

EL BACTERIOFAGO DEL ORGANISMO DE LOS NODULOS DE LAS PLANTAS LEGUMINOSAS EN LA ARGENTINA

Por EDGARDO N. CAMUGLI (1)

I — INTRODUCCION

Los bacterios radicícolas son microorganismos benéficos de la agricultura, que se encuentran en las nudosidades de la mayoría de las plantas leguminosas. Tienen por función la fijación del nitrógeno atmosférico por quimiosíntesis en simbiosis con las plantas, entregando a éstas el ázoe sintetizado y recibiendo de ellas los hidratos de carbono para su nutrición.

Estos bacterios poseen un enemigo que los destruye por lisis: es el agente que Holmes denominó *Phagus subvertens* H. La acción en el cultivo no está aún perfectamente establecida, existiendo opiniones contradictorias. Para algunos se manifiesta por una disminución en el número de los nódulos de las plantas y un decaimiento general del cultivo; otros sostienen que su acción no llega a perjudicar mayormente a las plantas.

Habiendo encontrado dificultades en el aislamiento de bacterios radicícolas (*Rhizobium meliloti* Dangeard) en un cultivo de alfalfa con síntomas de "fatiga", supusimos estar en presencia del bacteriófago de esos microorganismos. Los ensayos realizados posteriormente nos permitieron comprobar que en esos cultivos existía un proceso de bacteriofagia.

Este trabajo tiene por objeto señalar en nuestro país la presencia de este principio lítico, no haciéndose consideraciones sobre el rol que pueda tener en los cultivos de nuestras leguminosas, ya que esto motivará un trabajo posterior.

En la realización del presente trabajo se siguieron las técnicas indicadas por Laird (13) y Demolon y Dunez (5), con algunas modificaciones de otros autores.

II — ANTECEDENTES

El bacteriófago del organismo de las plantas leguminosas fué encontrado por primera vez por Gerretsen, Grijns, Sack y Söhnngen (10), en Alemania, en el año 1923. Aislaron de raíces y tallos de trébol, lupino y serradella un agente que era capaz de des-

(1) Ingeniero Agrónomo. Jefe de Trabajos Prácticos de Microbiología Agrícola en la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de La Plata.

truir por lisis los bacterios radicícolas. Con ello demostraron que el fenómeno de Twort-D'Herelle no sólo se produce en la vida animal sino que también se puede demostrar en la vegetal. El bacteriófago era resistente a temperaturas de 60° a 65° C. y a la desecación pasaba por membranas delgadas de colodio y opinaban que era el causante de la disolución de los nódulos en la planta.

Laird (op. cit.) en el año 1932, señaló los procedimientos a seguir para la demostración de la lisis de los bacterios radicícolas, indicando diversos medios de cultivo y técnicas. Aisló un "fago" que era activo a una dilución de $1/10^8$.

En Francia Demolon y Dunez (op. cit.), en 1935, encontraron el agente lítico en las nudosidades, raíces y tallos de un cultivo de alfalfa de más de un año y especialmente en las nudosidades en vías de disolución. No lo hallaron en las hojas. También lo encontraron en la tierra que rodeaba las raíces de las plantas. Propusieron técnicas para el aislamiento e identificación del bacteriófago. Además, demostraron la existencia de "fagos" de distinta potencia; algunos más activos que otros, y establecieron que diferentes razas de bacterios radicícolas no se mostraban igualmente susceptibles a un mismo "fago". Esto último ya había sido demostrado por Laird (op. cit.) y Almon y Wilson (1).

Vandecaveye y Katznelson (15) en los Estados Unidos de Norte América, en 1936, aislaron un potente principio lítico de dos suelos del Distrito de Yakima, donde vegetaban alfalfares de tres años; pero de los Distritos de Yakima y Ellensburg, con plantas de alfalfa de menos de tres años, fracasaron en el aislamiento del bacteriófago. Uno de los principios líticos aislados produjo una completa disolución en un cultivo líquido de *R. meliloti* a una dilución de $1/10^9$ y un parcial aclaramiento a una dilución de $1/11$.

