LEONARD y cols. 1964) y B. subtilis (ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961; BOTT y WILSON, 1967) la competencia se alcanza al comienzo de la fase estacionaria. En B. subtilis se encontró una correlación entre el tiempo de generación y la competencia (HORVATH, 1967) y esta última fue así mismo identificada con una fase particular del ciclo de crecimiento (BOTT y WILSON, 1967). En las condiciones experimentales usadas por estos autores, la competencia surgió siempre en el momento en que la densidad óptica del cultivo empezaba a desviarse de la curva lineal que caracteriza el crecimiento logarítmico ( $T_0$ ) y el máximo de competencia fue alcanzado siempre 3 horas después del  $T_0$ . Estos tiempos fueron siempre independientes de la mayor o menor transformabilidad de la estirpe usada.

Sin embargo se puede poner en duda la existencia de una relación directa entre la competencia y una fase particular del desarrollo. En condiciones especiales, Neisseria meningitidis y Nei-

sseria gonorrhoeae pueden mantener la competencia durante todo el ciclo de crecimiento (SPARLING, 1966). Si en Pneumococcus se anticipa el comienzo de la fase estacionaria por limitación de alguna de las sustancias del medio, el momento de aparición de la competencia no se anticipa por ello (TOMASZ, 1966) indicando que no es la proximidad de la fase estacionaria lo que determina la aparición del estado de competencia. Por otra parte, en B. subtilis, las esporas en germinación también son competentes (SPIZIZEN, 1958).

Recientemente, DOOLEY et als. (1971) han llegado a la conclusión de que existe una independencia absoluta entre el estado de competencia y el ciclo biológico de la bacteria receptora en el caso de B. subtilis, ya que las alteraciones metabólicas que originan el estado de competencia en una pequeña fracción de la población se inician en la fase logaritmica y se ponen de manifiesto en la fase estacionaria correspondientes a la fracción no competente, pero ellos no pueden ser englobadas en ninguna de tales fases.

### c) Desarrollo del estado de competencia

El significado del estado fisiológico requerido por las células receptoras para adquirir el estado de competencia fue difícil de explicar en las primeras investigaciones que se hicieron sobre la transformación de Pneumococcus debido fundamentalmente a lo artificioso de los requerimientos (RAVIN, 1961). Sin embargo, pronto

se llegó a la conclusión de que la población receptora tenía que pasar por un periodo de crecimiento y multiplicación antes de que fuese susceptible a la transformación (McCARTY et al. 1946). Trabajos posteriores demostraron de una manera definitiva la naturaleza transitoria de la competencia y se llegó incluso a calcular que el tiempo que permanece competente una célula individual de Pneumococcus era aproximadamente de 15 minutos (THOMAS, 1955).

SPIZIZEN (1958) fue el primero en describir un procedimiento que permitía la transformación de esporas germinantes de B. subtilis 168, un mutante inducido por rayos ultravioleta y aislado por BURKHOLDER y GILES (1947). Otro mutante de origen común, la cepa W-23, se encontró que no era transformable por los procedimientos convencionales de transformación (SUEOKA y YOSHIKAWA, 1963). ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN (1961) definieron las condiciones para la transformación de células vegetativas de B. subtilis. Estos autores observaron que cuando las células se multiplicaban en un medio mínimo semi-definido la competencia comenzaba a aparecer en el cultivo durante la transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria del desarrollo.

De una forma diferente a lo que sucedía en el sistema de Pneumococcus, en donde el estado de competencia está limitado a unos pocos minutos, en la mayoría de los casos, la duración del estado competente se observó que era de 3 a 4 horas, y aunque la aparición

de la competencia es algo asincrónica, es decir, diferentes células llegan a ser competentes a diferentes tiempos durante la competencia del cultivo (JENSEN y HAAS, 1963 b), parece ser que una célula individual puede permanecer transformable durante el mismo intervalo aproximadamente (NESTER, 1964; KAMMEN y cols. 1966 b).

Ya que Bacillus subtilis puede multiplicarse y ser transformado en un medio definido, los factores nutritivos que afectan al desarrollo del estado competente han sido estudiados profundamente. El extracto de levadura se vió que contenía factores inhibidores para la transformación de células vegetativas y podían ser reemplazados por bajas concentraciones de hidrolizado ácido de caseína (ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961). Además de suministrar los requerimientos auxotróficos, el hidrolizado de caseína conténia L-histidina, un aminoácido necesario para quelar los iones de  $\text{Cu}^{++}$  inhibidores presentes en el medio. Otros compuestos quelantes (p.e. EDTA) son capaces de reemplazar a la histidina. La estimulación de la transformación por el polifosfato (KOHYAMA y SAITO, 1960) puede también ser debida a su capacidad quelante (RAVIN, 1961).

Recientemente ha sido demostrado que la competencia del cultivo varia con la composición del hidrolizado de caseína comercial (WILSON y BOTT, 1968). Ciertos aminoácidos se ha demostrado que son estimulantes en el proceso de transformación (arginina, histidina, treonina, glicocola, valina, ácido aspártico, lisina y metionina) y otros inhibidores (alanina, ácido glutámico, leucina, iso-

leucina y prolina) y las concentraciones relativas de estos aminoácidos variaban considerablemente de un hidrolizado de caseína a otro.

YOUNG y SPIZIZEN (1961, 1963 b) han estudiado los requerimientos fisiológicos de la transformación usando como parámetros de medida la frecuencia de transformación y la incorporación del DNA. La inhibición de la transformación en medios ricos y en presencia de  $\text{Cu}^{++}$  se vió que era debida a una disminución en la incorporación por célula de DNA transformante marcado con  $\text{P}^{32}$ . La temperatura óptima oscilaba entre  $34^{\circ}\text{C}$  y  $37^{\circ}\text{C}$  y el pH óptimo entre 6.9 y 7.4. El aporte de oxígeno o aire incrementaba la incorporación del DNA y la transformación en relación con una atmósfera de  $\text{N}_2$  o con respecto a los resultados obtenidos en cultivos receptores no agitados. La naturaleza de la fuente de carbono (p.e. glucosa, piruvato o lactato) no tenían influencia sobre ninguno de los parámetros. La presencia de  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$ ,  $\text{Sr}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  era necesaria para obtener incorporación y transformación, siendo la concentración óptima para los cationes de 0.005 M. Otros cationes monovalentes o divalentes, no influían sobre la incorporación de DNA (YOUNG y SPIZIZEN, 1963 b) y la presencia de  $\text{Fe}^{++}$  y  $\text{Mn}^{++}$  (dos cationes asociados con la esporulación) destruían la competencia (BOTT y WILSON, 1968). El medio de cultivo original descrito por SPIZIZEN (1958) contiene 0.14 M de fosfato potásico, recientemente ha sido señalado que el anión fosfato podía actuar como un inhibidor competitivo de la transformación

(STEWART, 1968). Se encontró que la omisión del fosfato potásico del medio mínimo no alteraba el pH y que la respuesta lineal de la transformación frente a la concentración de DNA fue cinco veces mayor en el medio libre de fosfato.

Existen probablemente tantos métodos para obtener un cultivo competente de B. subtilis como laboratorios interesados en estudiar este fenómeno. Dado que altas concentraciones de aminoácidos eran inhibitorias del desarrollo de la competencia (ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961), muchos investigadores han empleado el procedimiento del "step-down" que implica dilución del primer cultivo en un segundo medio nutricionalmente mas pobre (pero conteniendo una mayor concentración de  $Mg^{++}$ ) durante un corto periodo de tiempo antes de la adición del DNA transformante. Sin embargo, actualmente se piensa que la disminución de las frecuencias de transformación se deben a la presencia de aminoácidos inhibidores en el hidrolizado de caseína (WILSON y BOTT, 1968) y que condiciones nutritivas precarias (semi-starvation-precarias) no se requieren de hecho para el desarrollo de la competencia. Otros métodos han probado igual eficacia y se han apreciado pequeñas diferencias tanto si las células son diluidas en un medio pobre (step-down) o en un medio enriquecido (step-up), o bien si permanecen en el medio original (BOTT y WILSON, 1967). De hecho el método señalado por BOTT y WILSON, que implica la adición del DNA transformante 3 horas después de que haya cesado la fase logarítmica, puede muy bien ser considerado como el método mas idoneo. (WILSON y BOTT, 1968).

#### d) Competencia y esporogenesis

Ante todo la competencia parece ser que está genéticamente determinada, YOUNG y SPIZIZEN en 1961 aislaron mutantes de B. subtilis que se caracterizaban por poseer grados muy diversos de transformabilidad. Aislando después, algunos de los raros transformantes de los mutantes de baja transformabilidad, comprobaron que estos mantenían el mismo bajo nivel de competencia del mutante inicial. Resultados idénticos se obtuvieron incluso después de transformaciones en cadena en las que se usaron como estirpes receptoras los transformantes de la transformación anterior (SPIZIZEN y cols. 1966). Parece, por lo tanto, que el grado de transformabilidad es una característica genéticamente estable.

Por otro lado, este hecho, parece estar relacionado con la capacidad de esporulación (ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961). En la mayoría de los casos en que, por mutación o por transformación, una estirpe dejó de ser esporógena, perdió también transformabilidad (SPIZIZEN, 1965). El ácido  $\alpha$ -picolínico, que es un inhibidor de la esporulación de B. subtilis (GOLLAKOTA y HALVORSON, 1960), también inhibe el desarrollo de la transformabilidad (SPIZIZEN y cols. 1966).

Es cierto que se obtuvieron también mutantes no esporógenos que sin embargo permanecen enteramente transformables (SCHAEFFER, 1964) pero debe recordarse que el proceso de esporulación comprende una serie de fases sucesivas y que el bloqueo de cualquiera de ellas da origen a mutantes no esporógenos (SPIZIZEN y cols. 1966) mientras que son

las primeras fases de este proceso las que parecen identificarse con la producción de la competencia (YOUNG y SPIZIZEN, 1961; YOUNG, 1966). Es posible, por lo tanto, que los mutantes que se vuelven no esporógenos sin perder su transformabilidad hayan sufrido un bloqueo del proceso esporulante en una de las últimas fases.

Finalmente, estudios autoradiográficos de cultivos competentes a los que se les añadió DNA tritiado presentaron marcas de desintegración del tritio asociadas a células que parecían presentar la morfología de los estadios de pre-esporulación (YOUNG, 1967). SPIZIZEN y cols. (1966) concluyeron de todos estos datos que durante las fases iniciales del proceso esporulativo se dá la síntesis de un producto capaz de determinar la competencia y que podría tal vez corresponder al activador del que nos vamos a ocupar a continuación.

e) Regulación autocatalítica de la competencia: factor de competencia.

La regulación de la competencia ha sido atribuida a tres factores principales: El activador, su inhibidor y los lugares de unión del activador situados en la superficie de la pared celular (TOMASZ, 1966). El activador, o FACTOR DE COMPETENCIA (FC) es una sustancia proteica producida por las células competentes. Fue descubierto por primera vez en Streptococcus (PAKULA y WALCZAK, 1963; PAKULA, 1965 b) y mas tarde en Pneumococcus (TOMASZ y HOTCHKISS, 1964). TOMASZ (1966), demostró que las células de Pneumococcus que se vuelven competentes producen el FC.

Cuando pequeñas cantidades de esa sustancia se difunden en el medio, se induce, en células vecinas incompetentes, la rápida producción del FC que las vuelve así competentes. La velocidad de este proceso autocatalítico está determinada por la probabilidad de colisión entre moléculas activadoras y células incompetentes por lo cual es dependiente de la concentración de células en el medio.

Cultivos sometidos a condiciones de incompetencia pueden volverse también competentes y por lo tanto productores de factor de competencia si son activados por la adición de pequeñas cantidades de un extracto del FC.

La naturaleza química del activador ha sido investigada por TOMASZ y MOSSER (1966) en *Pneumococcus* y han encontrado que posee un peso molecular de cerca de 10.000, se adhiere fuertemente al vidrio y a las superficies celulósicas y es inactivado por el calor y por bajas concentraciones de varias enzimas proteolíticas, pero no se altera por los tratamientos con lisozima, DN-asa o RN-asa. Cuando se encuentra disuelto en agua o en soluciones salinas, el FC es muy lábil pero a pH 10 - 11 presenta una gran estabilidad. No altera ninguna de las propiedades fisico-químicas o biológicas del DNA aislado. Su acción activadora parece consistir en una reacción con algunas estructuras de la superficie de las células incompetentes (lugares de unión del activador) lo que daría origen a su vez a la formación de lugares de unión para el agente transformante. En este

sentido, es de interés notar que la carencia de colina, hecho que no interfiere con la síntesis apreciable de RNA y de proteínas, bloquea completamente tanto el proceso de activación como la aparición espontánea de la competencia (TOMASZ, 1969).

Utilizando DNA donador marcado con isótopos radiactivos se comprobó que cultivos incompetentes incapaces de absorber DNA, comenzaban a absorberlo en cantidades apreciables después de haber sido tratados con el activador. Esta reacción de activación exige, por parte de la célula, una continua actividad metabólica. Enzimas proteolíticos así como inhibidores de la síntesis de proteínas o de RNA bloquean totalmente la reacción de activación. Por el contrario, tratando con las mismas enzimas o inhibidores, cultivos ya activados, la activación previamente obtenida no es destruida. Estos resultados indican que la reacción de activación implica la síntesis de al menos una nueva proteína.

En lo que se refiere a B. subtilis, TICHY (1972) ha llegado a conclusiones similares si bien en este caso los resultados no son totalmente concluyentes. Una vez que un cultivo de *Pneumococcus* ha alcanzado, bien espontáneamente, bien por activación, el apogeo de la competencia, esta puede ser mantenida indefinidamente diluyendo 1:2 el cultivo periódicamente en medio fresco. Si en lugar de esas diluciones, el medio fuese resuplementado con un pequeño volumen de una mezcla concentrada de sus componentes, o fuese totalmente sustituido sin alteración de la concentración celular, o diluido

1 : 2 en su propio filtrado, entonces no se evita el declive natural de la competencia (TOMASZ, 1966). De aquí se deduce que en estos cultivos se produce también un inhibidor de la competencia que precisa ser diluido en medio fresco, si se pretende mantener indefinidamente el nivel de la transformabilidad. Este inhibidor no se identifica con la DN-asa y parece actuar directamente sobre el FC (TOMASZ y MOSSER, 1966). Según TOMASZ la competencia varia sobre todo en función de los 2 factores hasta ahora mencionados el activador y el inhibidor.

Se admite, finalmente, la existencia de un tercer factor en la obtención de la competencia- los lugares de unión del activador- situados en la superficie externa de la pared celular.

TOMASZ (1966) realizó un experimento extraordinariamente significativo: A un cultivo en máxima competencia, añadió un cultivo incompetente, genéticamente diferente. El cultivo mixto resultante fue entonces incubado, determinandose periodicamente la transformabilidad de cada una de las estirpes. Los resultados mostraron que la cepa competente mientras sufría un declive temporal de la competencia, producía FC en cantidades suficientes para volver transformable a la cepa no competente. Este fenómeno fue interpretado como una pérdida recuperable de los lugares de unión del activador.

Fluctuaciones ciclicas en la transformabilidad ya habian sido descritas previamente por otros autores (HOTCHKISS, 1954).

También en el caso de la transformación de *Streptococcus* se propone la existencia de lugares de unión del factor de competencia puesto que incluso cuando la producción del activador se mantiene en el máximo y sin que se pueda detectar la presencia de ningún tipo de inhibidor, se observa a veces un acentuado declive de la transformabilidad (PAKULA, 1965 c).

Es posible que estos lugares de unión del factor de competencia constituyan los precursores de los lugares de unión del DNA donador. La existencia de estos últimos fue sugerida por vez primera a raíz de las experiencias realizadas con *Haemophilus*, en las cuales la transformación fue inhibida por la acción competitiva de DNA heterólogo (SCHAEFFER, 1957). También en *Pneumococcus* se llegó a la misma conclusión a través de estudios cinéticos de adsorción del DNA donador (HOTCHKISS, 1957). En ambos casos se calculó que cada bacteria competente tendría de 10 a 25 lugares de unión del DNA transformante. Mas recientemente se comprobó que el periodato sódico, que impide a las células masculinas de *E. coli* K12 conjugarse, como consecuencia de alteraciones de la pared celular (SNEATH y LEDERBERG, 1961), también causa incapacidad de transformación, tanto en *H. influenzae* como en *B. subtilis* (RANHAND y LICHSTEIN, 1966).

Un factor soluble ha sido también aislado de cultivos competentes de *B. subtilis*, el cual puede inducir la aparición de la competencia en cultivos no competentes. Este factor está presente en el sobrenadante (CHARPAK y DEDONDER, 1965) y en los extractos acuosos de cultivos competentes (AKRIGG et al. 1967 y 1970). Estos autores

han cromatografiado los extractos acuosos concentrados de células competentes y no competentes y han demostrado la existencia de ciertas sustancias en los extractos obtenidos de las células en estado de competencia. El material activo es termosensible e inactivado cuando se expone a tripsina o quimotripsina, pero no se inactiva cuando se somete a tratamiento con RNA-asa. No se ha descrito o postulado, inhibidor alguno de esta sustancia y el hecho de que una célula competente de B. subtilis parece retener su capacidad para incorporar DNA transformante durante 3 ó 4 horas (NESTER, 1964, KAMMEN et al. 1966 b) puede indicar la ausencia de un inhibidor. Sin embargo las experiencias de AKRIGG y AJAD son difícilmente reproducibles y han sido puestas en tela de juicio por diversos autores (STREIP et als. 1971). PIERSON et als. (1972) han detectado en el sobrenadante de cultivos competentes de B. subtilis una sustancia capaz de restaurar la competencia en células sometidas a un choque osmótico. Se trata de un factor sensible a las enzimas proteolíticas, el pH y a la temperatura. Por otra parte, JOENJEN et als. (1972) también a partir de sobrenadantes de células en estado de máxima competencia, han aislado un factor capaz de adelantar la aparición del máximo de competencia en células intactas en estado de baja competencia.

Aunque estos resultados son compatibles con los resultados del sistema de Pneumococcus deben aún ser analizados mucho mas datos antes de que se pueda emitir una conclusión definitiva sobre la importancia e identidad de este factor.

f) Enzima autolítica de la pared celular

Otra faceta de los posibles mecanismos bioquímicos de la competencia en B. subtilis, que ha sido mas profundamente estudiado es la acción de una enzima autolítica encontrada en la pared celular (YOUNG y SPIZIZEN, 1963 b; YOUNG, SPIZIZEN y CRAWFORD , 1963). Las paredes celulares aisladas de una cepa transformable de B. subtilis 168 ind<sup>-</sup> se lisan mas rapidamente que las paredes de cepas no transformables cuando son incubadas en un tampón fosfato a pH 8. Por análisis químico de los productos resultantes de esta autólisis, se demostró la presencia de una enzima que separa los polipeptidos de los polisacáridos de la pared celular, rompiendo las uniones entre el ácido acetil murámico y la L-alanina (YOUNG, TIPPER y STROMINGER, 1964). Esta enzima se denomina acetil muramil-L-alanin-amidasa. La autólisis exige una energía de activación de 9.2 Cal/mol y se comporta como una cinética de primer orden.

Esta enzima autolítica aparece durante la fase inicial del crecimiento logaritmico y, muy probablemente, desempeña un papel importante en el crecimiento de la pared celular (YOUNG, 1965, 1967.

La rotura del complejo peptidico facilitará la expansión de su rigido entramado al permitir la inserción de nuevos materiales en la pared y bajo la acción de una transpeptidasa que actua conjuntamente con la amidasa. Esta hipotesis está de acuerdo con el hecho de que la penicilina impida las transpeptidaciones (WISE y PARK, 1965, TIPPER y STROMINGER, 1965).

Durante el periodo de crecimiento celular que precede a la aparición de la competencia, la enzima autolítica acusa un aumento de actividad cuyo máximo coincide con la iniciación del periodo de transformabilidad. En mutantes de baja competencia o cuando cepas altamente transformables son cultivadas en condiciones desfavorables para la competencia, la actividad de esta enzima está muy limitada. Además, se ha demostrado que la acción inhibidora o estimulante de los diversos cationes bivalentes y de diferentes concentraciones iónicas (YOUNG, 1966) afectan de un modo paralelo a la enzima y a la competencia.

Parece por lo tanto que el desequilibrio de la pared celular, causado por la enzima autolítica facilita la penetración del DNA transformante, y así la competencia aparece como un estado fisiológico de crecimiento caracterizado por un desequilibrio entre la actividad de la amidasa y la de la transpeptidasa que da origen a un estado de adelgazamiento específico de la envuelta celular. Esta hipótesis está apoyada por los siguientes hechos:

- 1) Las bacterias E. coli K12 pueden ser transformadas por el DNA aislado del fago transductor  $\lambda$ , pero sólo en la presencia de un fago auxiliar que perfore la pared celular (KAISER y HOGNESS, 1960).
- 2) El DNA del fago T4 puede penetrar en esferoplastos de E. coli pero no en células completas de la misma bacteria (VAN DE POL, VELDHUISEN y COHEN, 1961).

3) El DNA del fago  $\lambda$  o del T1 puede de la misma manera transformar esferoplastos pero no células completas de E. coli (EVANS, MACKAL y COLEMAN, 1962).

4) El DNA del fago  $\phi$  174 infecta mejor los esferoplastos que las células completas de E. coli (GUTHRIE y SINSHEIMER, 1960; HOFSCHEIDER, 1960).

5) Finalmente, en muchas especies de Neisseria (SPARLING, 1966), así como de Pneumococcus (RAVIN, 1957) el grado de competencia es inversamente proporcional a la cantidad de polisacárido de la capsula.

En la transformación de B. subtilis existen, asimismo, una serie de datos que parecen apoyar esta hipótesis. La presencia de precursores de la pared celular hace bajar la frecuencia de transformación (SPIZIZEN, 1959); los cultivos competentes son más sensibles a la lisozima que los no competentes (MILLER, ZSIGRAY y LANDMAN, 1967) y, por lo menos en una de las cepas, los protoplastos absorben el DNA transformante en mayores cantidades que lo hacen las células intactas (HIROKAWA e IKEDA, 1966; HIROKAWA, comunicación personal).

Experimentos relativamente recientes en los que el hidrolizado de caseína, generalmente usada en el medio de transformación, fue sustituida por mezclas definidas de aminoácidos, mostraron que varios de los principales componentes de la pared celular (YOUNG y cols. 1963) inhiben la competencia, al paso que entre los constitu-

yentes de la pared celular no se encontraban los aminoácidos que estimulan la competencia (BOTT y WILSON, 1968).

La pared celular parece así constituir una barrera para la entrada del DNA donador. En realidad protoplastos obtenidos de células competentes absorben mas DNA que los protoplastos obtenidos a partir de células no competentes (HIROKAWA comunicación personal) y existen razones para pensar que la membrana citoplasmática constituye un punto de unión firme para el DNA transformante.

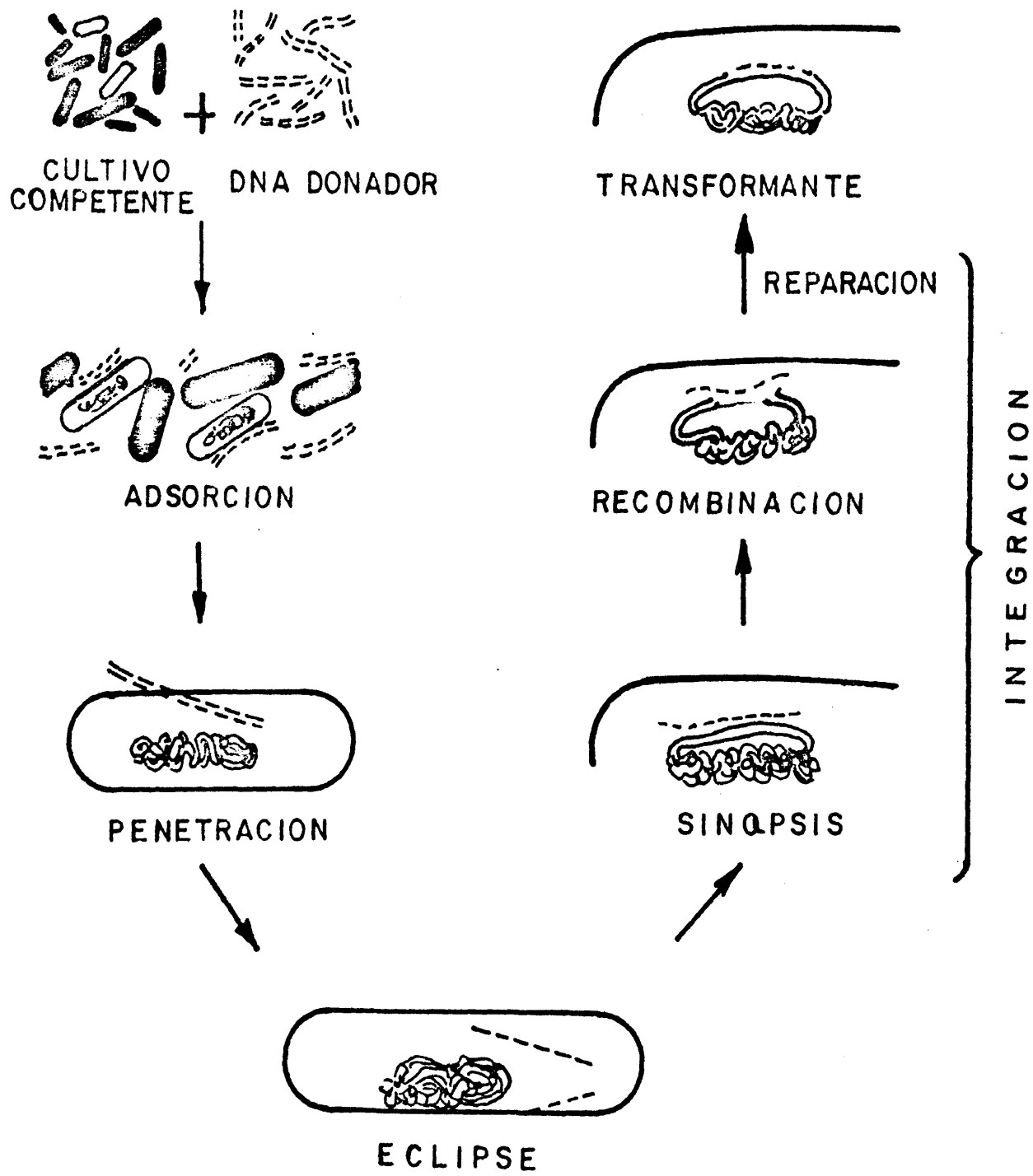
De todo lo anterior se desprende que el concepto de competencia no alude exclusivamente a un estado fisiológico absoluto sino que depende, asimismo, de la naturaleza del DNA donador utilizado, de su peso molecular, de su estructura en cadena simple o doble, de la presencia de uniones transversales, de su grado de homología con el DNA receptor, etc, etc. Por ejemplo las mismas condiciones que vuelven las células competentes para el DNA en cadena simple, pueden volverlas incompetentes para el DNA en cadena doble y vice-versa (POSTEL y GOODGAL, 1966; CHILTON, 1967). Por estas y otras razones ya expuestas, la competencia (definida como la transformabilidad) solo será mejor comprendida después de haberse estudiado las diversas fases del proceso de transformación y en este sentido son de resaltar los resultados obtenidos por el grupo de NESTER (DOOLEY et als. 1971) quienes han establecido 5 fases en el desarrollo de la competencia.

#### 4. Adsorción del DNA

Después de que las células de un cultivo son puestas en contacto con el DNA donador, este comienza por adsorberse a la superficie externa de las células que eran competentes (Fig. 1). El DNA adsorbido no se libera por repetidos lavados del cultivo, pero es fácilmente degradable por un tratamiento con DN-asa. Como este último tratamiento no afecta al DNA que ya hubiese penetrado en las células, se puede establecer de este modo una distinción experimental entre adsorción y penetración del DNA donador.

La existencia de la adsorción como una fase, en cierto modo, autónoma, en el proceso transformante con características propias que la distinguen de las fases subsiguientes de penetración e integración fue propuesta por primera vez para Pneumococcus (FOX y HOTCHKISS, 1957; LERMAN y TOLMACH, 1957) y más tarde para B. subtilis (KOHYAMA y SAITO, 1960) y H. influenzae (GOODGAL y HERRIOTT, 1961).

La adsorción se realiza con gran rapidez (LEVINE y STRAUSS, 1965), no exige una fuente de energía (BARNHART y HERRIOTT, 1963) y es independiente de la temperatura (BARNHART y HERRIOTT, 1963; LEVINE y STRAUSS, 1965). Depende sin embargo del tamaño y estructura del DNA donador, así como del pH y de la fuerza iónica del medio. El DNA desnaturalizado o fragmentado por ultrasomidos, pierde casi todo su poder de adsorción (BARNHART y HERRIOTT, 1963) y decrece también a medida que la fuerza iónica aumenta a partir de  $C1Na$  0.03 M



**FIG. 1**

Esquema representativo de las distintas fases del proceso de transformación.

hasta 0.3 M. Puesto que la concentración de sales afecta la interacción de superficies electricamente cargadas, ese hecho fue interpretado sobre la base de que el aumento de la fuerza iónica disminuye la atracción entre las cargas electrostáticas del DNA y de la superficie celular. El descenso gradual del pH (entre 7 y 5.5) provoca un aumento lineal en la adsorción, probablemente a causa de su efecto de reducción de cargas negativas (BARNHART y HERRIOTT, 1963).

La naturaleza electrostática de esta fase de adsorción fue también demostrada en B. subtilis, y usada para obtener el fraccionamiento electrocinético de cultivos competentes con el consiguiente enriquecimiento en células competentes. El método consistía en la filtración de los cultivos competentes a través de filtros con poros de diferentes tamaños, y resuspensión en medios con fuerzas iónicas diferentes (JENSEN y HAAS, 1963 a y b). Las conclusiones finales de estos estudios y de otros anteriores son en resumen las siguientes:

En un medio acuoso de pH neutro, la superficie celular mantiene una densidad de carga eléctrica negativa que es equilibrada por la carga positiva del medio. La densidad de carga eléctrica de la superficie celular depende de la naturaleza estructural intrínseca de la superficie celular (número de grupos amino y carboxílicos ionizables, etc) y varía con el estado fisiológico de la célula. Se demostró por ejemplo que la movilidad electroforética de las células bacterianas se altera hacia el final de la fase logarítmica.

La competencia surge en cada célula por un salto brusco hacia un máximo de carga negativa que produce un potencial electrocinético elevado. Los factores extrínsecos (medio de cultivo) causan entonces un descenso gradual de las cargas negativas de la superficie celular hasta un momento en que el DNA, negativamente cargado, es atraído por la pared celular. Esta es posiblemente una de las funciones de la albumina bovina de aquí que sea necesaria para la transformación de B. subtilis (ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN, 1961). De hecho una vez que estas sustancias proteicas se adsorben a la superficie celular, tienden a desplazar el punto isoelectrico en su dirección bajando así la densidad de carga electrica de la pared celular.

Por otra parte, el contenido en galactosamina de las paredes celulares de B. subtilis aumenta paralelamente con el incremento de la competencia en el cultivo, alcanzando ambos un máximo simultáneamente (YOUNG, 1967). Teniendo en cuenta el hecho de que la galactosamina se aísla en la misma fracción del ácido teicoico (YOUNG y cols. 1964), es bien posible que el aumento en galactosamina contribuya a la reducción de la carga electrica negativa de la pared celular, por combinación con grupos terminales fosfóricos (negativos) del ácido teicoico (YOUNG, 1967). El mismo papel, al menos parcialmente, parecen desempeñar los cationes que se sabe son necesarios para la transformación como por ejemplo,  $Ca^{++}$  en Diplococcus (FOX

y HOTCHKISS, 1957) y en Neisseria (LIE, 1965);  $\text{Ca}^{++}$  y  $\text{Mg}^{++}$  en Haemophilus (GOODGAL y HERRIOT, 1961; LEIDY, JAFFEE y ALEXANDER, 1962);  $\text{Mn}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  en B. licheniformis (LEONARD y cols. 1964) y  $\text{Sr}^{++}$ ,  $\text{Ba}^{++}$ ,  $\text{Ca}^{++}$  o  $\text{Mg}^{++}$  en B. subtilis (YOUNG y SPIZIZEN, 1963 a).

##### 5. Penetración del DNA

Cuando el DNA donador, adsorbido a las bacterias receptoras, se vuelve resistente a la acción de la DN-asa añadida al medio, se supone que ha penetrado en el interior de las células receptoras (Fig. 1). Esta penetración se da en esferoplastos o bacterias con pared celular completa, y en este último caso tanto en cepas transformables como no transformables. En cuanto a protoplastos aún existe controversia sobre la posibilidad de que tal proceso se lleve a efecto (MILLER et als. 1972). Al contrario de lo que sucede en la fase precedente, la penetración del DNA exige metabolismo celular, se lleva a cabo a una velocidad medible y es dependiente de la temperatura. La primera de estas características está basada en el hecho de que se requiere una fuente de energía (glucosa o bien otra) para que el proceso de penetración tenga lugar (YOUNG y SPIZIZEN, 1961) y por otro lado este proceso es inhibido por el 2-4 dinitro fenol, cianuro, acetato de iodo, azidas y otros inhibidores metabólicos incluso cuando son añadidos a un cultivo competente al mismo tiempo que el DNA (SPIZIZEN y cols. 1966; BARNHART y HERRIOTT, 1963). La energía de activación de este proceso de penetración fue calculada en 13.9 Kcal.

La cinética de la penetración del DNA se estudió en experimentos de transformación de B. subtilis en los cuales se añadió DN-asa a diferentes intervalos de tiempo después de haber suministrado el DNA al cultivo, determinandose en cada caso el número de transformantes obtenidos (LEVINE y STRAUSS, 1965). De este modo se demostró que para obtener por lo menos un transformante, se requiere un determinado periodo de tiempo entre la adición del DNA y de la DN-asa al que se llamó periodo de latencia. Su duración es independiente de los marcadores genéticos y de las estirpes usadas así como del grado de fragmentación, concentración o uniones transversales existentes en el DNA, no siendo alterada tampoco por la adición de un exceso de DNA homólogo no transformante.

El periodo de latencia es, con todo, dependiente de la temperatura, siendo mas largo a 26° C que a 37° C, y es nulo si el tratamiento con DN-asa se sustituye por lavados del cultivo, que eliminen el DNA del medio, pero no el adsorbido. A 26° C el periodo de latencia es de 2.5 min. De este periodo de tiempo, apenas cerca de 1.3 min. son de hecho utilizados para la entrada del DNA. El tiempo restante corresponde probablemente a algún proceso metabolico precedente (STRAUSS, 1965), como es la posible sintesis de un tipo de permeasa (KOHYAMA y SAITO, 1960). La existencia de una permeasa del DNA dotada de un mecanismo de transporte activo ha sido propuesta asimismo en la transformación de Haemophilus (STUY y STERN, 1964), siendo posible que los cationes necesarios para la reacción de transformación esten relacionados con esta enzima (SCHLISSEL y SWORD, 1966)

La duración del periodo de latencia para los dobles transformantes de genes ligados es directamente proporcional a la distancia cromosómica entre esos genes (STRAUSS, 1965). Este hecho indica que el DNA transformante penetra la pared celular longitudinalmente. Esta hipótesis fue confirmada mas tarde en experimentos que mostraban que esas transformaciones dobles son originadas por la misma molécula de DNA donador y que, por tanto, el periodo de latencia representa de hecho, el tiempo necesario para la entrada del segmento de una molécula de DNA comprendido entre las 2 marcas transformadoras. Ese tiempo es tanto mas largo cuanto mas alejados estuvieran esos marcadores (STRAUSS, 1966). El mecanismo por el cual se da la penetración del DNA no está demasiado claro en la actualidad. Por un lado parece exigir energía y metabolismo; por otro lado hay pruebas de que las células competentes tienen las paredes adelgazadas y modificadas, indicando que la penetración del DNA se da a través de hendiduras de la pared por un proceso físico, auxiliado por un descenso gradual en la carga negativa de la pared celular (YOUNG, 1967). Es posible que la aparente contradicción de estos datos provenga de no haberse distinguido todavia suficientemente entre la penetración de la pared y la penetración de la membrana, que podrian ser 2 fenómenos diferentes: el primero puramente físico; el segundo metabolico y energético. MILLER y LANDMAN (1966) presentaron casos en los cuales parte del DNA transformante, después de volverse resistente a la DN-asa parece quedar entre la pared y la membrana durante un periodo de tiempo considerable.

Otro aspecto del mecanismo de penetración ha sido puesto de manifiesto por autoradiografías de cultivos de B. subtilis recién transformados con DNA tritiado, en los que el 88% de las células que presentaban marcas de desintegración del tritio, estas se encontraban localizadas en la pared celular de bacterias dotadas de la morfología característica de las pre-esporas (YOUNG, 1967). Fue por eso aventurada la hipótesis de que el DNA después de fijarse a la membrana citoplasmática es forzado hacia el interior de la espora por el desarrollo de esta, quedando así separado del genoma vegetativo y de las nucleasas. Posteriormente, el medio sólido usado para poner de manifiesto la transformación impediría la consumación del proceso de esporulación, y restauraría el crecimiento vegetativo, permitiendo así la recombinación y la expresión del DNA transformante (YOUNG, 1967). Estos resultados están en franco desacuerdo con las experiencias de integración de DNA descritas para ERICKSON y BRAUN (1968).

Otras autoradiografías de cultivos del mismo organismo, también expuestas a DNA tritiado (WOLSTENHOLME, VERMEUEN y VENEMA, 1966), mostraron marcas de desintegración del tritio claramente asociadas con la pared externa de los mesosomas. Puesto que durante el desarrollo máximo de la competencia se da un notable aumento de los mesosomas, es posible que estos sirvan para transportar hacia el interior de la célula el DNA transformante ligado a la membrana

## 6. Eclipse

Después de que el DNA donador ha penetrado en el interior de las células competentes, se tienen que utilizar nuevos métodos

para poder estudiar las distintas vicisitudes que atraviesa antes de llegar a integrarse al genoma receptor. Uno de esos métodos es el de la reextracción y análisis del DNA intracelular de cultivos recién tratados por el donador. Ese DNA reextraído contiene tanto el DNA del receptor como el del donador que haya penetrado, pero será posible distinguir uno de otro si hubiesen sido marcados uno de ellos con elementos de densidad diferente o con diferentes radioisótopos; o bien, si poseen marcadores genéticos diferentes. En ese caso el DNA reextraído puede, a su vez, ser usado como donador para transformar otro cultivo receptor apropiado. Los transformantes de esta segunda transformación revelarán si el DNA reextraído contenía de hecho, y en qué grado, fragmentos del donador inicial. Así se denomina "actividad donadora" al grado en que el DNA reextraído es capaz de inducir transformación para los marcadores genéticos característicos del donador inicial. En el proceso de transformación de *Pneumococcus* se descubrió un breve periodo, después de la penetración del DNA donador, durante el cual el DNA reextraído no revela actividad donadora alguna (FOX, 1960). Este periodo fue denominado "ECLIPSE" por analogía con la fase de la infección vírica conocida con el mismo nombre.

