

**NOUS ASPECTES
DE LA SEXUALITAT BACTERIANA**

Comunicació presentada el dia 14 de febrer de 1962 pel doctor

CONRAD XALABARDER

Director de l'Institut Antituberculós
de Barcelona

Una de les coses més carregoses per als estudiosos de la genètica humana i dels éssers superiors ha estat el llarg temps necessari per a dur a terme aquestes observacions, i sobretot la dificultat de mantenir rigorosament estables les condicions peristàtiques i les del metabolisme individual. Per la qual cosa està sempre subjecte a crítiques severes qualsevol intent de comparar els resultats obtinguts per diferents observadors o, àdhuc, els d'un mateix observador en èpoques diverses.

Fou, per tant, una considerable millora per als estudis de genètica de poder treballar amb la mosca del vinagre *Drosophila melanogaster*, car es reproduïx de pressa i amb força abundor, i els seus caràcters fenotípics són ben fàcils de comprovar. Altrament, la seva cria pot ésser menada en condicions peristàtiques raonablement homogènies, i el gros format dels seus cromosomes salivals permet d'estudiar-los còmodament, sense necessitat d'instruments costosos. A despit d'aquests avantatges i del gran nombre de coneixements aportats per l'estudi d'aquest material, els caràcters fenotípics que podem observar en la *Drosophila* són només morfològics, sense que pugui obtenir-se cap indicació mesurable del seu metabolisme normal o modificat pels encreuaments imposats per l'experimentador.

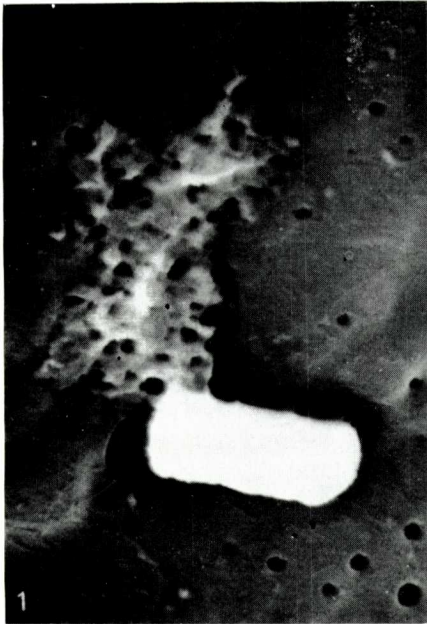
Com sigui que entre els anys 1929 i 1940, tant els bioquímics com els fisiòlegs anaren comprovant la identitat de composició i de mecanismes metabòlics entre els microorganismes i les cèl·lules dels organismes superiors, demostrant la fonamental unitat biològica de la matèria vivent, fou natural que els genetistes volguessin utilitzar per a llurs experiments els microbis i els bolets. Amb aquests últims no existia cap reserva mental, perquè era ja acceptat per tothom que tenen nuclis i formes de conjugació auto i heterosòmica. Amb aquesta base, BEADLE i TATUM (1941) otingueren llurs notables mutacions i recombinacions de *Neurospora crassa*.

En aquells temps, però, l'opinió general sostenia que les bacteries no tenien nucli, perquè els mètodes de coloració no deixaven traslluir cap diferenciació morfològica interna, i tot el cos bacterià quedava uniformement tenyit pels colorants bàsics. Els estudiosos d'aquest problema s'enginyaren en la creació de noves tècniques i trobaren que existeixen formacions intra-

bacterianes amb les mateixes afinitats pels colorants que la cromatina. Entre aquests investigadors cal citar primer MEYER (1894), AMATO (1909), DOBELL (1911), HOLLANDE (1934), i després també d'altres. El darrer dels autors citats publicà, el 1938, unes superbes fotografies, molt demostratives, que no tenen res a envejar a les que darrerament hom presenta com si fossin troballes modernes i amb voluntari oblit d'aquells importants i pacients treballs.

Tècniques més afinades i recents, siguin químiques (hidròlisi àcida seguida de tenyit amb colorants diversos), siguin físiques (espectrografia ultraviolada, microscopia electrònica i de contrast de fases), com també els mètodes bioquímics (tractaments amb enzims específics), no deixen ja el més petit dubte respecte a l'existència de substància cromatínica en totes les bacteries. El problema consisteix a precisar si la dita substància està disposada en morfologies homologables al veritable nucli de les altres cèl·lules, o bé si està dispersada informalment per tot el citoplasma. A despit dels innombrables treballs fets fins ara, les opinions sobre aquest punt divergeixen força. Els més rigoristes només accepten el nucli com un organet ben definit, individualitzat, permanent en totes les fases del desenvolupament cel·lular, diferenciable del citoplasma que l'envolta, del qual està separat per una membrana, i susceptible de partir-se directament o indirecta. Cal confessar que les masses cromàtiques que tenen les bacteries no reuneixen pas aquelles condicions de permanència formal i cronològica; al contrari: llur aparença és força variable segons quin sigui el moment vital de la bactèria, cosa ben raonable des del punt de vista biològic; però també és ben diferent segons el medi de cultiu i la tècnica utilitzada per a posar-les de manifest. Aquest és l'origen de llargues discussions, àdhuc entre els fervents partidaris d'un veritable nucli (DE LAMATER, HUNTER i MUDD, 1952; KNAYSI, 1956, etc.). D'altres, més prudents, parlen només de «cossos cromatínics» (ROBINOW, 1956), «equivalents nuclears» (KRIEG, 1954; BRANDES, SCHWARTZ i FLAIG, 1955; KELLEN-BERGER i RYTER, 1955), «nucleoides i carioides» (BRINGMANN, 1952), o bé d'«aparell nuclear» (TULASNE i VENDRELY, 1957). Un estudi crític de tota aquesta qüestió, molt interessant i complet, l'ha donat Mme. G. HOLLANDE (1962) ensems amb una explicació conciliatòria d'aquelles divergències, basada en els anteriors estudis d'A. Ch. HOLLANDE (1934). Es decanta decididament per la manca de nucli diferenciat, i creu que la cromatina no té persistència, sinó que decau i es refà contínuament en llocs diferents.