Demolon y Dunez (6), que son los investigadores que más estudios han realizado sobre el tema, determinaron que las razas de bacterios radicícolas del norte de Francia se lisaban a una dilución del "fago" de $1/10^4$, mientras que las del sur lo hacían a $1/10^7$. Dieron además técnicas para la determinación del bacteriófago en las plantas y en el suelo.

Katznelson y Wilson (11) en 1941, aislaron un principio lítico de los suelos de todos los alfalfares ensayados en Nueva York. En ese mismo año Fuller y Vandecaveye (9), con la colaboración de Katznelson, introdujeron modificaciones en los métodos y técnicas para el aislamiento e identificación del bacteriófago del *R. meliloti*.

Un medio adaptado al bacteriófago del *Rhizobium leguminosarum* Frank fué recomendado, en 1943, por Campbell y Hofer (3), eliminando con él las desventajas que presenta el medio 5 de Laird. También en 1943 Bottcher y Hofer (2) propusieron un método para

determinaciones semicuantitativas de bacteriófagos del suelo; el procedimiento es más sensible que el método del aclaramiento de los cultivos en tubos, para comprobar la presencia de pequeñas cantidades de "fagos" en el suelo.

En Méjico, en 1944, Sánchez Marroquín y Casas Campillo (14), estudiando cuarenta y ocho muestras, encontraron un cien por ciento de infestación en los suelos cultivados con alfalfa. Un principio lítico resultó activo a una dilución de $1/10^{14}$. Introdujeron modificaciones en el medio de Campbell y Hofer, utilizando aguamiel de maguey (jugo de Agave no fermentado).

Una uniformidad en la técnica del método de Yen (16), adaptado para medir "fagos" de bacterios radicolos, fué propuesta por Kleczkowska (12) en 1945, con el fin de conseguir estimaciones seguras que permitan comparar suspensiones de dos o más bacteriófagos.

III — MATERIAL

El bacteriófago fué aislado de plantas de alfalfa (*Medicago sativa L.*) de más de tres años y de tierras donde estas plantas vegetaban en un cuadro de la Facultad de Agronomía de La Plata, que mostraba síntomas de "fatiga". Las muestras utilizadas en los ensayos eran una mezcla de raíces y tallos de alfalfa y de la tierra que estaba en contacto directo con las raíces. Los tallos y las raíces fueron triturados en una máquina de picar carne y conjuntamente con la tierra fueron agregados en cantidad de 100 gramos, en frascos que contenían el líquido indicado por Demolon y Dunez (op. cit.). La composición de este medio es la siguiente:

Glucosa	3.0 g
PO_4HK_2	1.0 g
SO_4Mg	0.2 g
$ClNa$	0.1 g
Cl_2Ca	0.1 g
Cl_3Fe	0.02 g
CO_3Ca	1.0 g
Extracto de raíces de alfalfa	1000.0 ml

El extracto de raíces de alfalfa se prepara agregando a 1000 ml de agua destilada 200 g de raíces de alfalfa machacadas. Se hierva durante dos horas, se deja macerar durante la noche, se filtra y se lleva a volumen. Luego de agregadas las sales el pH se debe llevar a 7.8. Finalmente se distribuyen 500 ml del medio en los frascos que recibirán las muestras.

La lisis de los bacterios puede ser observada en medios líquidos o sólidos. En ambos es posible realizar una estimación cuantitativa del fenómeno. Los primeros ensayos los efectuamos en medios lí-

quidos, pues en ellos se produce la exaltación de la virulencia del bacteriófago, lo que facilita la observación.

Son varios los medios líquidos señalados para el estudio de las muestras a analizar y los bacterios radicales. De todos ellos preferimos utilizar el medio 5 de Laird, que está constituido por las siguientes sustancias:

PO ₄ HK ₂	0.5 g
SO ₄ Mg7H ₂ O	0.2 g
ClNa	0.2 g
CO ₃ Ca	0.5 g
Agua de levaduras al 10 %	200.0 ml
Agua destilada	800.0 ml
Se arregla la reacción a pH 7.8.	

