

INICIACIÓ A LA SOCIOLOGIA BACTERIANA

Comunicació presentada el dia 28 d'abril de 1966 pel doctor

CONRAD XALABARDER i PUIG

Director de l'Institut Antituberculós de Barcelona

Molts dels problemes biològics en els quals intervenen bactèries romanen incompresos per la dificultat de casar els fets d'observació diària amb el rígid i depassat criteri de la Bacteriologia oficial que encara atribueix a les bactèries una fixesa de caràcters que no tenen pas sempre. Accepta també com a fets indiscutibles que totes les cèl·lules d'un mateix cultiu pur són idèntiques i que la partició binària equitativa és l'única manera que tenen per a multiplicar-se. Això fa improductius els nombrosos treballs dedicats a l'estudi de qüestions ben importants —adaptació dels microorganismes; resistències als medicaments; la mateixa genètica bacteriana; l'origen d'alguns virus; els misteris dels gèrmens vius però que no fan colònies visibles; l'etiologia de certs processos morbosos que hom anomena degeneratius, i tants d'altres— perquè en cap d'ells no es té en compte el fet fonamental que les bactèries disposen d'una reproducció sexuada extracorpòria, ni s'ha considerat tampoc llur sociologia. Aquest mot significa, no pas una interrelació entre espècies diferents, sinó entre bactèries de la mateixa espècie i àdhuc d'una mateixa colònia.

Concedeixo que, atesa la clàssica formació biològica actual, parlar de sociologia bacteriana ocasiona, de sobte, un fort impacte mental perquè mai, fins ara, no s'havia parlat d'una cosa semblant. Justament aquest silenci és la cosa estranya, car les lleis que governen l'organització multicel·lular continuen essent un dels problemes bàsics de la Biologia experimental. Pel que es refereix als cultius de teixits superiors, ha estat l'objecte d'innombrables estudis que culminaren en una reunió tinguda a Holanda fa uns cinc anys. Però, pel que fa a les bactèries, no he trobat en la literatura cap referència a llur sociologia, malgrat saber tothom que elles s'agrupen formant el que hom anomena colònies. Tot el que hom en diu es refereix només a llur fesomia externa, superficial (forma, mida, límits, caràcters de superfície, coloració, etc.), però no diu res respecte al que són en realitat les susdites colònies. Això darrer és el que he estudiat des de fa temps, i aquestes notes presentades a la vostra consideració tenen per objectiu de començar a veure que les colònies no són vulgars apilaments de cèl·lules idèntiques, sinó que, al contrari, mostren una organització morfològica i funcional ben remarcables que els permet d'individualitzar-se de les altres colònies germanes.

Serán més compredores la significació i les conseqüències dels presents estudis amb bactèries, si fem de primer un resum dels principis bàsics de la sociologia humana. COMPTE digué que la vida social comença amb la família, el clan, la tribu, que són les formes inferiors de la societat, i creà aquell terme per a designar l'esforç dirigit a explicar la societat com un ésser estructurat. Sense cap mena de dubte, el fet social és una cosa nova, consistent en maneres d'obrar foranes a l'individu i també inexplicables per la sola manera d'ésser individual. Hi ha coses que cap organisme no acostuma a fer si roman aïllat dels altres, però que són resultes de les accions que quan estan reunits o associats *hi influeixen mútuament* de faisó inevitable.

Cal remarcar un fet curiós. Al segle XIX, les ciències socials prengueren model de les biològiques, i hom concebia la societat com si fos un organisme multicel·lular. Hom definia el grup social com una agregació d'individus entre els quals existeixen dues condicions essencials: relació definida i consciència individual del que representa el grup.

Per a COWLEY, el que ell anomena «grups primaris» es caracteritza per l'íntima associació d'individualitats en un conjunt comú, talment que molts dels membres, almenys per a moltes coses, s'adapten a la vida i als propòsits comuns del grup. Tal com féu notar KINGSLEY DAVIS, això implica tres condicions: proximitat física, petitesa del grup i caràcter constant de la relació.

Serà útil de recordar que el fenomen social s'ha relacionat amb la concentració de les poblacions. Els trets més característics són l'existència de zones o sectors diferents en el mateix nucli urbà i la diferència de comportament entre els nuclis urbans densos i els rurals (PARK). Recordem també que l'existència perdurable d'una societat comporta els següents requisits bàsics, acomplerts per un sistema de comunicació, de distribució, d'autoritat i d'ordenació de poder i, finalment, de ritual (ABERLE i col·laboradors). I per acabar aquest esbós de Sociologia aplicable al nostre estudi actual podem acceptar, amb FIRTH, que mentre no existeixi un complet aïllament físic no es pot donar un límit definit al concepte de societat, i que, tal com fou demostrat per SIMMEL, la concentració d'individus els fa canviar la natura de llurs relacions socials.