Algo similar sucedía en el caso de *B. subtilis* y en ambos géneros la actividad transformante del primer donador se recupera en función del tiempo de incubación. Sin embargo *H. influenzae* carece de la fase de eclipse y, aún más, la actividad inicial del donador es mayor y se reduce a un 50% después de un cierto tiempo de incubación.

La primera interpretación de este fenómeno en Pneumococcus (EPHRUSSI-TAYLOR, 1960 b) mantenía que el DNA donador sería inicialmente inactivado por la unión a un lugar receptor. Esta interpretación fue después abandonada, y recientemente rechazada (GHEI y LACKS, 1967).

En experiencias en las que el DNA donador marcado con  $P^{32}$  fue reextraído y fraccionado en gradientes de ClCs (LACKS, 1962), se ha observado que en el DNA reextraído pocos minutos después de la penetración, el  $P^{32}$  fue encontrado en una fracción constituida por pequeños oligonucleótidos dializables, y en otra, no dializable que sedimentaba en ClCs en la zona de alta densidad que caracteriza el DNA desnaturizado. En el DNA reextraído a partir de incubaciones sucesivamente más prolongadas después de la penetración, esa fracción de DNA desnaturizado aparece progresivamente más reducida hasta desaparecer por completo al mismo tiempo que el  $P^{32}$  del DNA donador comenzó a aparecer en una nueva fracción, asociado con el DNA en cadena doble del receptor. De aquí se concluyó que el periodo de eclipse es una consecuencia de la desnaturización del DNA donador, después de su penetración en las células receptoras, dado que en condiciones normales, el DNA desnaturizado no posee poder transformante y quedaría así explicada la ausencia de actividad donadora del DNA reextraído durante el periodo de eclipse. La integración subsiguiente del donador desnaturizado en el DNA en cadena doble del receptor restituiría al DNA reextraído la actividad donadora, cesando así el eclipse.

Esta hipótesis fue apoyada por trabajos posteriores de FOX y ALLEN (1964) y confirmadas por experiencias más recientes de GHEI y LACKS (1967). En estas últimas, el DNA reextraído durante el periodo de eclipse fue puesto en contacto con otro DNA desnaturalizado, en condiciones que permiten el emparejamiento de cadenas simples del DNA. El resultado fue la recuperación de la actividad donadora.

En Haemophilus se pensó desde el principio que no existía un periodo de eclipse, que los segmentos de DNA donador se integrarían en el genoma del receptor bajo la forma de cadenas dobles (HERRIOTT, 1961; STUY, 1965; VOLL y GOODGAL, 1961 y 1965). Esta conclusión estaba basada en experiencias con DNA heterocigótico artificial, en que se suponía que, por el apareamiento de dos tipos de DNA desnaturalizado, con diferentes marcadores genéticos, no se podía obtener un DNA híbrido que tuviese en la misma cadena ambos marcadores.

Cuando se probó que esta suposición era falsa (HERRIOTT, 1965) se puso en duda la inexistencia, en Haemophilus de una desnaturalización del DNA donador previa a la integración (VENEMA, PRITCHARD y VENEMA-SCHRODER, 1965 a). Experiencias posteriores empleando diversos marcadores en una misma molécula demostraron que, de hecho, no se observa desnaturalización del DNA donador aunque solo una de las cadenas de cada molécula se integra (NOTANI y GOODGAL, 1966).

Se supone que al mismo tiempo que se da esta integración, la otra cadena es destruida.

En B. subtilis también se llegó a admitir que no existía ningún periodo de desnaturalización, puesto que no se encontraba por fraccionamiento en ClCs ningún vestigio de DNA monocatenario (PÈNE y ROMIG, 1964). Sin embargo, se pensó que los métodos de precipitación del DNA usados por estos autores podían haber excluido el DNA desnaturalizado (VENEMA y cols. 1965 a). Posteriormente se han ido acumulando pruebas indirectas en favor de que la existencia en B. subtilis de un periodo de eclipse estuviese causado por la desnaturalización del DNA donador.

VENEMA y cols. (1965 a) demostraron que, en esta especie, el DNA donador sufre inmediatamente después de la penetración una pérdida transitoria de su capacidad transformante; que este eclipse corresponda a la desnaturalización del donador se apoyaría, parcialmente, en el hecho de que solo una cadena de cada molécula de DNA donador se integra en el genoma receptor. La integración monocatenaria del donador fue demostrada en las elegantes experiencias realizadas con DNA híbrido por VESTRI y cols. (1966).

Además, se ha encontrado donador desnaturalizado en el interior de células de B. subtilis en experimentos en los que se dió DNA donador marcado con  $N^{15}$ ,  $H^2$  y timidina  $H^3$  a células receptoras marcadas con  $P^{32}$ ,  $N^{14}$  e  $H^1$ . Durante un corto intervalo de tiempo,

Después de la penetración del DNA, se encontraron en el DNA reextraído, átomos del donador en fracciones de ClCs que correspondían tanto al donador nativo como al donador desnaturalizado (BODMER y GANESAN, 1964). Esto indicaría que el DNA penetra la pared celular bajo la forma de cadena doble y asume, después, la estructura monocatenaria.

Podemos también buscar apoyo para la teoría del eclipse-desnaturalización en experiencias realizadas con DNA dotado de uniones transversales. Así varios reactivos que añadidos a soluciones de DNA determinan una disminución de su capacidad transformante, causan también uniones transversales del DNA, como se demostró por la resistencia a la desnaturalización. Entre estos reactivos se encuentran el ácido nitroso (BECKER, ZIMMERMAN y GEIDUSCHEK, 1964; GEIDUSCHEK, 1961), la mitomicina C (NAKATA y SAKAMOTO, 1961) y los rayos ultravioleta (ZAMENHOF y cols. 1956, MARMUR y GROSSMAN, 1961), etc.

El hecho de que estos tratamientos causaran en el DNA, tanto una pérdida en su capacidad de transformación como una resistencia a la desnaturalización, parece significar que la integración ha de ser precedida o acompañada por la conversión de la cadena doble del DNA en cadenas simples, ya que fue demostrado que el tratamiento previo con rayos ultravioleta, del DNA donador o de las células receptoras de Haemophilus permite la penetración normal del agente transformante, pero impide su asociación con el genoma receptor. Como consecuencia de estos y de otros datos, se llegó a la conclusión de

que la formación de uniones transversales, inducidas por rayos ultravioleta, impide la desnaturalización del DNA donador, imposibilitando así su integración subsiguiente (NOTANI y GOODGAL, 1965). Es probable que los otros agentes causantes de uniones transversales, que, asimismo disminuyen la capacidad transformante del DNA, actuen por un mecanismo semejante.

De cuanto hemos dicho anteriormente cabe concluir que en el caso de H. influenzae no se da la desnaturalización del DNA donador, de aquí que no aparezca periodo de eclipse cuando se emplea para transferir un segundo receptor al encontrarse biológicamente intacto. En Pneumococos, las experiencias indican claramente la aparición de un estado monocatenario que explica el periodo de eclipse.

Finalmente, con respecto a B. subtilis, si bien se apunta hacia la existencia de una fase monocatenaria previa a la integración, este punto aún está sujeto a controversia; y así VENEMA y cols. (1970) (comunicación personal) señalan el haber obtenido evidencia sobre la existencia de un estado bicatenario especial del DNA donador consistente en una disminución de su tamaño y como consecuencia de su peso molecular, una vez incorporadas en el primer receptor lo cual le impediría competir biológicamente con las moléculas de este primer receptor cuando se extraen para transformar el segundo receptor.

No obstante, la investigación continúa abierta en este punto ya que mientras los recientes trabajos de DUBNAU y cols. (1971) apo-

yan las teorías de VENEMA, PIECHOWSKA y FOX (1971) en experiencias realizadas sobre gradientes de ClCs y de sacarosa con DNA donador obtenido después de la incorporación al primer receptor y tratado con pronasa y lipasa, apuntan hacia la existencia de un DNA monocatenario ligado a una proteína, lo cual justificaría su incapacidad para transformar a un segundo receptor y el no aparecer en los gradientes de densidades en la banda correspondiente al DNA monocatenario.

### 7. Integración

El DNA reextraído de cultivos que están en una fase avanzada del proceso de transformación, muestra haber recuperado la actividad donadora (en el caso de Pneumococcus y B. subtilis). Esta terminación del eclipse se debe a la integración del DNA donador (hasta entonces en cadena simple) en la estructura en cadena doble del receptor. Esta integración se da no por la mera adición del DNA donador al genoma receptor, sino por una sustitución parcial de este por aquel. En realidad desde hace bastante tiempo se comprobó que los caracteres dominantes y recesivos transformaban con idéntica eficacia (RAVIN, 1959), y más tarde se observó también la constancia de grupos ligados ("linkage") incluso entre genes de los que uno había sido transformado. (FOX, 1960; VOLL y GOODGAL, 1961; ANAGNOSTOPOULOS y CRAWFORD, 1961). Estos y muchos otros trabajos posteriores no dejaron ninguna duda sobre que la integración se da por sustitución de parte del genoma receptor por segmentos del DNA donador.

Para explicar esta sustitución se ha acudido a algunas variantes sobre las dos hipótesis generales formuladas hace ya largo tiempo, para la interpretación de la recombinación entre cromosomas la hipótesis de "rotura y reunión" ("breakage and reunion" DARLINGTON, 1935) y la de "selección de molde" ("copy choice" LEDERBERG, 1955). Aplicando la primera hipótesis al caso de la transformación, se admite que el donador y el receptor se fracturan en puntos homólogos y se unen de nuevo de modo que originan la formación de una estructura recombinada, que contiene fragmentos de una y de otra de las unidades iniciales. Este proceso recombinante no exige, por tanto, síntesis cromosómica.

En la hipótesis de la "selección de molde", por el contrario, sería durante la replicación cromosómica cuando se daría la recombinación; durante el proceso replicativo de la región transformada sería esta, en algunos casos, la que se toma como molde, surgiendo así un transformante, producto de este proceso de replicación, sin que el donador y el receptor originales se asociasen físicamente. La primera prueba indirecta a favor de la teoría de rotura y reunión fue presentada en Haemophilus, ya que se podía obtener dos genes ligados, uno introducido por el DNA donador y otro residente en el genoma receptor antes de que se hubiese dado replicación apreciable del DNA (FOX, 1960; VOLL y GOODGAL, 1961). Una prueba mas directa se obtuvo por medio de los experimentos realizados en Pneumococcus por FOX y HOTCHKISS (1960) empleando isotopos radiactivos y pesados y gradientes de CsCl.

En B. subtilis la integración física por rotura y reunión fue demostrada por primera vez, administrando DNA radiactivo a células competentes que poseían cromosomas marcados con isotopos pesados. El fraccionamiento en Cl Cs del DNA de esos cultivos recién transformados reveló la unión del marcador radiactivo con el de densidad (PENE y ROMIG, 1964). Todos los estudios posteriores han confirmado la integración por rotura y reunión en B. subtilis (BODMER y GANESAN, 1964; BODMER, 1965 y 1966).

Otro problema era saber si las dos o solo una de las cadenas de cada molécula del DNA donador eran integradas en el genoma receptor.

La integración de cadenas simples fue sugerida en experimentos con D. pneumoniae (FOX y ALLEN, 1964) y H. influenzae (NOTANI y GOODGAL, 1966). En B. subtilis las primeras indicaciones a favor de la integración en cadenas simples se obtuvieron a partir de experiencias con marcadores múltiples (BODMER y GANESAN, 1964). Posteriormente se encontraron pruebas más concluyentes por medio de hibridación de preparaciones de DNA genéticamente diferentes (VENEMA y cols. 1965 a; y VESTRI y cols. 1966)

La integración en cadenas simples, en B. subtilis, fue más recientemente confirmada por separación de las dos cadenas complementarias del DNA por medio de la acción diferencial del ácido polirriboguanilico (CHILTON, 1967). Estas últimas experiencias también demostraron que las dos cadenas complementarias del DNA de B. subtilis tienen idéntica capacidad de transformación.

Los mecanismos de integración y sus fases son menos claros y parecen mostrar algunas variaciones entre los diferentes sistemas de transformación. En general, se admite la existencia de por lo menos 3 fases diferentes: a) Sinopsis del donador en cadena simple con el DNA receptor en cadena doble, originando una estructura de cadena triple; b) recombinación por rotura y reunión; c) reparación de la molécula recombinada.

Para la interpretación molecular de la recombinación del DNA donador con el receptor durante el proceso de transformación se han elaborado dos modelos en los últimos años.

El primero de ellos (LACKS, 1966) admite que las variaciones en la eficiencia de integración, características de los diferentes loci, son debidas a diferentes tipos de incompatibilidad molecular entre los nucleótidos del DNA donador y los del receptor. Incompatibilidades acentuadas impedirían el apareamiento del donador con el receptor y su posterior recombinación, determinando así, los casos conocidos de baja eficiencia de integración. En los otros casos la estructura en cadena triple alcanzaría un equilibrio termodinámico, cuando el segmento donador establece dos uniones con una de las cadenas del receptor. Entonces una exonucleasa comenzaría por atacar la región terminal 3'-OH del segmento donador hasta la primera unión; ahí, la exonucleasa catalizaría una unión nucleotídica entre el segmento donador y el receptor, por un mecanismo semejante al ya demostrado en otros casos (RICHARDSON, LEHMAN y KORNBERG, 1964; MITRA y

KORNBERG, 1966) y pasaría entonces a atacar la región subsiguiente del receptor; al llegar a la segunda unión, catalizaría otro enlace nucleotídico entre el donador y el receptor y pasaría a degradar la sección restante del DNA donador (Fig. 2).

Se formaría así una molécula recombinada por un proceso enzimático que, al mismo tiempo que degradaría las secciones del DNA donador no integradas, establecería las uniones covalentes entre los segmentos integrados del donador y del receptor.

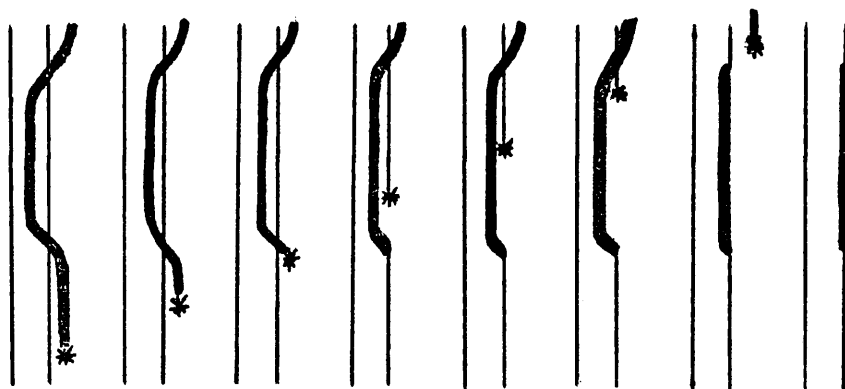


Fig. 2.- Representación esquemática del modelo de Lacks. En trazo fino el DNA receptor, en trazo grueso el DNA donador. El asterisco indica el lugar de actuación de la exonucleasa.

El modelo de LACKS postula por tanto, que es el mayor o menor grado de apareamiento en la fase de sinapsis el que determina la eficacia de integración de cada marcador genético.

El segundo modelo (EPHRUSSI-TAYLOR, 1966; EPHRUSSI-TAYLOR y GRAY, 1966) presupone, por el contrario, que los marcadores genéticos tanto de elevada como de baja eficacia de integración, forman inicialmente, con idéntica frecuencia, moléculas apareadas y recom-

binadas, pero un proceso subsiguiente de revisión elimina con preferencia las moléculas recombinadas pertenecientes a marcadores genéticos de baja eficacia de integración. Este modelo es el llamado "eliminación selectiva" ("destruction choice").

### 8. Expresión

Se ha demostrado en varios casos, que cerca de 30 a 45 min. después de la adición de DNA a cultivos competentes de B. subtilis, se encuentra ya consumado el proceso de integración del DNA donador (NESTER y STOCKER, 1963; BODMER y GANESAN, 1964; VENEMA y cols. 1965 a). Sin embargo, esas células recién transformadas manifiestan un periodo de latencia de 3 a 4 horas antes de expresar los genes recién integrados. Esto es, durante este periodo de tiempo, las células transformadas en  $\text{trp}^+$  por ejemplo, no sintetizan la sintetasa del triptófano (NESTER y STOCKER, 1963) o bien las células que han sido transformadas para el caracter de motilidad no manifiestan tampoco este caracter (STOCKER, 1963). Esta fase del proceso de transformación se denomina periodo de expresión latente ("expression lag").

En la transformación de otras especies, esta latencia de expresión parece no existir (LACKS y HOTCHKISS, 1960). A pesar de que en B. subtilis, los genes recién integrados atraviesan un largo periodo de expresión latente, algunos de los genes nativos de la célula receptora mantienen actividad metabólica. En realidad, células recién transformadas sintetizan abundantemente proteínas y m-RNA de

corta duración, mientras que la síntesis de RNA estable y la de DNA se encuentran reducidas (McCARTHY y NESTER, 1967).

Es sabido que, si las células recién transformadas para resistencia a antibióticos o a otras drogas son puestas en contacto inmediatamente con la respectiva droga, sólo pocos o ningún transformante se expresan. Si, por el contrario, el mismo cultivo fuese primero incubado durante pocas horas en un medio completo, exento de la droga de referencia, (medio de fijación) y entonces transferido al medio seleccionador de transformantes (medio, por lo tanto, con la droga), el número de transformantes expresados aumenta notablemente (IYER, 1962).

En menor grado el mismo fenómeno se ha observado para algunos marcadores auxotróficos (JENSEN y HASS, 1962). En el caso del marcador thy de B. subtilis se puede llegar a perder hasta 1/3 de los transformantes cuando no se da al cultivo recién transformado un periodo de fijación en medio completo (WILSON, FARMER y ROTHMAN, 1966). Por otra lado, experiencias con marcadores radiactivos mostraron que células con el 30% del DNA donador plenamente integrado, pero a las cuales no se le ha dejado atravesar el periodo de fijación, no dan origen a transformantes (BODMER, 1966). En experiencias idénticas pero en las que el DNA donador fue previamente tratado con DN-asa pancreática a bajas dosis (lo cual causa roturas del DNA en una sola de sus cadenas) el 70% del DNA donador plenamente integrado no dió origen a transformantes (BODMER, 1966). Estos hechos muestran que incluso cuando un marcador del donador está integrado en el DNA re-

ceptor por medio de enlaces covalentes, no significa que vaya necesariamente a ser expresado como transformante.

Por medio de incubación de cultivos recién transformados de B. subtilis en medios líquidos diferentemente suplementados, se demostró que la supervivencia de las células recién transformadas exige la presencia de aminoácidos no esenciales, concluyéndose que hay un síntesis polipeptídica necesaria para la expresión (KAMMEN y cols. 1966 a). Se demostró también que la presencia de dosis elevadas de actinomicina D y de puromicina no afectan a la supervivencia de las células recién transformadas. Estos hechos indican que la síntesis polipeptídica exigida para la expresión, no está dirigida por el RNA. Por otro lado, la adición de 5-fluorouridina en ausencia de aminoácidos no esenciales causa la muerte preferencial de los transformantes. Puesto que la 5-fluorouridina actúa como un inhibidor de la síntesis de los mucopéptidos de la pared celular, se supone que la síntesis polipeptídica, necesaria para la expresión, corresponde a la de los mucopéptidos de la envuelta celular.

Sin embargo, al añadirse 5 -fluorouridina en presencia de aminoácidos, no se encontró efecto letal, lo que indica que no es exclusivamente la reparación de la pared celular lo que está en juego.

Por otro lado, un modelo de regulación de la replicación cromosómica establecido por LARK (1966) también asegura la necesidad de una síntesis polipeptídica, no dirigida por el RNA, para la conversión del "pre-replicador" en "replicador", las cuales son estruc-

turas de unión del origen del cromosoma con las estructuras celulares periféricas. Tal conversión es indispensable para la iniciación de la replicación cromosómica.

Por lo tanto es bien probable que el periodo de fijación, necesario para la expresión de transformantes, represente una forma de estabilización a través de la unión del DNA integrado a la periferia de la célula, siendo esta una condición necesaria para la replicación y expresión.

### III. TRANSFECCION

El descubrimiento de la competencia en B. subtilis estirpe 168 desembocó en un renovado interés por los bacteriofagos de B. subtilis, habiéndose aislado y caracterizado un gran número de fagos transductores (THORNE, 1962; IIJIMA e IKEDA, 1963), utilizándose desde entonces la transformación y la transducción comparada (BARAT, ANAGNOSTOPOULOS y SCHNEIDER, 1965; EPHRATI-ELIZUR y FOX, 1961; AOKI, SAITO e IKEDA, 1963) para la clasificación de B. subtilis y especies intimamente relacionadas (AOKI, SAITO e IKEDA, 1963).

Fueron TAKAGI e IKEDA (1962) quienes por vez primera extrajeron el DNA de fagos transductores purificados y ensayaron por transformación el DNA bacteriano que contenían. Empleando métodos similares y valiéndose de DNA extraído a partir de los fagos de B. subtilis SP10 (OKUBO y cols. 1963) y PBS1 (MAHLER y cols. 1964) se ha conseguido aclarar en parte el mecanismo de la transducción en el género *Bacillus* así como facilitar grandemente la confección de mapas del genoma de este microorganismo (BARAT y cols. 1965).

La infección de células en estado de competencia por el ácido nucleico aislado de un virus da lugar a la producción de un virus completo este fenómeno ha sido definido como TRANSFECCION.

KAISER y HOGNESS (1960) fueron los primeros en demostrar la transfección infectando células de E. coli K-12 con DNA aislado de un fago defectivo  $\lambda$  y con un fago coadyuvante ("helper phage") con aquel relacionado.

Un tercer tipo de transfección, es la infección con DNA fágico de poblaciones celulares que habían desarrollado la competencia para transformación, sistema que fue investigado por ROMIG en 1962. Posteriores investigaciones sobre la transfección de B. subtilis indicaron que el virus del polio o el virus vacunal pueden desarrollarse en el interior de células de B. subtilis infectadas con el DNA virico correspondiente (SPIZIZEN, 1966).

La transfección puede ser considerada como un modelo simplificado de la transformación bacteriana. Una molécula de DNA virico entraria en la célula por un mecanismo similar al que introduce el DNA bacteriano en transformación e inicia la formación de un centro infeccioso, sin embargo la recombinación entre DNA donador y receptor y otras etapas que tienen lugar en las bacterias transformadas no son necesarias en transfección. De todos modos cada uno de los sistemas de transfección examinados mas arriba tiene rasgos característicos y el reconocimiento de los mismos es fundamental a la hora de valorar tales sistemas.

#### IV. EL CULTIVO CONTINUO EN EL ANALISIS DE FUNCIONES CE- LULARES.

El método del cultivo continuo se emplea cada vez mas en la industria microbiológica debido a que posee diversas ventajas con respecto a los procedimientos convencionales de cultivos ordinarios (MALEK, 1960). También se utilizan con gran éxito los cultivos continuos de microorganismos en investigaciones genéticas (MOSER, 1958).

Una condición indispensable de la vida es la interacción del organismo con su entorno, el intercambio continuo de materia entre ellos. Cada ser viviente, incluyendo la célula bacteriana, responde a las influencias exteriores remodelando correspondientemente sus estructuras y funciones con el fin de preservar su viabilidad, bajo condiciones modificadas, hasta los límites de su capacidad biológica.

En cultivos ordinarios la adaptación de las células a las condiciones ambientales tiene lugar solamente durante la fase de la-

tencia. Durante las fases subsiguientes, el medio cambia tan rápidamente que las células no tienen tiempo de adaptarse a él, la variación de su estado morfo-fisiológico va retrasada con respecto a la composición del medio.

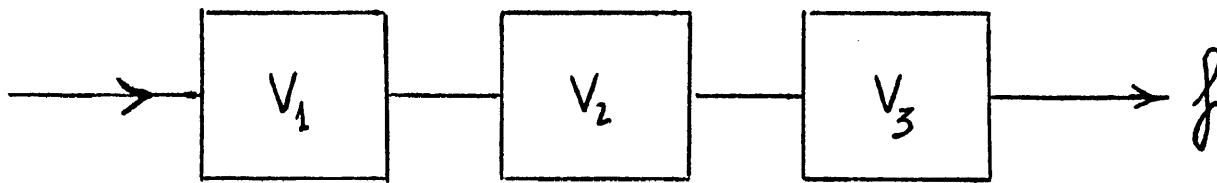
Así mismo, tales estados de desequilibrio pueden también presentarse en un medio fluyente si las células son retenidas en el matraz de cultivo mediante un filtro o cualquier otro procedimiento hasta que su número aumente por encima de un cierto nivel. En este caso el desarrollo de los microorganismos tiene el mismo carácter periódico que en los cultivos ordinarios.

Lo mismo ocurre para una cadena de fermentadores conectados en serie o para columnas verticales separadas en secciones. El medio fresco llega continuamente a uno de los extremos del aparato, mientras por el otro extremo libera el cultivo que ha completado su desarrollo. Tales métodos son continuos desde un punto de vista tecnológico, pero no en el aspecto fisiológico.

#### 1. Clasificación de los sistema de cultivo continuo

##### a) Sistemas de flujo simple (single stream)

Consisten en unas cadenas de fermentadores (de volúmenes iguales o desiguales) unidos en serie. Un medio de entrada único (de flujo  $f$ ) llega al primer fermentador, el cual pasa al siguiente y así sucesivamente, de tal modo que el flujo es el mismo a través de todos los fermentadores:



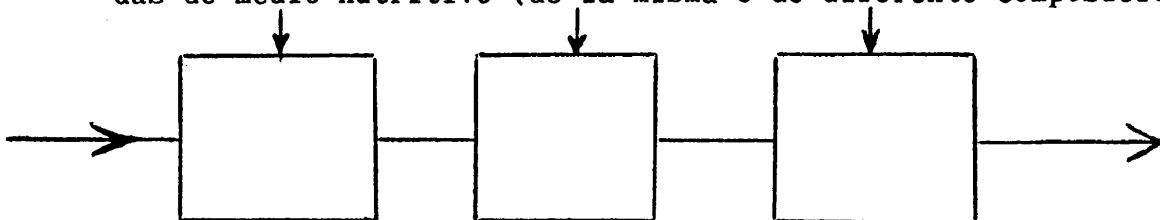
Las tasas de dilución ( $D_i$ ) en los diferentes fermentadores están siempre en una razón fija de uno a otro dependiendo de los volúmenes del fermentador

En el caso de que todos los fermentadores tuviesen el mismo volumen, sus tasas de dilución  $D_i$  serían las mismas para cada valor de  $f$ .

$$D_1 V_1 = D_2 V_2 = D_3 V_3 = \dots = f$$

b) Sistemas de flujo múltiple (Multi-stream)

Difieren de los anteriores en que tienen múltiples entradas de medio nutritivo (de la misma o de diferente composición)

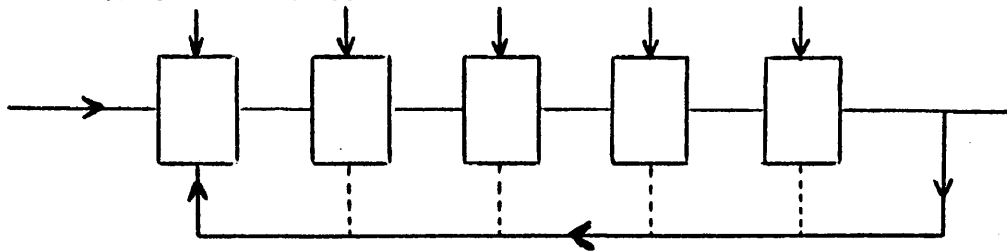


Se parecen a los sistemas single-stream en que las modificaciones introducidas en los últimos fermentadores no pueden afectar a los anteriores, y consecuentemente el primer fermentador de la cadena es idéntico en su comportamiento al de un fermentador continuo ordinario.

Difieren de los sistemas single-stream en que los diferentes medios nutritivos pueden ser variados independientemente y por lo tanto las tasas de dilución son también independientemente variables. Por ejemplo, cambiando el flujo de entrada del medio en el fermentador 2 es posible variar  $D_2$  sin cambiar  $D_1$  (aunque  $D_3$ ,  $D_4$ , etc. serán afectados necesariamente).

### c) Sistemas de flujo múltiple con Feedback

Son sistemas multi-stage modificados por el hecho de que material procedente del último fermentador, puede ser introducido en un fermentador anterior de la cadena



Este tipo de sistemas puede subdividirse en un gran número de variedades.

El material reciclado puede ser "cultivo puro" sin células: (FEEDBACK SIN CONCENTRACION) o bien mediante el empleo de centrifuga de flujo continuo o tanques de sedimentación etc., el líquido reciclado puede estar enriquecido de células: (FEEDBACK CON CONCENTRACION CELULAR)

## 2. Teoría de los sistemas de flujo simple

Dado que en la parte experimental de la presente memoria se ha empleado un sistema de este tipo vamos a dedicar especial

atención a la teoría que rige los mismos. Por otra parte, estos sistemas son los mas ampliamente usados hasta la fecha, aunque probablemente no son siempre los mas eficaces. En su forma mas simple se trata de un fermentador que posee un volumen constante  $V_1$ . El medio de cultivo que contiene el factor limitante de crecimiento  $S$  a una concentración  $S_0$  entra al fermentador con un flujo  $f$  y la tasa de dilución es:

$$D_1 = \frac{f}{V_1} \quad (1)$$

Las concentraciones de células y de sustrato en el fermentador son respectivamente:  $X_1$  y  $S_1$

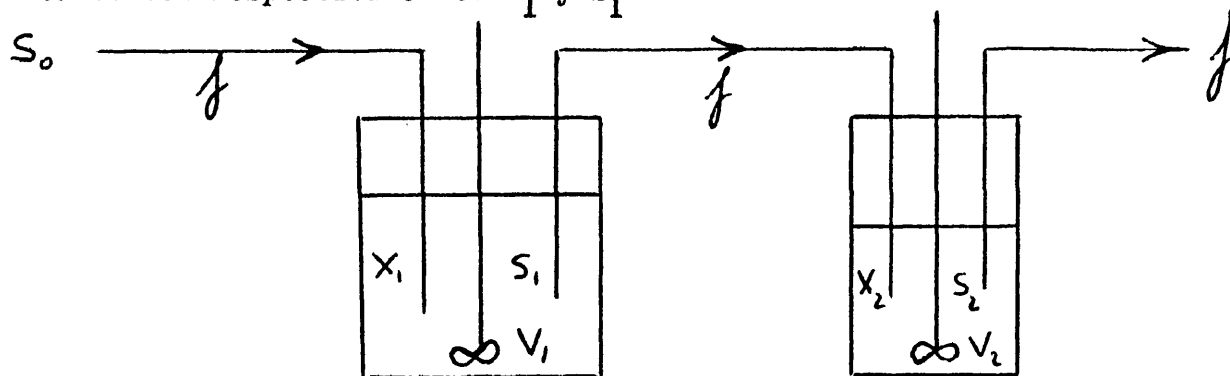


Fig. 3

El crecimiento bacteriano sigue la ecuación exponencial:

$$\frac{dx}{dt} = \mu x$$

Donde  $X$  es la concentración celular (peso seco/unidad de volumen) en el tiempo  $t$  y  $\mu$  es la tasa de multiplicación neperiana. Ahora bien, la tasa de multiplicación  $\mu$ , no es un valor constante sino que depende o está relacionada con la concentración de factor limitante  $S$  como se puede ver en las gráficas siguientes (MONOD, 1942):

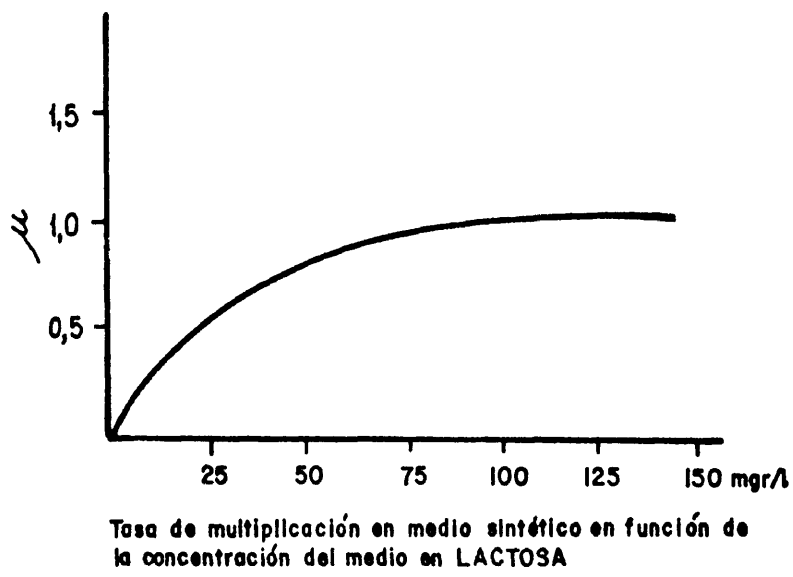
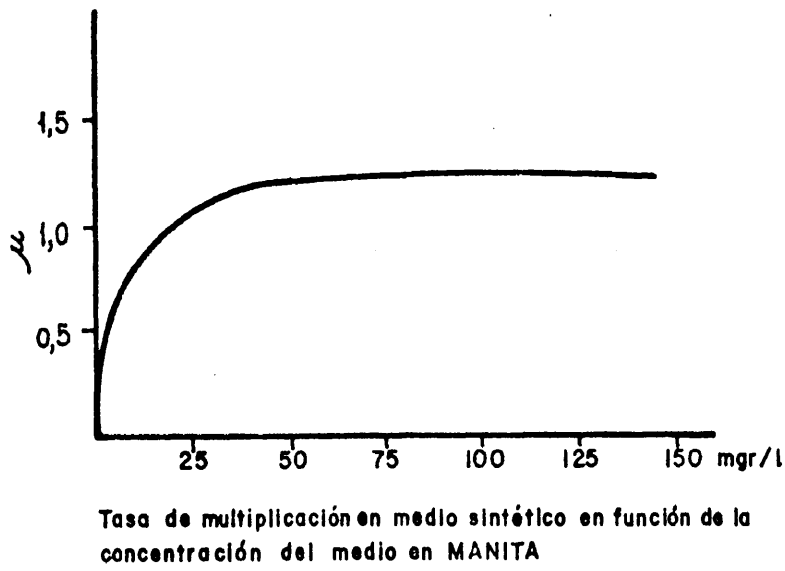
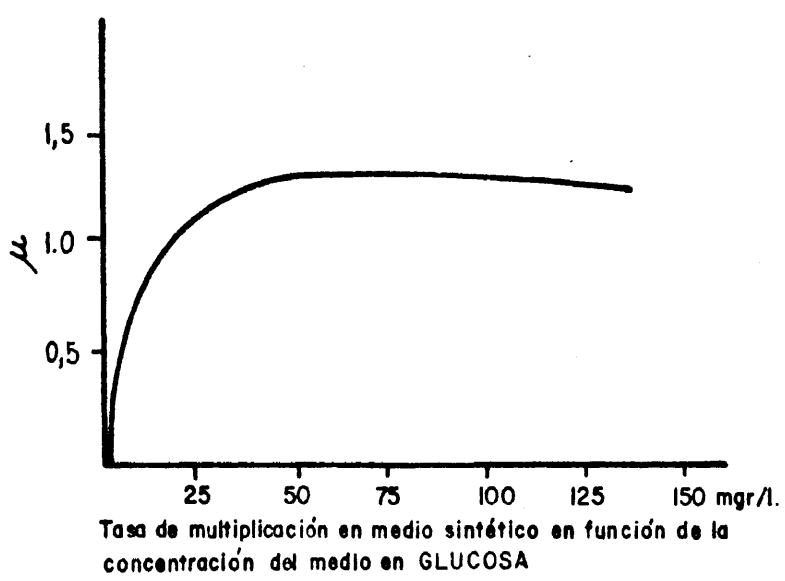


FIG. 4

Es evidente, sobre todo en el caso de la glucosa y de la manita, que la tasa de multiplicación es casi independiente de la concentración del sustrato hasta valores extremadamente bajos de los mismos. Con la lactosa, sin embargo, los resultados son netamente diferentes, ya que la tasa de multiplicación límite se alcanza más lentamente que en los casos precedentes.

Estos resultados demuestran que la relación estudiada, lejos de ser lineal, está por el contrario representada por una curva que tiende rápidamente hacia una asíntota horizontal. En primera aproximación, los límites entre los cuales se podría establecer una relación lineal son extraordinariamente estrechos y están comprendidos en una zona de concentraciones muy inferior a aquellas que se utilizan en la práctica.

Para establecer la relación entre el crecimiento y la concentración del sustrato en estas condiciones, se adopta una fórmula hiperbólica análoga a la que expresa la saturación de la hemoglobina en función de la tensión de oxígeno (Michaelis Menten):

$$\mu = \mu_0 \frac{S}{K_s + S} \quad (3)$$

Siendo  $\mu$  la tasa de multiplicación,  $S$  la concentración del sustrato limitante,  $\mu_0$  y  $K_s$  dos constantes. El significado fisiológico de estas dos constantes es claro. Se ve que el cociente:  $\frac{S}{K_s + S}$  tiende a 1 cuando  $S$  es grande con relación a  $K_s$ , en ese caso  $\mu = \mu_0$ ;  $\mu_0$  representa la tasa de crecimiento máxima. El mismo cociente es igual

a  $\frac{1}{2}$  cuando  $K_s = S$ ,  $K_s$  es pues la concentración del substrato para la cual la tasa de crecimiento es igual a la mitad de la máxima.

Los valores de la constante  $\mu_0$  se definen con precisión experimentalmente. Para  $K_s$  la experiencia nos proporciona solo un orden de magnitud.

