

**INTERCONVERSIÓ GENÈTICA DE FORMES SEGREGADORES
I NO SEGREGADORES D'AMINOÀCIDS EN POBLACIONS
DE *CITROBACTER INTERMEDIUM* C₃**

Comunicació presentada el dia 22 de maig de 1969 per

S. HERNÁNDEZ

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

El fenomen de l'heterogeneïtat colonial a *Citrobacter intermedium* C₃ fou estudiat d'antuvi per R. PARÉS, J. GUINEA i R. CLOTET^{5, 13}, els quals formularen la hipòtesi d'una població barrejada en equilibri de formes segregadores sg⁺ i no segregadores sg⁻ de glutamat. Hom pot obtenir colònies que no acumulen aquest aminoàcid al seu entorn (colònies C), constituïdes per una majoria d'elements no segregadors sg⁻. Prenent com a punt de partida petites fraccions d'aquestes poblacions, els autors esmentats establiren el canvi sg⁻ → sg⁺, per anàlisi de la fluctuació dels tipus colonials derivats d'elles¹¹. L'examen dels resultats fou coherent amb les següents hipòtesis: el canvi sg⁻ → sg⁺ té lloc amb una alta probabilitat per individu i generació; el canvi es transmet a la descendència i no és aparentment afectat pel medi; i la probabilitat d'aquest canvi no és igual per a tots els cultius, com passa en les mutacions clàssiques, sinó que en difereix perquè allí on es produeix, el canvi sembla que afecta una gran part dels elements de la població^{5, 6, 13}.

La transformació sg⁻ → sg⁺ és un fenomen genètic particular, i aquest treball té per objecte mostrar-ne alguns aspectes quantitius. Hom estableix el fonament d'uns experiments que permeten de determinar el pas d'una forma a l'altra i hom analitza el resultat d'aquests experiments. També és palesat con el taronja d'acridina (OA) i l'agitació mecànica poden reprimir la transformació.

Els experiments ací referits constitueixen un suport important pel fet de considerar el fenomen de la segregació de glutamat per *Citrobacter intermedium* C₃ com el resultat de la presència d'un material de tipus episòmic.

MATERIAL I MÈTODES

La soca C₃ de *Citrobacter intermedium* fou aïllada i estudiada per R. CLOTET, R. PARÉS i J. GUINEA^{2, 3, 5}. Hom la cultiva en un medi de glucosa i sals minerals. L'anàlisi de les colònies obtingudes sobre medi sòlid és duta a terme utilitzant la soca auxotròfica glutamat-dependent

Leuconostoc mesenteroides P-60 (ATCC 8042). Hom estén curosament una suspensió d'aquest organisme en *Glutamic Assay Medium* (Difco) damunt el medi sòlid on es fa *C. intermedium* C₃. Després d'incubació, el creixement de *Leuconostoc* permet de diferenciar tres menes de colònies de *C. intermedium*: colònies A, amb un abundant creixement de *Leuconostoc* al seu entorn; colònies B, amb molt poc creixement; i colònies C, sense desenvolupament de *Leuconostoc* al seu entorn. L'anàlisi colonial ha d'ésser practicada sota condicions rigorosament controlades, les quals han estat establertes i discutides meticulosament ^{5, 6}.

Una solució aquosa de taronja d'acridina (Schuchardt) és esterilitzada a part, a 110° C durant 10 minuts, i és afegida en quantitats adients en els medis indicats en els experiments descrits a l'apartat de resultats. Hom té cura d'incubar els tubs d'OA fora de la llum, dins fundes metàl·liques.

Els cultius, amb agitació, han estat realitzats en un bany «Gallenkamp», a una freqüència de 150 sacsejades per minut i a la màxima amplitud de l'aparell. Dins el cultiu hom situa dues barretes de vidre de 2 i 5 mm de diàmetre respectivament i d'una longitud justa per a no sobreixir del medi. En aquestes condicions l'agitació no produeix incorporació turbulenta d'aire ni es redueix a un moviment circular del medi.

La freqüència dels elements sg⁺ en una determinada població no pot ésser determinada directament per diversos motius: les colònies de tipus A no contenen únicament elements sg⁺; les colònies de tipus A poden ésser derivades d'individus sg⁻; hi ha una fracció de colònies B, l'origen de les quals no queda definit; hom no coneix cap medi de cultiu selectiu per a una de les dues formes.