En el medio 5 de Laird se obtiene un máximo desarrollo del *Rhizobium*, con un mínimo de formación de goma. Aparte de este medio existen otros, siendo el de Campbell y Hofer (3) uno de los más recomendables por ser completamente límpido, libre de precipitados y coloraciones; permite un gran desarrollo bacteriano, lo que hace resaltar los tubos con bacterios lisados de los testigos. El medio 5 de Laird puede presentar una coloración amarillento-parduzca, debido al agua de levaduras y una coloración blanquecina en las paredes de los tubos, por el carbonato de calcio precipitado. Estas observaciones ya habían sido señaladas por Campbell y Hofer (op. cit.), con cuyo medio han desaparecido esas dificultades. La composición de este último es la que se detalla a continuación:

Glicerofosfato de calcio	1.0 g
SO ₄ Mg	0.2 g
ClNa	0.2 g
Jugo de col ácida y fermentada "sauerkraut"	20.0 ml
Agua destilada	980.0 ml
Se arregla la reacción a pH 7.6.	

Para la observación de la lisis en medios sólidos utilizamos primeramente el mismo medio 5 de Laird más 1.5 de agar. En este medio no obtuvimos los resultados esperados, por lo que resolvimos emplear el indicado por Kleczkowska (op. cit.), en el cual las áreas lisadas resaltan notablemente con las zonas de desarrollo bacteriano. Este medio contiene:

Manita	10.0 g
PO ₄ HK ₂	0.5 g
SO ₄ Mg	0.2 g
ClNa	0.2 g
Gluconato de calcio	0.5 g
Agua de levaduras	100.0 ml
Agua corriente	900.0 ml
pH 7.6-7.8.	

Para la obtención de las cepas de bacterios radicolos empleamos el medio de Fred, Baldwin y Mc. Coy (7). Las pruebas de pureza de cada una de las cepas se efectuaron en leche y papa, preparados según las indicaciones de Fred y Waksman (8).

El instrumental de laboratorio necesario para la determinación del bacteriófago es simple. Utilizamos bujías *Chamberland F.* que detienen a los bacterios y dejan pasar el líquido con el principio lítico. Los filtros fueron previamente ensayados, controlando así probables deficiencias, para lo cual filtramos a través de ellos cultivos líquidos de *R. meliloti* de 24 horas y luego incubamos el filtrado a 28° C. durante varios días; la falta de enturbiamiento del líquido demostró la bondad de la bujía.

Utilizamos tubos de ensayos del mismo tamaño y de vidrio incoloro, perfectamente limpios. Estas condiciones de los tubos son muy importantes en la observación del fenómeno.

En la experimentación con bacteriófagos es condición principal trabajar con razas de bacterios radicolos susceptibles al agente lítico empleado. No poseíamos, al iniciar el trabajo, biotipos susceptibles de bacterios radicolos, puesto que nos proponíamos intentar el aislamiento del bacteriófago por primera vez. Por ello debimos ensayar una cantidad considerable de bacterios, a fin de tener mayores posibilidades de éxito. Con tal motivo formamos una colección de biotipos de bacterios con cepas provenientes del Instituto Experimental de Investigación y Fomento Agrícola-Ganadero de la Provincia de Santa Fe y de aislamientos que realizamos en plantas de alfalfa de La Plata, de Baradero y Miramar.

El bacteriófago lo mantuvimos en el líquido filtrado en tubos estériles, a temperaturas de laboratorio y de heladera.

IV — METODOS Y RESULTADOS

Por medio de las técnicas clásicas del estudio de los "fagos", es relativamente sencillo poner de manifiesto la existencia del bacteriófago de los bacterios radicolos.

Para la obtención de las cepas de *R. meliloti* de plantas de alfalfa seguimos los procedimientos corrientes para conseguir un cultivo puro.

Las muestras de suelo y alfalfa fueron introducidas en frascos Erlenmeyer que contenían 500 ml del líquido de Demolon y Dunez (op. cit.). Incubamos a 28° C. durante 48 horas. El líquido lo filtramos por algodón, luego por papel de filtro y finalmente por una bujía *Chamberland F.* Esta última filtración la efectuamos con el frasco de Kitasato, esterilizando previamente los aparatos. En esta forma obtuvimos un líquido amarillento, libre de bacterios y que luego comprobamos contenía el bacteriófago.

OBSERVACION DEL FENOMENO EN MEDIOS DE CULTIVOS LIQUIDOS

Con el primer filtrado y cultivos de bacterios radicícolos realizamos el siguiente ensayo:

Primer ensayo.