Ja veureu com tots aquests principis de la Sociologia humana poden aplicar-se perfectament a les bactèries, car mostren tenir una realitat social sota dos aspectes principals: com a institucions aïllades, anomenades colònies, i amb fenòmens de tendències, accions collectives i convivència d'interès comú. En els tractats de Bacteriologia no es fa cas d'aquest aspecte de la biologia microbiana, malgrat tenir l'extraordinària importància que anirem veient en el curs d'aquestes demostracions. Cal, però, començar dient que molts conceptes bacteriològics rutinàriament accep-

tats com a bons, certament no ho són. És, doncs, indispensable d'esmenar aquests errors per tal d'encetar sense prejudicis escolàstics l'estudi de la sociologia bacteriana.

En tots els tractats de Bacteriologia hom llegeix, encara avui, que les bactèries es multipliquen per divisió binària simètrica i equitativa i que, per tant, totes les bactèries d'un mateix cultiu són genèticament idèntiques; que la fase de creixement ràpid es tradueix gràficament per una ratlla més o menys inclinada però sempre recta; que cada una de les bactèries viables forma una colònia en sembrar-la en medis sòlids adients; conseqüència d'això darrer seria que el recompte de les colònies ens indicaria exactament el nombre de bactèries vives que havíem sembrat, etc. Cal corregir tantes inexactituds.

A les fotografies que ara us presento es remarca prou bé que dues cèl·lules procedents del trencament —gairebé sempre múltiple i no pas binari— d'un filament bacterià, no són ben iguals ni en constitució interna ni en funció genètica, àdhuc quan encara romanen enganxades. Serveixen també per a recordar que llur multiplicació comença sempre amb la sortida de substància nuclear vers el medi de cultiu, en forma arboritzada, i és de vegades ben fàcil de diferenciar morfològicament les ramificacions que provenen de cada una de les bactèries parentals. Altrament, les tècniques electroforètiques separen dues menes de bactèries, presents sempre en allò que hom considera cultius purs d'una sola espècie. Les conseqüències que comporta una tal separació i la seva ulterior recombinació, sobre la morfologia de les noves colònies, les anirem veient més endavant.

Després de fusionar-se les susdites ramificacions procedents de dues o de més bactèries —és molt important que recordeu aquesta eventual contribució múltiple que té lloc sempre en el medi de cultiu fora dels cossos bacterians—, va organitzant-se progressivament i ordenada aquest acoblament de gens, fins a acabar formant una o moltes bactèries filles. Aquest procés reproductiu és constant en totes les espècies aeròbies i anaeròbies, es repeteix de manera periòdica en el mateix cultiu i també té lloc en els medis sòlids. Això ens explica clarament moltes coses que amb els conceptes oficials són inconcebibles, com, per exemple: els graons en les gràfiques de creixement logarítmic, el diferent nombre de colònies nascudes d'inòculs idèntics, la discordança quantitativa entre el nombre de bactèries i la síntesi de l'ADN, la discordança de caràcters entre bactèries parentals i bactèries filles que hom atribueix, erròniament, a mutacions i que ara sabem que són producte de conjugacions múltiples simultànies; les onades de creixement visibles en les colònies, i tants d'altres.

El fet que la reproducció bacteriana comenci sempre amb l'aparellament de cèl·lules amb genomes diferents, pressuposa ja un primer grau d'associació i constitueix la família, base fonamental de tota la societat i origen

del que serà més endavant una colònia. Vegem tot seguit un bon rengle de fotografies que ensenyen com van estructurant-se aquestes associacions bacterianes fins a aconseguir llur complet desenvolupament, per la qual cosa les espècies *Tyrothrix scaber* i *B. subtilis* són particularment apropiades, atès que tenen una organització interna força característica i clarament visible (Projeccions).

Hem vist, doncs, que una colònia bacteriana no és pas un aglomerat informal de cèl·lules idèntiques des del punt de vista funcional; ans al contrari, ja de bell antuvi neixen de genotipus diferents i adopten disposicions i conductes que confereixen a cada colònia ben marcades individualitat i independència enfront de les altres colònies d'una mateixa sembra. La demostració gràfica és prou eloqüent, però cal fer encara alguns comentaris adients.

Una colònia és formada per milions de bactèries, integrades totes en una comunitat autònoma. Cadascuna d'elles per separat és capaç de créixer, de reproduir-se i d'actuar, però estan ara obligades a obeir les regles comunals dominades per unes nocions d'adaptació i de rendiment, de l'existència de les quals tot just comencem a adonar-nos. L'estudi de les poblacions bacterianes organitzades en colònies, de llurs lleis, del diferent comportament dels individus que hi pertanyen pot semblar, certament, una revolució en les idees i en els mètodes bacteriològics oficials, però no calen costosos aparells ni tècniques totalment noves per a estudiar aquesta sociologia bacteriana tan sorprenent.