Sigui com sigui, no podem negar que les bacteries tenen substància nuclear, la veritable disposició de la qual ha fet que alguns investigadors descriguin l'existència de cromosomes i de figures mitòtiques (ROBINOW,



Les ramificacions genètiques comencen sempre el procés de multiplicació i acostumen a tenir aspecte diferent segons l'espècie bacteriana. - Fig. 1: *B. coli communior*. - Fig. 2: *B. cereus*. - Fig. 3: *My. tuberculosis* humana. - Fig. 4: *Proteus X 19*.

DE LAMATER, etc.). D'altres ho neguen rodonament, però, de vegades, en els cultius microbians es troben uns individus gegants amb la cromatina disposada en grumolls separats amb regularitat per espais buits. Aquesta fesomia, citada ja per NEUMANN (1941) i per ROBINOW (1944), l'he vista en diferents espècies bacillars. En les meves fotografies es mostren talment com els «cromosomes politènics» que DARLINGTON descriu en la *Drosophila*. Ningú no ha pogut encara explicar llur possible significació evolutiva, però el fet és que existeixen i alguna en deuen tenir.

Encara que puguin persistir les discussions sobre l'existència d'un nucli anatòmic, és evident que fisiològicament ha d'existir un dispositiu amb funció nuclear que regeixi la vida i la reproducció bacterianes. Avui ja se sap que aquesta «funció nuclear» està localitzada en l'àcid desoxiribonucleic (ADN), sigui quina sigui la morfologia on estigui contingut i, pel que resulta d'aquestes investigacions, més aviat sembla estar en forma difusa.

Emprar bacteries per als estudis i experiments de genètica és avantatjós per molts motius: possibilitat d'obtenir cultius genotípicament purs d'una manera il·limitada i en gran nombre; perfecta diferenciació de les colònies; gran velocitat de proliferació que en molts troncs arriba a ésser de 10 generacions diàries; relativa uniformitat de tots els individus que componen una colònia; facilitat de recompte i de selecció; diversitat i intensitat de llurs funcions enzimàtiques, algunes de les quals no es troben en cap més cèl·lula vivent; facilitat de variacions adaptatives o mutacionals; sensibilitat a drogues i a bacteriòfags, la qual cosa permet de fer estudis precisos de les recombinacions; facilitat d'anàlisis bioquímiques o d'altra mena, etc.

L'existència de fases sexuades en les bacteries ja havia estat sospitada per diversos observadors, basant-se únicament en dades morfològiques (SCHAUDIN, 1902; DOBELL, 1909; LOOHNIS, 1921; POTHOFF, 1924; MELLON, 1925; NYBERG, 1927; STOUGHTON, 1932; BDIAN, 1933; ALLAN i COLY, 1939, etc.). Segons LINDEGREN i MELLON (1932), la fase sexuada seria comuna a totes les bacteries, mentre que la fissió binària representaria tan sols una fase parcial de llur complex cicle vital. La prova experimental, per bé que havia estat assajada sense èxit per SHERMAN i WING HU (1937), i també per GOWEN i LINCOLN (1942), fou donada la primera vegada per LEDERBERG i TATUM (1946) en obtenir variants ben caracteritzades i diferents dels «pares», després de recombinar artificialment dues varietats de la mateixa bactèria que difereixen entre elles per propietats bioquímiques ben precises i fàcils d'identificar. Aquell mateix any, DELBRUCK i BAILEY (1946) posaren en evidència uns fets similars en els bacteriòfags. Foren confirmats al cap

de poc temps per LURIA i DULBECCO (1949), els quals aconseguiren de recombinar partícules de bacteriòfags inactivades pels raigs ultraviolats, reformant-se aleshores bacteriòfags actius i virulents.

D'aleshores ençà s'han fet aportacions ben importants en el coneixement de la genètica bacteriana. HAYES (1952) descobrí la «polaritat sexual» o transferència unidireccional del material genètic, és a dir, l'existència de bactèries «donadores» i d'altres bactèries «receptores», equivalents als mascles i a les femelles dels éssers superiors. Aquesta diferenciació de sexes és admesa pels genetistes com una propietat global de determinats troncs bacterians i no pas de cada bactèria individual dins un mateix tronc. Ja veurem després que aquest concepte no correspon a la realitat dels fets observats per nosaltres, ni escau tampoc a allò que veuen els mateixos genetistes més ortodoxos, car «les bactèries donadores de vegades poden actuar com a receptores, malgrat conservar el genotipus mascle». WOLLMAN i JACOB (1959) confessen aquesta eventualitat, però no en donen l'explicació necessària.

En una sèrie de notabilíssims treballs que LEDERBERG anà publicant ensems amb diversos col·laboradors, va perfilant-se el concepte que els gens bacterians estan disposats en una estructura comparable als cromosomes de les cèl·lules superiors i que, molt sovint, s'ordenen escalonadament en forma de «grups d'unió». Han proposat els mapes genètics d'algunes bactèries, indicant àdhuc les distàncies respectives dels gens que componen el cromosoma, basant-se, per a fer-ho així, en la freqüència amb què el caràcter que suposen regit per cada gene isolat és transmès a la descendència de les bactèries que han fet recombinar experimentalment. Quant al mecanisme íntim d'aquesta recombinació genètica, hom considera necessari l'acoblament per contacte i fusió protoplasmàtica dels dos «parens». Per aquest pont d'unió passaria el cromosoma de la bactèria donadora cap endins de la bactèria receptora, en la qual es faria la combinació dels genomes respectius. WOLLMAN i JACOB fixen en 50 minuts el temps indispensable i suficient per a la transferència de tot el cromosoma, i asseguren que existeix també una «polaritat cromosòmica», volent expressar amb aquest mot que el seu pas d'una bactèria a l'altra comença sempre pel mateix extrem del cromosoma. Això explicaria — sempre segons aquells autors — que els gens situats més prop d'aquest extrem es transmeten més sovint que no els gens que es troben més allunyats, ja que la ruptura accidental del susdit cromosoma esdevé amb relativa facilitat d'una manera espontània i també pot provocar-se artificialment amb vista a comprovar aquella hipòtesi. Tota aquesta darrera argumentació recolza en aspectes morfològics trobats en

