

**ENSAYOS PRELIMINARES SOBRE LAS RELACIONES
FUNCIONALES EN EL TRASPASO DE FACTORES
DE RESISTENCIA A ANTIBIOTICOS
Y A FACTORES COLICINOGENICOS**

*(Trabajo realizado en el "Institut Universitaire de
Microbiologie Médicale" de Ginebra, Suiza).*

Por MANUEL ARTEAGA CARVAJAL, Q. F. Profesor Asistente del
Departamento de Farmacia de la Universidad Nacional
de Colombia.

COLICINAS

Al comienzo del estudio de las Colicinas (1), se conocían como tales algunas substancias con una acción antibiótica particular producida por cepas de *E. Coli*, pero investigaciones posteriores demostraron que esta propiedad no era exclusiva del grupo coli, puesto que también son producidas por muchas *Shigellas*, algunos *E. freudii* y, aunque raramente, también por *Salmonellas* y *Aerobacter* (2, 3).

Las cepas colicinogénicas pueden producir una o varias colicinas y las relaciones de actividad y sensibilidad son muy complejas.

Las colicinas son de naturaleza proteínica (4, 5) y su tamaño puede variar entre aquellas que son de molécula pequeña y pasan a través de una membrana de celofán y otras de molécula grande (6); los gérmenes productores exigen condiciones de cultivo especiales tales como el mismo medio de crecimiento, el pH, la presencia o ausencia de azúcares, anaerobiosis o aerobiosis violenta y otras, a fin de poder producir un máximo de colicina, la cual comienza a presentarse en el medio cuando se ha llegado a un 25% de la población máxima; la cantidad aumenta rápidamente y termina en una forma estacionaria. La producción puede ser inducida por varios agentes químicos y por los rayos U. V.

El carácter colicinogénico está dado por un factor genético sobre-agregado, es un "episoma" el cual se puede presentar bajo

dos estados: a) Como una unidad autónoma y, b) Integrado al cromosoma. La principal diferencia que caracteriza los dos estados de un episoma es la elevada frecuencia de transferencia en el estado autónomo, comparativamente con la que se presenta al estado integrado, cuando la transferencia es muy rara.

La forma de acción de las Colicinas es por fijación sobre las células sensibles, las cuales poseen receptores específicos, que por lo general son independientes y distintos, y que están bajo la dependencia de factores genéticos susceptibles de mutar, pero también de recombinar por cruces de dos parientes diferentes. La presencia o ausencia de esos receptores, es en gran parte la responsable de la especificidad de acción de la colicina. El mecanismo de la acción letal de las colicinas sobre las bacterias, no se conoce aún con claridad. La colicina E., por ejemplo, actúa bloqueando la síntesis del ADN y del ARN; ella es un agente bactericida y no bacteriolítico. Otra colicina llamada "col 18", sobre la cepa B₁, hace detener inmediatamente el crecimiento y la reproducción, y aun llega a bloquear las células que estaban en el proceso de división; las células se hacen cada vez más grandes, hasta un momento en el cual se rompe la pared celular.

Las propiedades colicinogénicas son caracteres hereditarios muy estables y son determinantes genéticos específicos para cada colicina. La presencia de esos factores determina no solamente la producción de colicina, sino también la inmunidad específica a la colicina producida. Los gérmenes productores no son sensibles a la colicina que ellos producen (7), aunque eventualmente bien pueden ser sensibles a otras colicinas. La inmunidad no es el resultado de la pérdida del receptor, puesto que las células inmunes pueden tenerlo.

Los factores colicinogénicos pueden ser transferidos de una cepa a otra, en cultivo mixto, y la eficacia de transferencia varía según el caso y depende no solamente del tipo de colicina, sino también de la cepa receptora; la transferencia se puede continuar en serie. Para su demostración se hace necesaria una técnica de selección (col⁺. str — y col — str⁺ - - - - 48 h). Las cepas que se han convertido en colicinogénicas conservan todas las propiedades de la cepa original no colicinogénica. Ninguna de las propiedades genéticas del "dador" colicinogénico es transferida simultáneamente, a menos que eventualmente pase también la propiedad F⁺ (factor de fertilidad) (8) y, naturalmente, la inmunidad a la colicina producida, como consecuencia directa de la adquisición del factor colicinogénico (11).