- a) TUBOS DE EXPERIMENTACION: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterios radicícolos + 1 ml del primer filtrado.
- b) TUBOS TESTIGOS: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterias radicícolas.
- c) TUBOS CONTROL: Con 10 ml del líquido de Laird + 1 ml del primer filtrado.

Los cultivos de bacterios radicícolos eran de 24 horas e incubados a 28° C.

En el ensayo a) utilizamos las 83 cepas de bacterios de nuestra colección, sembrando tres tubos con cada una de ellas.

Llevamos todos los tubos a estufa a 28° C. y efectuamos observaciones a las 24, 48 y 72 horas. En la mayoría de los tubos inoculados con el líquido del primer filtrado (ensayo a), a las 72 horas no mostraban diferencias con los testigos, es decir que permanecían completamente turbios, con excepción de siete tubos que presentaban un tenue aclaramiento. Los del ensayo c) permanecían límpidos, dado que el filtrado por las bujías era estéril.

Los cultivos que mostraron el leve aclaramiento fueron filtrados por una bujía Chamberland F. y el filtrado utilizado en el siguiente ensayo:

Segundo ensayo.

- a) TUBOS DE EXPERIMENTACION: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterios radicícolos + 1 ml del segundo filtrado.
- b) TUBOS TESTIGOS: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterios radicícolos.
- c) TUBOS CONTROL: Con 10 ml del líquido de Laird + 1 ml del segundo filtrado.

En este ensayo utilizamos solamente los cultivos que habían sido débilmente aclarados. La clarificación en esta oportunidad fué mayor, notándose que los cultivos de los tubos de experimentación permanecían más claros que los de los testigos. Una de las razas de bacterios ensayadas mostró un aclaramiento más intenso, por lo cual resolvimos continuar la experimentación con esta raza que ya mostraba ser la más susceptible. Con el filtrado de esta raza realizamos el siguiente ensayo:

Tercer ensayo.

- a) TUBOS DE EXPERIMENTACION: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterios de la raza susceptible + 1 ml del tercer filtrado.
- b) TUBOS TESTIGOS: Con 10 ml del líquido de Laird + bacterios

de la raza susceptible.

c) TUBOS CONTROL: Con 10 ml del líquido de Laird + 1 ml del tercer filtrado.

Lo mismo que en los ensayos anteriores, todos los cultivos fueron incubados a 28° C. A las 48 horas los tubos de experimentación presentaron un aclaramiento casi total, que daban la apariencia de no haber sido sembrados con bacterias (Fig. 1). Esta mayor clarificación de los cultivos de bacterias radicícolas, con los filtrados del segundo y tercer pasaje, se debe a la exaltación de la virulencia del bacteriófago al desarrollarse en presencia de los bacterias.

En los tubos con los cultivos lisados apareció entre el quinto y sexto día el crecimiento secundario.