llurs experiments de recombinació i que ells creuen ben demostratius dels acoblaments per fusió protoplasmàtica. En realitat, aquestes mateixes morfologies es veuen sempre en tots els cultius bacterians, àdhuc en els clonats purs que procedeixen d'una sola bactèria isolada amb el micromanipulador. Tornaré després a comentar aquesta qüestió, més important que no sembla de bell antuvi.

Els fets que acabo de citar i d'altres que han seguit després, d'indubtable filiació genètica, no exclouen pas l'existència d'altres variacions heretables que no són degudes a fusions sexuals. Ara escau, doncs, de parlar una mica de l'eterna i també incomprendible disputa entre els partidaris d'una evolució adaptativa i els mutacionistes intransigents. Per a aquests darrers, les mutacions que s'esdevenen a les bactèries havien de presentar invariablement els caràcters següents: és un canvi sobtat i discontinuat d'una o diverses propietats, transmès hereditàriament; els mutands nascuts són tan estables com llurs antecessors; s'esdevé per atzar, de manera imprevisible; afecta una mínima proporció d'individus de la colònia, però amb una xifra característica; pot afectar un o més caràcters fenotípics; en aquest darrer cas són mutualment independents.

Per bé que els mutacionistes ortodoxos mostren una veritable aversió pel mot evolució o adaptació, i tenen per cert que tot s'esdevé a causa d'uns gens específicament preformats amb vista a tots i cada un dels possibles esdeveniments futurs, els ha calgut confessar que existeixen moltes anomalies en aquell rígid patró que s'entesten a voler anar mantenint, com ho són, per exemple: les mutacions induïdes experimentalment, la manca d'acumulació de mutands en la fase de repòs del desenvolupament bacterià; la proporció constant de les mutacions, sense relació amb la velocitat de reproducció; l'acció evident d'influències externes, l'aparició d'un major nombre de mutands que el previst, l'existència de cicles periòdics en les mutacions, l'existència d'adaptacions genètiques específiques per l'ambient immediat, l'efecte GRIGG, és a dir, la supressió de mutands que «haurien de créixer», a causa de la gran quantitat de població que «no haurien de créixer» en presència d'un inhibidor específic, el fenomen de la reactivació per la llum solar dels mutands provocats amb ultraviolats, etc.

Per tal de sortir-se d'aquestes dificultats — per bé que només són dificultats per a ells mateixos — ens parlen de mutacions múltiples successives, mutacions reversibles, interferències negatives entre gens, transmissió incompleta del genoma, etc., i modifiquen tan hipotèticament llur primitiu concepte, que, amb tota la raó, DEAN i HINSCHWOOD (1957) pogueren escriure no

fa gaire: «Alguns aspectes de la controvèrsia mutació-adaptació ofereixen una interessant analogia amb la història de la teoria química del “flogiste”. És ben sabut que aquesta teoria no fou mai abandonada pels seus adeptes. Però, sota la pressió dels fets, hom la canvià, i la complementà amb tantes hipòtesis auxiliars, que esdevingué indistingible de la seva rival. Quelcom de semblant s'opera en la teoria mutacionista.» Si aquest punt de vista pot ésser titllat de parcial, perquè aquells autors són adaptacionistes convençuts, en canvi, l'opinió del mateix LEDERBERG (1957), creador de la genètica bacteriana, és ben clara i diu: «Per a totes aquelles anomalies que no encaixen bé amb la pura ortodòxia, cal preguntar-nos si aquesta manera d'analitzar els fets en termes de cromosomes o de citogenètica no és completament enganyadora i que potser existeix un mecanisme de recombinació genètica ben diferent.» I més enllà, diu: «Ens manca aprendre molt encara de la biologia bacteriana abans de poder fixar principis bàsics d'utilitat pràctica. Seria un greu error de desconèixer la grandíssima freqüència amb què les bactèries muten de faísó imprevisible, quan o com els plau, sense fer cas de les nostres grolleres tècniques.»

Uns altres mutacionistes ortodoxos, WOLLMANN i JACOB (1959), només saben explicar-se alguns estranys fets experimentals dient que aquells fenòmens «potser són deguts a particularitats encara desconegudes en el mecanisme de conjugació bacteriana». Precisament aquestes particularitats o mecanismes desconeguts són l'objecte d'aquesta Memòria, perquè durant els darrers dotze anys he anat comprovant que molts conceptes equivocats van copiant-se d'un tractat de Bacteriologia a l'altre, sense que corresponguin ni de bon tros a la realitat quan hom observa els fets tal com es presenten i sense prejudicis escolàstics.

Malgrat haver hom descrit repetidament l'existència de cicles evolutius complexos en moltes bactèries, l'opinió que encara preval avui és que només es multipliquen per divisió binària. A base d'aquesta afirmació — no gens ben demostrada, per cert — s'han elaborat uns mètodes i unes fórmules matemàtiques per tal de determinar el «temps de generació» de cada tronc microbià. En un treball publicat el 1958 vaig fer notar la falsedat d'aquestes fórmules, car la divisió binària simple és el procés menys important en la reproducció de les bactèries. En el susdit treball demostrava també que durant els primers minuts de cultiu totes les bactèries treuen fora de llur cos una substància més o menys filamentosa o granular, la qual desapareix més tard. Aleshores interpretarem aquest fet, d'observació constant, com una fase de «dispersió protoplasmàtica» amb possible significació genètica.