La transferencia del factor colicinogénico presente en cepas de *E. coli*, *Sh. sonnei* y otros gérmenes ha sido posible realizarla sobre otros *E. coli*, *Sh. sonnei*, *K. pneumoniae* y algunas *Salmonellas*.

De igual manera que la cinética de la transferencia confirma la independencia del factor colicinogénico el cual es transferido inmediatamente después de la unión de los gérmenes e independientemente de las características cromosómicas, el análisis de todos los descendientes de un mismo cigote demuestra que son colicinogénicos (10), lo que confirma también el estado autónomo de los factores (9) colicinogénicos, puesto que su réplica debe ser más rápida que la del cromosoma. Parece que ellos existen en forma de unidades autónomas independientes del cromosoma.

Entre el factor F de fertilidad y los colicinogénicos hay analogías muy estrechas y pueden ser transferidos a altas frecuencias y sin relación alguna con otros marcadores genéticos.

NOTAS AL TEXTO

1. El primer estudio fue hecho por Gratia en 1925.
2. Como la producción de una misma colicina se encuentra en todas las cepas aisladas de un mismo foco infeccioso, la investigación de este factor representa gran interés epidemiológico.
3. La producción de la colicina es independiente de la estructura antigénica del germen.
La clasificación de las propiedades colicinogénicas mostró ser de utilidad en muchos casos de gastroenteritis infantil.
4. La mayoría de las colicinas pueden ser destruidas rápidamente por enzimas proteolíticas, tales como las producidas generalmente por cepas de *Proteus*.
5. Las colicinas son proteínas purificables por precipitaciones repetidas con etanol y sulfato amónico y extracción con una mezcla de octanol-cloroformo.
6. La col. K es una macromolécula, constituida de un hidrato de carbono, una proteína y un lípido. La electroforesis no determina sino un solo componente pero por ultracentrifugación parece heterodispersa. Tiene una fuerte acción antibiótica y sus propiedades químicas, físicas, inmunológicas y tóxicas son iguales a las del antígeno "O" de las bacterias que la producen. No es de excluir el hecho de que la col. K. sea en realidad una molécula distinta, ligada al complejo antigénico "O" de las bacterias en cuestión, aunque los ensayos de separación hayan sido infructuosos. La acción colicinogénica parece corresponderle a la parte proteínica de la molécula del antígeno "O". Ella hace formar aglutininas y precipitinas.
7. Hay resistencias cruzadas, específicas y recíprocas, entre una colicina y un fago en particular, las cuales pueden ser disociadas por recombinación genética y se comportan como un marcador único.

8. Existen las posibilidades de unión con un factor F y relaciones con la transferencia de factores de resistencia a los antibióticos.
9. Todos los recombinantes son colicinogénicos, cualquiera que sea la colicina estudiada y la selección empleada para su aislamiento, en el caso de que el pariente F⁻ sea el solo colicinogénico.
10. La propiedad colicinogénica no tiene ninguna acción sobre la transferencia de otros factores.
11. En el cruce en el cual la propiedad colicinogénica es llevada por el pariente F⁺ o Hfr (High frequency recombinants), la frecuencia de transferencia no se invierte y muchos de los recombinantes serán aún colicinogénicos.

PARTE EXPERIMENTAL

Introducción al trabajo.

Gracias al empleo tan extendido de los agentes antibacterianos y antimicóticos, cada día se impone con mayor fuerza y claridad, la necesidad de establecer un control riguroso de la venta, formulación y valoración de esos agentes, ya que se puede determinar con certeza que existen factores de resistencia (episomas) en el citoplasma de muchos gérmenes los cuales pueden ser transferidos a otros gérmenes que inicialmente eran sensibles. (2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 13).