Supongamos ahora, que existe un 2º fermentador unido al 1º (Fig. 3 ) que se comporta como un recipiente estanco en el cual las bacterias cesan de multiplicarse inmediatamente, bien por congelación o bien por contener una sustancia antiséptica o bacteriostática. Entonces el número total de células en los dos quimostatos será:

$$X_T = X_1 + X_2$$

y derivando respecto al tiempo:

$$\frac{dX_1}{dt} = \frac{dX_T}{dt} - \frac{dX_2}{dt} \quad (4)$$

El número de células totales varía con relación al tiempo en función exclusivamente de la tasa de multiplicación de las células en el recipiente 1 por lo que:

$$\frac{dX_T}{dt} = \mu X_1 \quad (5)$$

Por otra parte en el recipiente 2, el número de células aumenta con el tiempo pues en cada momento penetra en el recipiente

un flujo  $f$  procedente del recipiente 1 que no solamente lleva sustancias nutritivas sino también células. Ahora bien la cantidad de células contenidas en el flujo  $F$  será:  $\frac{x_1 f}{V_1}$  y según (1), la concentración celular en el fermentador 2 aumentará con el tiempo en  $DX_1$ :

$$\frac{dx_2}{dt} = D x_1 \quad (6)$$

y sustituyendo en (4)

$$\begin{aligned} \frac{dx_1}{dt} &= \mu x_1 - D x_1; & \frac{dx_1}{dt} &= (\mu - D) x_1 \\ & & \frac{dx_1}{x_1} &= (\mu - D) dt \end{aligned} \quad (6 \text{ bis})$$

Integrando desde  $X = X_0$  hasta  $X = X_1$  y desde  $t = t_0$  hasta  $t = t_1$

$$\int_{x_0}^{x_1} \frac{dx_1}{x_1} = \int_{t_0}^{t_1} (\mu - D) dt \quad \ln \frac{x_1}{x_0} = (\mu - D)(t_1 - t_0)$$

luego la tasa de multiplicación:

$$\mu = D + \frac{\ln x_1 - \ln x_0}{t_1 - t_0} \quad (7)$$

Ahora bien, teniendo presente la curva de crecimiento exponencial en un cultivo ordinario:

$$X = X_0 2^n$$

que expresa el número de células al cabo de  $n$  generaciones siendo  $X_0$  el número de células en el tiempo cero. Es evidente que  $n = \mu' t$  y así la ecuación anterior se convierte en:

$$X = X_0 \cdot 2^{\mu' t}$$

Tomando logaritmos neperianos:

$$\ln X = \ln X_0 + \mu' t \ln 2 \quad \mu' = \frac{\ln X - \ln X_0}{t \ln 2} \quad (8)$$

Relacionando las expresiones (7) y (8) de  $\mu$ , haciendo la salvedad de que en cultivos ordinarios la tasa de dilución  $D = 0$  observamos que ambas se diferencian en que la última viene multiplicada por  $\frac{1}{\ln 2} = \frac{1}{0.693}$ . Por lo tanto la tasa de multiplicación neperiana debe siempre dividirse por 0.693

$$\mu' = \frac{\mu}{0.693}$$

Puesto que  $\mu'$  es el número de veces que se divide la célula en la unidad de tiempo ( $t$ ), el tiempo de duplicación ( $t_d$ ) de las células será

$$t_d = \frac{1}{\mu'} \quad t_d = \frac{0.693}{\mu}$$

Un estado de equilibrio ("steady-state") de las células y el medio es posible solamente en el caso de cultivos continuos homogéneos. Aquí las células crecen en un recipiente en medio líquido cuidadosamente agitado, el cual fluye a través de fermentador a una velocidad constante.

El crecimiento de un cultivo continuo se expresa según

(6 bis):

$$\frac{dx}{dt} = (\mu - D)x$$

Cuando la tasa de crecimiento  $\mu$  es igual a la tasa de dilución  $D$ , el número de células no pasa de un nivel constante ya que

$$\frac{dx}{dt} = 0$$

La composición del medio permanece también constante y las propiedades morfo-fisiológicas de las células varían entre ciertos límites estrechos relacionados con el ciclo de división celular.

NOVICK y SZILARD (1950) y MONOD (1950) demostraron que la tasa de multiplicación de las células se adapta espontáneamente a la tasa de dilución escogida, (dentro de los límites de la capacidad biológica de los organismos). Si  $\mu > D$ , la población comienza a aumentar en número, pero esto desequilibra la composición del medio y retrasa el crecimiento celular. Contrariamente si  $\mu < D$ , la población disminuye y las condiciones del medio se enriquecen con la consiguiente aceleración del crecimiento celular, hasta que en ambos casos se establece la igualdad  $\mu = D$ .

Cuanto hemos dicho anteriormente nos permite calcular en cada momento las variables necesarias para conocer el estado fisiológico de un determinado cultivo empleando sistemas de flujo simple una vez conocida la composición del medio de cultivo.

### 3. Esporulación en cultivo continuo.

Recientemente DAWES y cols. (1970) han realizado un estudio teórico-práctico sobre la relación existente entre la esporulación y la tasa de multiplicación en B. subtilis estirpe 168. Estos autores llegan a la conclusión de que existe una relación lineal entre la tasa de iniciación a la esporulación y la tasa de multiplicación, en el sentido de que aquella aumenta al disminuir la tasa de multiplicación ( $\mu$ ).

Los resultados obtenidos permiten establecer ecuaciones matemáticas que se emplean para conocer la aparición de pre-esporas en el quimostato en función de la tasa de dilución en cultivos continuos en equilibrio.

## I. INTRODUCCION: ESQUEMA

### EXPERIMENTAL

Como se desprende de la revisión bibliografica que acabamos de realizar, ha sido muy largo y fructífero el camino recorrido en el campo de la transformación bacteriana desde que en 1944 AVERY y sus colaboradores dieñon una explicación concluyente a los experimentos llevados a cabo por GRIFFITH en 1928 con células de Pneumococcus.

Este resurgir de la transformación bacteriana se ha visto sometido a profundos cambios hasta alcanzar el grado de madurez y desarrollo que en la actualidad le coloca en la vanguardia de la problemática biológica.

Analizar detalladamente las razones que han llevado a la situación actual sería ocioso pero basta señalar que la transformación se encuentra entre los cimientos que sostienen la Biología Molecular ya que nos permite disponer del sistema biológico idóneo para estudiar de forma directa la relación célula-macromolécula y como consecuencia la influencia que las alteraciones estructurales y funcionales del DNA y de la célula receptora ejercen sobre tales sistemas.

Sin embargo la rica bibliografía de que disponemos deja al descubierto algunas facetas que están llamadas a desempeñar un papel preponderante en un próximo futuro; se trata de buscar métodos que nos permitan estudiar los factores que regulan las diversas fases del proceso transformante. En este sentido BOTT y WILSON (1968) recurrieron al empleo de medios mínimos donde estudiaron la influencia que ejercen diversos aminoácidos en el desarrollo de la competencia y FELKNER y cols. (1970) llegan a la conclusión de que determinados aminoácidos juegan un papel regulador en la transformación; sin embargo, en ambos trabajos se concluye afirmando que en sus condiciones experimentales es difícil controlar los factores que intervienen en la incorporación del DNA.

Por otra parte HORVATH (1967) ha tratado de investigar el papel que ejerce sobre la transformación el estado fisiológico de la bacteria receptora y, si bien sus resultados le llevan a afirmar la existencia de tal influencia, este autor no puede dejar de limitar sus conclusiones a causa de la cambiante composición del medio ambiente en que se multiplica el microorganismo desde el momento en que comienza el desarrollo de la competencia hasta que se pone en contacto con el DNA transformante.

Así vemos que diversas líneas de evidencia llevan a la conclusión de que en la transformación deben estar implicados procesos de regulación y en este sentido hemos centrado nuestro trabajo en:

a) La búsqueda y puesta a punto de un método que nos permitiese colocar a las células receptoras en unas condiciones homogéneas a lo largo del tiempo y donde los diversos factores que intervienen en el desarrollo de la competencia fuesen controlables.

b) La influencia de determinadas sustancias sobre el sistema transformante como una primera aproximación al estudio de los posibles procesos regulatorios a que pueda estar sometida la competencia bacteriana.

Esperamos que los resultados que a continuación presentamos sean una aportación que permita ir esclareciendo una de las facetas mas oscuras y apasionantes del proceso transformante, lo cual, a su vez, será de gran ayuda en los numerosos y aún incipientes investigaciones que se realizan sobre la regulación en células eucariontes.

## II. MATERIAL Y METODOS

### 1. Estirpes bacterianas

Las estirpes bacterianas utilizadas en nuestro trabajo están indicadas en el cuadro 2.

### 2. Bacteriofagos

Los bacteriofagos utilizados fueron el tipo salvaje del fago SPPI (RIVA, POLSINELLI y FALASCHI, 1968) que nos fue amablemente donado por el Dr. T.A. Trautner, Max Planck Institut Berlin y el bacteriofago Ø 29 (REILLY y SPIZIZEN, 1965) cedido gentilmente por el Dr. E. Viñuela, Instituto Gregorio Marañón. Madrid.

Los cultivos bacterianos fueron almacenados en frío a 4°C en tubos de agar inclinado o bien en placas de agar común.

### 3. Medios de cultivo

Los principales medios de cultivo empleados en esta memoria consisten en modificaciones de los medios de BOTT y WILSON (1968) o de ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN (1961) y se encuentran descritos en el Cuadro 3.

Todos los medios fueron preparados con agua desionizada excepto HS, LS y Penassay (Difco) que se prepararon con agua bidestilada. El pH de los medios no tamponados se ajustó a 7.2 con ClH.

Los disolventes utilizados en los diferentes experimentos poseen la siguiente composición en gr/l (Cuadro 4).



CUADRO 2.- Estirpes de B. subtilis

Designación usada	Otras designaciones	Estirpe Original	Marcadores genéticos	Origen	Referencias y notas
WT	--	168	Tipo salvaje	O.E.Landman	Transformante del 168 ind
AR1	SB-25	168	his <sub>2</sub> <sup>-</sup> trp <sub>2</sub> <sup>-</sup>	E. Nester	
AR2	WB829; 455	168	trp <sub>2</sub> <sup>-</sup> thy <sub>x</sub> <sup>-</sup>	A.T.Ganesan	Farmer y Rothman, 1965
AR3	168 ind <sup>-</sup>	168	trp <sub>2</sub> <sup>-</sup>	B.E. Reilly	
AR1T	--	SB-25	Tipo salvaje	A. Tapia R. López	Transformante de AR1
HM	B. amyloliquefaciens		trp <sub>2</sub> <sup>-</sup>	E. Viñuelas	Welker y Campbell, 1967
HMS			trp <sub>2</sub> <sup>-</sup> SM <sup>r</sup>	A. Tapia R. López	
HMES	++		trp <sub>2</sub> <sup>-</sup> SM <sup>r</sup> <sub>ery</sub>	A. Tapia R. López	
MC-1		168 M	rec <sub>1</sub> <sup>+</sup> , rec <sub>2</sub> <sup>-</sup> her <sub>1</sub> <sup>+</sup> trp <sub>2</sub> <sup>-</sup> Mc <sub>3</sub>	T.A. Trautner	Okubo y Romig (1966)
W-23			SM <sup>r</sup>	Trautner	Spizizen, 1958

hcr: reactivación de la célula huesped

MCS: Mitomicyn C sensible

SM<sup>r</sup>: Streptomycina resistente

; trp = triptofano

; his = histidina

; thy = timina

ery<sup>r</sup>= eritromicina resistente

CUADRO 3.- Composición de los medios de cultivo en gr/l

	BWC	BWI	TY	HS	LS
$PO_4 H_2 K$	6	6		6	6
$PO_4 HK_2$	14	14		14	14
$SO_4 (NH_4)_2$	2	2		2	2
$SO_4 Mg$	0.72	0.72	1.2	0.012	0.012
$SO_4 Mn$			0.151		
Cl Na			5		
$Cl_2 Mg$					2.4
$Cl_2 Ca$					0.05
Citrato Sódico	1	1		1	1
Glucosa	5	5		5	5
Triptona			10		
Extracto de levadura			5	1	1
Hidrolizado de caseína				0.2	0.1
his, trp, arg, val, lys, thr, gly, met, asp	25 gr/ ml de cada uno				
Arginina				8	
Histidina				0.4	

Cuadro 4.- Composición de los disolventes en gr/l

	SSC	TBT	Diluyente de DNA
Cl Na	8.8	5.84	
Citrato Sódico	4.4		
Tris base		12.1	
Cl <sub>2</sub> Mg		2.03	
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>			1.3
PO <sub>4</sub> K <sub>2</sub> H			1.4
PO <sub>4</sub> K H <sub>2</sub>			0.6
SO <sub>4</sub> Mg			0.012
Asparragina			1.5
Glucosa			1.8
Gelatina			5

El pH de TBT fue ajustado a 7.2 con ClH fumante.

La composición de los diferentes tipos de medios sólidos empleados a lo largo de los experimentos realizados aparece en el cuadro 5.

CUADRO 5.- Composición de los medios de cultivo sólidos en gr/l

	TBAB	LTT	MM
Cl Na	5	10	
SO <sub>4</sub> Mg			0.2
SO <sub>4</sub> Mn		0.151	
SO <sub>4</sub> (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub>			2
PO <sub>4</sub> H K <sub>2</sub>			14
PO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> K			6
Citrato Sódico			1
Bacto triptona		10	
Bacto agar	8	15	16
Agar sangre triptosa	17.5		

En los experimentos de transformación para un solo caracter se adicionó a las placas de medio minimo (MM) 25  $\mu$  g/ml de los marcadores genéticos para los cuales no se deseaba transformar, para el recuento de viables se añadieron a las placas de MM todos los nutrientes requeridos a una concentración de 25  $\mu$  gr/ml cada uno.

#### 4. Preparación de Desoxirribonucleasa + Mg<sup>++</sup>

Las soluciones de desoxirribonucleasa (DNA-sa) se preparan en agua destilada estéril a una concentración de  $1 \mu\text{gr/ml}$ , repartida en tubos y almacenada a 00 C. Antes de ser usada, a los tubos de DN-asa stock para tener una concentración final de Mg<sup>++</sup> de 0.0012 M.

#### 5. Purificación del bacteriofago SPPI

Se parte de un cultivo de bacterias de la estirpe MC-1 multiplicadas en medio TY (SPATZ y TRAUTNER, 1970) e incubadas en agitador metabólico New-Brunswick mod. R-26 a 250 r.p.m. a 370 C hasta alcanzar una densidad óptica (D.O) correspondiente a un número de viables de aproximadamente  $10^9$  células/ml, en ese momento se añade el fago SPPI al cultivo, de tal forma que, la multiplicidad de infección (m.d.i) sea de 1/50 - 1/100 es decir una partícula fágica por cada 50 ó 100 células.

Una vez añadido el fago para dar la m.d.i. anteriormente señalada se deja incubar en agitación a 370 C durante 12 horas.

El lisado que contiene el fago se centrifuga durante 20' a 10.000 r.p.m. Sorvall empleando un rotor GS-A a 00 C y el sobrenadante se vuelve a centrifugar a 27.000 g (13.000 r.p.m.) durante 3 horas a 00 C en un rotor GS-A.

Finalizada la centrifugación se decanta rápidamente el sobrenadante y el precipitado se deja resuspender lentamente durante 12 horas a 40 C en el resto de medio que ha podido quedar en el tubo.

El precipitado ya resuspendido se centrifuga durante 2 horas a 0° C en gradiente preformado de ClCs a 90.000 g (25.000 r.p.m.) en una Spinco mod. L/L2. El fago se separa claramente en una banda próxima al fondo del tubo de centrifuga.

Por último el fago así purificado se dializa contra 6 l de TBT 24 h. con objeto de eliminar el ClCs.

La pureza de la obtención se puede apreciar en la fotografía al microscopio electrónico que se muestra en la Fig. 5

El diagrama de la Fig. 6 ha sido propuesto por RIVA y cols. (1968) en donde podemos apreciar que la cabeza del fago de contorno hexagonal posee una anchura aproximada de 450 Å debido muy probablemente a una conformación icosaédrica. La cola tiene aproximadamente 1.400 Å de longitud y 65 Å de espesor.

Las placas de lisis que produce este fago tiene aproximadamente un diámetro de 3 mm y forman un ancho halo en placas de LTT.

#### 6. Purificación del fago Ø 29

Para la purificación del fago Ø 29 hemos utilizado en esencia un protocolo experimental semejante al empleado para la purificación de SPPl.

En este caso, la bacteria huésped es la estirpe HM y la m.d.i. es de 1/5 - 1/10. El lisado celular se centrifuga durante 20' a 16.300 g y a 0° C y el sobrenadante se vuelve a centrifugar

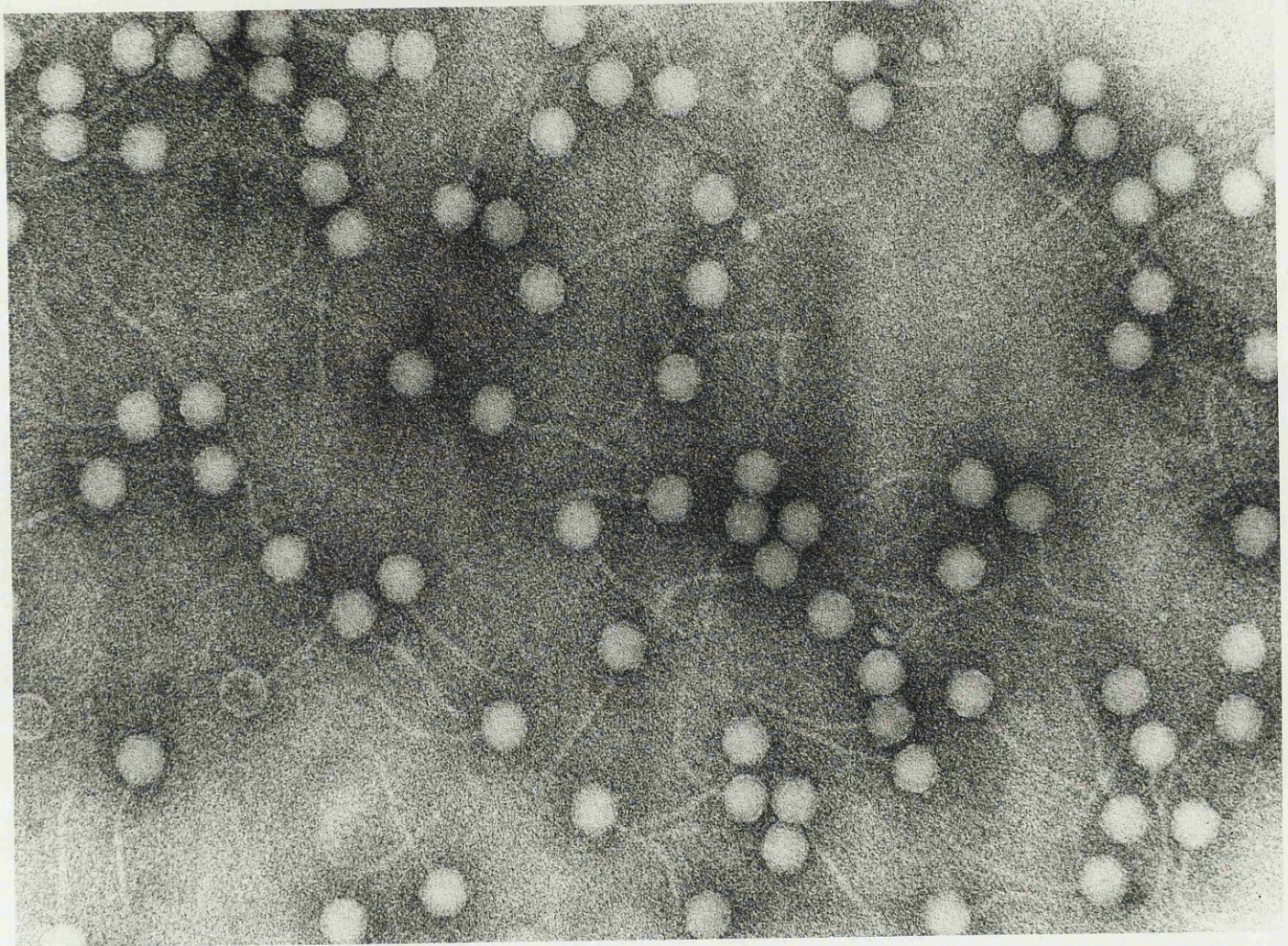


Fig. 5

Microfotografía del bacteriofago SPPI purificado

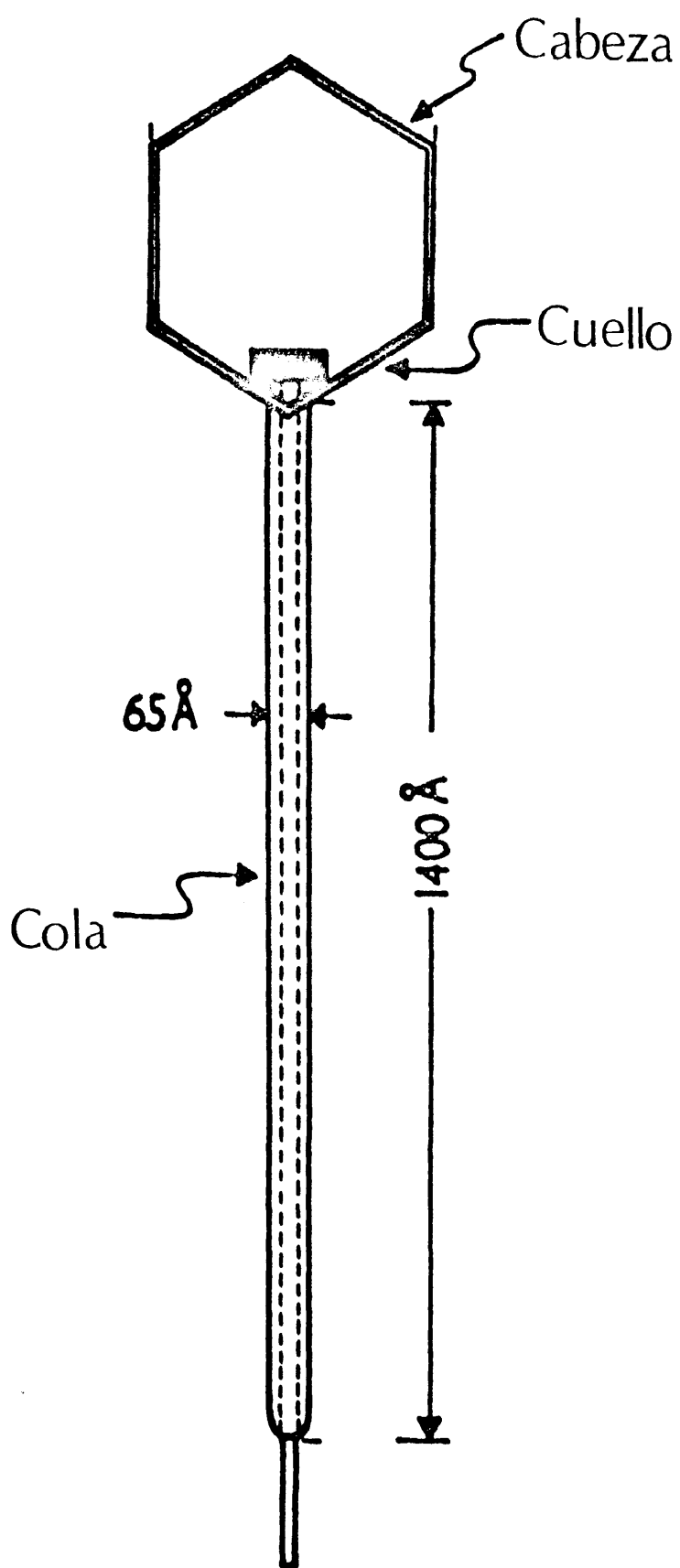


Fig. 6

Diagrama del bacteriofago SPP1 según RIVA y cols. (1968)

a 17.000 r.p.m. en una ultracentrifuga Beckman Mod. L/L2 utilizando un rotor R-19 a 0º C. El precipitado se deja resuspender lentamente y a continuación se centrifuga en gradiente de ClCs del mismo modo que con SPP1.

En la Fig. 7 mostramos la fotografía al microscopio electrónico. Las muestras del fago después de dializado fueron mezcladas con una gota de fosfotungstato potásico al 2% pH 7 y situadas sobre "Carbon coated grids" durante 5 min. Las rejillas fueron examinadas en un microscopio electrónico Philips.

El bacteriofago Ø 29, específico para algunas especies del género *Bacillus*, está formado, según describen MENDEZ y cols. (1971), por una cabeza con fibras, un cuello y una corta cola. La cabeza contiene por lo menos 3 polipeptidos de pesos moleculares 54.000, 48.000 y 28.000. El cuello consiste en 2 collares y 12 apéndices formados asimismo por 3 polipéptidos cuyos pesos moleculares de 80.000, 40.000 y 36.000 también han sido determinados por estos autores. Por último la cola contiene un polipeptido de peso molecular 71.000. Estos 7 polipeptidos estructurales de Ø 29 ocupan alrededor del 60% de la información genética que posee el DNA del fago cuyo peso molecular es de  $11 \times 10^6$  daltons.

#### 7. Métodos de extracción y purificación de DNA bacteriano

El DNA bacteriano se obtuvo de células de *B. subtilis* tipo salvaje (WT) empleándose principalmente dos procedimientos:

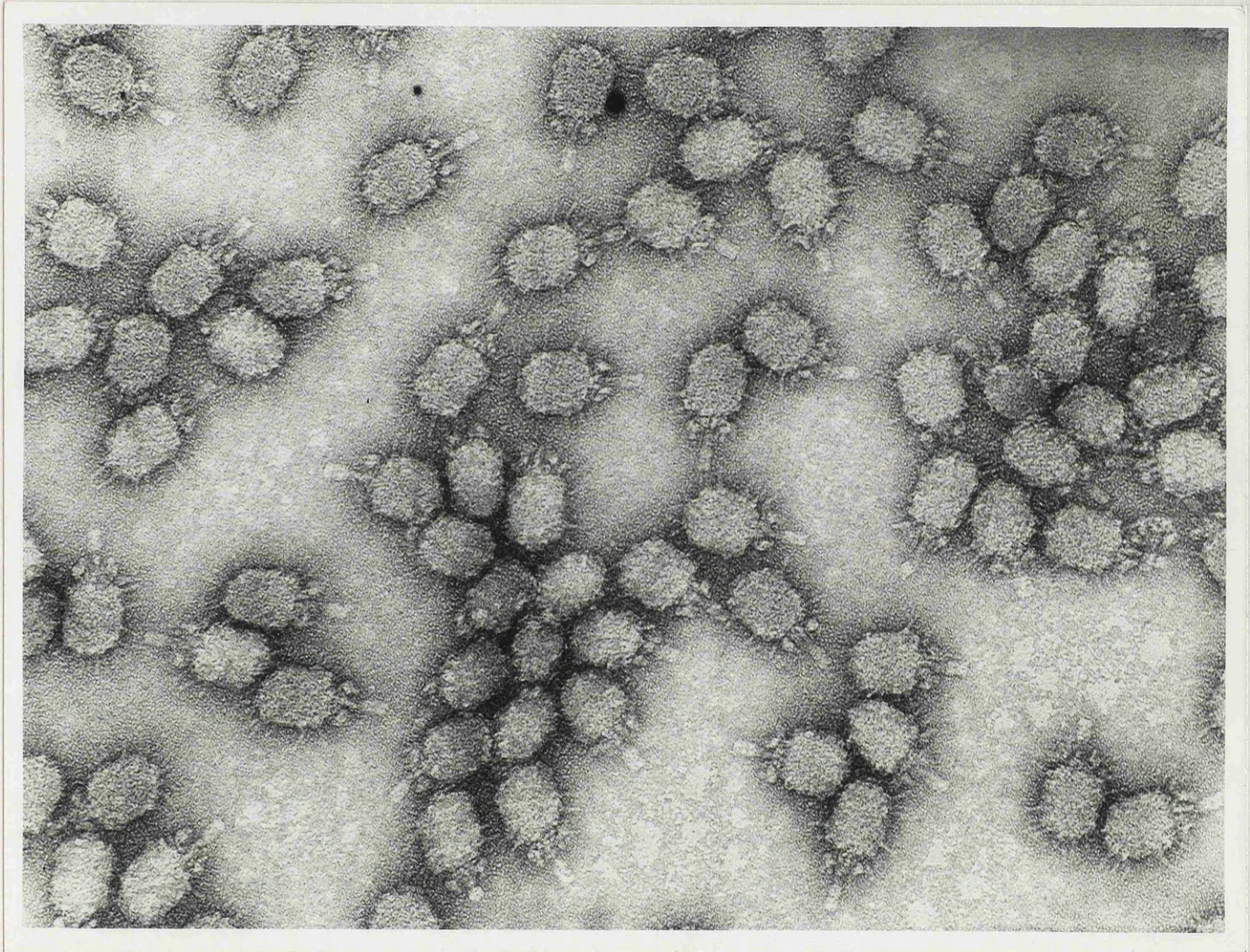


Fig. 7

Microfotografía del bacteriofago  $\phi$ -29 purificado

#### a) Método de Marmur

Este método descrito por MARMUR (1961) consiste fundamentalmente en provocar la lisis de las células que han estado multiplicándose hasta alcanzar el final de la fase logarítmica, por tratamiento con EDTA, lisozima y lauril sulfato sódico. La lisis del cultivo provoca un drástico incremento en la viscosidad acompañado de la liberación de los ácidos nucleicos.

A continuación se añade perclorato sódico a una concentración final 1M con lo que la alta concentración salina ayuda a disociar las proteínas de los ácidos nucleicos. La desproteinización se verifica utilizando cloroformo, alcohol isoamílico y los ácidos nucleicos se precipitan con alcohol etílico. El posterior tratamiento con RN-asa destruye el RNA y facilita su separación del DNA.

#### b) Método de Kirby modificado

En nuestros últimos experimentos hemos utilizado este método por la rapidez que proporciona para obtener el DNA. En esencia se basa en una serie de fenolizaciones del extracto celular obtenido por tratamiento con lisozima (VENEMA y cols. 1965)

### 8. Métodos de extracción y purificación de DNA fágico

#### a) DNA del fago SPP1

El genoma del fago SPP1 puede ser extraído como una molécula simple de DNA con un peso molecular de  $2.5 \times 10^7$  utilizando

una modificación del método de RIVA y cols. (1968) que consiste en lo siguiente: El fago purificado como se ha descrito anteriormente se lleva a un título aproximado de  $2 \times 10^{12}$  unidades formadoras de placas por ml (u.f.p./ml) diluyendo con SSC, muestras de 2.5 ml se colocan en matraces de 25 ml y se añade un volumen igual de fenol destilado y saturado con tris 0.1 M pH: 8. El DNA se extrae agitando suavemente la muestra durante 5 minutos a temperatura ambiente. Después de centrifugar a 4.000 g (10.000 r.p.m.) en un rotor SS-1 a 40 C durante 10 minutos, la fase acuosa se trata nuevamente con fenol como se acaba de describir y por último se dializa contra 2 litros de SSC estéril a 40 C durante 24 a 48 horas.

b) DNA del fago  $\phi$  29

El fago purificado se diluye en SSC hasta dar una concentración aproximada de  $2 \times 10^{12}$  u.f.p./ml, a continuación se añade "Sodium Lauril Sacosine" para dar una concentración final del 2% y se deja a temperatura ambiente durante 10 minutos en reposo. Transcurrido este tiempo se añade fenol destilado y saturado con SSC volumen a volúmen y se agita suavemente durante 10 minutos. Posteriormente se centrifuga a 3.020 g (5.000 r.p.m.) en rotor SS-34 a 00 C durante 5 minutos. Se retira con pipeta y propipeta la fase acuosa que se vuelve a fenolizar por 2 veces. Por último se dializa contra SSC tal y como se ha descrito mas arriba para la extracción del DNA de SPPI.

## 9. Valoración del DNA

### a) Método de la difenilamina

Este método se basa en el hecho de que la difenilamina reacciona con la desoxirribosa dando lugar a un compuesto coloreado característico que absorbe a  $600 \text{ m}\mu$ . El reactivo está constituido de una solución A de difenilamina en ácido acético glacial y una solución B de aldehído acético que se mezclan en el momento del uso y se añaden en un volumen doble a las diversas soluciones standard de DNA preparadas a concentraciones variables desde  $5$  a  $80 \mu\text{g/ml}$  incubándose juntas durante 18 horas a  $30^\circ \text{C}$ . Los valores de la D.O. a  $600 \text{ m}\mu$  se colocan en un gráfico contra los valores de las distintas concentraciones con objeto de obtener una recta patrón (Fig. 8).

Haciendo un tratamiento analogo con la muestra que queremos analizar, por comparación con la recta patrón podemos saber la concentración en  $\mu \text{gr/ml}$  de la muestra problema.

### b) Método de medida espectrofotométrica directa

Se basa en el hecho de los ácidos nucleicos presentan un máximo de absorción a una D.O. de  $260 \text{ m}\mu$ . Este método se emplea para determinar rutinariamente la concentración de DNA en muestras purificadas teniendo en cuenta que a un valor en absorciones de 1.0 corresponde una concentración de  $50 \mu \text{g/ml}$  de ácido nucleico. El criterio de pureza del DNA se obtiene al comparar este método con el de

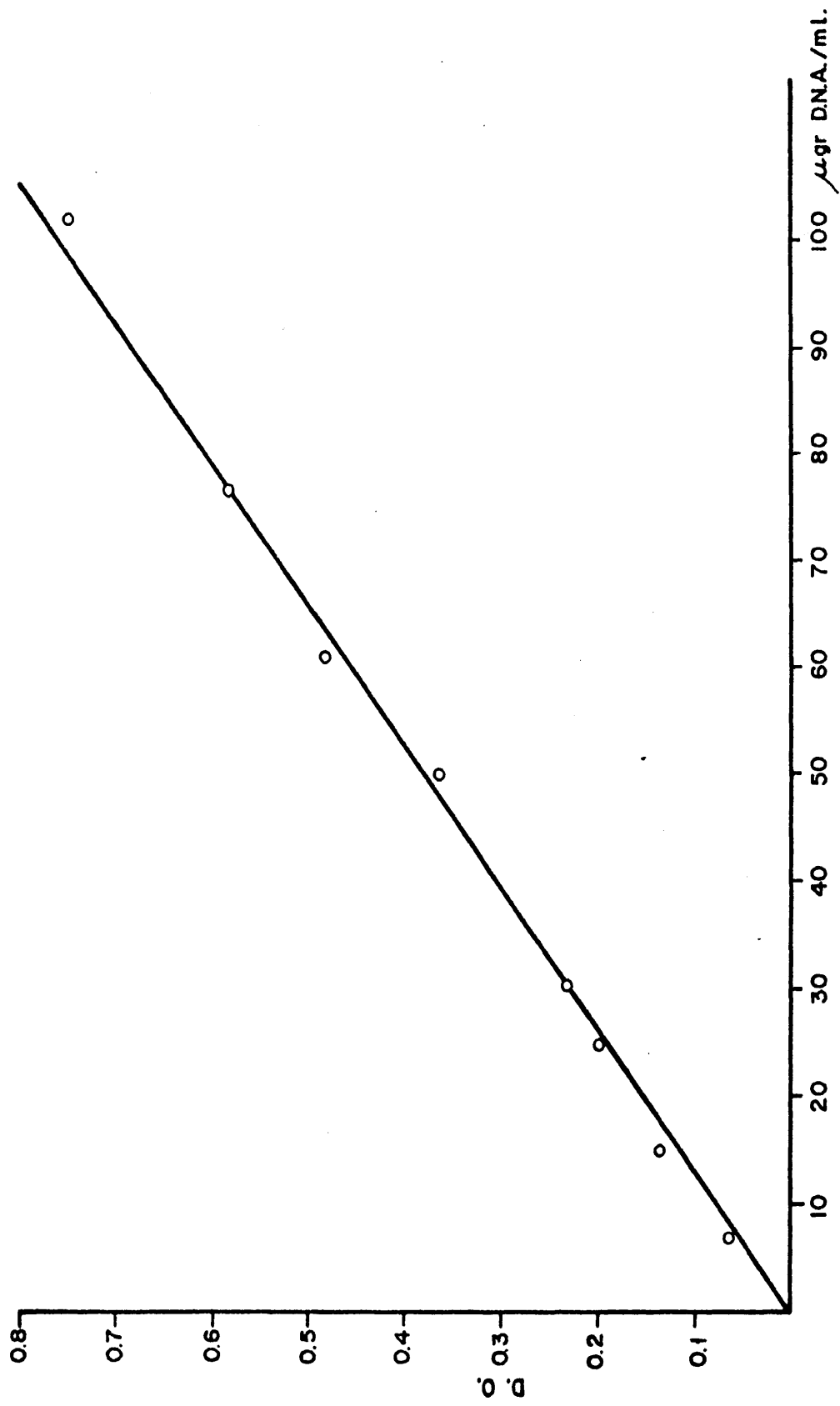


FIG. 8

Curva patrón para la valoración del DNA siguiendo el método de la difenilamina

difenilamina. En la Fig. 9 se presenta una grafica de los DNA de bacteria y fagos purificados por los métodos descritos anteriormente. Las determinaciones se realizaron en un espectrofotometro Beckman mod. DBG equipado con registrador automático mod. 1005.