L'estudi persistent i meticulós dels fenòmens biològics que tenen lloc durant les fases més inicials dels cultius, ultra la confirmació d'aquelles primeres observacions, m'ha demostrat la constància d'un episodi genètic que considero transcendental i l'exposició resumida del qual faig tot seguit.

MATERIAL I TÈCNiques EMPRADES

Les presents observacions han estat fetes en les següents espècies microbianes: *B. subtilis*, *B. mesentericus*, *B. cereus*, *Esch. coli commune*, *Esch. coli communior*, *Aerobacter aerogenes*, *Salm. typhi*, *Salm. Schottmuelleri*, *Salm. paratyphi*, *Salm. enteritidis*, *Salm. Danysz*, *Shigella minutissima*, *Shigella dysenteriae*, *Tyrothrix scaber* (Duclos), *Proteus X 19*, *Serratia marcescens*, *Neumobac. Friedländer*, *Stafil. aureus*, *Stafil. albus*, *Streptococcus*, *Sarcina lutea*, *Bustinza*, *My. tub. avium*, *My. tub. H37 Rv*, *Micrococcus I*, *Micrococcus II*.

Dels cultius mantinguts en llurs medis habituals de conservació (agar nutritiu, brou, Löwenstein, etc.) hom féu una sembra en brou peptonat, mantinguda 24 hores a 37°, per tal de treballar sempre amb cèl·lules joves. En tots els medis nutritius líquids que he assajat he vist que les bacteries es comporten de la mateixa manera, però he preferit d'ajustar-me a condicions més comparables i rigoroses, per la qual cosa he fet sempre els cultius definitius en el medi M-9 d'ANDERSON, que té la composició següent: KH_2PO_4 , 3 gr; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$, 15 gr; MgSO_4 , 0,2 gr; NaCl , 0,5 gr; NH_4Cl , 1 gr; Dextrosa, 4 gr; Aigua dest. 1.000 ml.

Diversos tubs que contenien 5 ml d'aquest medi sintètic i mantinguts a bany maria de 37° foren sembrats amb una gota cadascun d'aquells cultius recents. A intervals predeterminats, després de retirar 1 ml per a sembrar plaques i comptar colònies, a cada un dels tubs s'afegí formol i fou posat a la nevera. Durant la primera hora del cultiu els intervals foren de 5 minuts; fins a la segona hora, de 10 minuts, i després, cada 60 minuts fins al total de 24 hores d'observació. Quan fou acabada tota la sèrie, s'enllestiren les preparacions totes alhora, i amb les tècniques pròpies de la microscopia electrònica (rentar dues vegades els gèrmens amb aigua bidestillada i filtrada bacteriològicament; muntatge sobre el portaobjectes recobert amb film de col·loidi; metallització amb or-palladi; observació i fotografia amb el supermicroscopi Zeiss M 8 sota 50 quilovolts de tensió acceleradora).

Els tractaments enzimàtics foren fets amb ribonucleasa, desoxiribonucleasa i alfaquimiotripsina, generosament proporcionades per la casa PEVYA. Sempre foren utilitzades a la concentració d'1 miligr/ml, en medi taponant a pH 7.5 - i amb els gèrmens vius, és a dir, abans d'afegir el formol, mantenint llur acció durant 1 hora a 37°.

Les corbes de creixement bacterià s'han obtingut de 5 maneres diferents: registre fotogràfic nefelomètric continuat, per mitjà de l'acoblament que vaig construir i publicar l'any 1950; sembres sobre plaques d'agar nutritiu i comptant les colònies després de 20 hores de cultiu; mesurant amb cèl·lula fotoelèctrica l'opacitat dels cultius a intervals predeterminats i dibuixant les gràfiques corresponents als valors numèrics trobats.

Per tal d'obtenir membranes bacterianes isolades, o bé per a separar-les una mica del protoplasma i fer-ne més visible l'estructura, he utilitzat la tècnica de SALTON i HORNE (1951). Amb algunes bactèries el resultat fou molt bo, però amb d'altres no fou possible d'aconseguir l'objectiu proposat.

RESULTATS

Durant aquests estudis he observat que la manera de multiplicar-se les bactèries no es correspon gaire bé amb el que en diuen els llibres de Bacteriologia, en els quals la fase logarítmica, o de multiplicació ràpida, es dibuixa sempre com si fos una línia contínua. En les meves corbes de creixement aquesta recta és interrompuda per una o dues baixades de curta duració que s'han produït entre les 3 - 4 hores i les 7 - 8 hores del cultiu. Com és lògic, això varia segons el germen i les condicions peristàtiques. Aquest fet ja quedà registrat en algunes de les corbes fotogràfiques fetes l'any 1950, però aleshores vaig interpretar-lo com una falla en el dispositiu d'il·luminació, perquè no podia creure que no hagués estat observat anteriorment per ningú més; però ara l'han confirmat els recomptes de colònies. L'interès de tals observacions radica en el fet que les interrupcions marcades en les corbes de multiplicació logarítmica es corresponen bastant bé amb els importan-tíssims fenòmens biològics que descriuré tot seguit.