Conceptos generales.

Dentro de la gran variedad de “episomas” conocidos, se tienen los factores de Resistencia a los Antibióticos y los Colicinogénicos. (6, 7, 8, 9, 13, 14). Todos son agentes de naturaleza genética que se encuentran en el citoplasma bacteriano y le dan al germen características precisas heredables, no esenciales para la vida de las células que los poseen, pueden ser adquiridos por otros gérmenes y en algunas oportunidades los pueden perder (1, 12). Otra característica de los episomas, es que pueden encontrarse en dos estados: *Autónomo* en el citoplasma de la célula, o *integrado* al cromosoma celular, caso en el cual se multiplica al mismo ritmo del cromosoma del germen huésped. Al estado *autónomo* su multiplicación es mucho más rápida que la del cromosoma de la célula que lo posee. (7, 9, 15, 16).

Como ejemplo claro de “episoma” que se puede encontrar en los dos estados anteriormente mencionados, se tiene el factor F de fertilidad; el punto en el cual se integra al cromosoma es específico para cada cepa de gérmenes (cepas Hfr.). (6, 13, 14).

Al estado autónomo, los episomas pueden ser transferibles a otros gérmenes y a frecuencias que varían según la cepa “dadora” y la “receptora”. Ellos no son transferibles cuando están al estado integrado. (7, 8, 9).

Materiales, gérmenes y métodos.

Los gérmenes empleados en el trabajo fueron los siguientes:
Cepas “receptoras” (sensibles a los antibióticos en empleo y no colicinogénicas).

- Salmonella typhi A.
- Salmonella paratyphi B.
- Salmonella typhimurium 36.

Las cepas “dadoras” de determinantes de resistencia fueron de θ Escherichia coli, aisladas de casos de colitis o que se encontraban como miembros de la flora intestinal. Todos estos gérmenes, además de poseer el o los factores de resistencia, eran colicinogénicos.

Medios de cultivo.

Caldo Nutritivo Ordinario. (Difco) al 20%.

Agar Nutritivo Ordinario de fórmula:

Agar-Agar	20 gr.
Caldo Nutritivo (Difco)	20 gr.
Agua destilada	1.000 ml.

Medios de cultivo diferenciales:

- Agar Mc.Conkey (Difco).
- S. S. Agar (B. B. L.).

Antibióticos empleados.

A: Ampicilina, 100 μ gr./ml. de medio de cultivo diferencial.

S: Estreptomina, 100 μ gr./ml. de medio de cultivo diferencial.

C: Cloranfenicol, 20 μ gr./ml. de medio de cultivo diferencial.

T: Tetraciclina, 20 μ gr./ml. de medio de cultivo diferencial.

Na: Acido Nalidixídico, 20 μ gr./ml. de medio de cultivo diferencial.

Técnicas.

La determinación del espectro de resistencia de los *E. coli*, se hizo por medio de la técnica de réplica sobre una tela; ella se impregnó con las colonias que hubiesen crecido suficientemente aisladas sobre Agar Nutritivo Ordinario; al colocar placas de Agar McConkey sobre esta tela, se obtuvieron réplicas iguales; al Agar McConkey se le habían agregado los antibióticos en prueba.

Para averiguar si se presentaba transferencia de los "factores de resistencia" y posteriormente determinar el valor de la "frecuencia de transferencia" se empleó el caldo nutritivo ordinario para el desarrollo de los dos gérmenes en cultivo mixto (dadores y receptores en cultivo mixto). Después de incubación se hicieron siembras sobre los medios de cultivo diferenciales con o sin antibiótico (el S. S. Agar, se empleó sobre todo para la determinación de la "frecuencia de traspaso" de los "factores de resistencia" a los antibióticos, ya que inhibe el crecimiento de *E. coli*) (4).