#### 10. Origen comercial de los reactivos

Los reactivos utilizados en los diversos experimentos pertenecen a las siguientes casas comerciales:

MERCK Darmstadt. Alemania

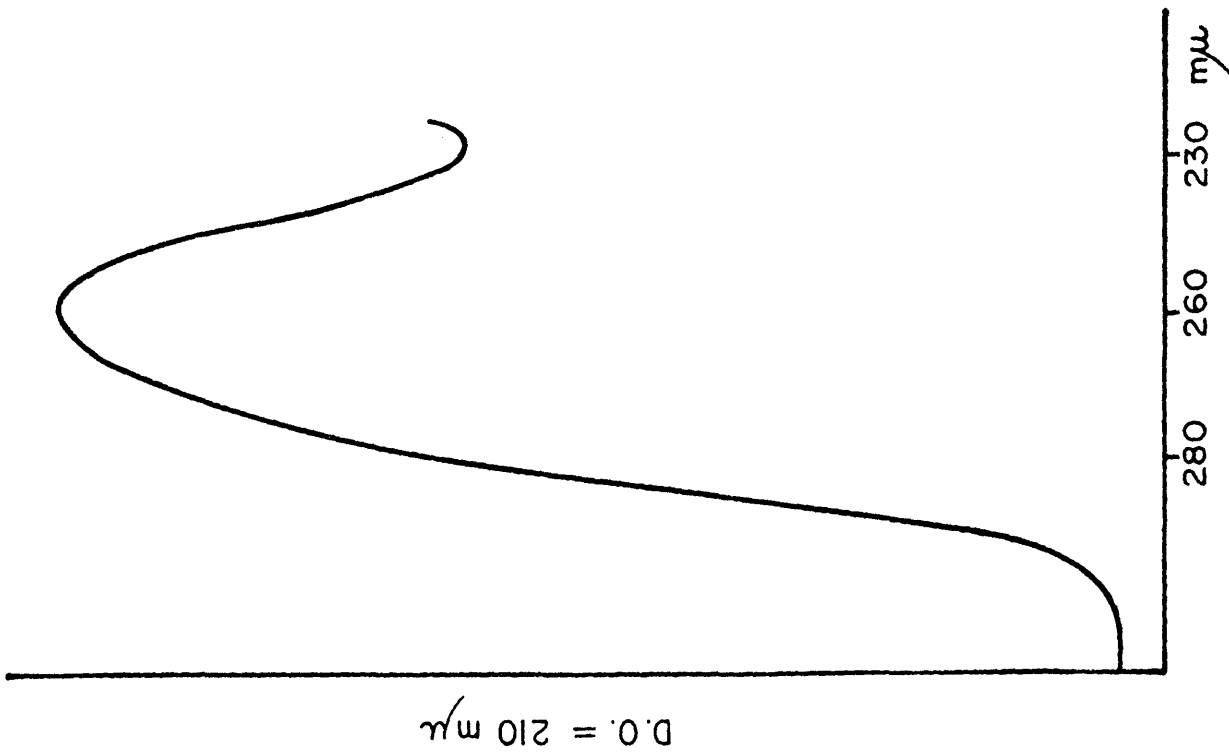
- Formalina
- Cloruro sódico
- Hidroxido potasico
- EDTA
- Perclorato sódico
- Fenol

MANN RESEARCH LABORATORIES. División of Becton Dickinson & Co.  
New York. U.S.A.

- Lauril sarcosil sódico 97%
- Lauril sulfato sódico

DIFCO LABORATORIES. Detroit 1, Michigan. USA

- Bacto Agar
- Bacto Triptona
- Triptosa agar-sangre base
- Triptona
- Extracto de levadura



D.O. = 320 mμ

280 260 230 mμ

FIG. 9

Gráfica espectrofotométrica de DNA de  $\phi$ -29 (izquierda) y de *B. subtilis* WT (derecha)

WORTHINGTON BIOCHEMICAL CORPORATION. Freehold, New Jersey. USA

- Acido desoxiribonucleico de timo de ternera
- Desoxiribonucleasa de pancreas bovino

NUTRITONAL BIOCHEMICAL CO. Cleveland. Ohio, USA

- Ribonucleasa NBC

SIGMA CHEMICAL CO. St. Louis. Missouri, USA

- Lisozima
- Timina

D'REMIO. Madrid

- Etanol de 96%

BRITISH DRUG HOUSE LTD (BDH). Poole. Inglaterra

- Fosfotrugstato sódico

Los aminoácidos empleados a lo largo de nuestro trabajo procedían de los Laboratorios Sigma o de los Laboratorios Merck.

### 11. Incubaciones

Siempre que no se diga lo contrario, las placas de cultivo fueron incubadas a 37<sup>o</sup> C y los cultivos líquidos a la misma temperatura con agitación circular en agitador New Brunswick Scientific Co., New Brunswick, New Jersey, USA modelo R.26, a una velocidad de 230-250 oscilaciones por minuto.

### 12. Determinación de la densidad de un cultivo por medio de la transmitancia optica.

Para el cálculo rápido y aproximado del número de células de un cultivo, usamos determinaciones espectrofotométricas de la

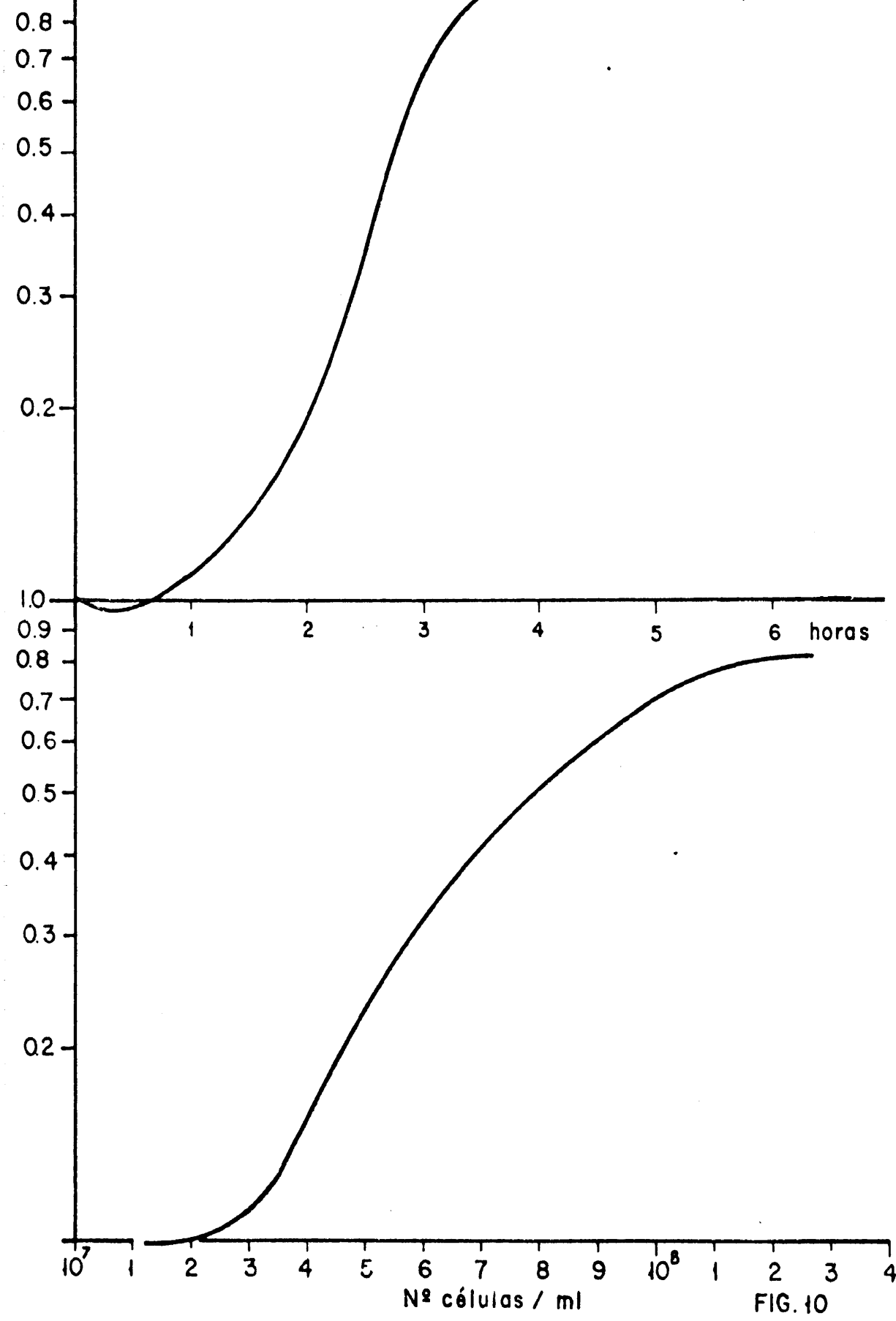
transmitancia óptica en un Spectronic 20 (Baush and Lomb, Rochester, New York, USA) a una longitud de onda de 500 m $\mu$  y usando como blanco agua destilada. Construimos para ello una curva patrón del siguiente modo: Durante la incubación de un cultivo en multiplicación activa, extrajimos varias muestras, en cada una de ellas medimos la transmitancia óptica en las condiciones descritas, y determinamos el número total de células viables del siguiente modo:

Se hacen diluciones del cultivo en medio TY. De la dilución conveniente se toman 0.05, 0.1 ó 0.2 ml que son añadidos al medio sólido distribuyéndose el inóculo uniformemente con una varilla de vidrio en forma de L. A menos que se diga lo contrario el medio usado fue LTT ó MM suplementado con 25  $\mu$ gr/ml de cada una de la exigencias de la estirpe usada.

La curva patrón resultante de estos ensayos se presenta en la Fig. 10.

### 13. Desarrollo de la competencia en cultivos ordinarios

El método utilizado ha sido el descrito por BOTT y WILSON (1968), que consiste en la siguiente: A partir de un cultivo stock de la estirpe deseada almacenado con frío (4 $\circ$  C) en tubo de agar inclinado, se inocula un matraz conteniendo 10-15 ml de medio TY o Penassay (Difco) y se incuba durante 12 h a 37 $\circ$  C. A continuación se centrifuga el cultivo y se resuspende en medio BWC, suplementado con 25  $\mu$ gr/ml de cada una de las exigencias de la estirpe, en un matraz de Modod, hasta dar una D.O.<sub>550</sub> - 0.1. Seguidamente la



Curva de crecimiento de *B. subtilis* AR1T en medio TY (arriba) y representación gráfica del número de viables/ml (abajo)

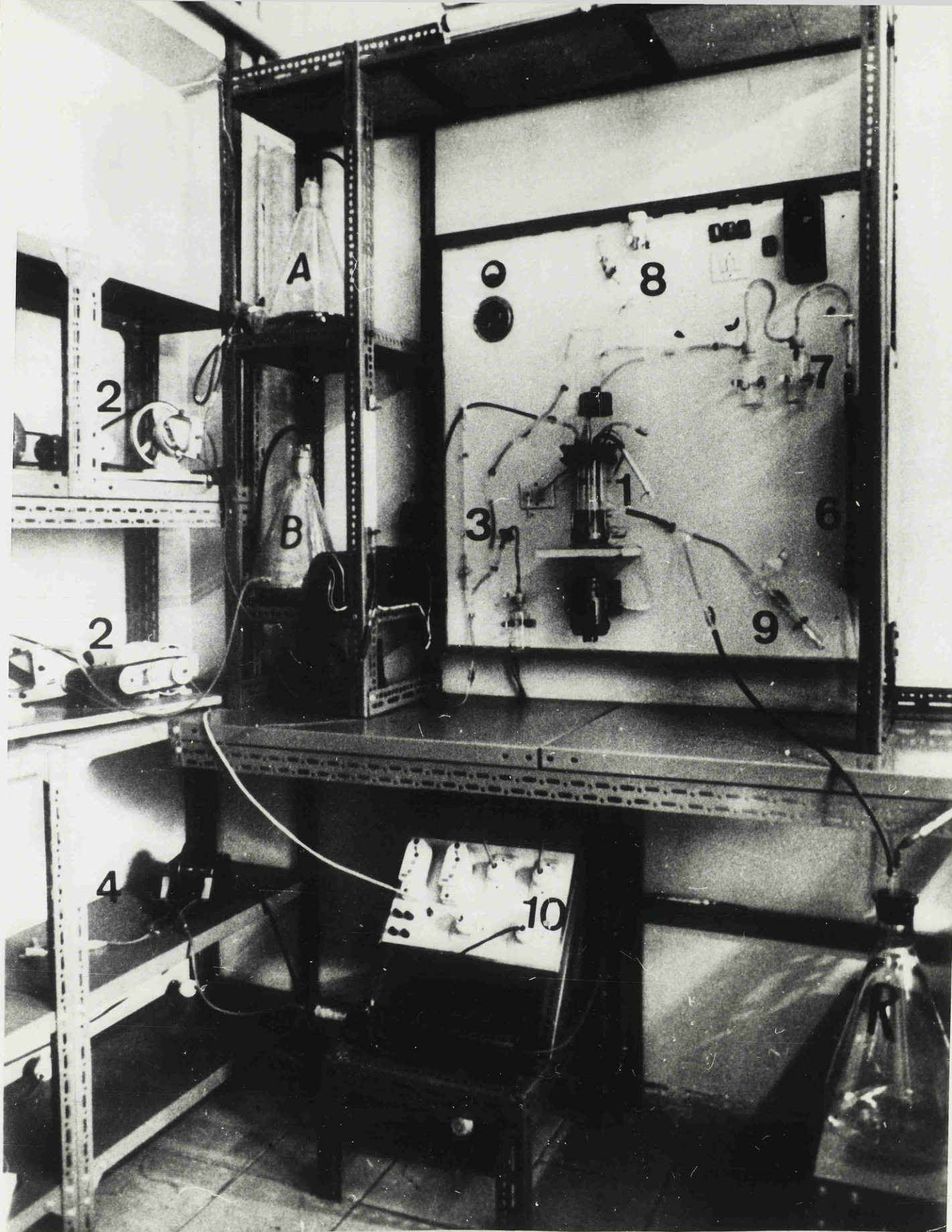
FIG. 10

la suspensión es incubada de nuevo. El máximo de competencia se alcanza a las 3 horas de haber abandonado la fase logarítmica, tiempo conocido como  $T_3$ .

Otro procedimiento usado para llevar las células al estado de competencia, fue el clásico de ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN (1961). Con la estirpe deseada se inocula una placa de Petri conteniendo LTT y se incuba durante 15-20 horas. Tomamos de la placa una cantidad de bacterias suficiente como para dar una  $D.O._{550} = 0.2$  en medio HS suplementado con  $25 \mu\text{gr/ml}$  de cada una de las exigencias de la estirpe. Se incuba a continuación durante 4 horas o más hasta alcanzar una  $D.O._{550}$  entre 0.8 y 1. El cultivo es entonces diluido  $1/20$  en medio LS y se incuba en agitación a  $37^\circ\text{C}$ . El máximo de competencia se alcanza a las 2 horas.

#### 14. Desarrollo de la competencia en cultivo continuo

Para desarrollar la competencia en cultivo en quimostato, utilizamos un equipo semejante al descrito por ROSENBERGER y ELSDEN (1960). La instalación para cultivo continuo de lo que da idea la Fig. 11 consta fundamentalmente de un quimostato (1) en el que se realiza el cultivo y que posee un sistema calentador termostatizado y un mecanismo de agitación. Al quimostato tienen acceso los diferentes medios estériles (A, B) que son impulsados por las respectivas bombas (2) a una velocidad regulable que se mide mediante el dispositivo correspondiente (3); el aire se insufla por un compresor (4) midiendo su flujo de entrada en un rotámetro (6); antes



Modelo de cultivo continuo similar al descrito por ROSEMBERGER y  
ELSDEN (1960)

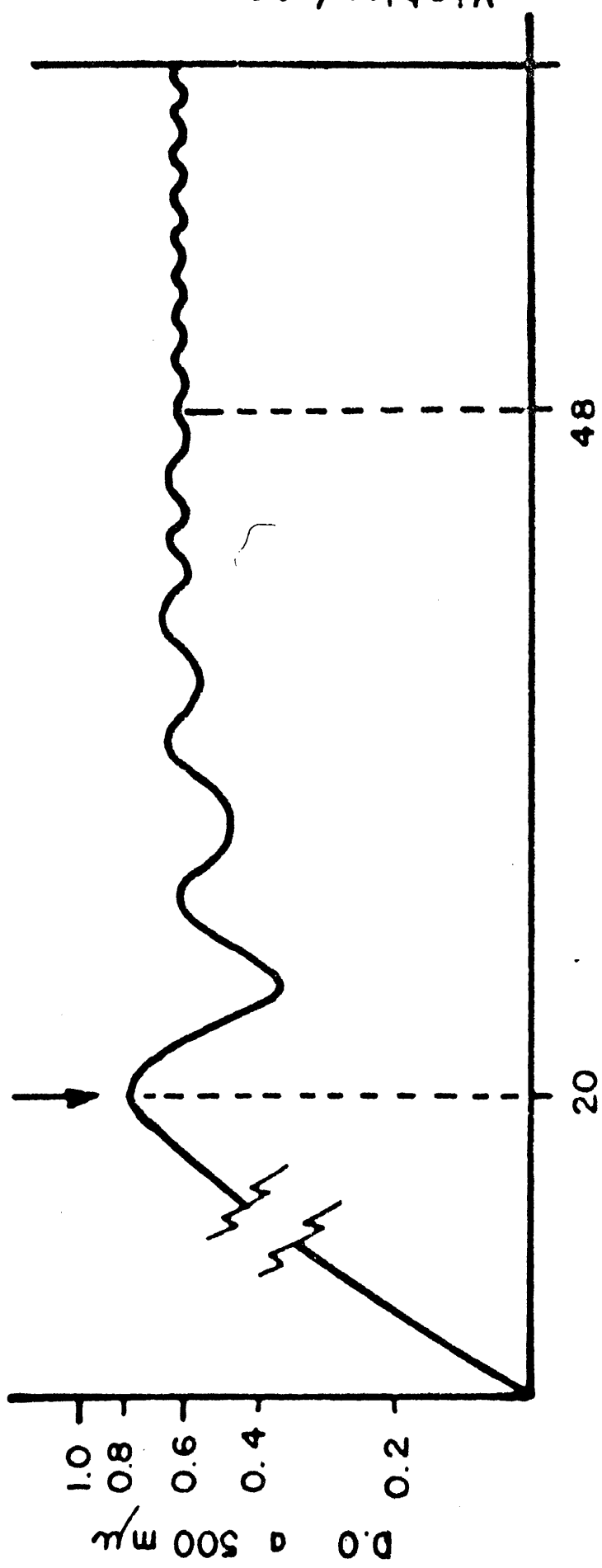
de entrar al quimostato, el aire burbujea en agua estéril (7) adquiriendo la humedad necesaria.

En la parte superior se aprecia un dispositivo (8) que corresponde a un sistema anti-espuma con silicona, por medio de un recipiente especial (9) se obtienen las muestras, y R corresponde al matraz de recogida del cultivo que sale del quimostato.

Los dispositivos para la toma de energía eléctrica de las bombas, el compresor, el calentador, termostato y agitador, se encuentran reunidos en el panel (10).

La estirpe escogida, que había estado multiplicándose en medio TY durante 12-14 horas se centrifuga y resuspenden en unos 6 ml. de medio BWC ó BWI que se toman con una jeringuilla estéril y se inyectan al interior del quimostato por una de las ramas laterales. Se deja multiplicar a las bacterias en el interior del quimostato a 37°C, manteniendo desconectado el flujo de entrada de medio, durante 12 horas. A partir de ese momento y cuando la D.O.<sub>550</sub> del cultivo es  $\approx 1$  se conecta la bomba 2 y se espera alrededor de 48 horas hasta que se alcanza el estado de equilibrio, estimación que se verifica por medidas de D.O.<sub>550</sub> y recuento de viables. Una vez alcanzado el estado de equilibrio estos parámetros permanecen constantes con el tiempo como indica la Fig. 12.

En aquellos experimentos en los que se deseaba mantener constante la concentración de una sustancia en el quimostato, el cálculo de la cantidad necesaria que se debe añadir al matraz no-



Tiempo en horas

FIG. 12

Variación de la D.O. de un cultivo en quimostato con respecto al tiempo

driza A ó B se realizó de acuerdo con las ecuaciones de HERBERT y cols. (1956)

#### 15. Procedimiento de transformación

A muestras de 0.9 ml de células que han alcanzado el estado de competencia por cualquiera de los procedimientos anteriormente descritos, se añadieron 0.1 ml de DNA en concentraciones saturantes en tubos de ensayo de 30 x 200 mm y la mezcla fue incubada a 37°C y a 250 r.p.m. Después de 30' de incubación, la reacción fue detenida añadiendo 100  $\mu$  gr de desoxirribonucleasa continuando la incubación durante 5 minutos mas.

Las diluciones del cultivo se prepararon en solución salina (pH : 7) y se sembraron en las placas apropiadas (MM ó MM suplementado) del modo descrito anteriormente.

Los experimentos de control se realizaron tratando el DNA con DN-asa durante 15 minutos antes de añadirlo a las células competentes.

A fin de determinar la frecuencia de retromutaciones espontáneas para las mismas características a obtener por transformación, inoculamos en todas las experiencias placas idénticas a las usadas para la determinación de transformantes con una muestra no diluida del cultivo competente inmediatamente antes de añadir el DNA transformante.

Las placas se incuban durante 24-48 horas, hasta que las colonias pueden ser contadas. Cada colonia corresponde a una célula sembrada en la placa, capaz de multiplicarse (esto es, "viable") en el medio de referencia. Para la determinación de cada valor usamos por lo menos 3 placas con 150-300 colonias cada una. A partir de esos valores y del de la dilución usada, determinamos el número total de células viables por ml de cultivo o de transformantes y el de mutaciones espontáneas (retromutantes) para el mismo carácter.

La frecuencia de transformación se obtuvo como un cociente entre el número de dobles transformantes ( $his_2^+ - trp_2^+ ; trp_2^+ - thy_2^+$ ) o bien de transformantes simples ( $his^+ trp_2^- ; his^- trp^+ , trp^- thy^+ trp^+ thy^-$ ) referidos al número total de células por ml triplicado por 100.

En este último tipo de experimentos de transformantes simples, las placas fueron suplementadas con  $25 \mu\text{gr/ml}$  de histidina, triptofano o timina respectivamente.

#### 16. Procedimiento de transfección

Los experimentos de transfección se llevaron a cabo del modo siguiente: Muestras de 0.8 ml de las células receptoras competentes fueron incubadas con 0.2 ml de DNA del fago SPP1 ó Ø 29 ( $10 \mu\text{gr}$ ) en un baño de agua a  $37^\circ\text{C}$  durante 30 minutos, o en agitación a  $37^\circ\text{C}$  y 250 r.p.m.

Al cabo de este tiempo se detiene la reacción con DN-asa 100  $\mu$ gr y se continua la agitación durante 5 minutos mas. Se hacen las diluciones apropiadas en medio TY y muestras de 0.15 ml de cada dilución se siembran en placas de LTT a las que se añade 0.15 ml de la cepa indicadora (MC-1, HM ó W-23) que había estado multiplicandose durante 12-14 horas en medio TY a 37 $^{\circ}$  C en agitación. La D.O.<sub>500</sub> de la cepa indicadora se ajusta aproximadamente a 1, cuando proceda, añadiendo medio TY fresco. La mezcla se distribuye sobre la superficie de la placa utilizando una varilla de vidrio en L hasta que quede bien seca, a continuación se incuba en estufa a 37 $^{\circ}$  C de 8 a 12 horas hasta que se aprecien con claridad las placas de lisis. Cada célula que haya incorporado una molécula de DNA producirá partículas fágicas que infectarán después de su liberación nuevas células del entorno, produciendo una discontinuidad o placa de lisis en la capa continua de la cepa indicadora. La razón de utilizar otras estirpes como cepas indicadoras en lugar de la misma bacteria que vamos a transfectar es que esta muestra un cierto grado de resistencia a la infección fágica por SPP1 o  $\phi$  29 lo que dificulta el recuento de las placas de lisis mientras que las cepas indicadoras son estirpes previamente seleccionadas extraordinariamente sensibles a estos bacteriofagos.

### 17. Estimación del número de esporas refractiles

La incidencia de esporas refractiles como una fracción del total de la población se determinó bajo el microscopio de contraste de fases como ha descrito DAWES y MANDELSTAN (1970). Las bacterias se tiñen con formalina al 5% de concentración final. Para una mejor observación es conveniente incubar durante 2 horas a 37° C con la formalina aunque para un recuento interesa hacerlo inmediatamente para evitar errores.

### III. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA EN CULTIVOS ORDINARIOS

Como hemos señalado anteriormente en el esquema experimental, nuestras investigaciones iban dirigidas especialmente hacia el estudio de la influencia que ciertos aminoácidos podrian ejercer en el desarrollo de la competencia. Sin embargo teniendo en cuenta que los cultivos ordinarios presentan serias dificultades para estudios de regulación al introducir nuevos parámetros en una situación ya de por si compleja (CLARK y LILLY, 1969), hemos pensado para vencer tales inconvenientes utilizar el quimostato donde las tasas de multiplicación celular pueden ser controladas por un nutriente esencial en unas condiciones perfectamente definidas.

Sin embargo, antes de abordar el problema en cultivo continuo era necesario elegir entre las diversas estirpes que poseiamos la mas idónea, como así mismo, el procedimiento para poner de manifiesto la competencia, y el medio de cultivo mas adecuado.

Para ello realizamos los diversos experimentos que a continuación se describen:

1. Curva de saturación de DNA por transformación y transfección.

a) Transformación

En la Fig. 13 se muestran los resultados de transformación obtenidos cuando se añadieron distintas concentraciones de DNA de *B. subtilis* WT que oscilaban entre  $2 \times 10^{-2}$   $\mu$  gr/ml a 20  $\mu$  gr/ml a células de ARI en estado de competencia, la transformación se hizo para un caracter simple histidina ( $his_2^-$ ) o triptofano ( $trp_2^-$ ) o bien para los dos caracteres ( $his_2^- trp_2^-$ ).

Como se aprecia en los gráficos anteriores tanto para uno como para otro caracter la concentración de DNA saturante es de 0.2  $\mu$  gr/ml.

b) Transfección

Se llevaron a cabo una serie de experiencias paralelas utilizando diferentes concentraciones de DNA del fago SPPI como donador, la estirpe ARIT como receptora y la estirpe MC-1 como indicadora siguiendo la técnica descrita en el capítulo anterior. Los resultados aparecen en la Fig. 14

La curva de la fig. 14 demuestra que se alcanza la saturación de DNA a concentraciones superiores (5  $\mu$  gr/ml) a las requeridas en transformación.

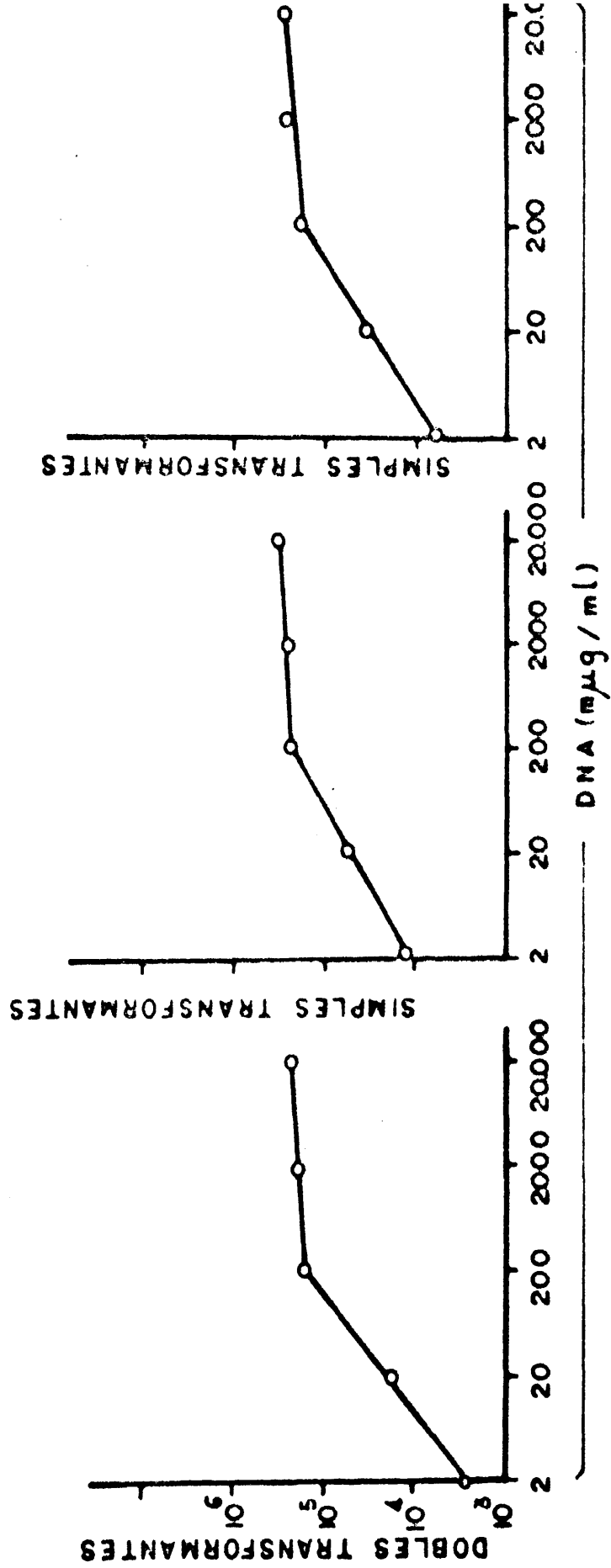


FIG. 13

Variación del número de dobles o simples transformantes con respecto a la concentración de DNA

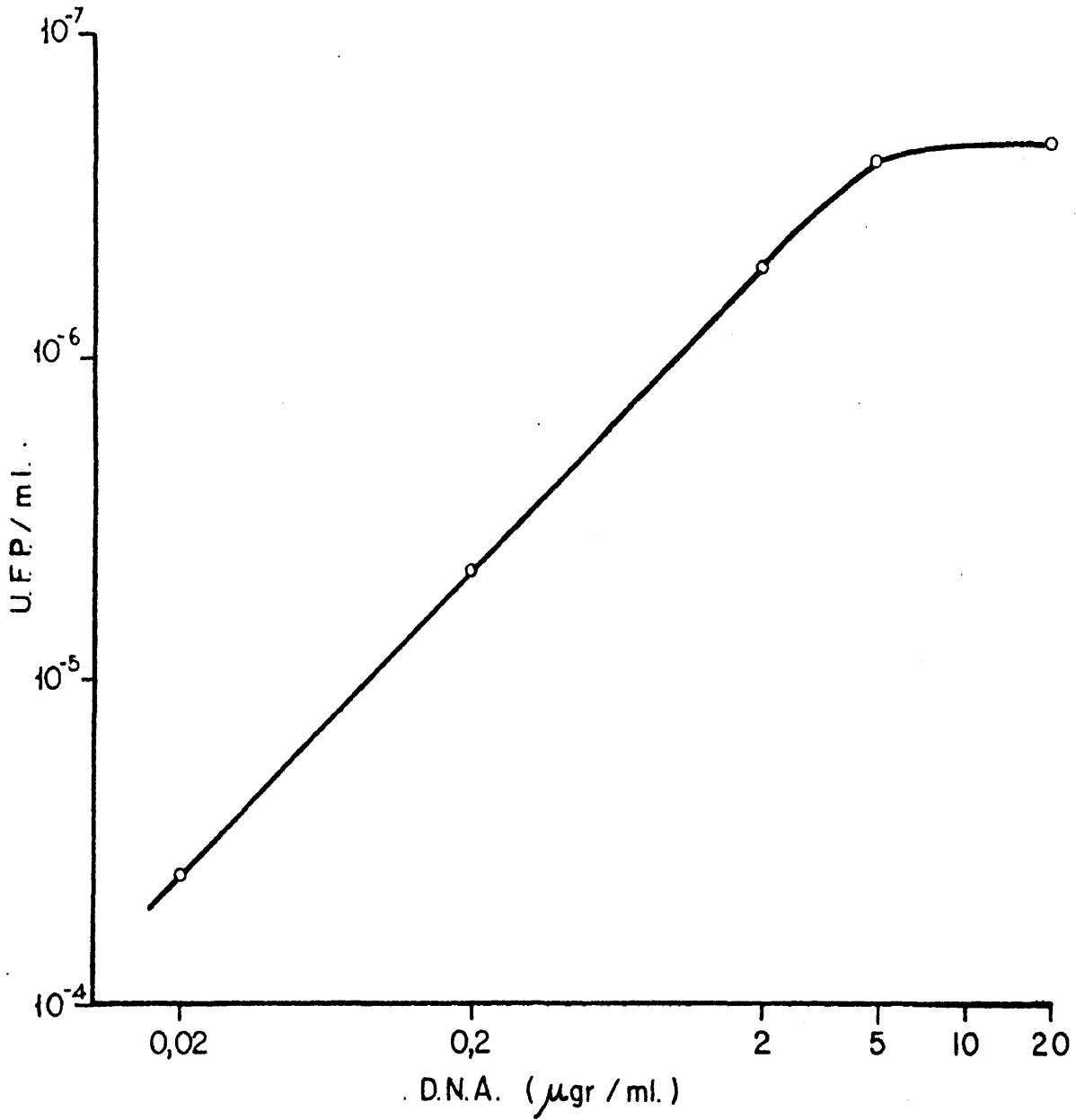


FIG. 14

Curva de saturación de DNA puesta de manifiesto por transfección

## 2. Curva de tiempo de exposición del DNA a las células competentes por transformación y transfección.

### a) Transformación

El tiempo necesario para que el DNA donador alcance el estado máximo de unión irreversible a las células competentes AR1, se calculó deteniendo el experimento de transformación añadiendo DN-asa a diferentes tiempos en alicuotas tomadas de una mezcla transformante.

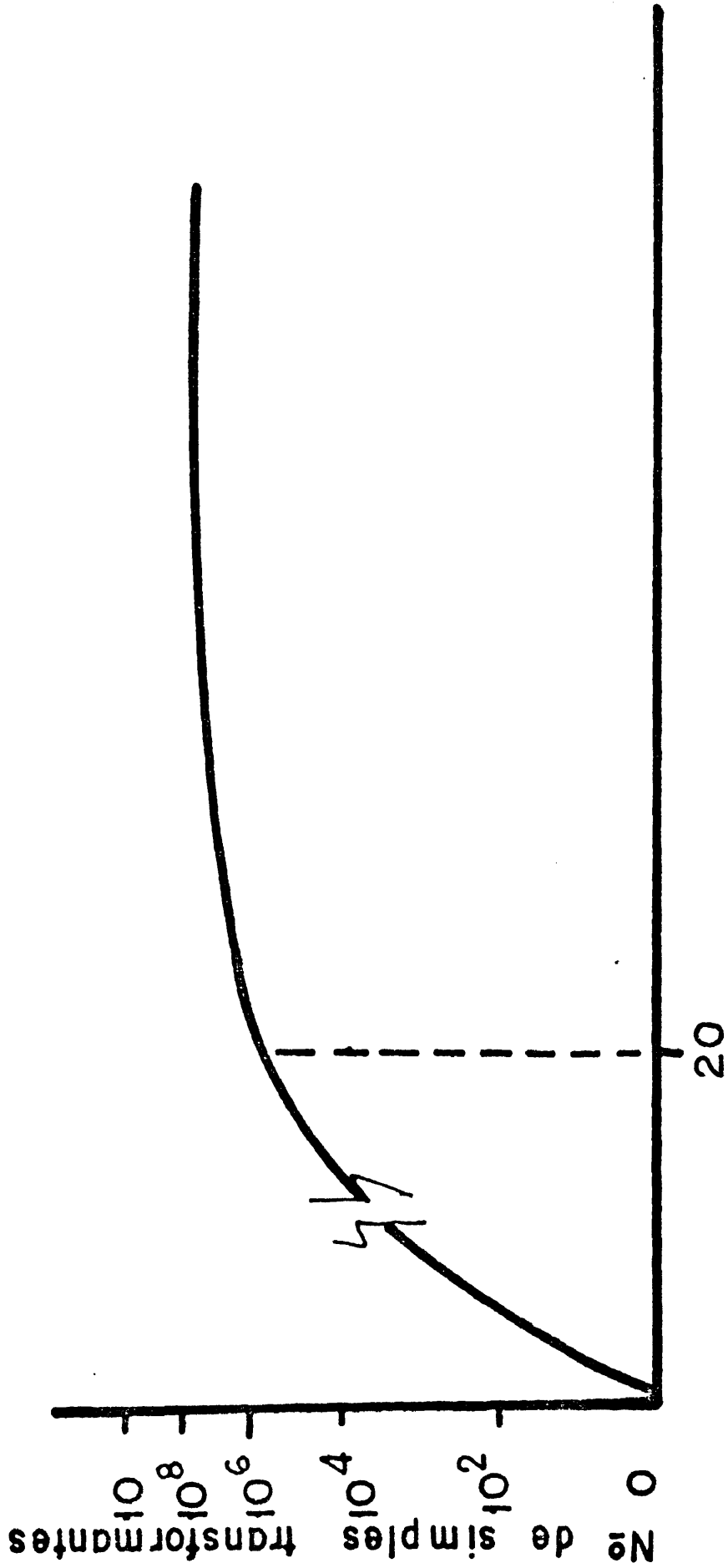
Los resultados representados en la Fig. 15 revelan que el estado de máxima unión irreversible se alcanza a los 20 minutos de incubación.

### b) Transfección

El tiempo óptimo de exposición del DNA de los fagos SPP1 o Ø 29 a células AR1T en estado de máxima competencia aparece representado en la Fig. 16.