Tantost com els gèrmens foren acabats de sembrar en medis líquids (brou peptonat o medi sintètic M-9, ja des dels primers minuts, hom veu que d'un cert nombre de bactèries surt una substància més o menys homogènia o filamentosa que va difonent pel medi de cultiu en forma de «ramificacions». La morfologia que presenta aquesta substància és bastant característica de

cada espècie microbiana, fins al punt que, en alguns casos, tan sols en veure-la ja podem dir de quin germen procedeix. Un fet és gairebé constant: la seva sortida només té lloc per un sol punt de la membrana, situat molt prop d'un dels pols de la bactèria quan aquesta és de forma bacil·lar. Rares vegades surt per altres llocs més centrals o bé per dos punts alhora. Es veu menys sovint encara que surti per una gran extensió de la superfície bacteriana, però en aquest cas acostuma a presentar una estructura ben particular constituïda per una infinitat d'elements granulars, apilotats entremig d'un magma llefiscós. Les vegades que he tingut avinentesa de mesurar-los, he trobat que els susdits grànuls tenen un diàmetre de 25 - 30 μ . Recordem només, per ara, aquesta mida i llur morfologia per a relacionar-ho amb el que diré després.

Cal aclarir tot seguit que aquestes morfologies no poden ésser interpretades com si fossin la resultant d'una lisi de les bactèries. Una elemental experiència en la contemplació d'imatges electròniques és prou perquè no pugui haver-hi confusió possible, sobre tot pel fet que la sortida del susdit material sembla estar orientada expressament de faísó unidireccional, mentre que el procedent d'una veritable lisi està escampat de qualsevol manera tot al voltant de la bactèria morta. En aquest darrer cas la bactèria està desfeta d'una manera ben ostensible, ben al revés d'aquelles altres que fan la impressió d'estar en plena vitalitat. És clar que la microscopia electrònica només pot donar-nos imatges estàtiques, sense gaires indicis de llur fisiologia; però havent fet les meves observacions cada minut i veient que els mateixos fets es repeteixen amb la mateixa constància i amb similar cronologia, podem acordar-los la mateixa valor que als exàmens microscòpics *in vivo*.

Calgué preguntar-me de seguida quina mena de substància és aquesta que surt de les bactèries tot just iniciat el cultiu i que, evidentment, no correspon a una lisi destructora de la cèl·lula. Un fet tan banal com és l'esquinçament de la membrana de col·lodió que serveix de suport als preparats electrònics, em donà ben aviat la prova que les anomenades «ramificacions» no són pas partícules independents de la bactèria, accidentalment adherides a la seva superfície durant les manipulacions de preparació, sinó que formen part integrant de la cèl·lula bacteriana. En aquest cas es veu ben clar com la «ramificació» continua aferrada al col·lodió, impedit que la bactèria caigués pel forat que es produí accidentalment a la membrana de suport i que fos xuclada per les poderoses bombes d'aspiració del microscopi electrònic, cosa que hauria succeït en cas que la bactèria i les «ramificacions» fossin dues coses independents. Altrament, en moltes de les fotografies que

presento ja es veu ben bé que les tan repetides «ramificacions» no són altra cosa que la substància nuclear bacteriana; però la confirmació indiscutible, l'he obtinguda per mitjà de l'acció enzimàtica específica. Tractant els preparats amb ribo i desoxiribonucleasa, d'acord amb la tècnica indicada abans, aquelles estructures no es modifiquen gens. El tractament amb tripsina dissol bastant els cossos bacterians, però deixa intactes els grànuls que formen l'eix de les ramificacions. Però quan es fa actuar conjuntament tripsina i desoxiribonucleasa, desapareixen totes aquelles estructures i resta només una part dels cossos bacterians. Per tant, les «ramificacions» extramicrobianes són, sens dubte, material nuclear, i, per la seqüència amb què s'esdevé l'atac enzimàtic, ens cal admetre que el grànul d'àcid desoxiribonucleic està recobert per una capa proteínica. Després tornaré a recordar aquesta conclusió, que considero ben important per altres motius; però crec que ja és ben justificat d'afegir un complement qualificatiu d'aquelles formacions anomenant-les, des d'ara, «ramificacions genètiques», tal com sembla confirmar-ho llur evolució ulterior.

Durant els primers minuts de cultiu les bactèries amb ramificacions genètiques romanen isolades, però ben aviat es veuen acoblades, posant-se en contacte per les respectives ramificacions, les quals arriben a barrejar-se de tal faísó que hom no pot dir on acaba l'una i on comença l'altra. Molt sovint, però, és ben clara una diferència de densitat i d'estructura entre el material procedent de cada una de les dues bactèries, com si hom pogués parlar de sexes oposats o complementaris. Una altra vegada només assenyalo el fet sense poder avançar quin pugui ésser el seu veritable significat, però no seria inversemblant que aquestes imatges fossin la confirmació fotogràfica de la «polaritat sexual» que HAYES descobrí l'any 1952 per mètodes indirectes, sobretot perquè gairebé sempre les ramificacions genètiques es presenten orientades, no pas a l'atzar, sinó una envers l'altra, mostrant una mútua quimiotaxis positiva. Aquest fet és tant més remarcable que la susdita atracció mútua roman invariable àdhuc fent el cultiu amb vibració contínua, per mitjà d'un aparell magnètic que produeix 100 batzegades cada segon i d'una amplitud de 5 mil·límetres, la qual cosa representa un bon trastorn vista l'escassa mida de les bactèries.

Cap als voltants de la segona hora de cultiu, la barreja extrabacteriana de les dues substàncies nuclears va modificant el seu primitiu aspecte semi-líquid i esdevé més estructurada, formant grumolls cada vegada majors i més densos als electrons, dels quals surten després noves bactèries filles. No em veig capaç de fer una descripció literària d'aquesta darrera fase del