La determinación de la producción de colicina se hizo por la técnica de la doble capa de agar (7, 9).

RESULTADOS

El traspaso de los factores de resistencia a los antibióticos se distribuyó en la forma que lo muestra el cuadro siguiente:

CUADRO I

Cruces hechos con	E. coli "dador" de factores de resistencia (factores de resistencia y porcentajes en que pasó el factor Colicinogénico).				
	A	S	C	T	Na
S. typhi A	7/14 (50%)	5/6 (83%)	16/22 (73%)	17/26 (65%)	0/5 (0%)
S. paratyphi B	5/14 (35%)	4/6 (66%)	5/22 (23%)	10/26 (38%)	0/5 (0%)
S. typhimurium 36	6/14 (43%)	4/6 (66%)	8/22 (35%)	15/26 (58%)	0/5 (0%)

NOTAS AL CUADRO:

- Significado de las fracciones:
Numerador: número de cepas que recibieron el factor de resistencia.
Denominador: número de cepas *E. coli* que actuaron como dadores del factor de resistencia.
- Las cepas que transfieren el factor de resistencia a la Ampicilina, son productoras de Ampicilinas constitutiva y, las otras (las que no dan origen a una transferencia del factor) son Ampicilinas inductible. (Trabajo personal hecho en paralelo).

Frecuencias de traspaso de los determinantes.

En cuanto a los valores de las frecuencias de traspaso, aunque ellas variaban considerablemente en algunos casos como se puede apreciar en los cuadros II, III y IV, eran, en términos globales, más altas en los cruces con la *S. typhi* A, que en los hechos con la *S. paratyphi* B. Los valores más bajos se presentaron con la *S. typhimurium* 36.

Cuando se comparan los valores de las “frecuencias de traspaso” de los “factores de resistencia” con aquellos de la “colicinogenia”, tanto en las colonias de la población seleccionada (para el o los antibióticos del caso), como en las de la población no seleccionada, se puede constatar una independencia entre los “episomas”, aunque parece que existen una serie de interacciones entre ellos.

CUADRO II
CEPA RECEPTORA: *Salmonella typhi* A.

Espectros de las cepas dadoras	Frecuencias de Transferencia de las Resistencias a los Antibióticos siguientes y Porcentaje de Colicinogenia.				Variabilidad de la Población Colicinogénica	
	A	S	C	T	Seleccionada	No seleccionada
C			$5,9 \cdot 10^{-3}$ (0%)		0%	0%
T				$4 \cdot 10^{-7}$ (50%) $7 \cdot 10^{-6}$ (100%)	0-100%	0-100%
ASC	$2,5 \cdot 10^{-4}$ (33%)	$5,9 \cdot 10^{-2}$ (100%)	$7 \cdot 10^{-2}$ (100%)		33-100%	89%
ACT	$1,6 \cdot 10^{-3}$ $3,5 \cdot 10^{-1}$ (0%)		$4 \cdot 7 \cdot 10^{-1}$ $1 \cdot 10^{-2}$ $7 \cdot 10^{-5}$ (0%)	$1 \cdot 3 \cdot 10^{-1}$ $6 \cdot 10^{-2}$ $5 \cdot 10^{-4}$ (0%)	0%	0%
ACTNa	$1,4 \cdot 10^{-1}$ (100%)		$1 \cdot 10^{-2}$ (100%)	$4,9 \cdot 10^{-3}$ (83%)	83-100%	78%
ASCT		$3,5 \cdot 10^{-3}$ $8,6 \cdot 10^{-1}$ (100%)	$1 \cdot 10^{-1}$ $2 \cdot 10^{-3}$ (100%)	$2 \cdot 6 \cdot 10^{-3}$ (83%)	83-100%	38-95%
CT			$2,4 \cdot 10^{-5}$ $4 \cdot 10^{-2}$ $1 \cdot 10^{-1}$ (87%)	$2,5 \cdot 10^{-1}$ $4 \cdot 10^{-1}$ (100%)	67-100%	85%
SCT		$4,2 \cdot 10^{-2}$ (0%)	$1 \cdot 10^{-1}$ (0%)	$3,1 \cdot 10^{-5}$ (0%)	0%	0%
AT	$5 \cdot 10^{-2}$ (17%)			$(1,4 \cdot 2,6) \cdot 10^{-1}$ (17%)	17%	5,5%
Variación entre	$3 \cdot 10^{-1}$ $1 \cdot 10^{-4}$ (0-100%)	$7 \cdot 10^{-1}$ $3 \cdot 10^{-3}$ (0-100%)	$7 \cdot 10^{-1}$ $2 \cdot 10^{-5}$ (0-100%)	$4 \cdot 10^{-1}$ $4 \cdot 10^{-7}$ (0-100%)	0-100%	0-100%

