

**EFFECTE PARADOXAL DEL TARONJA D'ACRIDINA
EN RELACIÓ A L'ACCIÓ D'UN FACTOR EPISÒMIC
DE *CITROBACTER INTERMEDIUM* C₃**

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1969 per

R. GUERRERO

Professor ajudant del Departament de Microbiologia a la Facultat
de Ciències de la Universitat de Barcelona

i

R. PARÉS i FARRÀS

Professor del Departament de Microbiologia a la Facultat
de Ciències de la Universitat de Barcelona

INTRODUCCIÓ

Després dels treballs de S. HERNÁNDEZ era versemblant d'assignar un origen episòmic a la propietat de la soca C₃ de *Citrobacter intermedium* d'alliberar glutamat al medi^{4, 5}. Però la hipòtesi quedà fora de tot dubte després que R. PARÉS-FARRÀS i J. GUINEA feren conèixer la transferència de la propietat de segregat glutamat a la soca ATCC 11606 de *Paracolobactrum intermedium*, la qual mai no la posà de manifest per ella mateixa^{9, 11}.

Per tal de poder explicar els fets observats, cal considerar, no dos, sinó tres tipus diferents de cèl·lules en les poblacions de les soques C₃: les sg⁺, i dues menes de sg⁻. Si la sg⁻ no tingués material episòmic, de petits inòculs derivats d'una colònia de tipus C seria possible d'obtenir una soca homogènia, baldament calgués repetir l'operació una vegada i una altra. Això no ha estat possible fins ara. Tot fa pensar en cèl·lules sg⁻ amb episoma autònom que poden passar a sg⁺ per integració, i cèl·lules sg⁻ que necessitarien, a més, infecció prèvia.

Si les formes sg⁺ fossin aquelles que no tenen material episòmic, hom podria obtenir fàcilment cultius segregadors homogenis, cosa que no passa, i l'efecte del taronja d'acridina (OA) estudiat per HERNÁNDEZ, hauria produït un augment i no una inhibició de la velocitat del canvi sg⁻ → sg⁺.

Tot feia pensar en tres estats: sense episoma, episoma autònom i episoma integrat; cal reconèixer, però, que necessitàvem proves més directes i prou convincents.

L'objecte d'aquest treball és de palesar un efecte aparentment contradictori de l'OA en relació a les soques C₃, anomenat per això ací «efecte paradoxal». A més, explica com aquest efecte paradoxal constitueix la desitjada prova directa de l'existència d'un estat integrat del material episòmic. L'efecte habitual, determinat per la propietat de l'OA d'inhibir la multiplicació de l'ADN bacterià extracromosòmic, que també hom pot aconseguir en la C₃, és la prova de l'existència de la forma autònoma.

MATERIAL I MÈTODES

Quant a l'aïllament i als trets taxonòmics i culturals de la soca C₃ que han estat tinguts en compte en aquest treball, cal remetre a ², bé que algunes de les dades corresponents ja havien estat donades a conèixer molt abans ^{1, 8, 10}. El fonament del mètode d'anàlisi colonial i la forma precisa en la qual ha estat portada ací són descrits a ^{3, 4}.

Ha estat utilitzat el taronja d'acridina Schuchardt, del qual cal preparar una solució aquosa a la concentració d'1 mg/ml, i esterilitzar-la a l'autoclau durant 10 min a 120° C, després d'haver-la repartida en ampulles de 5 ml tancades al foc. Hom afegeix les quantitats adients a cada experiment sota aquelles condicions que permetin de mantenir l'esterilitat del medi, preparat a part. Aquest últim és sempre el descrit a ² com a M₁.

RESULTATS

En la taula I queden especificades aquelles condicions en què foren duts a terme els experiments on fou assajat l'efecte de l'OA. En els caracteritzats per emprar un petit inòcul, hom obté una clara reducció de la fracció de colònies A relativa a la corresponent a la població normal; en els fets amb grans inòculs, un significatiu augment. Hom considera important que en el primer cas els temps d'incubació siguin curts (12 h), i llargs en el segon (12 a 72 h).

Fent subcultius successius amb 10 γ /ml d'OA cada 24 h, i emprant grans inòculs (10⁴-10⁶ cèl/ml), hom ha obtingut poblacions que per anàlisi colonial donaven un 100 % de colònies A. Subcultius amb 10 γ /ml d'OA començats amb inòculs d'1 a 10 cèl/ml han donat poblacions que per anàlisi colonial no produïen cap colònia de tipus A.

En els dos casos referits, el posterior subcultiu successiu en el medi sense OA porta a una població idèntica a la inicial de *Citrobacter intermedium* C₃.

Ha estat observat a cop d'ull que les poblacions que donen percentatges de colònies A molt alts creixen més ràpidament. Un càlcul del temps mitjà de generació basat en la llei logarítmica del creixement dona, de les 3 a les 16 h de cultiu, 1,25 h i 0,90 h respectivament, per a poblacions corresponents a un 10-30 % de colònies A i 80-100 % de colònies A. En aquests casos la població normal de C₃ dona per anàlisi colonial un 50-60 % de colònies A.