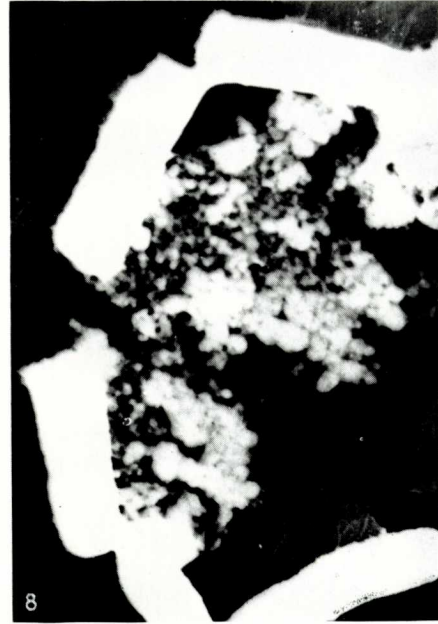
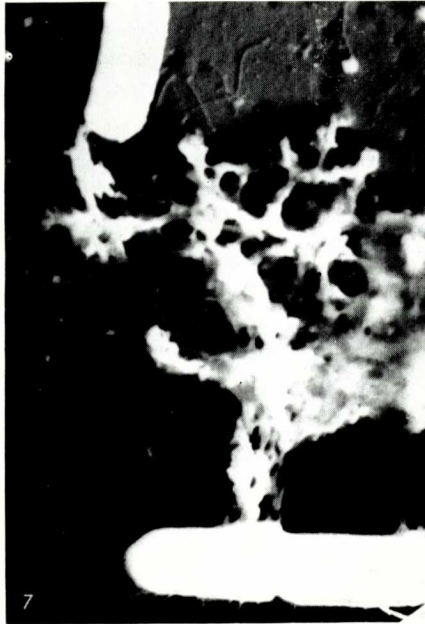
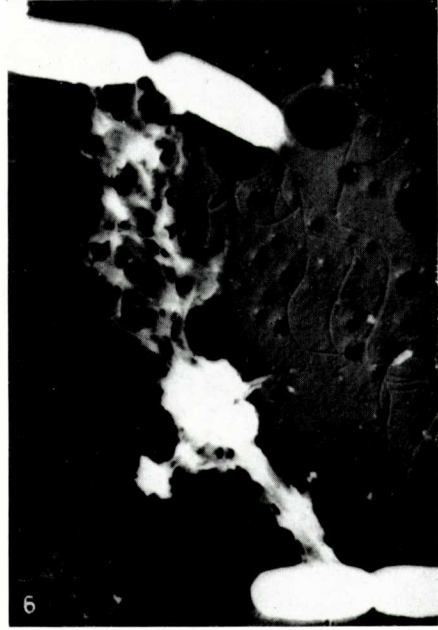
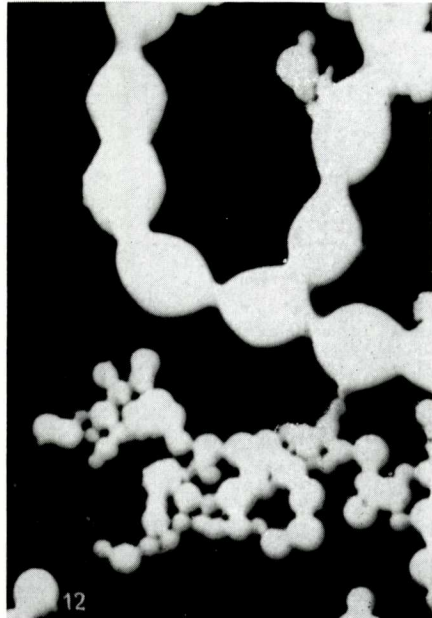
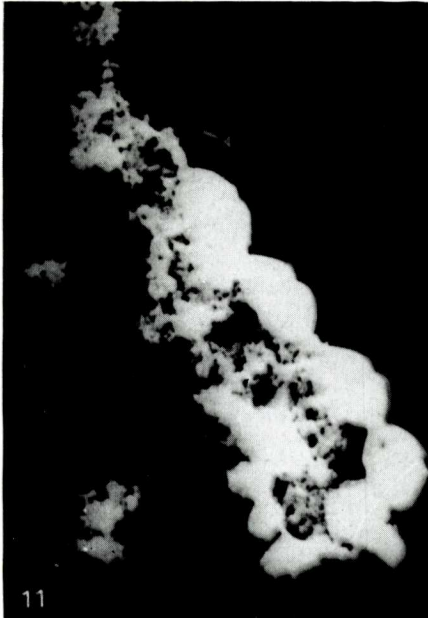


Fig. 5: Acoblament entre dos bacils tuberculosos humans, cultivats en medi sintètic M-9.
- Fig. 6: (*B. cereus*) Molt sovint la morfologia de la ramificació genètica de cada bacil és prou diferent per a donar suport al concepte d'existir una diferenciació sexual entre els individus d'una mateixa colònia nascuda d'un clon pur. - Figs. 7 i 8: (*B. cereus*) A la segona hora de cultiu, enmig de les dues aportacions nuclears fusionades, van formant-se elements cada vegada més individualistes i densos als electrons.



Finalment, en néixer noves bactèries. - Fig. 9: *B. cereus*, cultivat 3 hores i mitja en medi M-9. - Fig. 10: *Salm. enteritidis*, cultiu de 2 hores. - Fig. 11: Durant la primera hora del cultiu, un *Streptococcus* desprèn també ramificacions genètiques amb acoblaments múltiples, dels quals neix una nova generació ben abundosa. - Fig. 12: Al cap de 2 hores de cultiu.

procés formatiu, car no és igual per a cada germen ni per a totes les condicions peristàtiques del cultiu. Les fotografies electròniques que acompanyen aquesta Memòria són molt més provatòries que no totes les paraules escrites i ens mostren que l'autèntic naixement de les bactèries és ben diferent d'allò que diuen els tractats de Bacteriologia. Aquesta afirmació és vàlida, tant per a les bactèries de forma bacillar com per a les cocàcies. Vegem, per exemple, com a la primera hora del cultiu un *Streptococcus* dóna també sortida al material nuclear en forma d'una polseguera de finíssimes granulacions. A la segona hora ja és evident que aquestes granulacions són, elles mateixes, petits cocus que van creixent i disposant-se en les cadenes característiques d'aquesta espècie microbiana.