Si la velocitat del canvi sg⁻ → sg⁺ fos de l'ordre de magnitud de les mutacions conegudes als bacteris no tindria lloc el segon d'aquests condicionaments, i partint de poblacions constituïdes fonamentalment pel tipus sg⁻ fóra pràcticament impossible de trobar colònies A en un medi que també pot permetre el creixement de les colònies C.

La freqüència:

$$F' = \frac{\text{n.º mitjà de colònies A per placa}}{\text{n.º total mitjà de colònies per placa (N)}}$$

serà molt més gran que:

$$F = \frac{\text{n.º d'elements sg}^+ (x)}{N}$$

Per a petits inòculs constituïts de fraccions de la població d'una colònia de tipus C, hom pot considerar que $F = 0$. Això pressuposa que en estendre 0,1 ml d'una suspensió molt diluïda d'una colònia C, totes les colònies A que surtin després de revelar amb *Leuconostoc* seran originades per cèl·lules sg^- . Per tant, la determinació d'aquesta freqüència en un elevat nombre de plaques i sota unes condicions uniformes de treball ens permetrà de determinar la probabilitat P que una cèl·lula sg^- doni una colònia A ($P = N_A/N$).

Per a una població mixta tindrem

$$F' = \frac{N_A}{N} = \frac{x + \Delta}{N} \quad (I)$$

essent Δ el nombre de cèl·lules sg^- que han donat lloc a colònies de tipus A.

D'altra banda

$$\Delta = P(N - x) \quad (II)$$

Hom pot suposar en primera aproximació que la freqüència F creix linealment en funció del nombre de generacions n , com la freqüència de la mutació. Si considerem dos temps de generació n_1 i n_2 relativament petits i poc diferents, la velocitat a del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$ serà:

$$a = \frac{F_2 - F_1}{n_2 - n_1} = \frac{x}{Nn} \quad (III)$$

Dels valors de F' hom pot obtenir un quocient

$$a' = \frac{F'_2 - F'_1}{n_2 - n_1} \quad (IV)$$

Substituint en (IV) el valor de F' de (I) tindrem:

$$a' = \frac{\frac{x_2 + \Delta_2}{N_2} - \frac{x_1 + \Delta_1}{N_1}}{n_2 - n_1}$$

i fent operacions obtenim també:

$$a' = a \frac{N_1 \Delta_2 - N_2 \Delta_1}{N_1 N_2 (n_2 - n_1)}$$

Si fem $N_1 = N_2$ resta:

$$a' = a \frac{\Delta_2 - \Delta_1}{N (n_2 - n_1)}$$

Però aplicant (II) resta:

$$a' = a \frac{P (N - x_2) - P (N - x_1)}{N (n_2 - n_1)}$$

Però de (III) podem obtenir la transformació:

$$\boxed{a' = a (1 - P)} \quad (V)$$

L'expressió (V) dona la velocitat real del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$ a partir del quocient a' i del valor P , ambdós determinables experimentalment. Cal només partir d'inòculs adients per tal que després de n_1 , i n_2 generacions donin poblacions idèntiques en nombre total d'individus per unitat de volum.

Cal tenir en compte que la igualtat de les dues poblacions esmentades es mantindrà durant tota la fase logarítmica de llur creixement en tant que el temps de generació sigui el mateix.

Si a és molt gran, com és de preveure, cal el canvi invers $sg^+ \rightarrow sg^-$ per a poder arribar a l'equilibri de formes sg^- i sg^+ a la població. Per tant, amb un temps prou gran, $F_4 - F_3 = 0$, i $F'_4 - F'_3 = 0$. Això permet d'estimar la velocitat b d'aquest canvi invers. Efectivament, quan la població hagi arribat a l'equilibri:

$$\frac{x}{N} = \frac{\frac{N_A}{N} - P}{1 - P} \quad (VI)$$

Amb (VI), i amb el valor d'*a* pot ésser determinat el nombre de generacions necessàries per a arribar a l'equilibri, i amb això trobar també el valor de *b*:

$$b = a \frac{x}{N - x} \tag{VII}$$

El nombre mínim de generacions per a arribar a l'equilibri pot ésser determinat gràficament o analíticament a partir dels valors en l'equilibri de *x/N* i *a* o *b* (fig. 1).