## 3. Influencia de la agitación sobre la transfectabilidad

Dado que en la literatura aparecen discrepancias en cuanto al sistema de incubación del DNA del fago SPP1 con las células competentes, pues mientras RIVA y cols. (1968) recomienda la agitación, SPATZ y TRAUTNER (1970) lo hacen en estático, nosotros hemos realizado una experiencia incubando DNA de SPP1 con células competentes de AR1T con agitación o sin ella; los resultados aparecen en el siguiente cuadro: pag 112



Tiempo en minutos

FIG. 15

Variación del número de transformantes con respecto al tiempo de incubación de las células competentes con el DNA donador

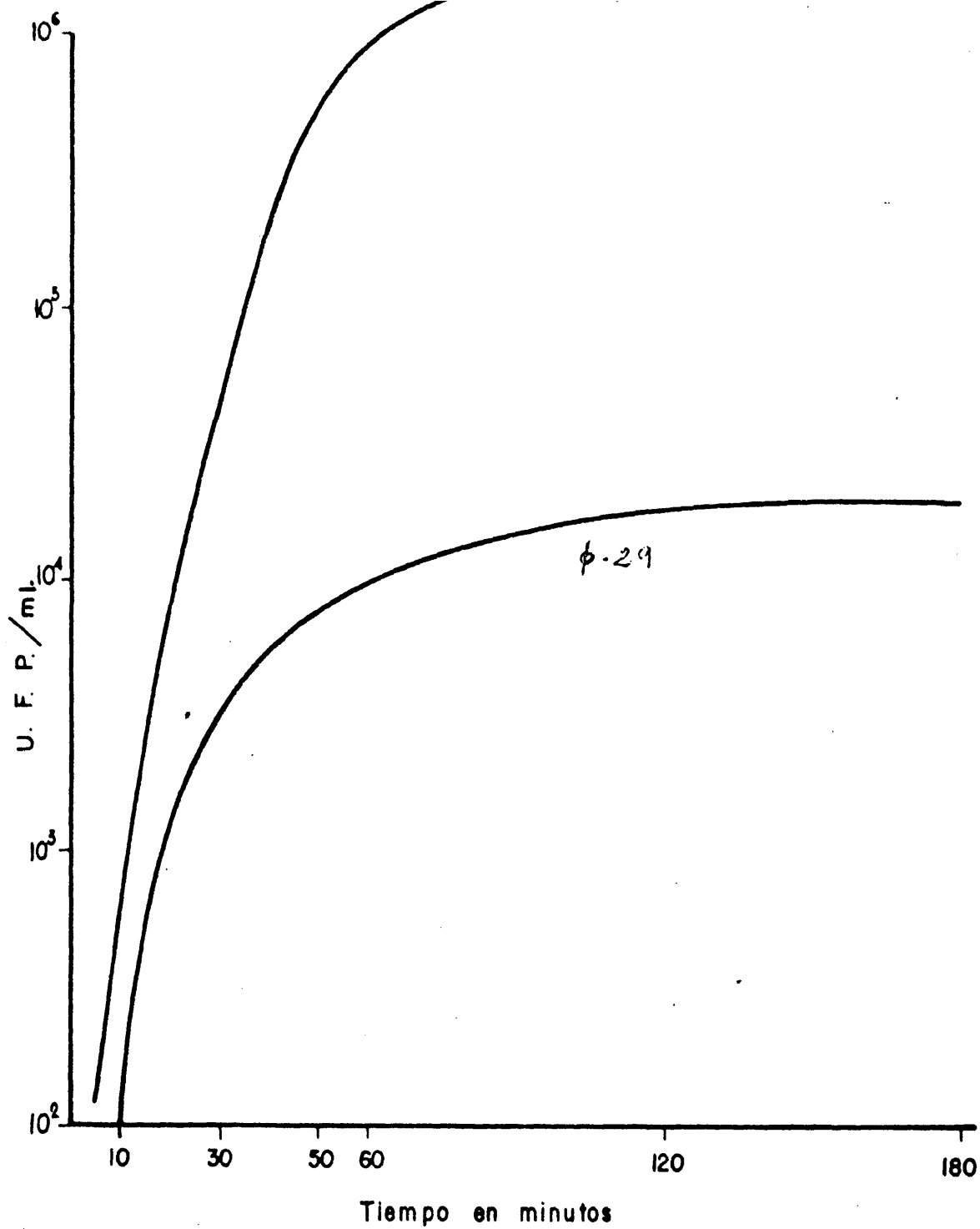


FIG. 16

Variación del número de transfectantes respecto al tiempo de incubación de las células competentes con el DNA donador (de  $\phi$ -29 ó de SPP1).

CUADRO 6

Frecuencia de transfectantes	
Con agitación	$4.5 \times 10^{-1}$
Sin agitación	$7.4 \times 10^{-3}$

Se observa claramente que la agitación favorece extraordinariamente la transfección en el caso de emplearse DNA de SPPI; cuando se utiliza DNA de Ø 29 la incubación ha de hacerse en estático pues la agitación perjudica considerablemente (TRAUTNER, comunicación personal)

Una vez establecidas las condiciones anteriores pasamos a seleccionar la estirpe bacteriana, el DNA fágico y el medio de cultivo mas adecuados para los estudios posteriores.

4. Desarrollo de la competencia según el método de Bott y Wilson ó de Anagnostopoulos y Spizizen para diferentes estirpes bacterianas.

Las diferentes estirpes se elevaron al máximo de competencia siguiendo los dos procedimientos descritos en Material y Métodos, los resultados aparecen en el cuadro 7

CUADRO 7

Estirpes bacterianas	Nº total de transformantes para trp	
	Método de Bott y Wilson	Método de Anagnostopoulos y Spizizen
AR1	$6 \times 10^5$	$5.8 \times 10^5$
AR2	$8 \times 10^4$	$8.5 \times 10^4$
AR3	$4 \times 10^5$	$3.8 \times 10^5$

Estos resultados nos dicen que con ambos métodos se obtienen cifras similares para la misma estirpe. Sin embargo el procedimiento de BOTT y WILSON tiene para nosotros la ventaja de tratarse de un medio mas sencillo y que no requiere, por otra parte, la dilución del cultivo.

La cepa mas transformable como se desprende del cuadro anterior es la AR1.

##### 5. Elección de las condiciones de transfectabilidad

Con objeto de elegir las condiciones mas idóneas para los futuros experimentos de transfección, realizamos una serie de experiencias en las que ensayamos distintas estirpes indicadoras, es decir aquellas células que han de servir de cespel para poner de manifiesto las placas de lisis.

Los resultados se muestran en el cuadro 8, donde se ha representado el grado de claridad de las placas de lisis obtenidas; las células receptoras habían alcanzado el estado de competencia según el método de ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN.

Como se puede observar las estirpes AR1T y AR2 poseen cierta resistencia a la infección por SPP1 ó Ø 29 lo que determina la aparición de placas turbias que impide el recuento de los transfectantes. Por otra parte, cuando se transfecta utilizando DNA de Ø 29 a pesar de que HM presenta una gran sensibilidad a este fago, es conveniente utilizar como estirpes indicadoras HMS o HMES sobre placas que contengan estreptomicina o eritromicina con objeto de impedir la multiplicación de las células receptoras (sensibles a estos antibióticos) pues AR1T y AR2 producen bacteriocinas que atacan a HM, HMS y HMES introduciendo errores en la interpretación de los resultados.

Así pues utilizando como estirpe indicadora la MC-1 siempre que la transfección se realizaba con DNA de SPP1 y la estirpe W-23 para las transfecciones con DNA de Ø 29, investigamos la frecuencia de transfección de diferentes estirpes receptoras que habían alcanzado el estado de competencia bien por el método de BOTT y WILSON, bien según el procedimiento de ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN.

Los resultados aparecen en el cuadro 9.



CUADRO 9

Desarrollo de la competencia expresado en función de la frecuencia de transfección:

A: Según el método de Bott y Wilson

B: Según el método de Anagnostopoulos y Spizizen

Cepa receptora	DNA donador		Cepa receptora	DNA donador	
	Ø-29	SPP1		Ø-29	SPP1
ARIT	$6 \times 10^{-3}$	$3.2 \times 10^{-1}$	ARIT	$4 \times 10^{-2}$	$2.6 \times 10^{-1}$
AR2	$9 \times 10^{-4}$	$5 \times 10^{-2}$	AR2	$2 \times 10^{-3}$	$6 \times 10^{-2}$
MC-1	0	0	MC-1	+	$9.8 \times 10^{-2}$

( \* ) En este experimento las placas fueron muy poco patentes aunque la transfección fue positiva.

Los resultados obtenidos en todos los experimentos descritos anteriormente nos indican, como discutiremos mas adelante, que las condiciones óptimas de transformación son las siguientes:

- a) Desarrollo de la competencia empleando el método descrito por BOTT y WILSON
- b) Estirpe receptora: AR1
- c) Concentración de DNA saturante 0.5  $\mu$  gr/ml
- d) Tiempo de incubación de las células competentes con el DNA donador de 30'

En cuanto a los experimentos de transfección las condiciones elegidas son:

- a) Desarrollo de la competencia según el procedimiento de BOTT y WILSON
- b) Estirpe receptora: AR1T
- c) DNA donador del fago SP1 a una concentración de 10  $\mu$  gr/ml.
- d) Tiempo de incubación de las células competentes con el DNA donador de 30' en agitación a 250 r.p.m.
- e) Estirpe indicadora: MC-1

#### IV. ESTUDIO DE LA COMPETENCIA EN CULTIVO CONTINUO

Para estudiar el desarrollo de la competencia en quimostato es preciso establecer previamente una serie de parámetros con objeto de trabajar en unas condiciones normalizadas. El primero de ellos es el cálculo del factor limitante puesto que al cultivar en quimostato células auxotrofas como ARI con necesidades nutritivas de histidina y de triptófano no tenemos, en principio, la seguridad de que la tasa de multiplicación  $\mu$  venga condicionada por la concentración de la fuente carbonada o por la de los nutrientes esenciales.

##### 1. Cálculo del factor limitante

En las Figs. 17, 18 y 19 se representan las variaciones de la tasa de multiplicación, calculadas de acuerdo con la fórmula 7 de la pag. 66, con respecto a la concentración del sustrato.

Resulta evidente que a partir de determinadas concentraciones del sustrato la tasa de multiplicación celular  $\mu$  permanece constante, existiendo pues unas concentraciones críticas ( $C_0$ ) a las cuales se alcanza la tasa de multiplicación máxima ( $\mu_m$ ), concentra-

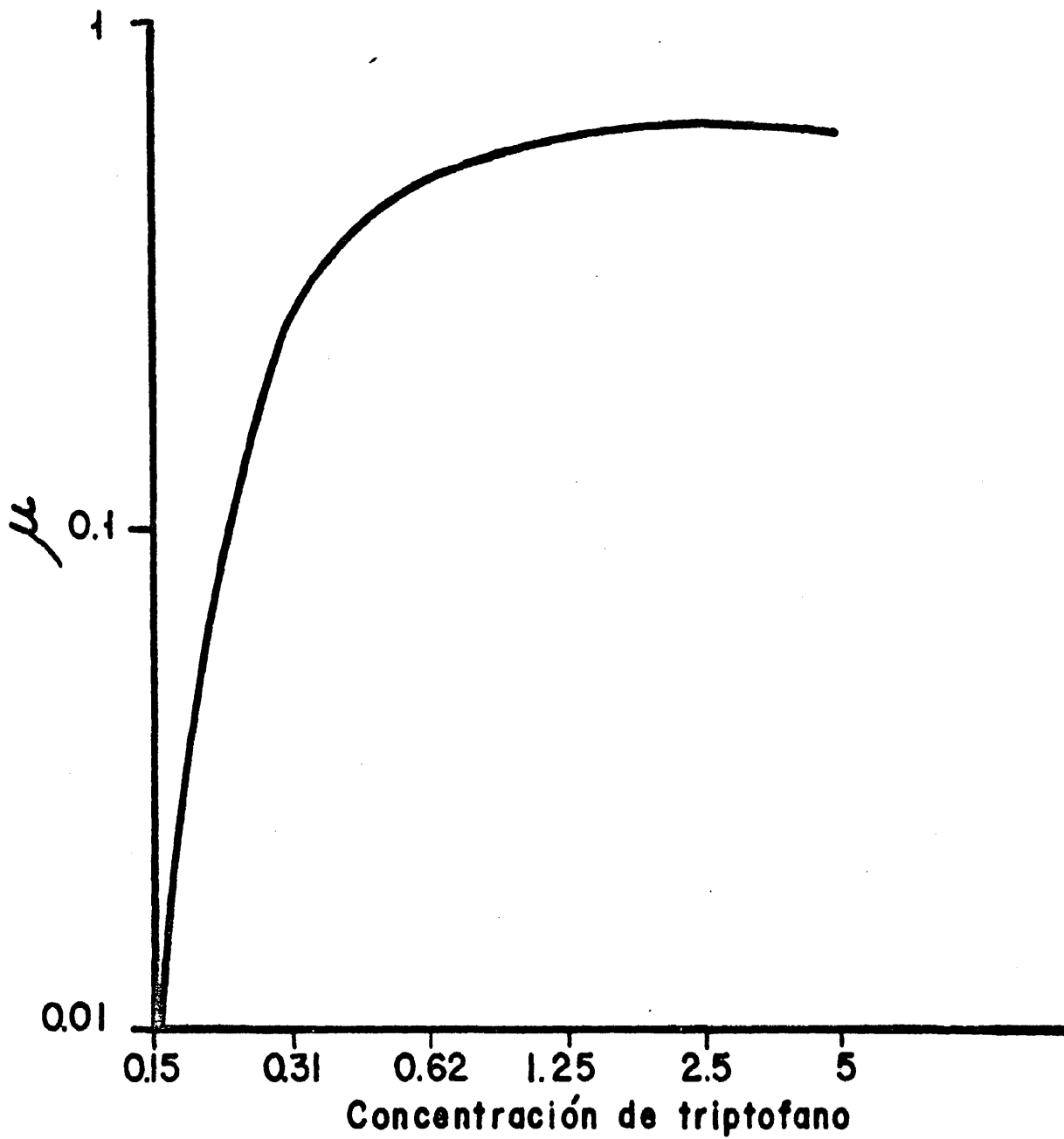


FIG. 17

Variación de la tasa de multiplicación respecto a la concentración de triptófano.

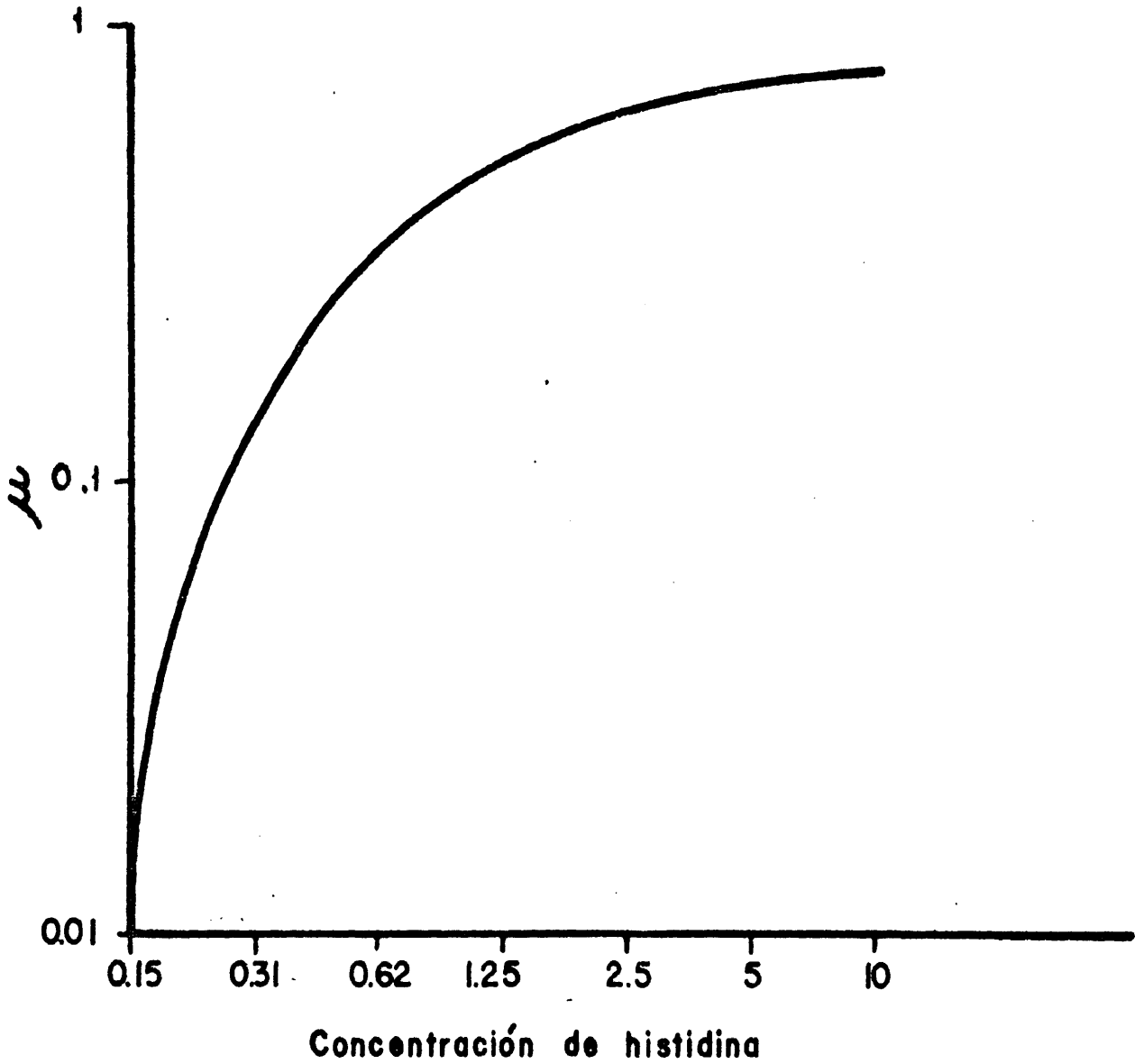


FIG. 18

Variación de la tasa de multiplicación respecto a la concentración de histidina

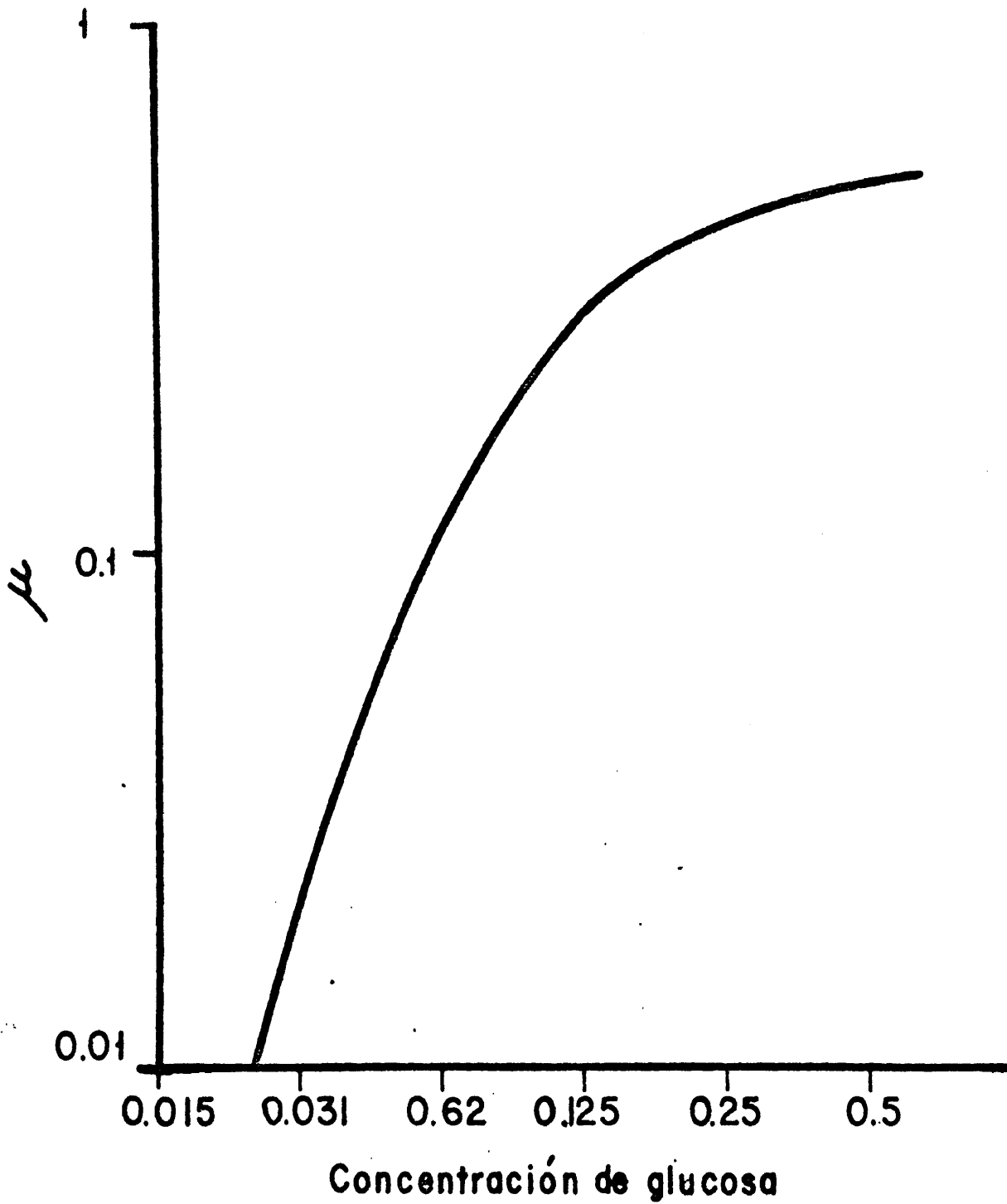


FIG. 19

Variación de la tasa de multiplicación respecto a la concentración de glucosa

ciones que debemos tener en cuenta con objeto de conseguir que el factor limitante sea único.

En efecto, si el medio de cultivo contenido en el matraz nodriza (A Fig. 11) se ha preparado con una cantidad de triptófano y de histidina tal, que para cualquier tiempo de duplicación, en el quimostato exista una concentración de estos aminoácidos igual o superior a  $C_0$  estas sustancias no afectarán a la tasa de multiplicación celular. Por el contrario, teniendo presente la Fig. 19, la cantidad de glucosa que debe contener el matraz nodriza ha de ser aquella con la cual a ningún tiempo de duplicación estudiado se supere en el quimostato la concentración crítica  $C_{0\mu}$  condicionando, de este modo, al ser el factor limitante, el tiempo de duplicación de las células.

## 2. Competencia y tasa de multiplicación analizado por transformación y transfección.

### a) Transformación

Para conocer las variaciones de la onda de competencia con respecto a la tasa de multiplicación celular llevamos a cabo unos experimentos de transformación con la estirpe ARI utilizando distintas concentraciones de histidina con objeto de variar los valores de  $\mu$ , los resultados están representados en las Figs. 20 y 21. Era difícil sin embargo conocer si las variaciones en la capacidad transformante podían ser atribuidas a las diferentes tasas de

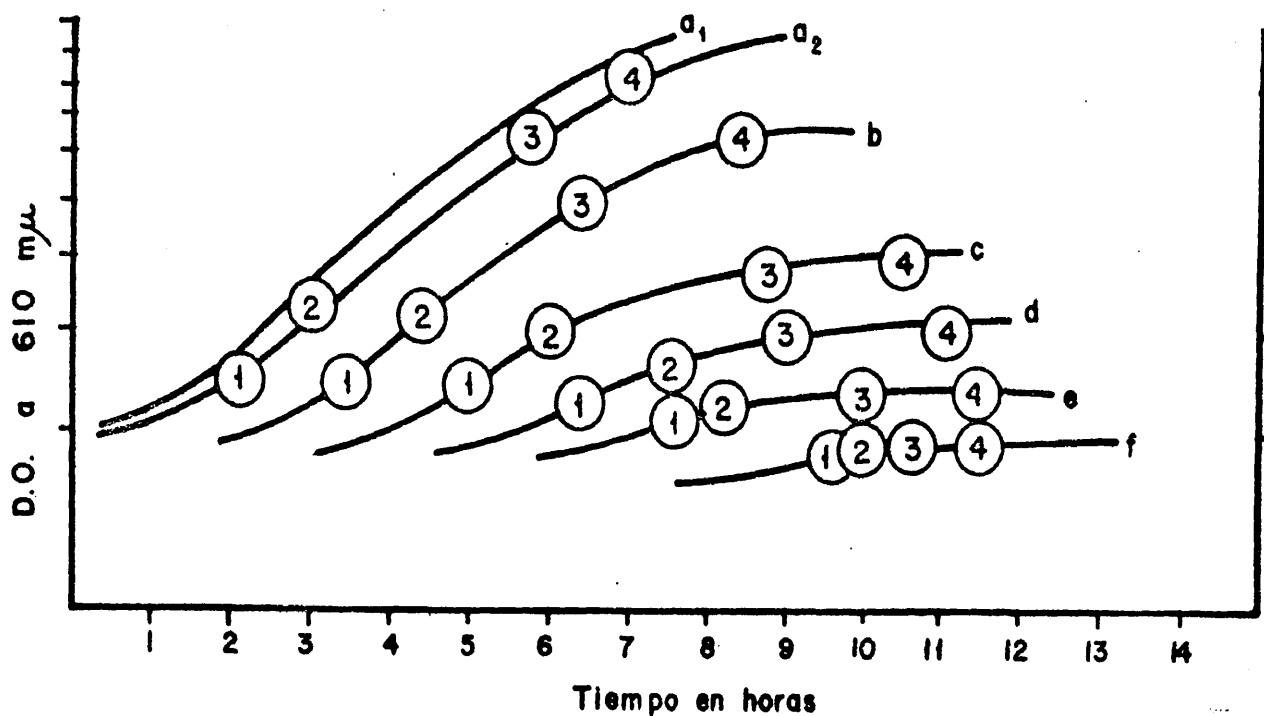


FIG. 20

Variación de la D.O. de un cultivo de *B. subtilis* ARI multiplicándose en medios con diferentes concentraciones de histidina: a<sub>1</sub> = 100 μgr/ml, a<sub>2</sub> = 50 μgr/ml, b = 25 μgr/ml, c = 12.5 μgr/ml, d = 6.25 μgr/ml, e = 3.12 μgr/ml, f = 1.56 μgr/ml. Los números en el interior de los círculos indican los momentos que fueron tomadas las muestras para determinar la onda de competencia por transformación.

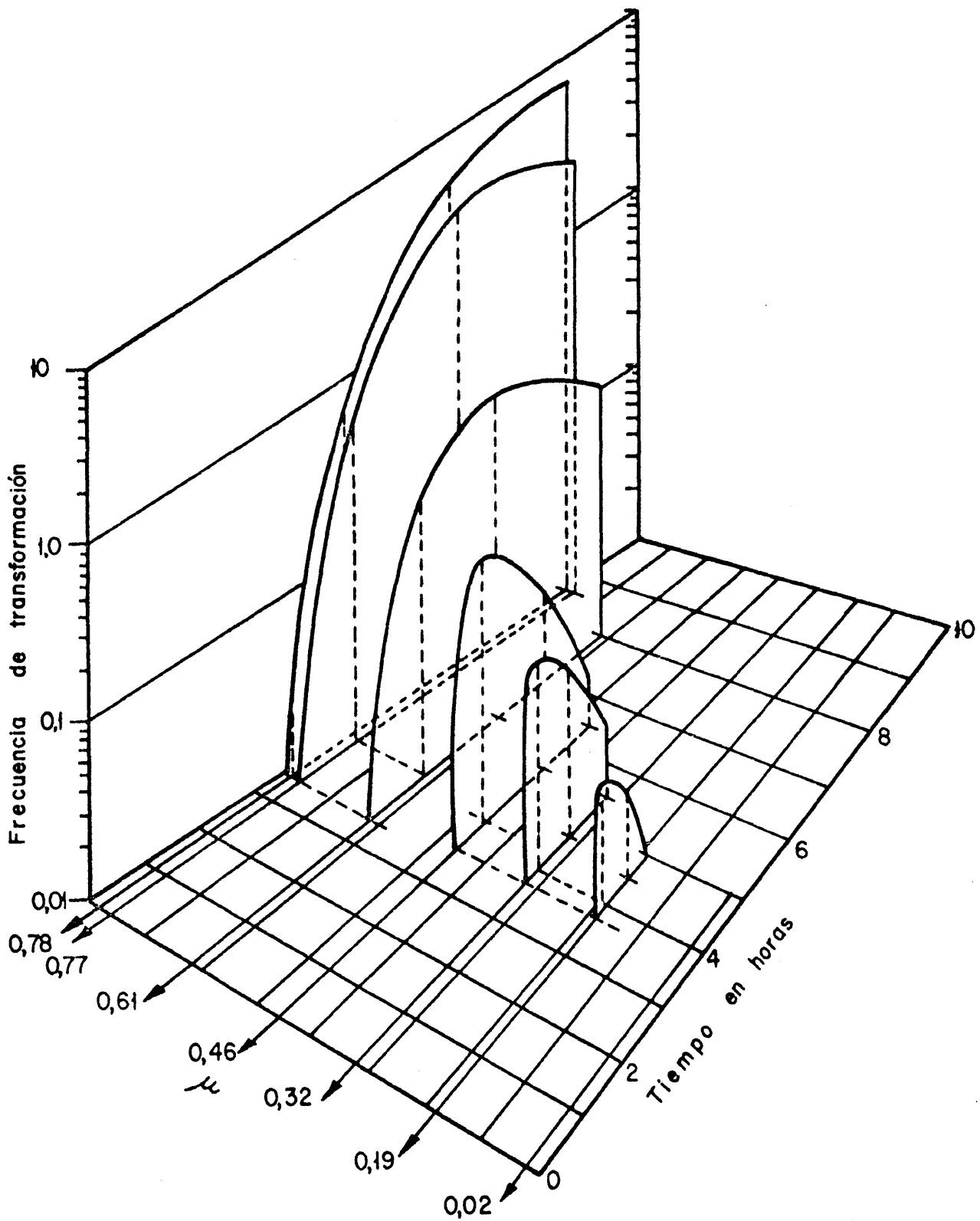


FIG. 21

Variación de la onda de competencia de B. subtilis ARI respecto a los valores de la tasa de multiplicación y a las concentraciones de histidina en las condiciones indicadas en la fig. 20

multiplicación ( $\mu$ ) o a las bajas concentraciones del factor limitante que da origen a un medio agotado o bien a ambas circunstancias. Por otra parte estas condiciones así como las usadas por HORVATH (1967) no excluían la posibilidad de que otros factores, como por ejemplo sustancias catabólicas acumuladas en el medio, pudiesen ejercer una influencia decisiva sobre la transformabilidad.

Con objeto de evitar la interferencia de tales productos catabólicos llevamos a cabo experimentos de transformación cultivando las células en quimostato y manteniendo la L-histidina como factor limitante.

La Fig. 22 muestra los resultados obtenidos en estos experimentos donde se puede apreciar una estrecha relación entre el desarrollo de la competencia y la tasa de multiplicación, existiendo dos valores máximos a tiempos de duplicación 2.5 horas y 6.5 horas siendo el primero el mayor en nuestras condiciones experimentales.

#### b) Transfección

La Fig. 23 representa las variaciones de la frecuencia de transfección a diferentes tiempos de duplicación de las células receptoras AR1T.

Al tratarse de una estirpe prototrofa, la glucosa pasó a ser en este caso, el factor limitante.

Una vez mas los experimentos de transfección confirman los resultados obtenidos con transformación en el sentido de que

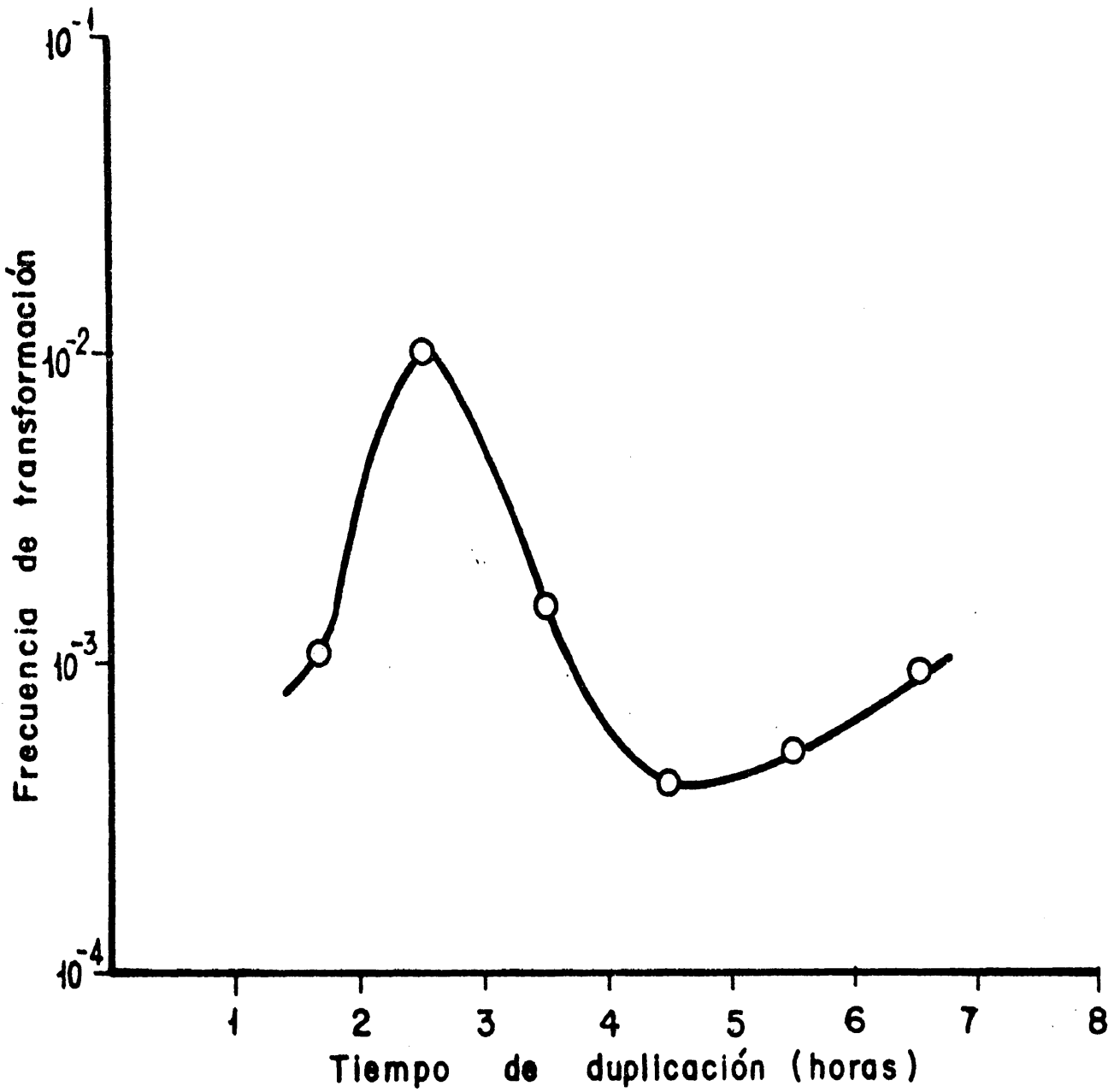


FIG. 22

Relación entre el tiempo de duplicación y la frecuencia de transformación en B. subtilis ARI multiplicándose en quimostato. Cada punto es el valor medio de tres experimentos realizados cada 48 horas.

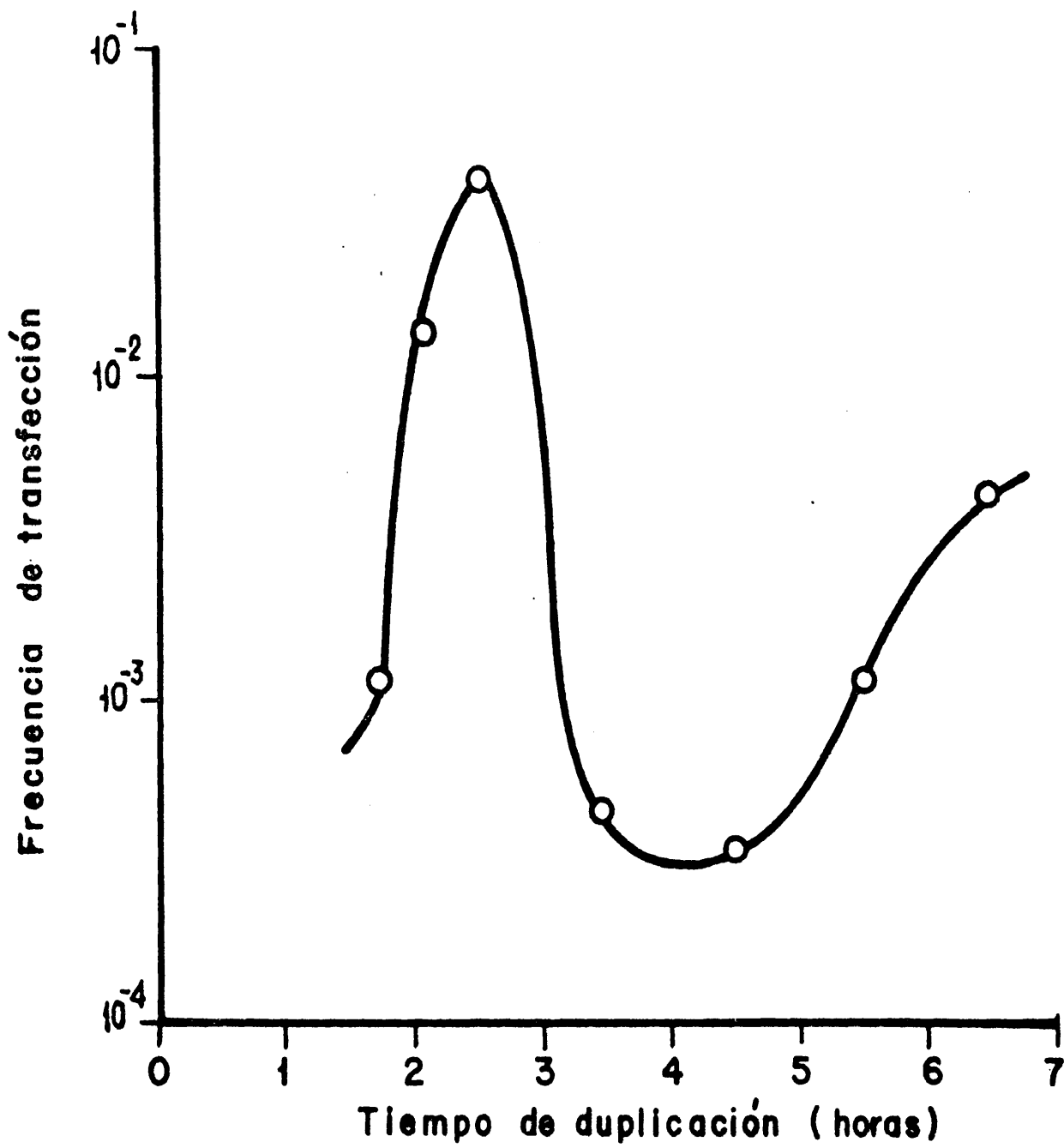


FIG. 23

Relación entre la frecuencia de transfección y el tiempo de duplicación cuando las células receptoras se multiplicaban en medio BWC.

se detectan claramente dos valores máximos de competencia a tiempos de duplicación 2.5 h y 6.5 h.

### 3. Competencia y esporulación en cultivo continuo

Diversos autores (SPIEIZEN y cols. 1963) han señalado que debía de existir una estrecha relación entre el estado de competencia, la esporulación y el ciclo de Krebs, basándose fundamentalmente en el hecho de que en cultivos ordinarios al máximo de competencia se alcanza en los primeros estadios de la fase estacionaria de desarrollo bacteriano, esto es cuando en el cultivo el número de pre-esporas es máximo y por consiguiente es el momento en que en las células se están realizando mayor número de ciclos de Krebs.

Por nuestra parte, teniendo en cuenta los resultados anteriormente expuestos, realizamos un estudio que nos indicara el número de esporas presentes en el quimóstato a diferentes tiempos de duplicación. La Fig. 24 indica como el número de esporas aumenta a medida que el tiempo de duplicación se hace mayor. Estos resultados experimentales confirman plenamente las consideraciones matemáticas propuestas por DAWES y THORULEY (1970)

Considerando las Figs. 22, 23 y 24 es evidente que un máximo de competencia ( $t_d = 2.5$  h) aparece cuando el número de pre-esporas en el quimostato es marcadamente bajo y consecuentemente la posibilidad de hallar ciclos de Krebs intactos es también muy baja.