Aquests són els fets d'observació, insospitats fins ara certament, però la constant repetició dels quals en tots els gèrmens estudiats fa creure que la fase sexuada amb la barreja extracorpòria de substància nuclear és un esdeveniment fonamental i obligat en la vida de les bactèries. Com sigui que aquesta darrera constatació enclou en si mateixa un bon nombre de conseqüències biològiques transcendents, calia presentar proves abundants de les dades que, al meu entendre, li serveixen de sòlid basament. Però cal també afegir alguns comentaris adients.

LEDERBERG (1956), ANDERSON i col. (1957) i MEYNELL (1962) han publicat unes imatges microscòpiques que ells tenen per molt demostratives dels acoblaments bacterians, observades en llurs experiments de recombinació. Les meves fotografies són idèntiques a les presentades pels dits autors, però faig constar d'una manera expressa que es troben sempre en tots els cultius de qualsevol bactèria, àdhuc els que procedeixen d'un clon pur. Són imatges molt corrents en microscopia electrònica, a les quals no podem concedir cap significat especial d'ençà que sabem que la divisió binària simple és d'una importància secundària per a la multiplicació bacteriana (XALABARDER, 1954). Altrament, resultaria molt difícil als genetistes ortodoxos d'explicar per què són també molt freqüents en certes espècies microbianes les aparents conjugacions directes triples o quàdruples, com les que he fotografiat diverses vegades, i que tant s'assemblen a les formes de conjugació de certs microbolets. Això no té res d'extraordinari, vist que no hi ha cap diferència fonamental entre els Micets i les Bactèries pel que es refereix a llur biologia. Per contra, és realment incompreensible el motiu pel qual la majoria de bacteriòlegs es neguen a fer extensius a les bactèries els coneixements sòlidament establerts en el camp de la Micologia, sense que

ahora puguin precisar on és i en què consisteix el límit de separació que tan ficticiament volen marcar entre ambdues disciplines científiques. Aquelles suposades imatges de recombinació són, potser sí, imatges de conjugació, però que trobem també sempre en els anomenats cultius purs de certes espècies o troncs bacterians. La significació biològica d'aquesta observació, la comentaré més endavant, perquè ara és més oportú de discutir l'essència de les anomenades «ramificacions genètiques».

De bell antuvi em semblaren a mi mateix que eren partícules estranyes adherides accidentalment a les bactèries durant les manipulacions preparatòries. Ben aviat, però, els fets demostraren que aquesta interpretació no era bona, i que les citades ramificacions són veritable substància nuclear, però que no procedeix d'una lisi, sinó que presenten les següents particulars característiques: A) Apareixen de seguida que les bactèries inicien un nou cultiu, augmenten molt en nombre durant les primeres hores i desapareixen gairebé del tot quan els cultius estan ja ben desenvolupats. B) Sempre es veuen en situació subpolar, i poques vegades surten per altres llocs de la bactèria. C) Quan hom sembla bactèries mortes no es formen mai ramificacions semblants. D) Per abundant que sigui el material que les compon, la bactèria no es veu mai destruïda o buidada, sinó, al contrari, ben turgent i amb aspecte de plena vitalitat. E) Els tractaments amb enzims específics demostren que són formades, precisament, per material nuclear. F) L'ur morfologia és bastant diferent en cada espècie bacteriana, la qual cosa no s'esdevé mai en el material informe procedent d'una veritable lisi.

Essent així, era obligat de pensar que tenen significació genètica, sobretot en comprovar que quan hi ha dues bactèries acostades llurs ramificacions no estan orientades a l'atzar, sinó que sempre s'apropen mútuament i es confonen en una massa única, a partir de la qual es formen noves bactèries. Com he indicat abans, de vegades existeixen evidents diferències morfològiques entre les ramificacions de cada una de les bactèries acoblades. Aquesta observació, l'he feta molt sovint, i sembla donar suport a allò que HAYES (1952) denominà «polaritat sexual», volent dir amb això que hi ha espècies bacterianes donadores o mascles, i altres espècies receptors o femelles. Molts experiments fets amb bactèries sensibles o resistents als bacteriostàtics o als bacteriòfags tendeixen a confirmar aquella pensada de HAYES, però WOLLMAN i JACOB (1959) fan notar, molt encertadament, que «de vegades una espècie bacteriana donadora es comporta com a receptora, malgrat conservar el seu genoma mascle». Això és incompreensible, si ens atenim al credo dels genetistes ortodoxos, per als quals el caràcter de

donador o de receptor és una propietat global de cada tronc bacterià. És més fàcil d'entendre ara que hem vist com les conjugacions genètiques tenen lloc entre individus del mateix tronc microbià. Hom podria aduir que, àdhuc en els anomenats cultius purs d'una determinada espècie, existeixen individus heterozigots que podrien actuar indistintament com a donadors o com a receptors dins una mateixa colònia. Per tal de minimitzar aquesta possibilitat he fet fins a 10 seleccions successives d'una sola colònia amb l'intent de deixar només els homozigots. Malgrat aquesta precaució, cada vegada que he fet una nova sembra d'aquest tronc seleccionat o purificat, sempre han aparegut les ramificacions genètiques i les conjugacions extracorpòries, i només durant les primeres hores del cultiu, com d'habitud.