CUADRO III

CEPA RECEPTORA: *Salmonella paratyphi B.*

Espectros de las cepas dadoras	Frecuencias de Transferencia de las Resistencias a los Antibióticos siguientes y Porcentaje de Colicinigénia.				Variabilidad de la Población Colicinigénica	
	A	S	C	T	Seleccionada	No seleccionada
T				6.10 ⁻⁵ 2.10 ⁻⁷ 4.10 ⁻⁸ (17%)	17%	0-15%
AT	1,2.10 ⁻⁶ (0%)			9.10 ⁻³ 7.10 ⁻² (0%)	0%	0%
ACT	3,5.10 ⁻⁵ (0%)		4.10 ⁻² (0%)	3,6.10 ⁻³ (0%)	0%	39%
ASC	2,8.10 ⁻⁶ (0%)	1,9.10 ⁻⁴ (100%)	1.10 ⁻⁴ (100%)		0-100%	0%
ASCT		2,2.10 ⁻⁶ (0%) 4,4.10 ⁻¹ (100%)	2.10 ⁻³ (100%)		0-100%	78%
ACTNa			9.10 ⁻⁴ (100%)	3.10 ⁻⁵ (100%)	100%	23-55%
CT			3,5.10 ⁻² (100%)	2.10 ⁻¹ (100%) 2.10 ⁻² (0%)	0-100%	0%
SCT		2,1.10 ⁻⁵ (0%)		4.10 ⁻⁵ (0%)	0%	0-78%
Variación entre	4.10 ⁻⁵ 1.10 ⁻⁶ (0%)	4.10 ⁻¹ 2.10 ⁻⁶ (0-100%)	4.10 ⁻² 1.10 ⁻⁴ (0-100%)	2.10 ⁻¹ 4.10 ⁻⁸ (0-100%)	0-100%	0-78%

CUADRO IV
CEPA RECEPTORA: *Salmonella typhimurium* 36.

Espectros de las cepas dadoras	Frecuencias de Transferencia de las Resistencias a los Antibióticos siguientes y Porcentaje de Colicinogenia.				Variabilidad de la Población Colicinogénica	
	A	S	C	T	Seleccionada	No seleccionada
C			8.10^{-7} (0%)		0%	0%
T				3.10^{-3} 8.10^{-6} (2-3) 10^{-8} $4.5.10^{-9}$ (0%)	0%	0%
AT				$3.4.10^{-7}$ (33%)	33%	0%
ASC	$3.4.10^{-7}$ (50%)	$2.8.10^{-1}$ (100%)	2.10^{-1} (100%)		50-100%	50%
ACT	$3.5.10^{-8}$ (0%)		$5.4.10^{-2}$ $4.3.10^{-1}$ (0%)	6.10^{-2} 5.10^{-3} (0%)	0%	0%
ASCT		$1.4.10^{-6}$ (0%) $6.1.10^{-1}$ (100%)	1.10^{-6} (100%)		0-100%	0-11%
ACTNa			$5.1.10^{-7}$ (100%)	7.10^{-7} (100%)	100%	67%
CT			2.10^{-5} 7.10^{-3} (100%)	4.10^{-1} 6.10^{-6} (100%)	100%	78-89%
SCT		$3.3.10^{-6}$ (0%)		2.10^{-6} (0%)	0%	0%
Variación entre	3.10^{-7} 3.10^{-8} (0-50%)	6.10^{-1} 1.10^{-6} (0-100%)	4.10^{-1} 5.10^{-7} (0-100%)	1 4.10^{-9} (0-100%)	0-100%	0-100%