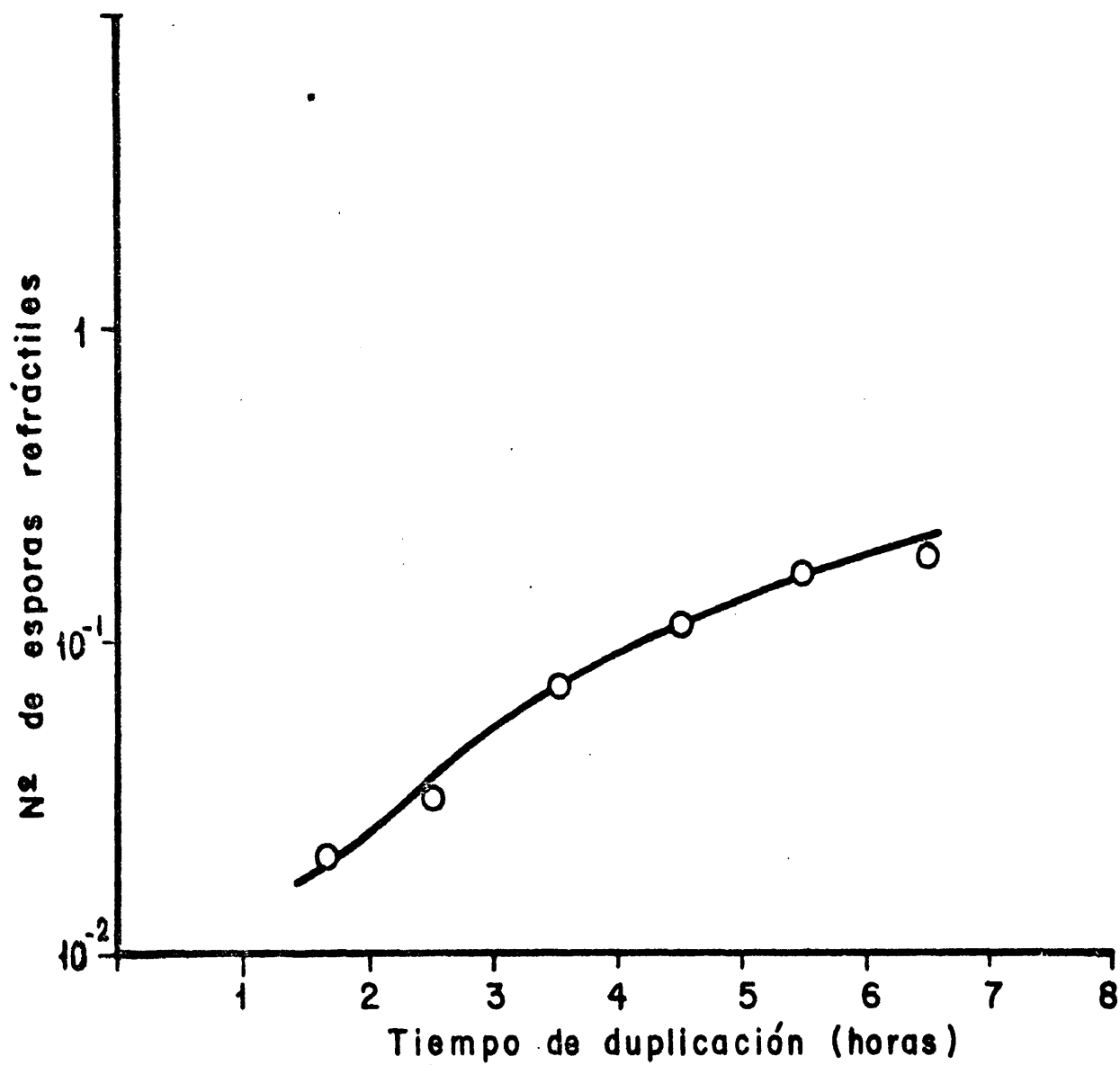


FIG. 24

Relación entre el tiempo de duplicación y el número de esporas refráctiles presentes en el quimostato

V. INFLUENCIA DE LOS AMINOACIDOS  
INHIBIDORES Y ESTIMULANTE SOBRE EL  
DESARROLLO DE LA COMPETENCIA EN  
CULTIVO CONTINUO

Para clarificar los resultados contradictorios que en el capitulo anterior hemos señalado, llevamos a cabo algunos experimentos que condujeran a estudiar la influencia, así como el posible efecto regulador, que los aminoácidos calificados como estimulantes o inhibidores por BOTT y WILSON (1967) podian tener sobre el desarrollo de la competencia en cultivos multiplicandose a diferentes tiempos de duplicación.

La Fig. 25 ilustra los resultados obtenidos en la frecuencia de transfección cuando los aminoácidos fueron extraídos del medio BWC, es decir cuando las células receptoras se multiplicaban en el quimostato en medio BWI. Estos experimentos revelan la existencia de un solo máximo de competencia a un  $t_d = 2.5$  h mientras que el otro máximo que existia a 6.5 h. ha desaparecido completamente.

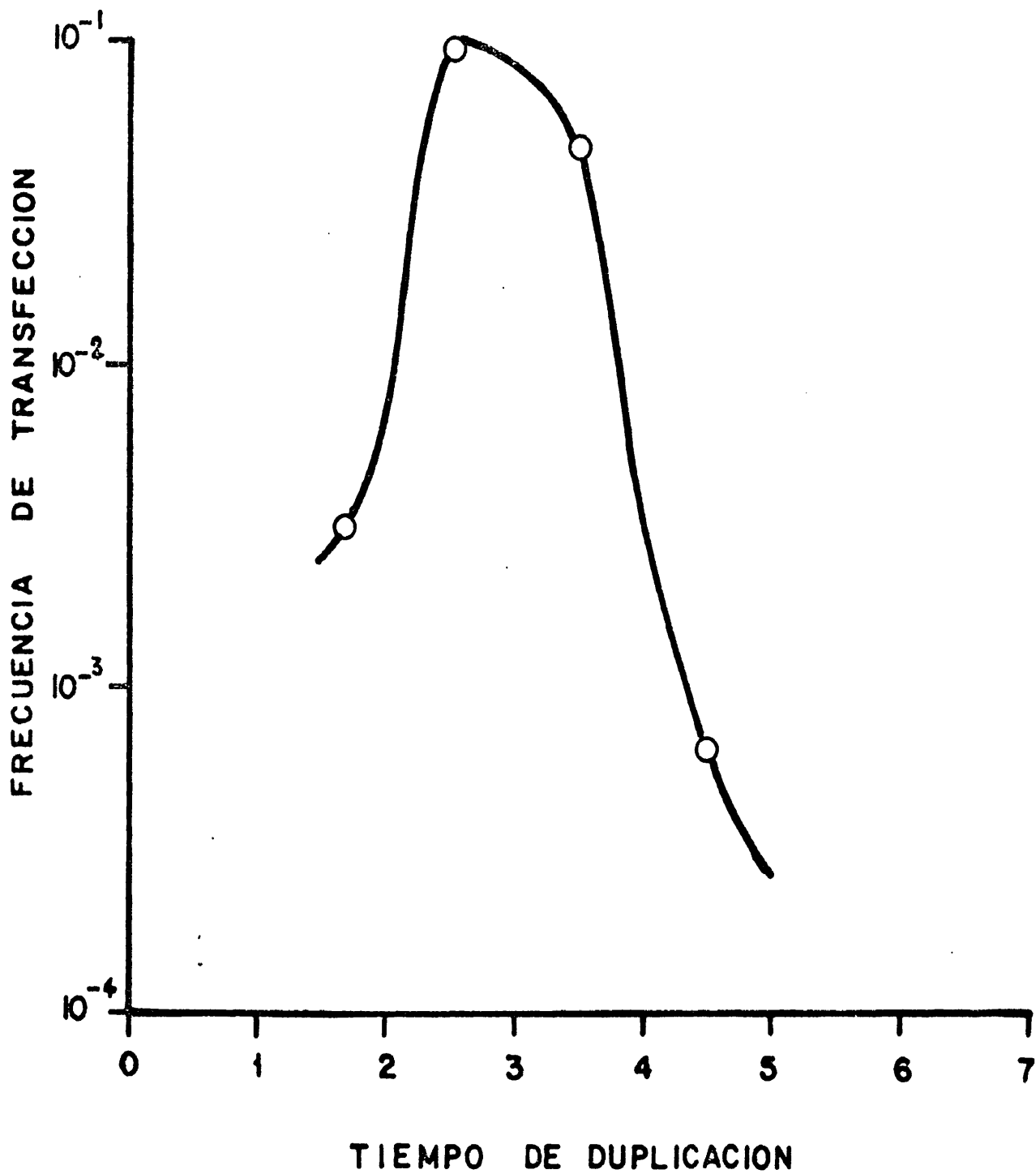


FIG. 25

Relación entre la frecuencia de transfección y el tiempo de duplicación de las células multiplicándose en medio BWI.

Con objeto de caracterizar el comportamiento de los aminoácidos considerados como inhibidores (p. ej. ácido L-glutámico, L-alanina) y estimulantes (p. ej. L-arginina, L-histidina) en cultivos ordinarios, llevamos a cabo un nuevo experimento en el cual el aminoácido estudiado se mantuvo a una concentración constante en el quimostato durante todo el experimento.

Los datos señalados en la Fig. 26 muestran que una concentración constante de 50  $\mu$  gr/ml de ácido L-glutámico o de L-alanina incrementa la frecuencia de transfección para tiempos de duplicación que oscilan entre 1.7 h a 5.5 h respecto a la curva de transfección en medio BWC, mientras que el nivel de competencia cae bruscamente a tiempos de duplicación mas altos.

Por otro lado, llevamos a cabo experimentos similares usando una concentración constante de los aminoácidos estimulantes. La L-arginina y la L-histidina disminuyen el nivel de competencia con respecto a la curva base entre 1.7 h y 3.3 h., mientras que incrementan la transfección desde 3.4 h hasta 6.5 h, como se muestra en la Fig. 27.

Los datos anteriormente expuestos sugieren la marcada influencia que el tiempo de duplicación tiene sobre el desarrollo de la competencia. Así, centramos nuestra atención en los tiempos de duplicación de 2.5 h y 6.5 h, cada uno de los cuales tenía un

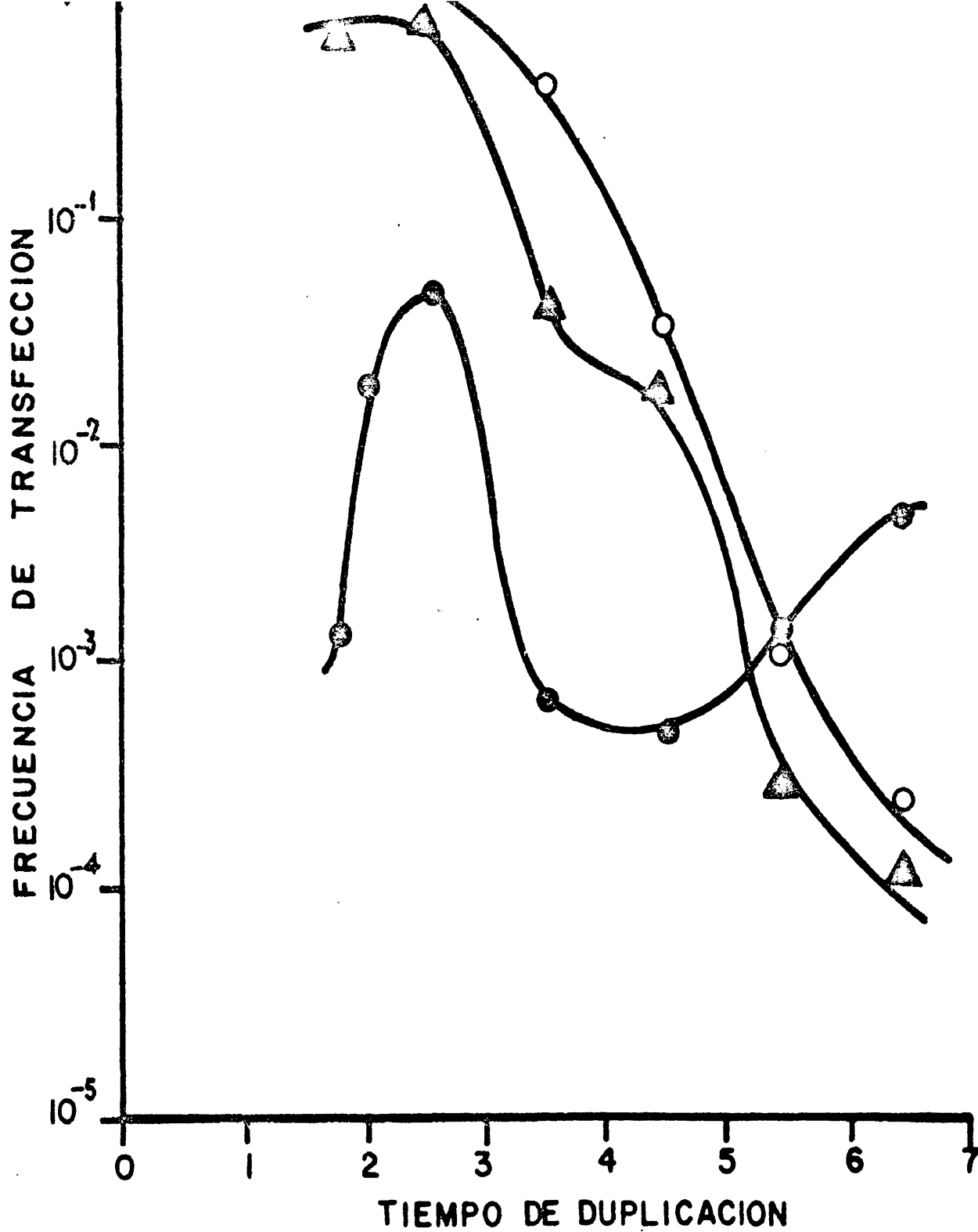


FIG. 26

Efecto de una concentración constante (50  $\mu$ gr/ml) de ácido L-glutámico (O) y L-alanina (▲) sobre la frecuencia de transfección en función del tiempo de duplicación. (●) transfección en medio BWC. La concentración de los aminoácidos estudiados fue mantenida constante como se describe en Material y Métodos.

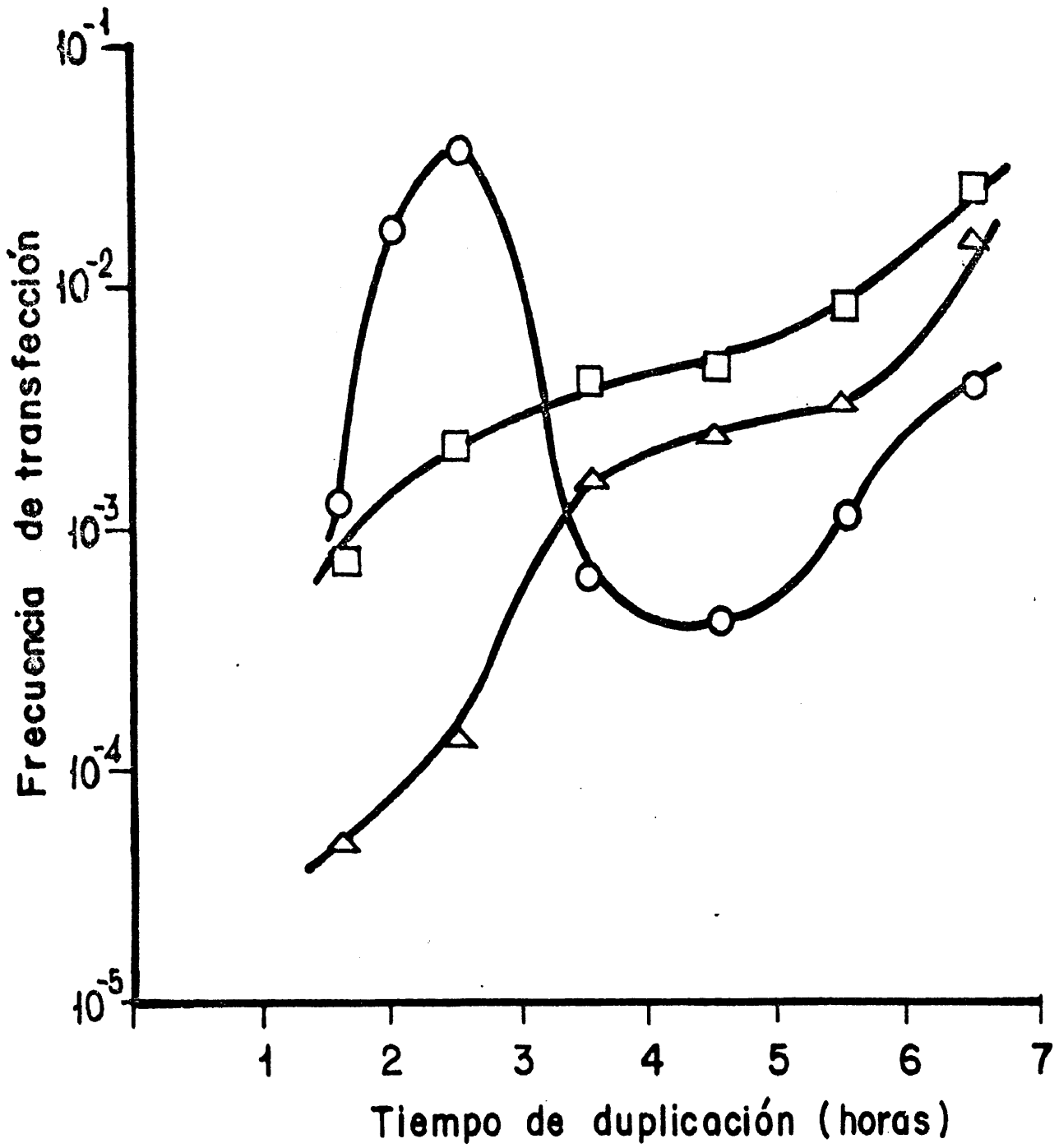


FIG. 27

Efecto de una concentración constante de  $50 \mu$  gr/ml de L-arginina ( $\Delta$ ) y L-histidina ( $\square$ ) sobre la frecuencia de transfección en función del tiempo de duplicación. (O) Transfección en medio BWC.

comportamiento claramente diferente. De este modo, llevamos a cabo varios experimentos para estudiar la cinética de la transfección cuando el cultivo receptor era "pulsado" con cantidades variables de aminoácidos. La Fig. 28 nos muestra que la arginina inhibe la competencia más de 2 unidades logarítmicas cuando la concentración del aminoácido se incrementa desde 0 a 100  $\mu$ gr/ml en el quimostato, donde las bacterias receptoras estaban creciendo a un  $t_d$  constante de 2.5 h. En contraste, cuando se añadió el ácido L-glutámico al medio BWI, la competencia se mantuvo constante o fue ligeramente estimulada.

Similares experimentos se llevaron a cabo a  $t_d = 6.5$  h, usando el medio BWI. Podemos ver, de los resultados mostrados en la Fig. 29 que el ácido L-glutámico inhibe completamente el desarrollo de la competencia mientras que la arginina la estimula de una forma moderada hasta una concentración de 15  $\mu$ gr/ml, a partir de la cual la competencia permanece constante.

Los resultados indicados en las Figs. 28 y 29 y reunidos en la Fig. 30, ponen de manifiesto el hecho de que el mismo aminoácido (L-glutámico, o bien L-arginina) tienen efectos experimentales absolutamente contrarios para los dos diferentes tiempos de duplicación estudiados.

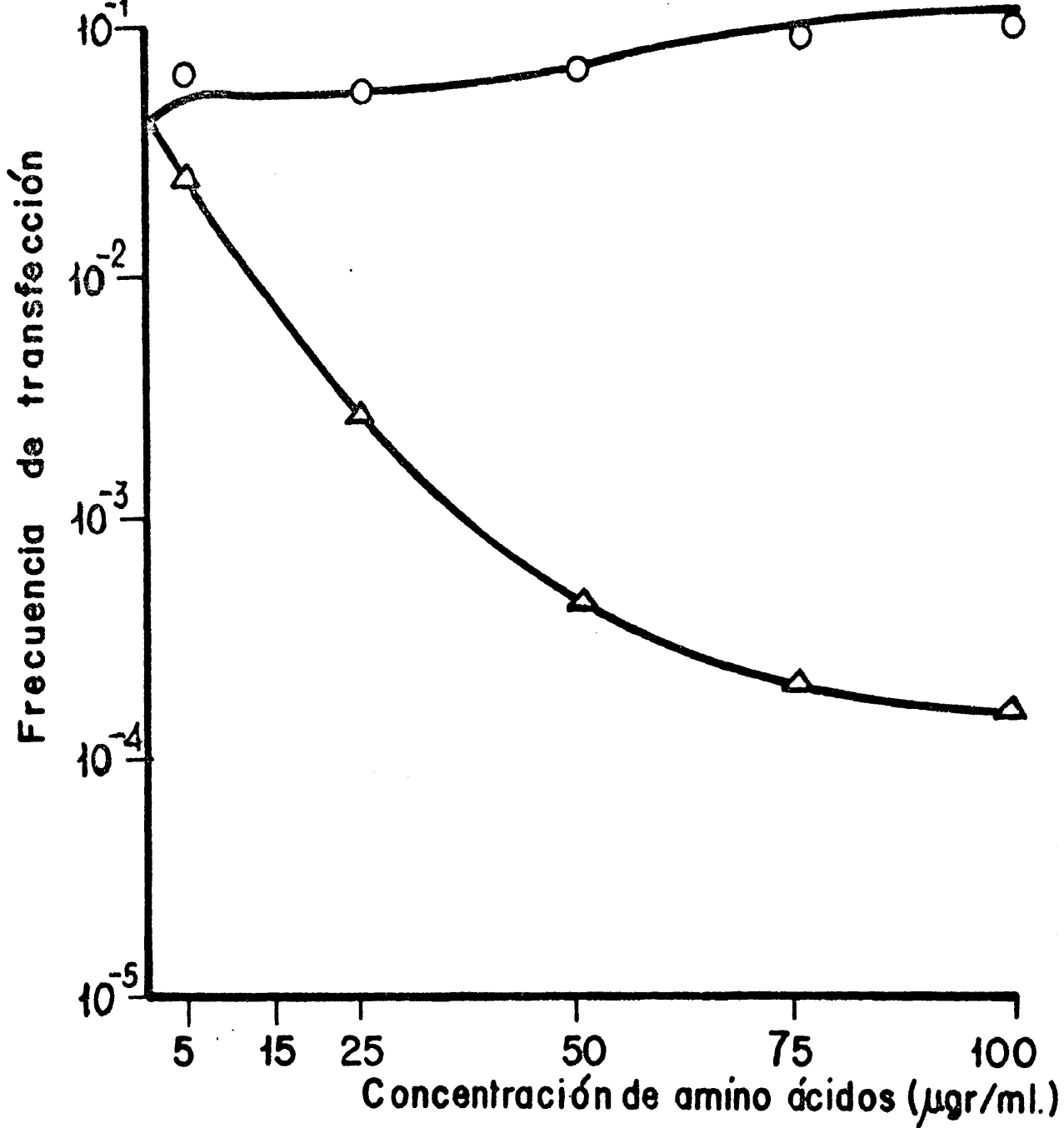


FIG. 28

Variaciones de la frecuencia de transfección cuando las células receptoras se multiplican a un tiempo de duplicación constante (2.5 h) en medio BWI en presencia de diferentes cantidades de ácido L-glutámico (O) ó L-arginina (Δ).

Cuando la concentración de los aminoácidos fue modificada, se dejó transcurrir siempre un intervalo de 48 horas entre cada experimento.

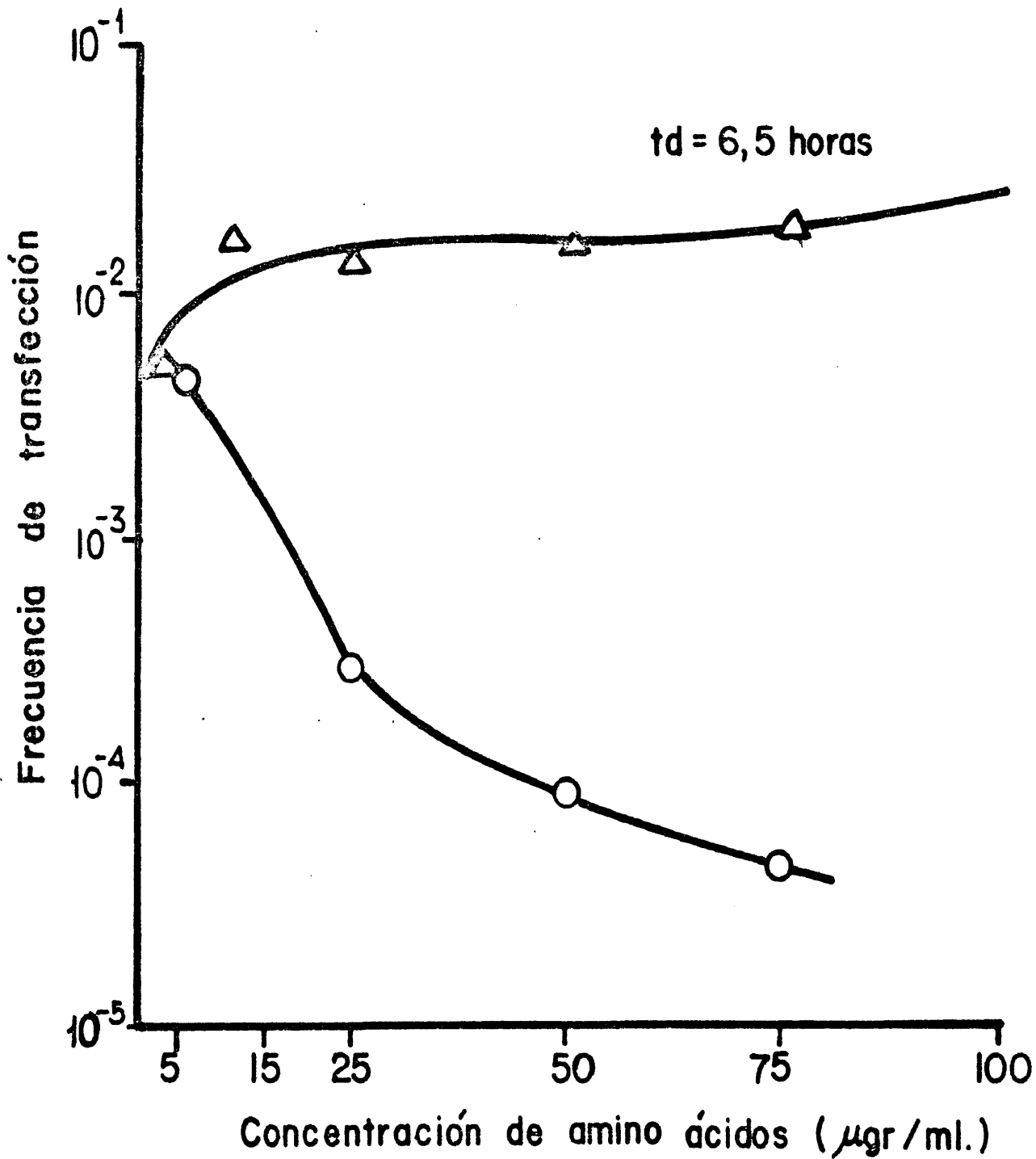


FIG. 29

Variaciones de la frecuencia de transfección cuando las células receptoras se multiplican a un tiempo de duplicación constante (6.5 h.) en medio BWI en presencia de diferentes cantidades de ácido L-glutámico ( $\circ$ ) ó L-arginina ( $\Delta$ ).

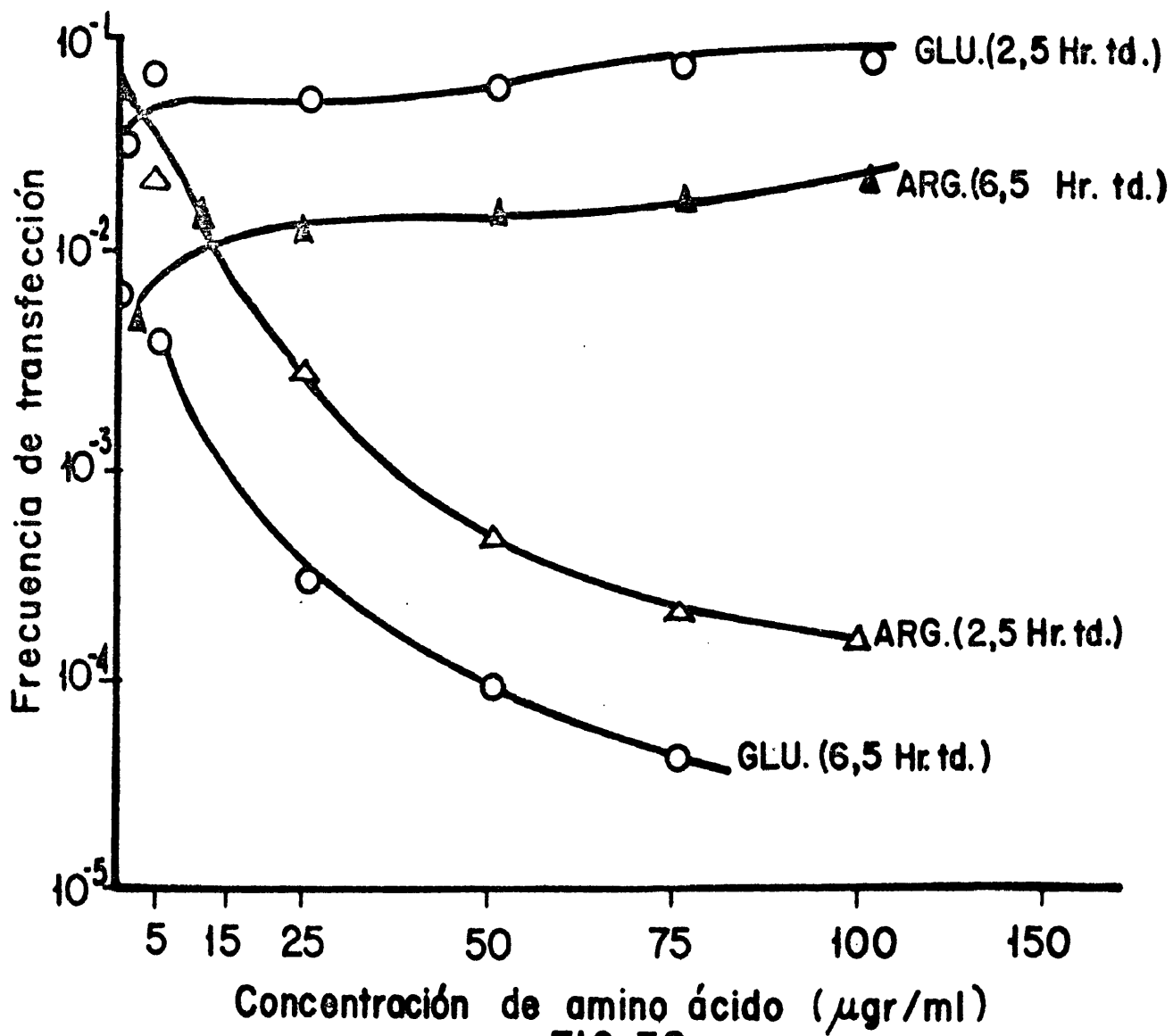


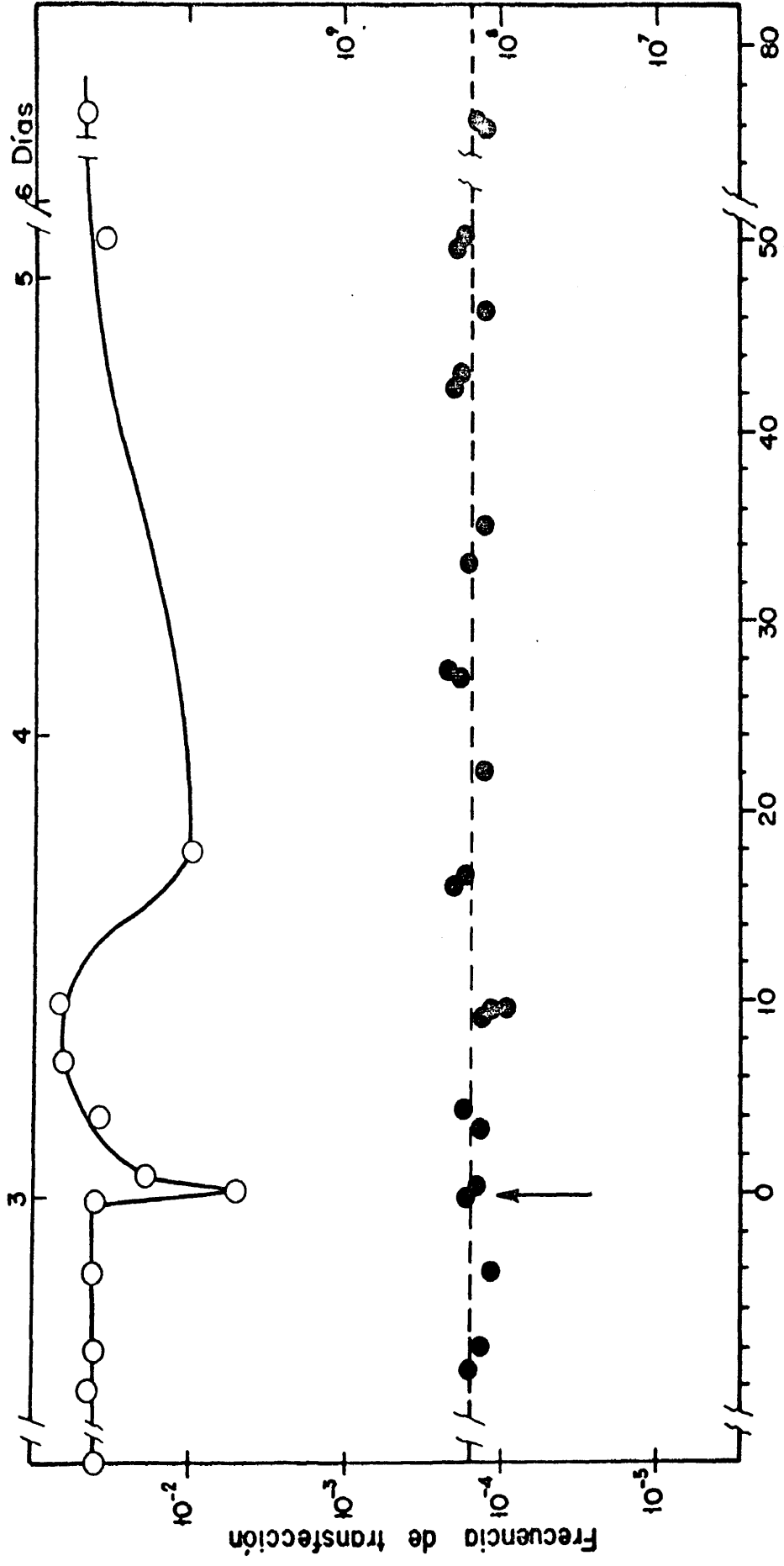
FIG. 30

Cinética de la transfección a  $td = 2.5$  h y  $td = 6.5$  h cuando el medio BWI fue suplementado con concentraciones variables de ácido L-glutámico o de L-arginina.

## VI. REGULACION DE LA COMPETENCIA POR EL ACIDO L-GLUTAMICO Y LA L-ARGININA

Durante la realización de los experimentos que hemos descrito en las páginas anteriores pudimos comprobar que los valores de transfectabilidad, no alcanzaban un nivel constante hasta que habian transcurrido 48 horas desde el momento en que se había añadido el "pulso" de aminoácido. Este hecho nos llevó a pensar que tanto la L-arginina como el ácido L-glutámico desempeñaban un papel regulatorio en el desarrollo de la competencia, lo que nos indujo a estudiar el modo de acción que estos aminoácidos tenían sobre el desarrollo de la competencia para lo cual realizamos una serie de experimentos en los que podíamos poner de manifiesto la influencia que sobre la frecuencia de transfección, tenían los aminoácidos estudiados en función del tiempo de actuación de los mismos.

Las figs. 31, 32 y 33 muestran las variaciones de transfectabilidad, en presencia de tres diferentes concentraciones de ácido L-glutámico durante las primeras 48 horas.



Tiempo de cultivo en horas

FIG. 31

Variación de la frecuencia de transfección en función del tiempo.  
 La flecha indica el momento en que se añade al quimostato  $10^{-4}$  gr/ml  
 de ácido L-glutámico. Las células estaban multiplicándose a un  
 $t_d = 2.5$  h.