En els tractats de Bacteriologia podem apreciar la immensa quantitat de treball que hom ha dedicat a la descripció meticulosa i a la classificació dels microbis, però hi manca sempre l'estudi aprofundit de llur biologia primària. És difícil d'esbrinar, doncs, quines són les lleis que governen l'organització social d'una colònia bacteriana, perquè la quasi totalitat dels estudis fets fins ara pateixen del fonamental defecte de creure que la multiplicació de les bactèries té lloc per partició binària exclusivament, malgrat haver estat fetes esporàdiques demostracions de cicles evolutius més complexos. Els moderníssims treballs de genètica bacteriana, amb els elegants experiments de recombinació duts a terme, aporten coneixements força interessants, però no han modificat gens ni mica aquell clàssic concepte de la partició binària. Per contra, les discrepàncies en els resultats que s'obtenen en els experiments de recombinacions fan dubtar seriosament de l'exclusivitat d'aquest procés de reproducció i ens forcen a acceptar la possibilitat d'altres «mecanismes desconeguts», segons l'honrada declaració de LEDERBERG i de WOLLMAN i JACOB.

En treballs anteriors (1953, 1954, 1955, 1957 i 1958) he demostrat que les bactèries es multipliquen també per altres mecanismes i que la partició binària és, probablement, el menys efectiu de tots ells. Els resultats que presento ara són la plena confirmació del mateix criteri i ensenyen que, si bé la partició binària pot servir per a anar mantenint constantment el nombre de gèrmens vius en la fase estacionària, l'embranchida inicial de la multiplicació es fa sempre per mitjà d'una fase sexuada que s'efectua al defora dels cossos bacterians, en el si del medi de cultiu. Aquest fet, a bastament demostrat en la present Memòria, fa ben comprensible que pugui haver-hi «errors» en les lleis que, de segur, regeixen la genètica bacteriana, donant cabuda a les anomalies que desorienten i preocupen els inves-

tigadors perquè els esgarrien la regularitat dels «mapes cromosòmics» que tan pacientment intenten d'establir. És fàcil que moltes suposades mutacions tinguin potser també aquest origen.

Que les susdites lleis de recombinació existeixen, ho confirmen unes altres observacions que he efectuat a posta. En semblar conjuntament uns troncs bacterians que no es recombinen entre ells, cada un d'ells forma les ramificacions genètiques que els són pròpies, però mai no s'atreuen mútuament, ni es barregen, ni fan aquells característics acoblaments que he descrit abans. Aquesta és una nova prova que els esmentats acoblaments responen a una afinitat genètica específica i que no són el producte casual de fenòmens físics de veïnat.

La sortida del material nuclear i els acoblaments sexuals extracorporis són fets inesperats, ben cert, però de la realitat dels quals ja no és possible de dubtar ara. Altrament, aquest esdeveniment no contradiu els conceptes sostinguts pels genetistes. Segons WOLLMAN i JACOB, «la conjugació comença tantost com les bactèries afins es posen en contacte; els acoblaments són a bastament sòlids per a resistir la dilució del cultiu; la conjugació no és pas esdeveniment escàs, sinó que sovinteja molt; únicament es transfereix material genètic i no el citoplasmàtic». LEDERBERG ens diu que la recombinació, perquè pugui reeixir, exigeix dues condicions: bactèries joves i medis de cultiu líquids; és a dir: exactament el mateix que he observat en els presents estudis, els quals ens presenten, això no obstant, una novetat força notable. Tots els estudis de genètica bacteriana es refereixen a mutacions i a recombinacions entre troncs emparentats però diferents, perquè accepten encara que la multiplicació per fissió binària és la sola manera de reproduir-se que tenen les bactèries. El fet cert és que la recombinació genètica no és pas exclusiva de l'acoblament accidental, espontani o provocat experimentalment, de dos troncs diferents, sinó que és un fet constant i primordial al començ de tots els cultius, àdhuc entre les bactèries germanes procedents d'un sol clonus originari.

Acabem de veure, doncs, una manera de reproducció bacteriana constantment observada en tots els gèrmens, tant els de forma bacillar com els cocacis, ben diferent de la divisió binària i simètrica que només accepten els tractats clàssics. La conjugació dels genomes patern i matern fora dels cossos microbians aclareix els problemes que tenen capficats els genetistes referents a les anomalies tan sovint observades en els mapes genètics dels recombinats i també a l'existència de recombinats amb caràcters corresponents a més de dos pares. Pretenen de justificar-ho dient que potser hi ha

«transmissió parcial de cromosoma» (HAYES; WOLLMAN i JACOB), «eliminació miòtica de fragments cromosòmics» (LEDERBERG, CAVALLI-SFORZA), possibilitat d'acoblements successius, etc. Tot això es comprèn més bé en saber que la barreja dels genes té lloc en el mateix medi de cultiu, i, per bé que és segur que ha d'obeir lleis ben precises que de moment desconeixem, d'aquesta manera resulta molt més fàcil la producció d'alguna falla en el compliment d'aquelles lleis biològiques, que no pas si l'autèntica conjugació havia de fer-se dins les mateixes bactèries. I qui sap si això que ara interpretem com si fossin anomalies genètiques accidentals no són altra cosa sinó el compliment meticulosament precís d'allò que està sàviament establert per tal de mantenir l'equilibri general de tota la Natura.

Al meu entendre, la contribució més important derivada dels estudis de genètica bacteriana és d'haver demostrat que l'únic suport de la informació genètica és l'àcid desoxiribonucleic (ADN), tant en els microorganismes com en les cèl·lules superiors, i que pot acomplir aquesta funció primordial àdhuc sense formar part integrant d'estructures biològiques definides, com són els virus, bacteriòfags, etc. Tots els notabilíssims experiments de transformació de certes bactèries — als quals he contribuït personalment (1954, 1955, 1957) — en són la prova definitiva. Per tant, la constitució química dels virus a ADN essent fonamentalment idèntica a la constitució química dels genes (DARLINGTON digué que un virus és un gene descolgat del seu cromosoma), i havent vist en les fotografies d'aquesta Memòria que el genoma bacterià és constituït per granulacions de 25 - 30 μ , és a dir, igual que alguns virus, és enraonat de pensar que l'origen d'aquests darrers pot consistir en una accidental detenció en el desenvolupament de les bactèries. Queda oberta així una ampla via per a fecundes investigacions futures.