TAULA I

Efectes normal i paradoxal de l'OA en relació a poblacions de *Citrobacter intermedium* C3, segons els resultats de l'anàlisi colonial

A. *Experiments caracteritzats per emprar petits inòculs* (1-100 cèl/ml). Incubació 12 h.

	Experiment n. 2		Experiment n. 3		Experiment n. 4		Experiment n. 8	
	OA	—	OA	—	OA	—	OA	—
Nombre de plaques	5	5	9	4	12	6	6	6
Nombre total de colònies	25	188	66	16	127	75	109	108
Nombre colònies A	1	74	8	5	7	39	0	58
Freqüència A, en %	4,0	39,3	12,1	31,2	5,5	52,0	0	53,7

Mitjana de la reducció de la fracció de colònies A: 87,74 %

B. *Experiments caracteritzats per emprar grans inòculs* (10.000 cèl/ml). Incubació 12-72 h.

	n. 0		n. 00		Experiment n. 1		Experiment n. 5		Experiment n. 6		Experiment n. 7	
	OA	—	OA	—	OA	—	OA	—	OA	—	OA	—
Nombre de plaques	4	4	14	6	5	6	12	8	6	6	6	6
Nombre total de colònies	235	86	366	87	42	58	105	75	106	106	106	106
Nombre colònies A	175	50	252	38	5	16	30	29	54	54	50	50
Freqüència A, en %	74,5	58,1	68,8	43,6	11,9	27,6	28,5	38,7	51,9	51,9	47,2	47,2

Mitjana de l'augment de la fracció de colònies A: 24,63 %

DISCUSSIÓ

Ara per ara, deixant a part el bacteriòfag λ , hom coneix tres tipus de factors episòmics: el factor F de fertilitat a *Escherichia coli* K 12, els factors Col., i el factor R^{7, 13, 14}. No obstant això, amb relació al concepte primitiu d'episoma⁶, cal tenir en compte que alguns factors R no són transmissibles per conjugació, i en cap no hi ha evidència d'una forma integrada estable¹².

El factor S descrit pel grup del Departament de Microbiologia de la Facultat de Ciències, sembla ésser dotat de totes les propietats inherents al concepte estricte d'episoma, sense que això vulgui dir que un coneixement més profund permeti d'establir-ne diferències. Després del treball^{4, 5, 9, 11} hom pot concloure l'existència d'un material genètic extracromosòmic transferible per infecció.

L'efecte paradoxal només pot ésser el resultat de dos fets: la insensibilitat a l'OA del factor S integrat, com es dona en tots els altres estats integrats d'ADN extracromosòmic¹², i la major velocitat de multiplicació de les formes sg⁺, és a dir, amb l'episoma integrat.

Hom verifica la interpretació referida en seleccionar les formes sg⁺, i hom obté poblacions que l'anàlisi colonial revela amb un major percentatge de colònies de tipus A.

NOTA. — No volem concloure aquest treball sense agrair a la senyoreta J. Valoix la seva col·laboració i el seu ajut, tant en l'aspecte experimental com en l'humà, tan necessaris en tota empresa científica.

BIBLIOGRAFIA

1. CLOTET, R., i PARÉS-FARRÀS, R. — *Producción de aminoácidos por bacterias del suelo*. I Reunión de Microbiólogos Españoles. Madrid, 1962.
2. CLOTET, R.; GUINEA, J., i PARÉS-FARRÀS, R. — *Segregación de aminoácidos por una cepa de "C. intermedium"*. «Microbiol. Español.», 21: 155 (1968).
3. GUINEA, J. — *Estudio sobre la segregación de aminoácidos por "E. intermedia" C₅ y su condicionamiento genético* (tesi doctoral). Universitat de Barcelona, 1966.
4. HERNÁNDEZ, S. — *Segregación de glutamato en "Citrobacter intermedium" C₅ como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico* (tesi doctoral). Universitat de Barcelona, 1968.
5. HERNÁNDEZ, S., i PARÉS-FARRÀS, R. — *Interconversió genètica de formes segregadores i no segregadores d'aminoàcids en poblacions de "C. intermedium" C₅*. «T. Soc. Cat. Biol.», 27: 71-80 (1969).
6. JACOB, F., i WOLLMAN, E. L. — «Compt. Rend.», 247: 154-56 (1958).

7. LAVALLE, R., i JACOB, F. — «Compt. Rend.», 252: 1678-80 (1961).
8. PARÉS-FARRÀS, R., i CLOTET, R. — *Producción de aminoácidos por bacterias del suelo*. VII Jornades Bioquímiques Llatines. Gènova, 1963.
9. PARÉS-FARRÀS, R., i GUINEA, J. — *Transferencia interespecífica del factor episómico que condiciona la segregación de glutamato en "C. intermedium" C₃*. V Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Saragossa, 1968.
10. PARÉS-FARRÀS, R.; GUINEA, J., i CLOTET, R. — *Excreción de aminoácidos por un coliforme*. III Reunión de Bioquímicos Españoles. Oviedo, 1965.
11. RAMOS, A.; GUINEA, J., i PARÉS-FARRÀS, R. — *The transfer of a factor which determines glutamate secretion from "Citrobacter intermedium" C₃ to "Paracolonobacterium intermedium" (ATCC 11606)*. V General Meeting of the Society for General Microbiology. Edimburg, 1968.
12. SCAIFE, J. — *Episomes*. «Annual Review of Microbiology», 21, 601-38 (1967).
13. SILVER, S., i OZEKI, H. — «Nature», 195: 873-74 (1962).
14. WATANABE, R. — «J. Bacteriol.», 85: 788 (1963).