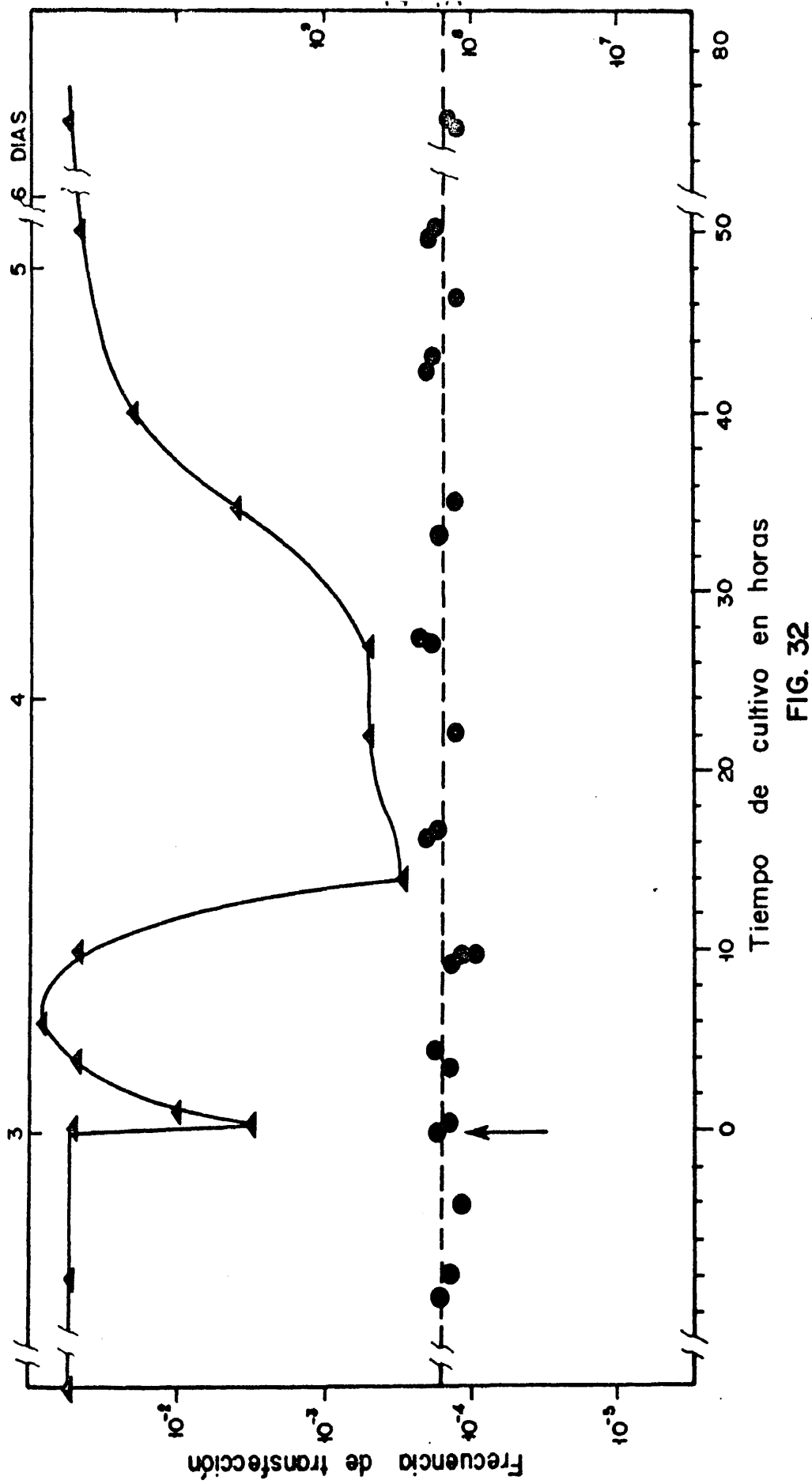


FIG. 32

Variación de la frecuencia de transfección en función del tiempo. La flecha indica el momento en que se añade al quimostato 25 gr/ml de ácido L-glutámico. Las células estaban multiplicándose a un  $td = 2.5$  h.

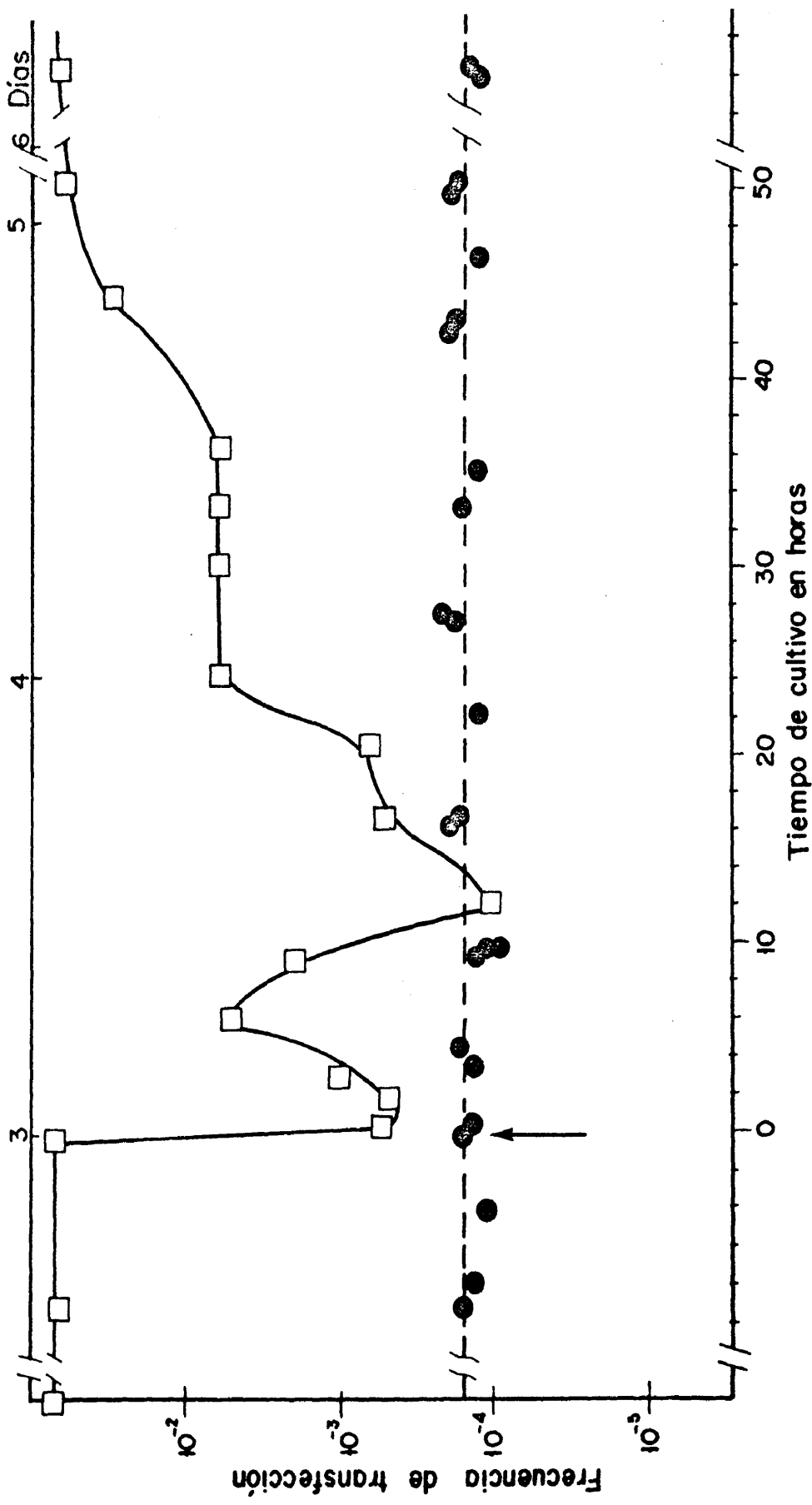


FIG. 33

Variación de la frecuencia de transfección en función del tiempo. La flecha indica el momento en que se añaden al quimostato 50  $\mu$  gr/ml de ácido L-glutámico. Las células estaban multiplicándose a un  $t_d = 2.5$  h.

En las tres figuras se pueden observar oscilaciones paralelas que se van acentuando a medida que la concentración del aminoácido se hace mayor. A partir de 48 horas se aprecia que no existen variaciones significativas en la frecuencia de transfectantes.

En la Fig. 34 presentamos los resultados de un experimento similar realizado en presencia de 50  $\mu$  gr/ml de L-arginina.

En este caso no aparecen oscilaciones semejantes a las descritas mas arriba, sino una inhibición progresiva de la transfectabilidad que alcanza un equilibrio o valor constante a las 48 horas de haber añadido la L-arginina al medio de cultivo.

En ambas experiencias se hicieron recuentos de viables a los tiempos señalados con el fin de observar posibles variaciones en el número de células presentes en el quimostato. Como se desprende de las Figs. 31 a 34 el número de células no experimentó variaciones sensibles.

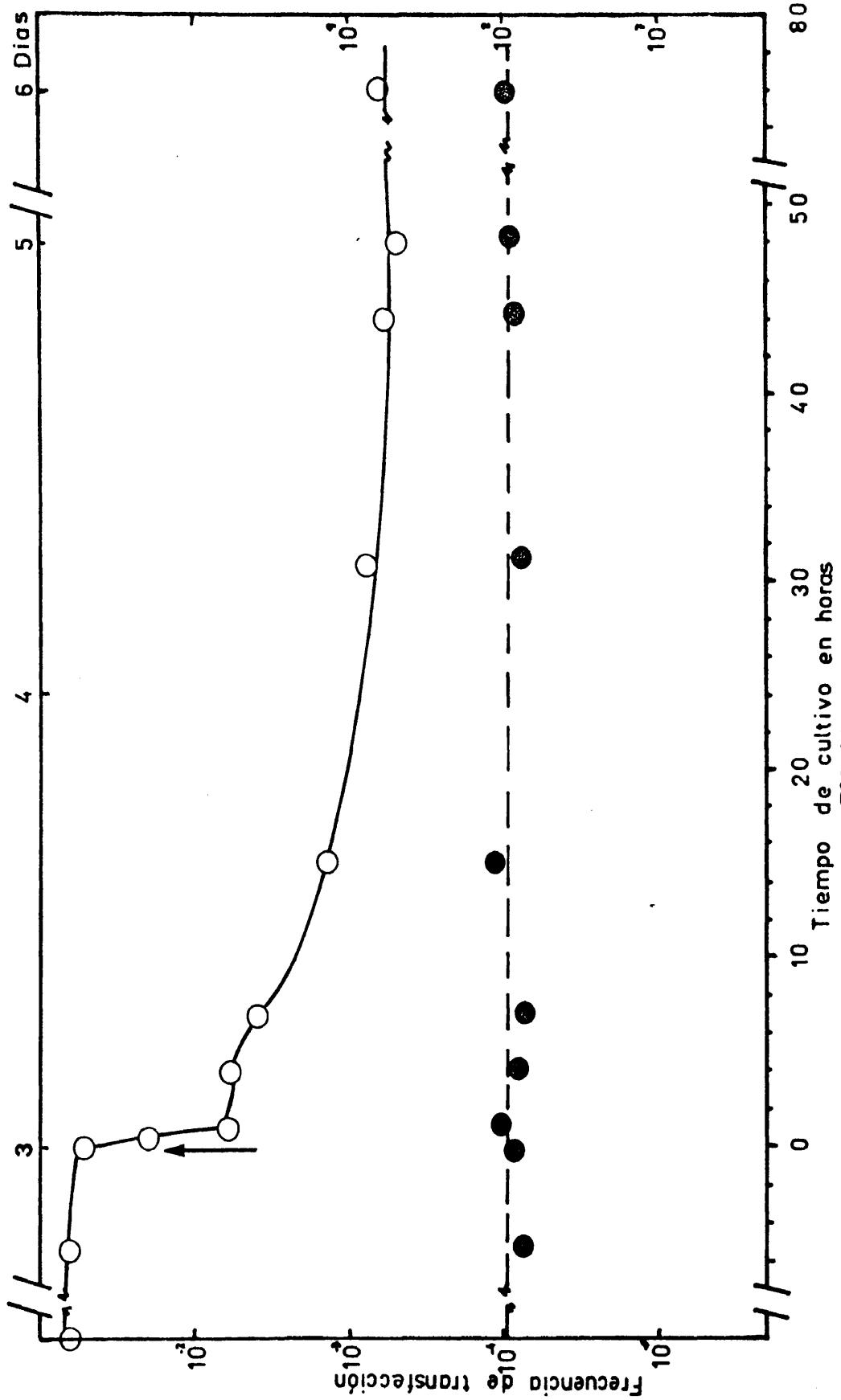


FIG. 34

Variación de la frecuencia de transfección en función del tiempo. La flecha indica el momento en que se añade al quimostato 50 gr/ml de L-arginina. Las células estaban multiplicándose a un  $t_d = 2.5$  h.

## VII. CONSIDERACIONES ACERCA DE LOS RESULTADOS

Con objeto de poner en evidencia los posibles fenómenos de regulación que intervienen capacitando a células de B. subtilis para entrar en competencia, en el presente capítulo, nos proponemos considerar separadamente los distintos conjuntos de resultados obtenidos según las fases de nuestro protocolo de trabajo.

### 1. Condiciones optimas para el desarrollo de la competencia.

Dado que existe una gran controversia en cuanto a la definición de la competencia y sobre todo una gran laguna en cómo se alcanza dicho estado, no existen por el momento normas fijas para conseguir que determinadas células bacterianas entren en estado de competencia. Por esa razón resulta absolutamente imprescindible, antes de centrarnos en el problema, determinar, en cada caso concreto, las condiciones que resulten óptimas para el desarrollo de dicha competencia pues variaciones tan insignificantes como la composición del agua (BOTT comunicación personal) o incluso el origen comercial de los productos usados para preparar el medio de cultivo (LANDMAN, comunicación personal) pueden afectar decisivamente los resultados que se obtengan.

Con este fin, realizamos una curva de saturación que nos permitiese conocer la cantidad mínima de DNA necesaria para que se pusieran de manifiesto todas las células competentes del cultivo. La Fig. 13 nos indica las variaciones en el número total de transformantes, para el carácter histidina, triptófano o bien para ambos caracteres, al modificar la concentración de DNA añadido a células competentes. Se puede apreciar claramente cómo a partir de una concentración de DNA de  $0,2 \mu\text{gr/ml}$  el número total de transformantes permanece invariable, lo cual nos indica que existe una saturación de los lugares de unión de las células por las moléculas transformantes. Es evidente, así mismo, que los valores alcanzados en transformación para un solo carácter (histidina o triptofano) son iguales entre si debido a tratarse de dos marcadores genéticamente ligados, es decir, consisten en cistrones situados uno a continuación del otro en el cromosoma bacteriano, sin embargo, cuando la transformación se realiza para los dos caracteres simultáneos, aunque la cantidad de DNA que satura las células competentes sea la misma, el número total de transformantes es menor como era lógico suponer.

En la fig. 14 están representados los resultados de un experimento en el que el DNA añadido era el del fago SPPI, es decir las células competentes del cultivo se ponen de manifiesto por transfección. Como se desprende del gráfico, a partir de  $5 \mu\text{gr/ml}$  el número de placas de lisis permanece constante, lo que se podría interpretar, de la misma manera que en el caso anterior, como que los lugares

de unión al DNA por parte de las células competentes estaban saturados; sin embargo, esta interpretación estaría en desacuerdo con el hecho de que  $0,2 \mu\text{gr/ml}$  de DNA bacteriano son suficientes para saturar estos lugares, como se demostró en la Fig. 13, y se los lugares de unión se encuentran en la superficie de las células, estos son independientes de la clase de DNA utilizado. Aunque este hecho es cierto, no podemos olvidar que el DNA suministrado en el caso de un experimento de transfección, ha de dirigir la síntesis de una partícula fágica completa y por lo tanto las moléculas de DNA que penetren al interior de una célula competente, o bien deben llevar la totalidad de la información, o bien han de recombinarse con otras moléculas de DNA con objeto de reparar las pérdidas que se hayan producido durante el proceso de extracción y purificación del DNA transfectante.

En el caso de la transformación, recientes experimentos de DUBNAU y cols. (1971) y DAVIDOFF-ABELSON (1971) llevan a pensar que una vez que una molécula de DNA ha penetrado en el interior de la célula competente, es rápidamente degradada en segmentos muy pequeños los cuales pueden entonces recombinarse con el DNA de la célula e incorporar éste carácter; con lo cual, suponiendo que una célula competente tenga saturados de DNA todos los lugares de unión la probabilidad de obtener un transformante será mayor que la de obtener un transfectante, aunque a partir de una cierta concentración de DNA ( $5 \mu\text{gr/ml}$  en este caso) desaparecería el efecto de yuxtaposición y apreciaríamos el de saturación.

Teniendo presente la meta que nos proponíamos alcanzar, esto es, el estudio de la regulación de la competencia en quimosato, resultaba muy importante conocer cual es el tiempo mínimo que debe permanecer el DNA en contacto con las células competentes hasta hacerse insensible a la DNAsa, pues una incubación muy prolongada alteraría notablemente las condiciones fisiológicas de las células que se estaban multiplicando a un tiempo de duplicación determinado y cuyo efecto sobre la competencia queríamos conocer.

El experimento, cuyos resultados se representan en la Fig. 15, indica la cinética de la penetración de DNA bacteriano en el cual se añadió DN-asa a diferentes intervalos de tiempo después de haber suministrado el DNA al cultivo, determinándose en cada caso el número de transformantes para el carácter histidina obtenidos. Como se puede apreciar existe un periodo de latencia de 2 minutos, es decir, que para obtener por lo menos un transformante ( $his^+$ ) se requieren 2 minutos entre la adición del DNA y la DN-asa. Estos resultados confirman los obtenidos por LEVINE y STRAUSS (1965) quienes demostraron que el periodo de latencia es independiente de los marcadores genéticos y de las estirpes utilizadas aunque depende de la temperatura a la que se haga el experimento. De los 2 minutos de periodo de latencia sólo una parte del tiempo es consumido para la entrada del DNA, el tiempo restante corresponde probablemente a la síntesis de un tipo de permeada (KOHYAMA y SAITO, 1960) dotada de un mecanismo de transporte activo (STUY y STERN, 1964).

A medida que se prolonga el tiempo de incubación de las células competentes con el DNA, el número de transformantes para el marcador histidina va aumentando progresivamente hasta alcanzar su máximo valor a los 20 minutos; a partir de este tiempo el número de transformantes permanece constante.

Este experimento, de la misma manera que los realizados por diversos autores (LEVINE y STRAUSS, 1965; STRAUSS, 1966; YOUNG, 1967), no llega a demostrar claramente que después de 20 minutos todo el DNA haya penetrado al interior de la célula receptora sino simplemente que una vez transcurridos 20 minutos desde la adición del DNA, todas aquellas moléculas que se habían unido a la superficie celular se han hecho insensibles al ataque enzimático, bien por haber penetrado al interior de la célula, bien por permanecer situadas entre la pared y la membrana. Es pues importante distinguir entre la penetración de la pared y la penetración de la membrana; en ambos casos el DNA no es atacado por la DN-asa, sin embargo podría tratarse de dos fenómenos diferentes: el primero puramente físico, el segundo metabólico y energético. En nuestro laboratorio hemos realizado experimentos (datos no publicados) en los que se ha suministrado DNA bacteriano a protoplastos de B. subtilis AR2 en medios osmóticamente protegidos sin haberse conseguido nunca transformación positiva; por el contrario, cuando el tratamiento con lisozima no era lo suficientemente enérgico como para convertir las células en protoplastos, sino que permanecían restos de pared adosados a la membrana

la transformación se verificaba con entera normalidad apreciándose incluso un notable aumento en el número de transformantes totales. En cualquier caso tanto si el DNA ha penetrado al citoplasma celular como si permanece irreversiblemente unido a la pared bacteriana siempre y cuando mantengamos el criterio apuntado en la pag. 18 de que definimos la competencia como transformabilidad, después de transcurrido 20 minutos de contacto con el DNA todas las células que habían alcanzado el estado de competencia se pondrán de manifiesto al originar colonias en un medio ausente del marcador para el cual estamos transformando.

De esta manera y teniendo en cuenta que en nuestras condiciones experimentales los tiempos de duplicación mas cortos que podemos conseguir en el quimostato son de 1,7 h estamos dentro de los límites permisibles, pues 20 ó 30 minutos de incubación no modificarían muy sensiblemente las condiciones fisiológicas de las células.

La Fig. 16 representa los resultados obtenidos en unos experimentos en los que se evidencia la cinética de la unión irreversible del DNA fágico SPPI ó  $\phi$ -29 a las células ARIT que se encontraban en máxima competencia.

A pesar de no disponer de datos experimentales directos que lo confirmen, parece plausible suponer por extrapolación, que en el caso de la transfección, el periodo de latencia es algo mas largo que en transformación y por razones que hasta el momento permanecen desconocidas, el tiempo óptimo de incubación de las células competen-

tes con el DNA fágico se encuentra entre los 60 y los 120 minutos. Resulta difícil dar una solución razonada para explicar el comportamiento diferencial de unas mismas células competentes frente a diferentes moléculas de DNA, sin embargo constituye un hecho incontrovertible que muy probablemente esté relacionado con el fenómeno de la penetración del DNA exógeno. Existen algunos autores (ERICKSON y BRAUM, 1968) que opinan que la penetración del DNA se verifica por apareamiento de bases complementarias durante la replicación del DNA bacteriano; en este sentido, sería más probable o más rápida la penetración de DNA bacteriano que la del bacteriófago por lo que la sensibilidad al ataque por la DN-asa sería más duradero en este último caso. En lo que a nuestro trabajo se refiere, no podemos mantener en contacto a las células competentes con el DNA por más de 30 minutos debido a las razones que mencionamos anteriormente por lo que, a pesar de que el número de transfectantes no será máximo y con objeto de homogenizar las situaciones transformación-transfección, hemos realizado todos los experimentos con un periodo de incubación de 30 minutos.

La misma Fig. 16 demuestra también que el nivel de competencia es muy superior en el caso de suministrar DNA de SPPI que de Ø-29. El fenómeno había sido descrito anteriormente por numerosos autores (REILLY y SPIZIZEN, 1965; FOLDES y TRAUTNER, 1964) así como que la infectividad del DNA de Ø-29 previamente tratado con tripsina, qui-

motripsina y pronasa se reducía notablemente mientras que estos mismos tratamientos no causan reducción alguna en la infectividad de DNA de SPP1 (HIROKAWA, 1972). Es probable que la necesidad de una proteína ligada al DNA de  $\phi$ -29 y el hecho de ser el único DNA fágico descrito hasta la fecha que sea sensible al tratamiento con enzimas proteolíticos convierte a la transfección con DNA de este bacteriofago, en condiciones normales, en un fenómeno singular digno de estudio por si mismo.

El cuadro 6 nos demuestra la positiva influencia que la agitación, de las células competentes AR1T con moléculas de DNA de SPP1, ejerce sobre el número de transfectantes. Este hecho, observado también en experimentos de transformación, no se reproduce al utilizar DNA de  $\phi$ -29 (TRAUTNER, comunicación personal). Los resultados presentados en el cuadro 6 nos indican que, en los experimentos de transfección con SPP1 de la cepa AR1T, es conveniente la incubación con agitación, pues de este modo se evidencia un mayor número de células competentes.

Los resultados de los cuadro 7, 8 y 9 nos sirven, en primer lugar, para elegir entre las estirpes ensayadas, aquella que alcanza un mayor nivel de competencia y en segundo lugar para establecer las mejores condiciones de transfectabilidad seleccionando la mejor estirpe indicadora, es decir, aquella que fuese mas sensible a la infección por los bacteriófagos  $\phi$ -29 ó SPP1. Como ya mencionabamos en el capítulo precedente nos encontramos con que las

estirpes indicadoras de la serie HM son sensibles a ciertas subtilisinas producidas por AR1T y AR2 lo que nos obligaba a complicar el sistema de transfección añadiendo un antibiótico a las placas de medio sólido. No cabe duda de que la simplificación máxima se conseguiría utilizando como estirpe indicadora la propia estirpe receptora del DNA, sin embarco resulta obvio, de la observación del cuadro 8, que, excepto la estirpe MC-1, las restantes son resistentes en cierta medida a la infección fagica lo que impide el empleo de estas estirpes como indicadoras. Por otra parte de los resultados expuestos en el cuadro 9 se deduce que la estirpe MC-1 no entra en competencia en el medio BWC siendo ésta una de las razones por las que nos vemos obligados a prescindir de la estirpe MC-1 en los experimentos de transfección.

El conjunto de resultados que hemos comentado a lo largo del presente capítulo nos han servido para determinar las condiciones óptimas de trabajo que nos servirían para abordar el estudio de la regulación de la competencia. Estas condiciones, resumidas en el capítulo anterior, son las siguientes:

- a) Las estirpes receptoras, como se deduce de los cuadros 7 y 9, han de ser AR1 (para los experimentos de transformación) o bien AR1T (para los de transfección) ya que son estas estirpes las que presentan los niveles mas altos de competencia.
- b) Para desarrollar el estado de competencia se ha de emplear el método de Bott y Wilson pues como se desprende de los

cuadros 7 y 9 no existen diferencias notables en los niveles de competencia de las células ARI ó ARIT puesto de manifiesto por transformación o transfección respectivamente, Una de las razones mas importantes para decidirnos a no utilizar el procedimiento de ANAGNOSTOPOULOS y SPIZIZEN para desarrollar la competencia, es que este método implica el cambiar de medio de cultivo, lo cual dificultaría extraordinariamente su empleo en quimostato en la realización de los estudios de regulación que nos habiamos propuesto llevar a cabo.

c) Cuando se añada a las células competentes DNA bacteriano, debe hacerse a una concentración superior a  $0,2 \mu\text{gr/ml}$  (Fig. 13). En los experimentos de transfección, el DNA a utilizar será el del bacteriofago SPPI (Fig. 16) a una concentración superior a  $5 \mu\text{gr/ml}$  (Fig. 14).

d) En todos los experimentos para poner de manifiesto la competencia, la incubación de las células receptoras con el DNA se ha de hacer en agitación (Cuadro 6) prolongandose esta durante 30 minutos (Figs. 15 y 16).

e) En cuanto a la estirpe indicadora que ha de emplearse en las experiencias de transfección será la MC-1 (Cuadro 8).

## 2. Tiempo de duplicación y competencia

El examen de la Fig. 21 pone de manifiesto las variaciones de la frecuencia de transformación con respecto a los valores de la

tasa de multiplicación estudiado en cultivos ordinarios. Las Figs. 22 y siguientes demuestran la eficacia del uso del cultivo continuo para estudiar la transformación y la transfección de B. subtilis multiplicándose en medios definidos como el BWC. BOTT y WILSON (1968) habian manifestado que el estado competente estaba asociado con una fase específica del desarrollo y que una alteración de la tasa de multiplicación en la fase logaritmica tenía un efecto muy pequeño sobre el desarrollo de la competencia.

Nuestros resultados (Figs. 22 y 23) indican que en cultivo continuo el desarrollo de la competencia, fuertemente influido por la tasa de multiplicación, muestra frecuencias máximas a tiempos de duplicación 2,5 h y 6,5 h en nuestras condiciones experimentales.

Por otra parte, BOTT y WILSON (1967) han encontrado que en ausencia de aminoácidos estimulantes (medio BWI), la frecuencia máxima de competencia disminuye mas de un 30% con respecto a la obtenida en medio suplementado BWC. Por el contrario, nosotros observamos (Fig. 25) que a un tiempo de duplicación de 2,5 h la máxima competencia permanece inalterada o es ligeramente estimulada cuando las bacterias receptoras se multiplican en medio BWI, mientras que a tiempos de duplicación superiores a 4,5 h, el estado de competencia desaparece por completo.

Estos resultados podian sugerir que cuando las bacterias se estan multiplicando en cultivo continuo a un tiempo de duplicación de 2,5 h las condiciones fisiológicas que conducen a la competencia

difieren marcadamente de aquellas que conducen a la competencia en cultivos ordinarios. Esta conclusión está reforzada por el hecho de que la pre-esporulación es muy baja al tiempo de duplicación anteriormente citado (Fig. 24). La baja tasa de pre-esporulación cuando la competencia es muy alta, no concuerda con la sugerencia hecha por algunos autores (SPIZIZEN y cols. 1967) de que la pre-esporulación tiene un efecto positivo sobre el desarrollo de la competencia.

Mas aún, cuando estos experimentos se llevaron a cabo en presencia de 50  $\mu$  gr/ml de ácido L-glutámico o bien de L-alanina (aminoácidos inhibidores) en el quimostato, como se muestra en la Fig. 26, un agudo incremento en el nivel de competencia fue detectado a un tiempo de duplicación de 2,5 h mientras que a tiempos de duplicación de 6,5 h el estado competente fue claramente inhibido.

Si las curvas de competencia se hacian en presencia de 50  $\mu$  gr/ml de L-arginina o L-histidina (aminoácidos estimulantes) se obtiene un fenómeno inverso (Fig. 27). Es decir, a un tiempo de duplicación de 2,5 h, el nivel de competencia era fuertemente inhibido, pero fue estimulado cuando las bacterias se multiplicaban a un tiempo de duplicación de 6,5 h.

Todo lo anteriormente expuesto parece demostrar claramente que el fenómeno de la competencia es completamente independiente del ciclo del ácido cítrico, puesto que el ácido L-glutámico y la L-alanina son inhibidores específicos de la aconitasa (HANSON y cols. 1968).

Mas todavia, el hecho de que la arginina estimule la competencia a un tiempo de duplicación 6,5 h, contradice completamente la suposición de FELKNER (1970) de que un ciclo del ácido citrico intacto es necesario para la consecución del estado de competencia. Estos resultados, como se puede ver, indican que la competencia está decididamente mas influenciada por el tiempo de duplicación que por un ciclo de Krebs intacto.

De los datos presentados podemos concluir que las vias que conducen a la competencia, para los tiempos de duplicación de 2,5 h y 6,5 h, son completamente diferentes. La forma de alcanzar el estado competente a un tiempo de duplicación de 6,5 h es similar a las condiciones que elevan a este mismo estado en cultivos ordinarios. Esta afirmación está apoyada por el efecto de ciertos aminoácidos sobre la expresión final de la competencia. Estas conclusiones podrían estar relacionadas con aquellas expuestas por EPHRATI-ELIZUR (1968) en cultivos ordinarios quienes surgió que la competencia en la fase logaritmica temprana podía diferir en algunos aspectos importantes de la competencia en la fase estacionaria temprana. Finalmente, nuestros estudios sugieren algunas modificaciones al modelo propuesto por ERICKSON (1970) en el sistema de transformación de B. subtilis, ya que mientras este autor excluye a la transformación como un mecanismo evolutivo en este microorganismo, nosotros hemos encontrado que las células receptoras, multiplicandose activamente en un quimostato, pueden incorporar DNA y son capaces de expresar marcadores genético.

### 3. El estado de competencia y su regulación

De los resultados expuestos en las Figs. 31, 32 y 33 se aprecia como inmediatamente después de añadir al quimostato el ácido L-glutámico tiene lugar una inhibición brusca de la transfectabilidad, inhibición que es mas acentuada en el caso de la Fig. 33 cuando la concentración de ácido L-glutámico era de 50<sup>μ</sup> gr/ml. Si tenemos en cuenta el modelo recientemente descrito por PIERSON y cols. (1972) para B. subtilis, según el cual se postula la existencia de dos factores, uno fuertemente unido a la pared, capaz de liberarse el medio por choque osmótico que podríamos considerar como equivalente a los "lugares" ("sites") de unión del DNA, y otros un factor proteico que se libera en el medio (factor de competencia), cuya interacción da lugar a "sites" actuados susceptibles de unir DNA exógeno, podemos interpretar estos resultados como consecuencia de una interacción del glutámico con los lugares de unión del DNA a la superficie bacteriana impidiendo de este modo que las moléculas transfectantes se fijen de una manera irreversible a la pared celular.

La gradual recuperación del estado de competencia podría ser explicada suponiendo que el ácido L-glutámico dereprime alguna región del DNA celular cuya secuencia de bases codifica polipéptidos implicados en la síntesis del factor de competencia siguiendo un modelo similar al modelo del operón de JACOB y MONOD, de este modo, a pesar de que el glutámico bloquea los lugares de unión del DNA fágico con la superficie celular, el aumento de FC sintetizado impediría la

manifestación del efecto inhibitorio que produce el gentámico en cultivos ordinarios, o cuando las células se multiplican a un  $td = 6,5$  h.

Hay que tener en cuenta además, que en las condiciones fisiológicas anteriormente apuntadas ( $td = 6,5$  h o en cultivos ordinarios) se han podido sintetizar ciertas sustancias de naturaleza inhibitoria que no están presentes a  $td = 2,5$  h lo que haría más notorio el efecto inhibitor del ácido L-glutámico sobre el desarrollo de la competencia.

En cuanto a la recuperación del nivel de competencia en las 3 primeras horas después de la adición del ácido L-glutámico podría ser debido a la heterogeneidad de la población celular, en el sentido de que el DNA fágico podría fijarse a la pared bacteriana de una manera irreversible en presencia de un precursor del factor de competencia es decir de una sustancia de naturaleza proteica que no hubiera adquirido su estructura definitiva, transcurrido ese tiempo, y teniendo presente que el  $td = 2,5$  h, la población celular como un todo manifiesta inhibición.

En la Fig. 34 se presentan los resultados obtenidos al añadir al quimostato  $50 \mu$  gr/ml de L-arginina, en este caso la hipótesis para explicar la inhibición de la transfectabilidad sería esencialmente la misma que hemos señalado para el ácido glutámico con la diferencia de que la arginina actuaría como represor, en vez de como

inductor, de la síntesis del FC. Del mismo modo que en las consideraciones precedentes, la inhibición no alcanzaría los niveles definitivos hasta transcurrido un cierto tiempo debido a que el cultivo no está sincronizado siendo la población celular heterogénea. Esto explicaría el efecto inhibitorio de la arginina a  $t_d = 2,5$  h pero no la estimulación que origina a  $t_d = 6,5$  hr.

En definitiva y teniendo en cuenta los datos presentados en las figuras 26 a 34 resulta evidente que el desarrollo de la competencia presenta fluctuaciones y alteraciones notables y contrapuestas según estén presentes en el medio de cultivo aminoácidos que forman parte de la pared celular de B. subtilis mayoritaria (ácido L-glutámico y L-alanina) o bien minoritariamente (L-arginina y L-histidina) regulando la capacidad de las células para incorporar DNA exógeno, éste es su competencia. Como ya hemos mencionado repetidas veces a lo largo de este trabajo, el estado de competencia puede ser el resultado final de un gran número de fenómenos o de procesos bioquímicos que permanecen hasta el momento desconocidos por lo que la interpretación de los resultados obtenidos en los experimentos descritos en presencia de aminoácidos deberán continuarse y así después de exhaustivos estudios posteriores dirigidos a corroborar o rechazar interpretaciones como las señaladas anteriormente se podrán esclarecer definitivamente el oscuro fenómeno de la competencia. Sin embargo, trabajos actuales llevados a cabo en nuestro laboratorio y cuyos resultados se han obtenido durante la redacción de esta memoria, por

lo cual no figuran en ella, demuestran que el efecto que sobre células de baja competencia tiene el sobrenadante de células que se estaban multiplicando en un quimostato a td de 2,5 hr en presencia de 50  $\mu$ gr/ml de L-arginina, es marcadamente inferior que el descrito por JOENJE y cols. (1972) lo que es un dato mas que apoya la conclusión apuntada anteriormente de que por lo menos uno de los efectos regulatorios que puede tener la arginina sobre el desarrollo de la competencia podría ser afectando la biosíntesis del factor de competencia.

Por otra parte, ELLWOOD (1970) ha encontrado una clara influencia del tiempo de duplicación sobre la composición de la pared de células de B. subtilis multiplicandose en quimostato. Esto unido al hecho de que las paredes celulares de las bacterias competentes y no competentes difieren marcadamente en sus propiedades químicas (YOUNG y cols. 1963) e inmunológicas (TOMASZ, 1970) apoyaría la conclusión de que el efecto contrapuesto que ejerce un mismo aminoácido sobre la capacidad de competencia td de 2,5 h y de 6,5 hr, se pueda deber además de un efecto regulador de la biosíntesis del FC, a una influencia variable y asimismo de tipo regulador, sobre ambos tipos de poblaciones (competente y no competente), dependiendo tal efecto de las condiciones fisiológicas de las células que vienen determinadas principalmente por su constante de multiplicación. Dicho en otras palabras, la influencia que podría ejercer la presencia de un determinado aminoácido sobre la biosíntesis de un "site" a td 2,5 h

sería despreciable mientras que tal influencia aparecería como crítica a  $t_d$  de 6,5 hr, o a la inversa. Si se admite tal hipótesis los aminoácidos mayoritarios en composición de la pared celular, ejercen un efecto inhibitor sobre los "sites" a tal de 6,5 hr, mientras que los minoritarios no influyen sobre los mismos de forma significativa, siendo esta una situación similar a la que aparece en cultivos ordinarios (BOTT y cols. 1968).

Es importante hacer notar que a pesar de suponer que existe un bloqueo por parte de la arginina y del ácido glutámico sobre los lugares de unión del DNA a la pared celular, podrían muy bien estos aminoácidos afectar a cualquiera de los pasos subsiguientes alterando igualmente la expresión de la competencia. En este sentido queremos indicar que solo hemos pretendido iniciar una línea de investigación que en modo alguno hemos cerrado con la finalización de esta memoria, por el contrario las posibilidades que nos ofrece el empleo del cultivo continuo en este campo y que han quedado patentes a lo largo del trabajo, sirven para que elaboremos programas de investigación futura cuyo final por el momento no es previsible.

Cabe señalar como metas inmediatas, algunas de las cuales están en vías de solución, el aislamiento o detección del factor de competencia, el análisis fino de las alteraciones de pared en función del tiempo de duplicación de la bacteria en ausencia o presencia de aminoácidos así como las posibles modificaciones que tales alteraciones pudieran ejercer sobre la unión irreversible del DNA

a la pared, datos que han de contribuir al esclarecimiento de los procesos de incorporación de macromoléculas informativas a células vivas uno de los puntos clave en las modernas investigaciones de la Biología Molecular.

## VIII. RESUMEN Y CONCLUSIONES

En la presente memoria de tesis nos hemos propuesto contribuir al estudio del problema de la incorporación a células vivas de macromoléculas con capacidad informativa; hemos elegido para ello el sistema de transformación bacteriana por encontrar entre otras razones que en el se presentan una serie de características que le hacen idoneo para este tipo de estudios como son la obtención relativamente sencilla de poblaciones en estado de competencia así como la facilidad para conseguir DNA altamente purificado a través de métodos muy asequibles en la actualidad. Para ello hemos realizado en primer lugar un estudio bibliográfico en el que se recogen, dentro de la rica bibliografía que se posee sobre el tema, datos sobre los mecanismos habituales de intercambio genético en bacteriología, dando especial énfasis a la transformación bacteriana.

El estudio realizado sobre transformación lo hemos dividido atendiendo a las diversas etapas por las que atraviesa el DNA donador desde el momento en que se añade al cultivo bacteriano hasta que llega a ser incorporado al patrimonio genético de la célula receptora y es expresado como tal. Dentro de todas y cada una de tales etapas se relacionan los factores que aporta la célula competente o

las alteraciones que sufre la misma para llegar a ser reconocida por el DNA donador; por otra parte, también se señalan las características que este material genético ha de poseer para llegar a ser incorporado a la célula.

Este estudio bibliografico en el cual hemos procurado dar lugar preponderante a la incorporación del DNA nos mostró claramente las multiples lagunas aún existentes en el conocimiento íntimo de la transformación bacteriana y nos llevó al planteamiento de un protocolo experimental en el que se han obtenido datos acerca de:

1.- Estirpes de B. subtilis mas idoneos para estudios de transformación o transfección.

2.- Elección del medio de cultivo mas adecuado para el desarrollo optimo del estado de competencia teniendo en cuenta que este ha de ser muy simple para permitirnos estudios de regulación en cultivo continuo.