CONCLUSIONES E HIPOTESIS

En base a los resultados anteriormente anotados, se pueden sacar las conclusiones que siguen y que además dan origen a algunas hipótesis interesantes de estudiar posteriormente.

1. Dada la proporción en que se manifiesta el factor “colicinogénico” (col +) en la progenie, se puede suponer que está parcial o totalmente reprimido por el o los determinantes de resistencia a los antibióticos (R.), o ya en la célula “receptora” impide la transferencia de los determinantes de resistencia, los reprime, o se presenta una segregación de factores.
2. Mostraron un interés particular las relaciones del factor col. + con el de la resistencia a la tetraciclina (RT), y con los de resistencia a la tetraciclina-cloranfenicol (RT - C), cuando se encuentran solos en el germen “dador”.

a) Se pudo constatar que si la célula “dadora” promueve una transferencia de alta frecuencia del “factor de resistencia a la tetraciclina”, el factor col. + también pasa a alta frecuencia.

b) Por otra parte se tiene que si los factores de resistencia a la tetraciclina y al cloranfenicol (si están solos) transfieren los dos a alta frecuencia, o el de la tetraciclina a baja y el del cloranfenicol a alta frecuencia, el factor “colicinogénico” transfiere a baja frecuencia.

En el caso contrario, o sea, una “frecuencia de transferencia” elevada para el “factor de resistencia a la tetraciclina”, y baja para el cloranfenicol, o que transfiera solamente uno de los dos a alta frecuencia, la proporción de células “colicinogénicas” de la progenitura es alta.

3. Otro punto interesante a constatar, es que todos los gérmenes “Ampicilino resistentes”, son productores “inductibles o constitutivos” de Ampicilinas, y los que dieron origen a una transferencia de resistencia a la Ampicilina, eran todos productores “constitutivos” de Ampicilinas.

RESUMEN

En el trabajo, después de definir en qué consisten los “episodios” y en particular los “colicinogénicos” (col.) y los de “resistencia a los antibióticos” (R), fueron seleccionadas varias cepas de *Escherichia coli* col uni o plurirresistentes a cinco antibióticos de

amplio espectro las cuales sirvieron como “dadoras” de esos caracteres de resistencia y de colicinogenia. Como cepas “receptoras” de los factores se emplearon la *Salmonella typhi* A, la *S. paratyphi* B y la *S. typhimurium* 36. Luego se hizo el estudio de la progenie de los gérmenes citados. (Se desarrollaron en cultivos mixtos) y de esta manera se establecieron los valores de las “frecuencias de transferencia” de los caracteres y se hicieron ensayos a fin de comprender cuáles son sus relaciones funcionales, pudiéndose deducir varias hipótesis interesantes y que dan margen a estudios posteriores.

S U M M A R Y

Several strains of *Escherichia coli* uni or pluriresistant to five broad spectrum antibiotics were selected as “donors” of the resistance (R.) and colicinogenicity (col) characters. *Salmonella typhi* A, *S. typhimurium* 36 and *S. paratyphi* B were used as “receptors” of those characters. A study on progeny of the microorganisms referred to about were made in order to stablish the “transference frequency values” of the characters. Findings of the functional relationships are also discussed.