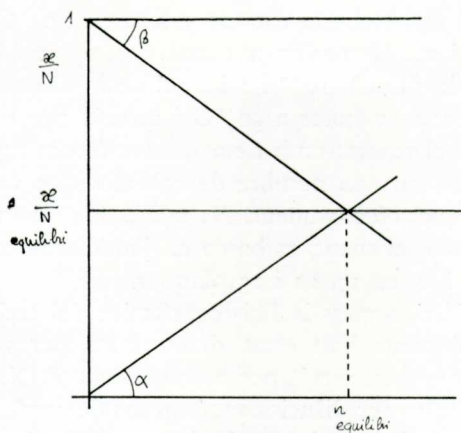


FIG. 1. Equilibri $sg^- \rightleftharpoons sg^+$ a partir de poblacions sg^- i sg^+

RESULTATS

A la taula I hom mostra els resultats obtinguts en tres experiments reiteratius i fonamentats en l'exposició teòrica precedent.

TAULA I

Velocitat del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$, segons $a = \frac{a'}{1 - P}$

Prova	P	F ₁	n ₁	F ₂	n ₂	a'	a
1	0,55	0,51	0,6	0,615	6,7	0,017	3,8·10 ⁻²
2	0,275	0,45	0,2	0,61	6,7	0,02	3,0·10 ⁻²
3	0,223	0,225	0,25	0,54	10,1	0,02	4,1·10 ⁻²

La probabilitat que una cèl·lula sg^- doni una colònia A és la fracció de colònies A d'una població procedent d'una colònia C, tot prenent-ne una part prou petita perquè no calgui considerar les cèl·lules sg^+ que puguin contenir. Cada valor de P ha estat obtingut d'11, 23 i 20 plaques amb un nombre de colònies de 25 per terme mitjà. Les diferències han estat cercades expressament fent el revelat de *Leuconostoc* en temps cada cop més petits.

Hom parteix d'una colònia de tipus C suspesa en 10 ml de Ringer 1/4; hom prepara dilucions 10^{-2} , 10^{-4} , 10^{-6} i 10^{-8} i hom estén volums de 0,1 ml sobre plaques de la dilució 10^{-4} per tal de determinar el valor de P . Hom inocula tubs de 10 ml de medi de cultiu amb 0,1 ml de la dilució 10^{-2} , la qual és incubada durant 3 hores a 30 °C; amb aquesta sèrie hom troba F'_1 i n_1 . Hom duu a terme una operació paral·lela amb inòculs de 0,1 ml de la dilució 10^{-6} i 1 i 2 ml de la dilució 10^{-8} . Aquesta última sèrie és incubada 12 hores a 30 °C i serveix per a determinar F'_2 i n_2 . En tots els casos el revelat amb *Leuconostoc* és obtingut per extensió directa de 0,1 ml, i en surt un nombre de colònies que varia de 10 a 35, la qual cosa indica que, efectivament, $N_1 = N_2$. Els resultats de F'_1 i n_1 corresponents a cada experiment, es basen en l'anàlisi colonial de 10, 19 i 18 plaques. El de F'_2 i n_2 en 17, 21 i 15 plaques.

Per a calcular n_1 i n_2 segons la llei logarítmica del creixement, cal conèixer els inòculs. Aquests han estat determinats per recompte viable damunt les plaques que han servit per a determinar P . No obstant això, per als inòculs constituïts per dilucions més grans de 10^{-6} , l'enumeració és feta independentment aplicant el mètode del nombre més probable de microorganismes viables. Els valors obtinguts són molt semblants i permeten d'assignar a a un valor mitjà de $3,6 \cdot 10^{-2}$.

Per tal de determinar la relació x/N a l'equilibri ha estat dut a terme un experiment semblant, en què és determinat F_3 a les 24 h. i F_4 a les 33 h. Els valors mitjans obtinguts són de 0,312 i 0,485, no significativament diferents després de la prova de la «t» de Student. Els valors de F' corresponents a la tercera i la quarta sèries han estat obtinguts de l'anàlisi colonial de 14 i 8 plaques respectivament.