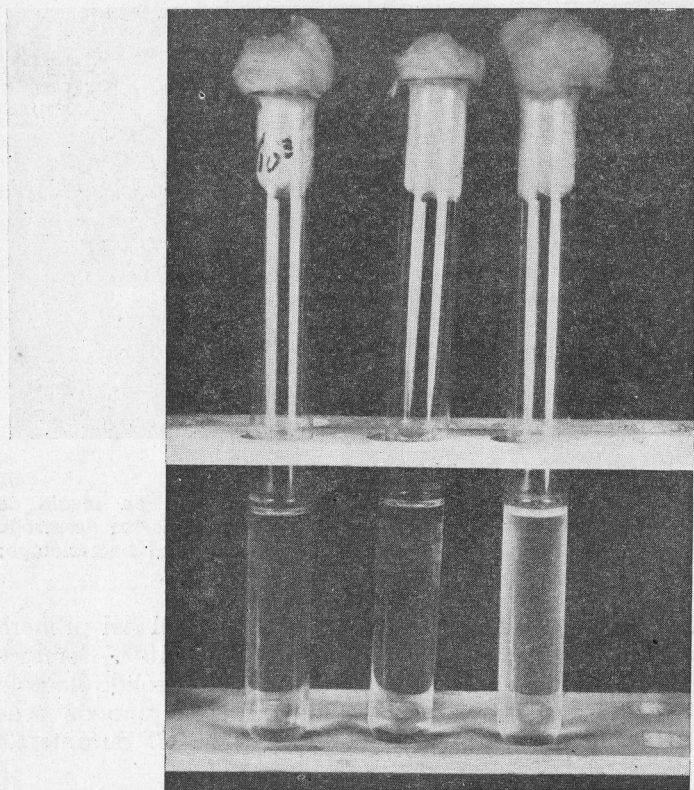


Fig. 1

Acción del bacteriófago sobre *Rhizobium meliloti* Dangeard, en medio de cultivo líquido. Los dos tubos de la izquierda, que permanecen claros, con el agregado de bacteriófago. El de la derecha, sin bacteriófago. X 0,5.

OBSERVACION DEL FENOMENO EN MEDIOS DE CULTIVOS SOLIDOS

Para la observación de la lisis en medios sólidos utilizamos, como ya hemos dicho, el mismo medio 5 de Laird más el agregado de 1,5 % de agar. Dado que los resultados en este último medio no fueron los esperados, resolvimos emplear el recomendado por Kleczwoska (op. cit.) con óptimos resultados.

Previamente preparamos una serie de tubos con 9 ml del medio líquido 5 de Laird, sembrándolos con la cepa susceptible al bacteriófago. Incubamos a 28° C. durante 24 horas. Con estos tubos efectuamos doce diluciones del tercer filtrado que contenía el principio lítico, inoculando el primer tubo con 1 ml del "fago"; luego



Fig. 2

Acción del bacteriófago sobre *Rhizobium meliloti* Dangeard, en medio de cultivo sólido. 1. Los pequeños círculos corresponden a las zonas sin desarrollo bacteriano. X 0,6. - 2. Arriba, estria de bacterio radicolola con bacteriófago; abajo, sin bacteriófago.

de mezclar bien sembramos un segundo tubo con 1 ml del primero y así sucesivamente hasta obtener una dilución del $1/10^{12}$. Sembramos 1 ml de cada una de esas diluciones en el medio sólido licuado y entibiado a 42° C. Volcamos el contenido de cada uno de esos tubos en cajas de Petri estériles. Incubamos a 25° C. durante 24 horas.

En las primeras cajas no observamos desarrollo bacteriano, debido a la gran concentración del "fago" que produjo una lisis completa. Las cajas que fueron sembradas con las diluciones $1/10^6$, $1/10^7$ y $1/10^8$ presentaron zonas completamente claras sin desarrollo bacteriano, que contrastaban con superficies blanquecinas de des-

arrollo. Las cajas que contenían una gran dilución del "fago" presentaron muy pocas zonas sin desarrollo.

Las zonas sin desarrollo se observan a simple vista; son de forma circular y pequeñas, siendo más extensas cuando se hacen confluentes, pero entonces no son de formas definidas, miden 1 a 2 mm de diámetro (Fig. 2, izquierda).

La lisis la observamos también en medios sólidos, haciendo dos estrías del bacterio susceptible sobre el medio anterior, solidificado en una caja de Petri. Luego sobre una de esas estrías efectuamos otra con el líquido que contenía el bacteriófago. Incubamos a 28° C. durante 48 horas. Observamos en la primera estría un desarrollo bacteriano abundante, mientras que en la segunda existían zonas estériles y muy pocas de crecimiento (Fig. 2, derecha).

La observación de la lisis en medios líquidos y sólidos nos permitió identificar el bacteriófago del *R. meliloti*. Pero con el fin de confirmar los resultados obtenidos, decidimos seguir las indicaciones de Chester (4), en un estudio de bacteriófagos de bacterios fitopatógenos. Dice el citado autor que se puede estar seguro de la presencia de un bacteriófago cuando se trabaja con un control esmerado y completo, por las observaciones de los efectos del bacteriófago en medios sólidos y en las diluciones en serie y por la persistencia de la reacción a través de numerosos y sucesivos pasajes. Para un completo control realizamos, ajustándonos a la técnica del autor mencionado, los siguientes ensayos:

- a) Tubos que contenían 10 ml del medio líquido de Laird + bacterios radicícolas de la raza susceptible + 1 ml del líquido con bacteriófago.
- b) Tubos que contenían 10 ml del medio líquido de Laird + bacterios radicícolas de la raza susceptible.
- c) Tubos que contenían 10 ml del medio líquido de Laird + 1 ml del líquido con bacteriófago.
- d) Tubos que contenían el medio líquido de Laird.
- e) Tubos que contenían 10 ml del medio líquido de Laird + bacterios de la raza susceptible + 1 ml del líquido de un pasaje anterior de un cultivo de varios pasajes, que no se le había agregado bacteriófago.
- f) Tubos con 10 ml del medio líquido de Laird + 1 ml del filtrado utilizado en e).

Los cultivos del ensayo a) se clarificaron a las 48 horas. Los del ensayo c) permanecieron completamente claros, puesto que sólo fueron sembrados con el bacteriófago. En igual forma se presentaron los del ensayo d), dado que contenían el medio sin sembrar. Los tubos del ensayo e) tenían por finalidad descartar la posibilidad

de una influencia de los productos del metabolismo bacteriano y de la existencia de un bacteriófago "simbiótico" asociado con los bacterios del ensayo; presentaron una turbiedad igual al del ensayo b). Finalmente, los tubos del ensayo f) permanecieron completamente claros y sirvieron de control para el filtrado agregado en e).

DETERMINACION CUANTITATIVA DE LA VIRULENCIA DEL BACTERIOFAGO. EN MEDIOS LIQUIDOS

Esta determinación consiste en establecer la máxima dilución del "fago" que es capaz de producir lisis de un cultivo de bacterios.

Procedimos en la siguiente forma:

Sembramos doce tubos que contenían 9 ml del medio líquido de Laird con bacterios de la raza susceptible. Incubamos a 25° C. durante 24 horas. Al cabo de ellas agregamos al primer tubo 1 ml de un filtrado de bacteriófago de "octavo pasaje"; luego de mezclar retiramos 1 ml y lo agregamos al segundo tubo de la serie y así sucesivamente hasta el duodécimo tubo. Incubamos a 25° C. y realizamos las observaciones que consignamos a continuación:

VIRULENCIA DEL BACTERIOFAGO DE "OCTAVO PASAJE"

Dilución	Horas de observación				
	18	24	48	72	96
1/10 ¹	aaaa (1)	aaaa	aaaa	aaa	aa
1/10 ²	aaaa	aaaa	aaaa	aaa	aaa
1/10 ³	aaaa	aaaa	aaaa	aaa	aaa
1/10 ⁴	aaa	aaaa	aaaa	aaaa	aa
1/10 ⁵	aaa	aaa	aaaa	aaaa	aa
1/10 ⁶	aaaa	aaaa	aaaa	aaaa	aaa
1/10 ⁷	aa	aa	aaaa	aaa	aa
1/10 ⁸	a	aa	aaaa	aaa	a
1/10 ⁹	a	a	aaaa	aa	n
1/10 ¹⁰	n	n	aa	aa	n
1/10 ¹¹	n	n	a	a	n
1/10 ¹²	n	n	a	n	n

- (1) aaaa Perfectamente claro.
 aaa Casi claro.
 aa Definidamente más claro que el control.
 a Muy ligeramente claro.
 n Igual que el control.

En el cuadro anterior se puede observar que el bacteriófago aislado por nosotros era capaz de lisar cultivos líquidos de *R. meliloti* a una dilución de $1/10^9$.

V — RESUMEN Y CONCLUSIONES

En el presente trabajo se demuestra la existencia del bacteriófago *Phagus subvertens* H., en nuestro país. Fué hallado en las raíces de las plantas y tierra de un cuadro de alfalfa (*Medicago sativa* L.), de la Facultad de Agronomía de La Plata, que mostraba síntomas de "fatiga" o "cansancio".

Luego de analizarse los antecedentes en la bibliografía extranjera e indicar la distribución geográfica, se describen los materiales empleados, muestras ensayadas y cultivos utilizados.

Las cepas de bacterias radicícolas de La Plata, Baradero y Miramar se obtuvieron por los procedimientos corrientes para conseguir un cultivo puro.