R É S U M É

On trouve dans le travail qu’après avoir défini ce qui sont les “épisodes” et en particulier les “colicinogéniques” (col.) et ceux de “résistance aux antibiotiques” (R.), il été faite la sélection de plusieurs souches sauvages de *Escherichia coli* col uni ou plurirésistantes a cinq antibiotiques d’ample spéctre d’activité; postérieurement, elles ont agie comme “donneurs” de ces caractères. Les souches employées comme “recépteurs” de ces facteurs on été la *Salmonella typhi* A, la *S. paratyphi* et la *S. typhimurium* 36. Après il est faite l’étude de la progéniture de ces germes (ils se sont développés en culture mixte) et de cette façon il a été établie les valeurs des “fréquences de transfert” de ces caractères et ils ont été faites des essais pour comprendre les rélations fonctionnelles entre eux, et il peut se déduire plusieurs hypothèses intéressantes pour faire des études ultérieures.

B I B L I O G R A F I A

1. ALFOLDI, L., F. JACOB, E. L., WOLLMAN et R. MAZE.
Sur le déterminisme génétique de la colicinogenie. C. R. Acad. Sci.; 246, 3531 (1958) Paris.

2. ANDERSON, E. S. AND DATTA, N.
Resistance to Penicillins and its Transfer in Enterobacteriaceae. Lancet; 1, 407 (1965).
3. ANDERSON, E. S. AND LEWIS, M. J.
Drug Resistance and its Transfer in Salmonella typhimurium. Nature; 206, 579 (1965) London.
4. ANDERSON, E. S. AND LEWIS, M. J.
Characterization of a Transfer Factor Associated with Drug Resistance in S. typhimurium. Nature; 208, 843 (1965) London.
5. DATTA, NAOMI.
Transmissible drug resistance in an epidemic strain of Salmonella typhimurium. J. Hyg.; 60, 301 (1962).
6. DUBNAU, EUGENIE AND STOCKER B. A. D.
Behavior of three colicine factors and R (drug-resistance) factor in Hfr crosses in S. typhimurium. Genet. Res., Camb.; 9, 283 - 297 (1967).
7. FREDERICQ, P.
Genetics of Colicinogenic Factors. Zbt. Bakt., I Abt., Orig.; 196, 142 - 151 (1965).
8. FREDERICQ, P. et BETZ - BAREAU, M.
Influence de diverses propriétés colicinogènes sur la fertilité d'Escherichia coli. C. R. Soc. Biol.; 150, 615 (1956) Paris.
9. FREDERICQ, P.
Colicines et autres bacteriocines. Ergeb. der Mikrobiol.; 37, 114 - 161 (1963).
10. HAYES, W.
Conjugation in Escherichia coli. Brit. med. Bull.; 18, 36 (1962) London.
11. IIJIMA, T.
Transfer of Colicinogenic Character by Protoplast of Escherichia coli K₁₂. Jap. J. Genet.; 34, 213 (1959).
12. KATO, Y., HANAOKA, M. AND TSUNEHISE, A.
The Elimination of a Colicinogenic Factor by a Drug resistance Transferring Factor in Escherichia coli K₁₂. Biken's Journal; 5, 77 - 86 (1962), Osaka, Japan.
13. MARILYN MONK AND C. R. CLOWES.
Transfer of the Colicine I Factor in Escherichia coli K₁₂ and its Interaction with the Fertility Factor. J. Gen. Microbiol.; 36, 365 - 384 (1964).
14. ROSA NAGEL DE ZWAIG.
Association Between Colicinogenic and Fertility Factors. Genetics; Vol. 54, N° 2 (1966).
15. ROSA NAGEL DE ZWAIG, DORA N. ANTON AND J. PUIG.
The Genetic Control of Colicinogenic Factors E₂, I and V. J. Gen. Microbiol.; 29, 473 - 484 (1962).
16. ROSA NAGEL DE ZWAIG AND J. PUIG.
The Genetic Behaviour of Colicinogenic Factor E₁. J. Gen. Microbiol.; 36, 311 - 321 (1964).