Amb el valor mitjà a l'equilibri de $x/N = 0,4$ i el corresponent valor de P , aplicant (VII) hom obté un valor b igual a $2,37 \cdot 10^{-2}$, del mateix ordre que a .

Gràficament, com és indicat a la fig. 1, ha estat obtingut el valor mínim de n a l'equilibri, el qual resulta ésser de 7-8 generacions.

A la taula II hom pot veure els resultats obtinguts en dos experiments paral·lels als de la taula II, però duent a terme el cultiu en presència de 50 γ /ml d'OA. Cada valor de P ha estat obtingut respectivament de 19 i 13 plaques, duent a terme el revelat amb *Leuconostoc mesenteroides* P-60,

sobre colònies més grans que d'ordinari per tal que totes les colònies de tipus A es possessin ben clarament de manifest. Els valors de F'_1 i n_1 es basen en els resultats de 13 i 10 plaques. Els de F'_2 i n_2 , en 8 i 5 plaques.

TAULA II

 Efecte del taronja d'acridina a la velocitat del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$

<i>Prova</i>	<i>P</i>	F'_1	n_1	F'_2	n_2	a'	a
1	0,91	0,542	- 1,4	0,39	3,98	- 0,029	- 0,3
2	0,77	0,8	- 0,33	0,041	3,26	- 0,21	- 0,91

Hom troba valors negatius d' a en tots dos casos. La significació d'aquests valors és posada fora de tot dubte per l'anàlisi estadística dels resultats utilitzant el mètode de la «t» de Student per a diferenciar els valors corresponents a la segona i la tercera sèries, els quals constitueixen la base del càlcul.

A la taula 3 presentem els resultats obtinguts en dos nous experiments paral·lels en els quals el cultiu té lloc amb agitació constant. El nombre de plaques amb una mitjana de 25 colònies cada una sobre el qual han estat obtinguts els valors de P , F'_1 i n_1 i F'_2 i n_2 , són 17-6, 13-15 i 16-15.

TAULA III

 Efecte de l'agitació a la velocitat del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$

<i>Prova</i>	<i>P</i>	F'_1	n_1	F'_2	n_2	a'	a
1	0,55	0,55	- 0,76	0,17	7,1	- 0,084	- 0,1
2	0,41	0,4	0,87	0,39	7,5	- 0,0015	- 0,002

La velocitat del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$, en cultius agitats també resta anul·lada. No obstant els valors negatius obtinguts, una anàlisi estadística adient posa de manifest que els dos valors experimentals no difereixen significativament de 0.

DISCUSSIÓ

Hem discutit en un altre lloc les raons per les quals no resulten aplicables els mètodes coneguts per a la determinació de la velocitat de la mutació en l'estudi cinètic del canvi $sg^- \rightarrow sg^+$.

Els valors obtinguts d' *a* són excepcionalment grans si hom els mira com un fenomen mutacional. Els canvis genètics coneguts que tenen lloc amb una freqüència propera són assignats a caràcters deguts a ADN extracromosòmic, bé que no sempre hagin estat trobades proves directes ^{1, 4}.

El fet que en les proves de fluctuació dutes a terme amb la transformació $sg^- \rightarrow sg^+$, no obtinguem distribucions de les freqüències de colònies de tipus A, corresponents a la de Poisson, fa pensar també ací en un fenomen de tipus infecció ⁶.

El taronja d'acridina pot eliminar el factor F d'*Escherichia coli* K-12 quan es troba lliure al citoplasma ⁷. Aquesta propietat es posa també de manifest sobre molts altres plàsmids ⁸, bé que no sobre tots ¹². De fet, l'obtenció de valors negatius d'*a* en els experiments amb OA referits més amunt, insinuen la possibilitat de l'eliminació d'un factor de tipus episòmic que determinava la mateixa propietat de segregar glutamat. També insinuen que la velocitat normal del canvi és deguda a multiplicació ràpida d'aquest factor i la transferència a d'altres cèl·lules per infecció. Paral·lelament als factors de fertilitat F d'*Escherichia coli* K-12 i als factors R de resistència acoblada a antibiòtics ¹⁶, hom pot així suggerir l'existència d'un factor S que condicionaria la segregació de glutamat a *Citrobacter intermedium* C₃.