3.- Se han puesto a punto diversos métodos, descritos en la literatura, para la obtención y purificación de DNA bacteriano y de DNA fágico.

4.- Con vistas a las experiencias en cultivo continuo se realizaron pruebas comparativas entre transformación y transfección para conocer cual de las dos sistemas reportaba mayores ventajas en el estudio de la incorporación del DNA exogeno.

5.- Dentro de los dos sistemas señalados se determinaron las respectivas cinéticas de incorporación de DNA a la célula competente.

6.- Determinación de las condiciones necesarias para el desarrollo de un procedimiento, mediante cultivo continuo, para mantener las células, indefinidamente, en estado de competencia puesto de manifiesto por transformación y por transfección.

7.- Estudio de la relación existente entre el tiempo de duplicación y el desarrollo de la competencia.

8.- Mediante ensayos realizados en cultivo continuo en presencia de determinados aminoácidos en el medio de cultivo o a través de la determinación del número de preesporas se estudia la influencia que determinadas vías metabólicas consideradas hasta hoy como imprescindibles, ejercen en el desarrollo de la competencia.

9.- Finalmente se estudia la influencia que ejercen determinados aminoácidos, anteriormente considerados a través de estudios en cultivos ordinarios como estimulantes e inhibidores de la competencia, sobre el desarrollo de la misma a diferentes tiempos de duplicación. Asimismo, dentro de estos tiempos de duplicación se investigó la influencia temprana y tardía de los aminoácidos sobre la competencia.

Los resultados obtenidos en las experiencias que se indican en el resumen anterior nos permiten concluir que: la estirpe AR-1 es la más idónea para estudios de transformación, mientras que la AR1T, derivada de la anterior, es la indicada en experiencias de transfección.

Dentro de la amplia gama de medios de cultivo conocidos para conseguir que las células de B. subtilis alcancen el estado de competencia nuestros resultados aconsejan el empleo del medio de BOTT y WILSON ya que une a su gran sencillez y eficacia el que las células desarrollan a competencia sin necesidad de recurrir a un procedimiento de "step-down". Por otra parte, en estudios realizados en cultivo continuo para tiempos de duplicación bajos se recomienda el empleo de una modificación del medio de BOTT y WILSON que simplifican la composición del mismo quedando reducido a glucosa y sales, lo cual le hace idóneo para realizar estudios de regulación.

Se han establecido las condiciones necesarias para la elección del factor limitante en estirpes de B. subtilis mutantes o de genotipo salvaje siendo la histidina el factor limitante en experiencias de transformación realizadas en cultivo continuo empleando la estirpe AR1 ( $his_2^- trp_2^-$ ) y la glucosa en las experiencias de transfección con la estirpe salvaje AR1T.

Nuestros resultados demuestran que B. subtilis multiplicándose en quimostato en las condiciones señaladas alcanzan estado de

competencia que se mantiene constante para cada tiempo de duplicación una vez alcanzado el equilibrio del cultivo.

Dentro de los márgenes determinados por nuestras condiciones experimentales los valores de competencia encontrados muestran dos máximos a tiempos de duplicación de 2,5 hr y de 6,5 hr, siendo mas elevado el primero. Los valores de transformabilidad o de transfectabilidad encontrados son siempre inferiores a aquellos obtenidos en cultivos en agitación en la fase estacionaria temprana (1%). Sin embargo, a tiempos de duplicación de 2,5 hr se alcanzan valores del orden de 0,1%.

Habida cuenta de las precarias condiciones en las cuales se desarrollan las células de B. subtilis en quimostato que condicionan los procesos de integración y expresión del DNA donador nuestros resultados aconsejan el empleo de la transfección como medio optimo para estudios de incorporación.

Basandonos en la influencia que determinados aminoácidos (que intervienen en el ciclo del acido tricarboxilico) ejercen sobre el desarrollo de la competencia y en la aparición de preesporas a diferentes tiempos de duplicación hemos podido descontar, en contra de los resultados existentes en la literatura, una influencia directa del ciclo de Krebs en el desarrollo de la competencia en B. subtilis.

Por último las experiencias realizadas a tiempos de duplicación de 2,5 hr y 6,5 hr demuestra que determinados aminoácidos

mayoritarios en cuanto a su contenido en la pared celular de B. subtilis y considerados hasta hoy como inhibidores de la competencia pueden en otras condiciones fisiológicas, estimular o no afectar el desarrollo de la misma; inversamente, aminoácidos considerados como estimulantes en cultivos agitados pueden ejercer un efecto inhibitorio. Nuestros primeros resultados parecen indicar que este efecto inhibitorio o estimulante sobre la transfecibilidad podría estar localizado a diferentes niveles, es decir en la biosíntesis del factor de competencia o bien alternando los lugares de fijación del DNA ("sites") de forma contrapuesta según sean las condiciones fisiológicas a las cuales se desarrolla la célula receptora.

De cuanto hemos dicho anteriormente creemos que con el desarrollo de estudios de transformación bacteriana sobre células puestas en estado de competencia a diferentes tiempos de duplicación mediante el empleo de cultivo continuo hemos establecido un sistema con indudables ventajas que nos permite abordar desde una nueva perspectiva el problema de la competencia, particularmente en lo que se refiere a los procesos de regulación envueltos en la misma que hasta hoy han tropezado con inconvenientes insalvables en los estudios realizados sobre cultivos en agitación.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.- ABEL, P. y TRAUTNER, T.A. (1964) Z. Vererbungsl. 95, 66. Ref. SPATZ y TRAUTNER (1970)
- 2.- ANAGNOSTOPOULOS, C. y CRAWFORD, I.P. (1961). Transformation studies on the linkage of markers in the tryptophan pathway in Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 368
- 3.- ANAGNOSTOPOULOS, C. y SPIZIZEN, J. (1961) Requirements for transformation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 81, 741
- 4.- AKRIGG, A. y AYAD, S.R. (1970) Studies on the competence-inducing factor of Bacillus subtilis. Biochem. J. 117, 397
- 5.- AKRIGG, A., AYAD, S.R. y BARKER, G.R. (1967) The nature of a competence inducing factor in Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun. 28, 1062
- 6.- AOKI, H., SAITO, H. e IKEDA, Y. (1963) Transduction and transformation between Bacillus subtilis and Bacillus natto. J. gen. Appl. Microbiol. 9, 307
- 7.- ARCHER, L.J. (1970) Genetica Molecular (apuntes del II Curso de Genética Molecular) Fundação Calouste Gulbenkian. Estudos Avançados de Oeiras. Oeiras (Portugal)
- 8.- AVERY, O.T., MCLEOD, C.M. y McCARTY, M. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. I. Induction of transformation by a deoxyribonucleic acid fraction isolated from Pneumococcus type III. J. Exptl. Med. 76, 25
- 9.- BARAT, M., ANAGNOSTOPOULOS, C. y SCHNEIDER, A.M. (1965) Linkage relationships of genes controlling isoleucine, valine and leucine biosynthesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 90, 357
- 10.- BARNHART, B.J. y HERRIOTT, R.M. (1963) Penetration of deoxyribonucleic acid into Hemophilus influenzae. Biochim. Biophys. Acta. 76, 25

- 11.- BECKER, E.F. Jr, ZIMMERMAN, B.K. y GEIBUSCHEK, E.P. (1964) Structure and function of cross-linked DNA. I. Reversible denaturation and Bacillus subtilis transformation. J. Mol. Biol. 8, 377
- 12.- BODMER, W.F. (1965). Recombination and integration in Bacillus subtilis: Involvement of DNA synthesis . J. Mol. Biol. 14, 534
- 13.- BODMER, W.F. (1966) Integration of deoxyribonuclease treated DNA in Bacillus subtilis transformation. J. gen. Physiol. 49, 223
- 14.- BODMER, W. y GANESAN, A.T. (1964) Biochemical and genetic studies of integration and recombination in Bacillus subtilis transformation. Genetics 50, 717
- 15.- BOTT, K.F. y WILSON, G.A. (1967) Development of competence in the Bacillus subtilis transformation system. J. Bacteriol. 94, 562
- 16.- BOTT, K.F. y WILSON, G.A. (1968) Metabolic and nutritional factors influencing the development of competence for transfection of Bacillus subtilis. Bact. Rev. 32, 370
- 17.- BRANEFORS, P. (1964) Transformation of streptomycin resistance in Bordetella pertusis. Acta. pathol. microbiol. scand. 62, 249
- 18.- BRAUN, W. (1965) Bacterial genetics Philadelphia. W.B. Saunders. Co.
- 19.- BRENNER, S. y HORNE, R.W. (1959) A negative staining method for high resolution electron microscopy of viruses. Biochim. Biophys. Acta 34, 103
- 20.- BERKHOLDER, P.R. y GILES, N.H. (1947) Induced biochemical mutations in B. subtilis. Amer. J. Bot. 34, 345
- 21.- BURTON, K. (1956) A study of the conditions and mechanism of the diphenylamine reaction for the colorimetric estimation of deoxyribonucleic acid. Biochem. J. 62, 315
- 22.- CATLIN, B.W. (1960) Transformation of Neisseria meningitidis by deoxyribonucleates from cells and from culture slime. J. Bacteriol. 79, 579

- 23.- CATO, A. y GUILD, W.R. (1968) Transformation and DNA size. I. Activity of fragments of defined size and a fit to a random double cross over model. *J. Mol. Biol.* 37, 157
- 24.- CHARPAK, M., DEDONDER, R.M. (1965) Production d'un "facteur de competence" soluble par Bacillus subtilis ind<sup>-</sup> 168 . C. *R. Acad. Sci. (Paris)*, 260, 5638
- 25.- CHILTON, M.D. (1967) Transforming activity in both complementary strands of Bacillus subtilis DNA. *Science* 157, 817
- 26.- CLARK, P.H. y LILLY, M.D. (1969) En: 19th Symp. Soc. for gen. Microbiol. London at the Univ. Press. pag. 113
- 27.- DARLINGTON, C.D. (1935) The time, place and action of crossing-over. *J. genet.* 31, 185
- 28.- DAVIDOFF-ABELSON, R. y DUBNAU, D. (1971) Fate of transforming DNA after uptake by competent B. subtilis: Failure of donor DNA to replicate in a recombination deficient recipient. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 68, 1070
- 29.- DAWES, I.W. y THORNLEY, J.H.M. (1970) Sporulation in Bacillus subtilis. Theoretical and Experimental Studies in Continuous Culture Systems. *J. gen. Microbiol.* 62, 49
- 30.- DAWES, I.W. y MANDELSTAN, J. (1970) Sporulation of Bacillus subtilis in continuous culture. *J. Bacteriol.* 103, 529
- 31.- DENNIS, E.S. y WAKE, R.G. (1968) The Bacillus subtilis genome; studies on its size and structure. En Symposium on replication and recombination of genetic material. W.J. Peacock y R.D. Brook editors. Canberra. Australian Acad. Sci. pag. 61
- 32.- DOOLEY, D.C., HADDEN, C.T. y NESTER, E.W. (1971) Macromolecular synthesis in B. subtilis during development of the competent state. *J. Bacteriol.* 108, 668
- 33.- DUBNAU, D. y DAVIDOFF-ABELSON, R. (1971) Fate of transforming DNA following uptake by competent B. subtilis. I. Formation and properties of the donor-recipient complex. *J. Mol. Biol.* 56, 209
- 34.- EBERLE, H., y LARK, E.G. (1967) Chromosome replication in B. subtilis cultures growing at different rates. *Proc. Nat. Acad. Sci. (Washington)* 57, 95

- 35.- ELLWOOD, D.C. (1970) The wall content and Composition of B. subtilis var. niger grown in a chemostat. Biochem. J. 118, 367
- 36.- EPHRATI-ELIZUR, E. (1965) Development of competence for transformation experiments in an overnight culture of germinating spores of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 90, 550
- 37.- EPHRATI-ELIZUR, E. (1968) Spontaneous transformation in Bacillus subtilis. Genet. Res. 11, 83
- 38.- EPHRATI-ELIZUR, E. y FOX, M.S. (1961) Comparison of transduction versus transformation of linked markers of Bacillus subtilis Nature 192, 433
- 39.- EPHRATI-ELIZUR, H.E. (1960) On the biological functions of deoxyribonucleic acid. En: Microbial Genetics. W. Hayes y R.C. Clowes editors, Cambridge. The University Press Pag. 132
- 40.- EPHRUSSI-TAYLOR, H.E. (1966) Genetic recombination in DNA induced transformation of Pneumococccys. IV. The pattern of transmission and phenotypic expression of high and low-efficiency donor sites in the ami A locus. Genetics. 54, 211
- 41.- EPHRUSSI-TAYLOR, H.E. y GRAY, T.C. (1966) Genetic studies of recombining DNA in pneumococcal transformation. En: Proc. of Sym. on Macromolecular Metabolism, Little Brown and Co. Boston pag. 211
- 42.- ERICKSON, R.J. (1970) New ideas and data on competence and DNA entry in transformation of B. subtilis. Current Topics in Microbial and Immunol. 53, 149
- 43.- ERICKSON, R.J. y BRAUM, W. (1968) Apparent dependence of transformation on the stage of DNA replication of recipient cells. Bact. Rev. 32, 291
- 44.- EVANS, E.A., MACKAL, R.P. y COLEMAN, L. (1962) Infection of protoplasts whit DNA from the virulent bacteriophage T1. Fed. Proc. 21, 456
- 45.- FARMER, J.L. y ROTHMAN, F. (1965). Transformable thymine-requiring mutant of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89, 262
- 46.- FELKNER, I.C. y WYSS, O. (1970) Regulation of competence development in Bacillus subtilis. Biochem. Biophy. Res. Commun. 41, 901

- 47.- FÖLDES, J y TRAUTNER, T.A. (1964) Infectious DNA from a newly isolated B. subtilis phage. Z. Vererbungsl. 95, 57
- 48.- FOLSOME, C.E. (1968) Deoxyribonucleate binding and transformation in mycoplasma laidlawii. J. gen. Microbiol. 50, 43
- 49.- FOX, M.S. (1960) Fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. Nature 187, 1004
- 50.- FOX, M.S. y ALLEN, M.K. (1964) On the mechanism of deoxyribonucleate integration in Pneumococcus transformation. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 52, 412
- 51.- FOX, M.S. y HOTCHKISS, R. (1957) Initiation of bacterial transformation. Nature 179, 1322
- 52.- FOX, M.S. y HOTCHKISS, R. (1960). Fate of transforming deoxyribonucleate following fixation by transformable bacteria. Nature 187, 1002
- 53.- GANESAN, A.T. (1967) Particulate fractions in macromolecular synthesis and genetic transformation pags. 19-47. En: Organizational biosynthesis (Eds. H.J. Vogel, J.O. Lampen y V. Brison) New York. Academic Press. 1967
- 54.- GEIDUSCHEK, E.P. (1961) Reversible DNA. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 950
- 55.- GERMANNE, G.R. y ANDERSON, D.L. (1966) Binding of homologous polymerized deoxyribonucleic acid by streptomyces griseus. J. Bacteriol. 92, 662
- 56.- GHEI, O.K. y LACKS, S.A. (1967) Recovery of donor deoxyribonucleic acid marker activity from eclipse in pneumococcal transformation. J. Bacteriol. 93, 816
- 57.- GOLLAKOTA, K.G. y HALVORSON, H.O. (1960) Biochemical changes occurring during sporulation of Bacillus cereus. J. Bacteriol. 79, 1
- 58.- GOODGAL, S.H. y HERRIOTT, R.M. (1957) Studies on transformation of Hemophilus influenzae. En. The chemical Basis of Heredity Jhons Hopkins Press. Baltimore pag. 336
- 59.- GOODGAL, S.H. y HERRIOTT, R.M. (1961) Studies on transformation of Hemophilus influenzae. II. The molecular weight of transforming DNA by sedimentation and diffusion measurements. J. gen. Physiol. 44, 1229

- 60.- GRIFFITH, F. (1928) The significance of pneumococcal types. J. Hyg. XXVII, 113
- 61.- GUTHRIE G.D. y SINSHEIMER, R.L. (1960) Infection of protoplasts of E. coli by subviral particles of bacteriophage  $\phi$  x 174. J. Mol. Biol. 2, 297
- 62.- HANSON, R.S. y COX, D.P. (1967) Effect of different nutritional conditions on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. J. Bacteriol. 93, 1777
- 63.- HAYES, W. (1964) The genetics of bacterial and their viruses. Studies in Basic Genetics and Molecular Biology. Jhon Wiley and Sons. Inc. New York, pag. 496
- 64.- HERBERT, D., ELSWORTH, R. y TELLING, R.C. (1956) The continuous culture of bacteria; a theoretical and experimental astudy. J. gen. Microbiol. 14, 601
- 65.- HERRIOTT, R.M. (1961) Formation of heterozygotes by annealing a mixture of DNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 47, 146
- 66.- HIROKAWA, H. (1972) Transfecting deoxyribonucleic acid of Bacillus Bacteriophage  $\phi$ -29 that is protease sensitive. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S. 69, 1555
- 67.- HIROKAWA, H. e IKEDA, Y. (1966) Genetic recombination of transforming deoxyribonucleic acid molecules with the recipient genome and among themselves in protoplasts of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 92, 455
- 68.- HOFSCHEIDER, P.H. (1960) Veber ein infektiöses desoxyribonucleinsäure-agens aus dem phagen  $\phi$  x 174. Z. Naturforschung 15b, 441
- 69.- HORVATH, S. (1967) Development of competence in cultures of Bacillus subtilis inoculated with different numbers of bacteria. J. gen. Microbiol. 48, 215
- 70.- HOTCHKISS, R.D. (1954) Cyclical behavior in pneumococcal growth and transformability occasioned by environmental changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 40, 49
- 71.- HOTCHKISS, R.D. (1957) Criteria for quantitative genetic transformation of bacteria. En: The Chemical Basis of Heredity Johns Hopkins Press, Baltimore, pag. 321

- 72.- IJIMA, T. e IKEDA, Y. (1963) Transduction of amylase productivity of *Bacillus subtilis* by bacteriophage. *J. gen. Appl. Microbiol.* 9, 97
- 73.- IKEDA, H. y TOMIZAWA, J. (1965) Transducing fragments in generalized transduction by phage Pl. II. Association of DNA and protein in the fragments. *J. Mol. Biol.* 14, 110
- 74.- IYER, V.N. (1962) Application of the membrane filter for the quantitative study of transformations with particular reference to phenotypic expression of an erythromycin resistance mutation. *J. Bacteriol.* 84, 326
- 75.- JAVOR, G.T. y TOMASZ, A. (1968) An autoradiographic study of genetic transformation. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 60, 1216
- 76.- JENSEN, R.A. y HAAS, F.L. (1962) Quantitative studies on the expression of a transformed character in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* 61, 963
- 77.- JENSEN, R.A. y HAAS, F.L. (1963 a) Electrokinetics and cell physiology. I. Experimental basis for electrokinetic cell studies. *J. Bacteriol.* 86, 73
- 78.- JENSEN, R.A. y HAAS, F.L. (1963 b) Electrokinetics and cell physiology. II. Relationship of surface change to onset of bacterial competence for genetic transformation. *J. Bacteriol.* 86, 79
- 79.- JOENJE, H., GRUBER, M. y VENEMA, G. (1972) Stimulation of the development of competence by culture fluids in *B. subtilis* transformation. *Biochem. Biophys. Acta* 262, 189
- 80.- KAISER, A.D. y HOGNESS, D.S. (1960) The transformation of *E. coli* with deoxyribonucleic acid isolated from bacteriophage dg. *J. Mol. Biol.* 2, 392
- 81.- KAMMEN, H.O., BELOFF, R.H. y CANELLAKIS, E.S. (1966 a) Transformation in *B. subtilis*. I. Role of amino acids in stabilization of transformants. *Biochim. Biophys. Acta* 123, 39
- 82.- KAMMEN, H.O., BELOFF, R.H. y CANELLAKIS, E.S. (1966 b). Transformation in *B. subtilis* II. The development and maintenance of the competent state. *Biochim. Biophys. Acta* 123, 56
- 83.- KENT, J.L. y HOTCHKISS, R.D. (1964) Kinetic analysis of multiple linked recombinations in pneumococcal transformation. *J. Mol. Biol.* 9, 308

- 84.- KOHIYAMA, M. y SAITO, H. (1960) Stimulation of Genetic transformation in *B. subtilis* by biologically inactive DNA and polyphosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 41, 180
- 85.- LACKS, S. (1962) Molecular fate of DNA in genetic transformation *J. Mol. Biol.* 5, 119
- 86.- LACKS, S. (1966) Integration efficiency and genetic recombination in pneumococcal transformation. *Genetics.* 53, 207
- 87.- LACKS, S. y HOTCHKISS, R.D. (1960) Formation of anylomaltase after genetic transformation of *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 45, 155
- 88.- LARK, K.G. (1966) Regulation of chromosome replication and segregation in Bacteria. *Bact. Rev.* 30, 3
- 89.- LEDERBERG, J. (1955) Recombination mechanism in bacteria. *J. Cellular Compt. Physiol.* 45, Suppl. 2, 75
- 90.- LEDERBERG, J. y TATUM, E.L. (1946) Novel genotypes in mixed cultures of biochemical mutants of bacteria. *Cold. Spring. Harbor Symp. Quant. Biol.* 11, 113
- 91.- LEIDY, G., JAFEE, I. y ALEXANDER, H.E. (1962) Emergence of competence (for transformation) of three *Hemophilus* species in a chemically defined environment. *Proc. Soc. Exptl. Biol. Med.* 102, 86
- 92.- LEONARD, C.G., MATTHEIS, D.K., MATTHEIS, M.J. y HOUSEWRIGHT, R.D. (1964) Transformation to prototrophy and polyglutamic acid synthesis in *Bacillus licheniformis*. *J. Bacteriol.* 88, 220
- 93.- LERMAN, L.S. y TOLMACH, L.J. (1957) Genetic transformation. I. Cellular incorporation of DNA accompanying transformation in *Pneumococcus*. *Biochim. Biophys. Acta* 28, 68
- 94.- LERMAN, L.S. y TOLMACH, L.J. (1959) Genetic transformation. II. The significance of damage to the DNA molecule. *Biochim. Biophys. Acta* 33, 371
- 95.- LEVINE, J.S. y STRAUSS, N. (1965) Lag period characterizing the entry of transforming deoxyribonucleic acid in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 89, 281
- 96.- LEVINTHAL, C., DAVISON, P. (1961) Degradation of deoxyribonucleic acid under hydrodynamic shearing forces. *J. Mol. Biol.* 3, 674

- 97.- LIE, S. (1965) Studies on thenotypic expression of competence in Neisseria meningitidis. Acta Pathol. Microbiol. Scand. 64, 119
- 98.- LUZZATTI, V., MASSON, F. y LERMAN, L.S. (1961) Interaction of DNA and proplavine: A small angle x-Ray scattering study. J. Mol. Biol. 3, 634
- 99.- McCARTHY, C. y NESTER, E.W. (1967) Macromolecular synthesis in newly transformed cells of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 94, 131
- 100.- McCARTY, M., TAYLOR, H.E. y AVERY, O.T. (1946) Biochemical studies of environmental factors essential in transformation of pneumococcal types. Cold. Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 11, 177
- 101.- MAHLER I., CAHOON, M. y MARMUR, J. (1964) Bacillus subtilis deoxyribonucleic acid transfer in PBS2 transduction. J. Bacteriol. 87, 1423
- 102.- MALEK, I. (1960) Development and Furhter Perspectives of the Continuous Flow Method of cultivation of Microorganisms. En: Continuous Culture of Microorganisms S.C.I. Monograph n<sup>o</sup> 12. London
- 103.- MARMUR, J. (1961) A procedure for the isolation of deoxyribonucleic acid from microorganisms. J. Mol. Biol. 3, 208
- 104.- MARMUR, J. y GROSSMAN, L. (1961) Ultraviolet light induced linking of deoxyribonucleic acid strands and its reversal by photoreactivating enzymes. Proc. Natl. Acad. Sci. US. 47, 778
- 105.- MENDEZ, E. RAMIREZ, G., SALAS, M. y VIÑUELA, E. (1971) Structural proteins of bacteriophage  $\phi$ -29. Virology 45, 567
- 106.- MILLER, D.H. y HUANG, P.C. (1972) Identification of competence repressing factors during log phase growth of H. influenzae. J. Bacteriol. 109, 560
- 107.- MILLER, I.L. y LANDMAN, O.E. (1966) On the mode of entry of transforming DNA into Bacillus subtilis. Symposium on the Mutational Process. II. The Physiology of Gene and Mutation Expression, Publishing House of the Czechoslovak Academy of Sciences. Prague, pag. 187.
- 108.- MILLER, I.L. y LANDMAN, O.E. (1963) Obstacles to transformation presented by bacterial anatomy. Bacteriol. Proc. 63, 34

- 109.- MILLER, J.L., PALMER, P.D. y LANDMAN, O.E. (1972) Comparison of deoxyribonucleic acid uptake and marker integration in Bacilli and protoplasts of B. subtilis. J. Bacteriol. 110, 661
- 110.- MILLER, I.L., ZSIGRAY, R.M. y LANDMAN, O.E. (1967) The formation of protoplasts and quasispheroplasts in normal and chloramphenicol-pretreated Bacillus subtilis. J. gen. Microbiol. 49, 513
- 111.- MITRA, S. y KOANBERG, A. (1966) Enzymatic mechanisms of DNA replication. En: Proc. of Symp. on Macromolecular Metabolism, little Brown and Co. Boston pag. 59
- 112.- MONOD, J. (1950) La technique de culture continue. Théorie et applications. Ann. Inst. Pasteur 79, 390
- 113.- MONOD, J. (1942) Recherches sur la croissance des cultures bactériennes. Herman et cie. Paris
- 114.- MOSER, H. (1958) The Dynamics of Bacterial Populations Maintained in the Chemostat. Carnegie Institution of Washington Publication
- 115.- NAKATA, Y., NAKATA, K. y SAKAMOTO, Y. (1961) On the action mechanism of mitomycin C. Biochem. Biophys. Res. Commun. 6, 339
- 116.- NESTER, E.W. (1964) Penicillin resistance of competent cells in DNA transformation of B. subtilis. J. Bacteriol. 87, 867
- 117.- NESTER, E.W. y STOCKER, B.A.D. (1965) Biosynthetic latency in early stages of deoxyribonucleic acid transformation in B. subtilis. J. Bacteriol. 86, 785
- 118.- NOTANI, N.K. y GOODGAL, S.H. (1965) Decrease in integration of the transforming DNA of Hemophilus influenzae following ultraviolet irradiation. J. Mol. Biol. 13, 611
- 119.- NOTANI, N.K. y GOODGAL, S.H. (1966) On the nature of recombinants formed during transformation in Hemophilus influenzae. En: Proc. of Symp. on Macromolecular Metabolism, Little Brown and Co. Boston pag. 197
- 120.- NOVICK, A., SZILARD, I. (1950) Experiments with the chemostat on the spontaneous mutation of bacteria. Proc. Natl. Acad. Sci. Washington 36, 708
- 121.- OKUBO, S. y ROMIG, W.R. (1966) Impaired transformability of a Bacillus subtilis mutant sensitive to mitomycin C and ultraviolet radiation. J. Mol. Biol. 15, 440

- 122.- OKUBO, S., STODOLSKY, M., BOTT, K.F. y STRAUSS, B. (1963) Separation of the transforming and viral deoxyribonucleic acids of a transducing bacteriophage of *Bacillus subtilis*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 50, 679
- 123.- OTTOLENGUI, E., HOTCHKISS, R.D. (1962) Release of genetic transforming DNA from pneumococcal cultures during growth and desintegration. J. exp. Med. 116, 491
- 124.- PAKULA, R. (1965 a) Inhibition of transformation of Streptococci by antibodies. J. Bacteriol. 90, 1501
- 125.- PAKULA, R. (1965 b) Factors regulating competence in transformation of Streptococci. J. Bacteriol. 90, 1320
- 126.- PAKULA, R. y WALLZAK, W. (1963) On the nature of competence of transformable streptococci. J. gen. Microbiol. 31, 125
- 127.- PENE, J.J. y ROMIG, W.R. (1964) On the mechanism of genetic recombination in transforming *Bacillus subtilis*. J. Mol. Biol. 9, 236
- 128.- PERRY, D. y SLADE, H.D. (1962) Transformation of the streptococci to streptomycin resistance. J. Bacteriol. 83, 443
- 129.- PERRY, D. y SLADE, H.D. (1966) Effect of filtrates from transformable and nontransformable streptococci on the transformation of streptococci. J. Bacteriol. 91, 2216
- 130.- PIECHOWSKA, M. y FOX, M.S. (1971) Fate of transforming deoxyribonucleate in *B. subtilis*. J. Bacteriol. 108, 680
- 131.- PIERSON, D.L., WEPPNER, W.A. y LEACH, F.R. (1972) The effect of osmotic shocking upon *B. subtilis* transformation. Can. J. Microbiol. 18, 1405
- 132.- POSTEL, E.H. y GOODGAL, S.H. (1966) Uptake of single-stranded DNA in *Hemophilus influenzae* and its ability to transform. J. Mol. Biol. 16, 317
- 133.- RANHAND, J.M. y LICHSTEIN, H.C. (1966) Periodate inhibition of transformation and competence development in *Hemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 92, 956
- 134.- RANHAND, J.M. y HERRIOTT, R.M. (1966) Inosine and lactate: factors critical during growth for development of competence in *Haemophilus influenzae*. Biochem. Biophys. Res. Commun. 22, 591

- 135.- RAVIN, A.W. (1957) The significance of bacterial transformation to studies of the neoplastic process. Ann. N.Y. Acad. Sci. 68, 333
- 136.- RAVIN, A.W. (1959) Reciprocal capsular transformations of pneumococci. J. Bacteriol. 77, 296
- 137.- RAVIN, A.W. (1961) The Genetics of transformation. En: Advances in Genetics. 10, 61
- 138.- REILLY, B.E. y SPIZIZEN, J. (1965) Bacteriophage deoxyribonucleate infection of competent Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 89, 782
- 139.- RICHARDSON, C.C., LEHMAN, I.R. y KORNBERG, A. (1964) A deoxyribonucleic acid phosphatase-exonuclease from E. coli. II. Characterization of the exonuclease activity. J. Biol. Chem. 239, 251
- 140.- RIVA, S., POLSINELLI, M. y FALASCHI, A. (1968) A new phage of Bacillus subtilis with infectious DNA having separable strands J. Mol. Biol. 35, 347
- 141.- ROMIG, W.R. (1962) Infection of B. subtilis with phenol-extracted bacteriophages. Virology 16, 452
- 142.- ROSEMBERGER, R.F. y ELSDEN, S.R. (1960) The yields of streptococcus faecalis grown in continuous culture. J. gen. Microbiol. 22, 726
- 143.- SCHAEFFER, P. (1957) L'inhibition de la transformation comme moyen de mesure de la competence bacterienne. C.R. Acad. Sci. Paris 245, 451
- 144.- SCHAEFFER, P. (1958) Interspecific reactions in bacterial transformation. Symp. Soc. Exptl. Biol. 12, 60
- 145.- SCHAEFFER, P. (1964) Transformation. En: The Bacteria. vol. V I.C. Gunsalus and R.V. Stanier, editors Academic Press. Inc. New York pag. 87
- 146.- SCHLISSEL, H.J. y SWORD, C.P. (1966) Conditions affecting transformation of a group H. streptococcus. J. Bacteriol. 92, 1357
- 147.- SETLOW, R.B. y CARRIER, W.L. (1964) The disappearance of thymine dimers from DNA: an error-correcting mechanism. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 226
- 148.- SINGH, R.N. (1972) Number of DNA uptake sites in competence cells of B. subtilis. J. Bacteriol. 110, 266

- 149.- SNEATH, P.H.A. y LEDERBERG, J. (1961) Inhibition by periodate of mating in *E. coli* K-12. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.* 47, 86
- 150.- SPARLING, P.F. (1966) Genetic transformation of *Neisseria gonorrhoeae* to streptomycin resistance. *J. Bacteriol.* 92, 1364
- 151.- SPANZ, H.Ch. y TRAUTNER, T.A. (1970) One way to do experiments on gene conversion? Transfection with heteroduplex SPPI DNA. *Mol. Gen. Genet.* 109, 84
- 152.- SPIZIZEN, J. (1958) Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 44, 1072
- 153.- SPIZIZEN, J. (1959) Genetic activity of deoxyribonucleic acid in the reconstruction of biosynthetic pathways. *Fed. Proc.* 18, 957
- 154.- SPIZIZEN, J. (1965) En: Spores III. L.L. Campbell y H.O. Halvorson, editors. *Amer. Soc. microbiol.* pag. 125
- 155.- SPIZIZEN, J., REILLY, B.E. y DAHL, B. (1963) Ref. Spizizen y cols. (1966) *Proc. Intern. Congr. Genetics.* 11th the Hague 1, 31.
- 156.- SPIZIZEN, J., REILLY, B.E. y EVANS, A.H. (1966) Microbioal transformation and transfection. *Ann. Rev. Microbiol.* 20, 371
- 157.- STEELE, B.F., SAUBERLICH, H.E., REYNOLDS, M.S. y BAUMANN, C.A. (1949) Media for *leuconostoc mesenteroides* P-60 and *Leuconostoc citrovorum* 8081. *J. Biol. Chem.* 177, 533
- 158.- STEWART, C.R. (1968) Enhancement and inhibition of transformation in *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 95, 2428
- 159.- STOCKER, B.A.D. (1963) Transformation of *Bacillus subtilis* to motility and prototrophy; micromanipulative isolation of bacteria of transformed phenotype. *J. Bacteriol.* 86, 797
- 160.- STRAUSS, N. (1965) Configuration of transforming deoxyribonucleic acid during entry into *B. subtilis*. *J. Bacteriol.* 89, 288
- 161.- STRAUSS, N. (1966) Further evidence concerning the configuration of transforming deoxyribonucleic acid during entry into *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 91, 702
- 162.- STREIPS, UaN. y WELKER, N.E. (1971) Competence-inducing factor of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 106, 955

- 163.- STUY, J.H. (1965) Fate of transforming DNA in the Hemophilus influenzae transformation system. J. Mol. Biol. 13, 554
- 164.- STUY, J.H. y STERN, D. (1964) The kinetics of DNA uptake by Hemophilus influenzae. J. gen. Microbiol. 35, 391
- 165.- SUEOKA, N., YOSHIKAWA, H. (1963) Regulation of chromosome replication in Bacillus subtilis. Cold. Spr. Harb. Symp. Quant. Biol. 28, 47
- 166.- SZYBALSKI, W., OPARA-KUBINSKA Z. (1966) Physico-chemical and biological properties of genetic markers in transforming DNA. Symp. Biol. Hung. 6, 43
- 167.- TAKAGI, J. e IKEDA, Y. (1962) Transformation of genetic traits by the DNA prepared from a lysogenic phage S-1. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 482
- 168.- TAKAHASHI, I. (1962) Genetic transformation of Bacillus subtilis by extracellular DNA. Biochem. Biophys. Res. Commun. 7, 467
- 169.- THOMAS, R. (1955) Recherches sur la cinetique des transformations bacteriennes. Biochem. Biophys. Acta (Amst.) 18, 467
- 170.- TICHY, P. (1972) De Novo Protein Synthesis during the Development of Competence in B. subtilis. Folia Microbiol. 17, 213
- 171.- TICHY, P. y LANDMAN, O.E. (1969) Transformation in quasi spheroplasts of B. subtilis. J. Bacteriol. 97, 42
- 172.- TIPPER, D.J. y STROMINGER, J.L. (1965) Mechanism of action of penicillins. A proposal based on their structural similarity to acyl-D-alanyl-D-alanine. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 1133
- 173.- THORNE E.B. (1962) Transduction in Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 83, 106
- 174.- TOMASZ, A. (1966) Model for the mechanism controlling the expression of competent state in Pneumococcus cultures. J. Bacteriol. 91, 1050
- 175.- TOMASZ, A. (1969) Some aspects of the competent state in genetic transformation. Ann. Rev. Genetic. 3, 217
- 176.- TOMASZ, A. (1970) Cellular metabolism in genetic transformation of Pneumococci: Requirement for protein synthesis during induction of competence. J. Bacteriol. 101, 860

- 177.- TOMASZ, A. y HOTCHKISS, R.D. (1964) Regulation of the transformability of pneumococcal cultures by macromolecular cell products. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 51, 480
- 178.- TOMASZ, A. y MOSER, J.L. (1966) On the nature of the pneumococcal activator substance. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 55, 58
- 179.- VAN DE POL, J.H., VELDHUISEN, G. y COHEN, J.A. (1961) Phage transformation: A new interim for the biological activity of bacteriophage DNA. Biochim. Biophys. Acta 48, 417
- 180.- VENEMA, G., PRITCHARD, R.H. y VENEMA-SCHRÖDER, T. (1965) Fate of transforming deoxyribonucleic acid in *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 89, 1250
- 181.- VERMEULEN, C.A. y VENEMA, G. (1971) Autoradiographic stimulation of competence and the relation between competence and transformability in cultures of *B. subtilis*. J. gen. Microbiol. 69, 239
- 182.- VESTRI, R., FELICETTI, L. y LOSTIA, O. (1966) Transformation by hybrid DNA in *B. subtilis*. Nature 209, 1154
- 183.- VOLL, M.J. y GOODGAL, S.H. (1961) Recombination during transformation in *Hemophilus influenzae*. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 47, 505
- 184.- VOLL, M.J. y GOODGAL, S.H. (1965) Loss of activity of transforming DNA after uptake by *Hemophilus influenzae*. J. Bacteriol. 90, 873
- 185.- WATSON, J.D. y CRICK, F.H.C. (1953) Molecular structure of nucleic acids a structure for deoxyribose nucleic acid. Nature 171, 737
- 186.- WELKER, N E. y CAMPBELL, L.L. (1967) Unrelatedness of *Bacillus amyloliquefaciens* and *Bacillus subtilis*. J. Bacteriol. 94, 1124
- 187.- WILSON, G.A., BOTT, K.F. (1968) Nutritional factors influencing the development of competence in the *B. subtilis* transformation system. J. Bacteriol. 95, 1439
188. WILSON, M.C., FARMER, J.L. y ROTHMAN, F. (1966) Thymidylate synthesis and aminopterin resistance in *B. subtilis*. J. Bacteriol. 92, 186
- 189.- WISE, E.M. Jr y PARK, J.T. (1965) Penicillin: its basic site of action as an inhibitor of a peptide cross-linking reaction in cell wall mucopeptide synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S. 54, 75.