De acuerdo con Vandecaveye y Katznelson (op. cit.) los ensayos para determinar el principio lítico dieron resultados positivos en un alfalar de más de tres años, no hallándolo en cuatro alfalfares de uno a dos años. Las raíces de aquellas plantas presentaban escasa cantidad de nódulos y de ellos muchos en vías de disolución.

La lisis de los bacterios se comprobó, en los medios líquidos, por la clarificación del cultivo luego de agregarse el filtrado con el bacteriófago y en los medios sólidos, por la aparición de zonas sin desarrollo microbiano.

El bacteriófago demostró ser activo en diluciones de $1/10^{10}$ con filtrados de octavo pasaje, en cultivos líquidos de *R. meliloti* en el medio 5 de Laird.

De los ochenta y tres biotipos de bacterias radicícolas (*Rhizobium meliloti* Dangeard) ensayados, sólo siete demostraron ser susceptibles al bacteriófago y sólo uno fué lisado completamente.

La certeza de la presencia del bacteriófago deriva de la observación del fenómeno en medios sólidos y en las diluciones en serie, por la permanencia de la reacción a través de gran cantidad de pasajes y porque el trabajo se efectuó con un control esmerado y completo.

VII—BIBLIOGRAFIA CITADA

- (1) **Almon, L. and P. W. Wilson.** 1933. Bacteriophage in relation to nitrogen fixation by red clover. Arch. Mikrobiol. 4: 209-219.
- (2) **Bottecher, E. and A. W. Hofer.** 1943. Semi-quantitative determinations of bacteriophage in soils. Jour. Bact. 45: 407-408.
- (3) **Campbell, J. and A. W. Hofer.** 1943. A medium adapted to the bacteriophage of *Rhizobium leguminosarum*. Jour. Bact. 45: 406-407.
- (4) **Chester, K. S.** 1933. Studies bacteriophage in relation to phytopathogenic bacteria. Zentralbl. f. Bakt. II Abt. 89: 1-30.
- (5) **Demolon, A. et A. Dunez.** 1935. Recherches sur le rôle du bactériophage dans la fatigue des luzernières. Ann. Agron. 5: 89-111.
- (6) **Demolon, A. et A. Dunez.** 1936. Nouvelles observations sur le bactériophage et la fatigue des sols cultivés en luzerne. Ann. Agron. 6: 434-454.
- (7) **Fred, E. B., I. L. Baldwin and E. Mc Coy.** 1932. Root Nodule Bacteria and Leguminous Plants. Madison.
- (8) **Fred, E. B. and S. A. Waksman.** 1928. Laboratory Manual of General Microbiology. New York.
- (9) **Fuller, W. H. and S. C. Vandecaveye.** 1941. Isolation and identification of rhizobia bacteriophage. Soil Sci. Soc. of Amer. 6: 197-199.
- (10) **Gerretsen, F. C., A. Gyns, J. Sack und N. L. Söhgen.** 1923. Das Vorkommen eines Bakteriophagen in den Wurzelknöllchen der Leguminosen. Zentralbl. f. Bakt. II Abt. 60: 311-316.
- (11) **Katznelson, H. and J. K. Wilson.** 1941. Occurrence of *Rhizobium meliloti* bacteriophage in soils. Soil Sci. 51: 59-63.
- (12) **Kleczkowska, J.** 1945. The production of plaques by *Rhizobium* bacteriophage in poured plates and its value as a counting method. Jour. Bact. 50: 71-79.
- (13) **Laird, D. G.** 1932. Bacteriophage and the root nodule bacteria. Arch. Mikrobiol. 3: 159-193.
- (14) **Sánchez Marroquín, A. y C. Casas Campillo.** 1944. Aislamiento, incidencia y caracterización del bacteriófago del *Rhizobium meliloti*. An. Esc. Nac. Ciencias Biol. 3 (3-4): 304-329. México.
- (15) **Vandecaveye, S. C. and H. Katznelson.** 1936. Bacteriophage as related to the root nodule bacteria of alfalfa. Jour. Bact. 31: 465-477.
- (16) **Yen, A. C. H.** 1935. Pour plate study of bacteriophage. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 32: 1006-1010.