La transferència cèl·lula-cèl·lula dels referits factors té lloc a través de fimbries sexuals, diferenciables de les altres fimbries per llur capacitat de fixar bacteriòfags. Com sigui, són làbils a la forta agitació mecànica ^{9, 10, 16}. També la transferència del factor S és barrada per l'agitació mecànica, d'acord amb els valors nuls d'*a* que abans hom ha assenyalat.

El model genètic més coherent per a explicar els fets referits sembla ésser el d'un ADN extracromosòmic integrat en les formes sg^+ . Les formes sg^- podrien estar desproveïdes d'aquest factor o tenir-lo lliure, com a plàsmid. L'existència d'aquests dos tipus de cèl·lules sg^- sembla ésser necessari des del moment que hom ha pogut obtenir colònies A a partir de fraccions molt petites de la població d'una colònia del tipus C. Aquest model genètic ha tingut una important confirmació en la transferència del factor S a *Paracolobactrum intermedium* ATCC 1166 aconseguida per R. PARÉS i J. GUINEA ^{14, 15}.

BIBLIOGRAFIA

1. BRAUN, W. — *Bacterial Genetics*. W. B. Saunders Company. Philadelphia-London, 1965.
2. CLOTET, R. — *Producción directa de alanina por "Citrobacter intermedium" C₃* (tesi doctoral). Fac. Cien. Univ. Madrid, 1967.
3. CLOTET, R.; GUINEA, J., i PARÉS, R. — *Segregación de aminoácidos por una cepa de "Citrobacter intermedium"*. «Microbiol. Españ.», 21: 155 (1968).

4. DAVIS, B. D.; DULBECCO, R.; EISEN, H. N.; GINSBERG, H. H., i WOOD, W. B. — *Microbiology*. Hoeber Medical Division. 1967.
5. GUINEA, J. — *Estudios sobre la segregación de aminoácidos por "Escherichia intermedia" C₃ y su condicionamiento genético* (tesi doctoral). Fac. Cienc. Univ. Barcelona, 1966.
6. HERNÁNDEZ, S. — *Segregación de glutamato en "Citrobacter intermedium" C₃ como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico* (tesi doctoral). Fac. Cienc. Univ. Barcelona, 1968.
7. HIROTA, T., i IJIMA, T. — *Acriflavine as an effective agent for eliminating F factor in "Escherichia coli"*. «*Nature*», 180: 655 (1957).
8. HIROTA, T. — *The effect of acridine dyes on mating type in "Escherichia coli"*. «*Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*», 46: 57-64 (1960).
9. JACOB, F., i WOLLMAN, E. L. — *The chemical basis of heredity*. McElroy W. D. Glass H. B. Eds. John Hopkins Press. Baltimore, 1957.
10. JACOB, F., i WOLLMAN, E. L. — *Les épisomes, éléments génétiques ajoutés*. «*Compt. rend.*», 247: 154-156 (1958).
11. LURIA, S. E., i DELBRUCK. — *Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance*. «*Genetics*», 28: 491-511 (1943).
12. NOVICK, R. P. — *Staphylococcal plasmids*. Symposium Extrachromosomal Genetics Elements in Bacteria. 53 General Meeting Society for General Microbiology. Edimburg, Sep. 1968.
13. PARÉS, R.; GUINEA, J., i CLOTET, R. — *Excreción de aminoácidos por un coliforme*. III Reunión Bioquímicos Españoles. Oviedo, 1965.
14. PARÉS, R., i GUINEA, J. — *Transferencia interespecífica del factor episómico que condiciona la segregación de glutamato en "Citrobacter intermedium" C₃*. V Jornadas de Genética Luso-españolas. Saragossa, 1968.
15. RAMOS, A.; GUINEA, J., i PARÉS, R. — *The transfer of a factor which determines glutamate secretion from "Citrobacter intermedium" C₃ to "Paracolobactrum intermedium"* Symposium Extrachromosomal Genetics Elements in Bacteria. 53 General Meeting Society for General Microbiology. Edimburg, Sep. 1968.
16. WATANABE, T. — *Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria*. «*Bacteriol. Rev.*», 27: 87-115 (1963).