Tal com un organisme és format de cèl·lules vives, també una colònia aïllada és una comunitat, ben curiosa, per cert, que manté una disciplina estricta entre les bactèries que conté, mitjançant un sistema d'informació que governa el destí i el funcionament de totes elles com si fos, diguem-ne, una entitat jurídica pròpia, emancipada de les altres colònies germanes seves. Només quan hom ha fet una sembra massiva i les bactèries estaven atapeïdes, les colònies creixen ja confuses, formant una catifa contínua sobre la superfície de l'agar. En aquest cas, però, la morfologia individual acostuma a ésser ben diferent de la que tenen les bactèries que han format colònies aïllades.

Un dels enigmes, ben intrigant, és la diversitat de mides que tenen les colònies d'un mateix germen en una mateixa sembra. Si començaren a multiplicar-se fins a formar colònies petites, ¿per què no arriben a fer colònies tan grosses com les altres? Posat, és clar, que disposin d'espai vital suficient per a fer-ho. Hom podria suposar que les bactèries havien mort abans d'aconseguir-ho, però fóra una idea ben innocent, ja que és fàcil de comprovar que en les colònies petites els gèrmens són tan viables com en les grosses; llurs ressembres ho demostren prou bé. Ara ja sabem que per a formar colònia no n'hi ha prou amb la progènie d'un sol aparella-

ment, sinó que cal un nombre determinat d'aquests, com a mínim, perquè pugui constituir-se un centre d'organització —semblant al que passa en els cultius de teixits— que dirigeixi el progressiu i ordenat desenvolupament d'aquesta cosa, encara tan enigmàtica, que en diem una colònia bacteriana. És molt probable que la mida definitiva d'aquesta estigui determinada, de bon començament, pel nombre d'aparellaments pròxims i afins que s'hagin acumulat a primera hora.

Tothom sap que les colònies, àdhuc si tenen espai lliure a bastament, només creixen fins a una mida, característica de cada germen i de cada medi de cultiu. Això ens posa de seguida un altre problema: ¿per on creixen les colònies: pel mig o per les vores? És versemblant que la multiplicació de les bactèries tingui lloc pertot arreu de la colònia, però no és cap niciesa fer-se aquella interrogació davant uns fets tan notables com els següents: les onades de creixement per capes sobreposades; la limitació inexorable de la mida de les colònies normals; l'evidència fotogràfica seriada de l'origen central de les colònies de *Tyrothrix* i de *B. subtilis*, com heu vist fa poc; el tenyit amb eosina o altres colorants àcids d'aquestes colònies submergides, comença sempre per una taca central que s'estén després cap a la perifèria dels globus.

Aquests fets d'observació fan pensar que el centre de la colònia és la font principal de noves bactèries o, almenys, el centre organitzador que comanda tota la seva ulterior organització interna. Això explica de manera raonable que les vores de les colònies deturin llur expandiment quan estiguin massa allunyades del susdit centre, o bé quan aquest resulti ja perjudicat en el seu funcionament rector per l'excessiu acumulament de bactèries que competeixen pel mutual metabolisme. Uns resultats experimentals tendeixen a confirmar-ho. Si hom parteix pel bell mig una colònia, ja ben formada però encara en període de creixement, quan aquest s'ha acomplert, totes dues meitats mostren igual extensió. Però si el tall en separa només un segment allunyat del centre, aquest segment ja no segueix el ritme de creixement ulterior de la colònia amputada i manté la mateixa superfície que tenia quan en fou separat. Clavant finíssims capillars de vidre, he aconseguit d'aïllar per tots costats un segment del «pinyol» central de colònies joves; tot el sector perifèric corresponent al sector aïllat queda també inhibit o molt pertorbat. També la destrucció mecànica del centre d'una colònia en detura el creixement i ja no torna a repoblar-se aquella regió desorganitzada.

Vegeu, doncs, com el centre d'una colònia exerceix un paper fonamental en el desenvolupament d'aquesta i és on radica l'ordenació de l'arquitectura i de les funcions del conjunt bacterià associat. Està a l'abast de tothom d'observar la regularitat morfològica, moltes vegades rigorosament simètrica que té la superfície de moltes colònies. Fent talls prims

de colònies vives, vull dir sense fixar i sense tenyir, he demostrat un fet molt notable, com és la distribució per sectors de llurs bactèries, separats de llurs veïns per límits ben definits i a dret fil. Aquestes disposicions no poden resultar d'un apilotament desordenat de les bactèries nou nades; només pot provenir d'un principi ordenador, semblant al que governa l'arreglament cel·lular en els teixits superiors. La pretesa homogeneïtat interna de les colònies queda també desmentida en comprovar que certs colorants vitals es fixen electivament en diferents sectors clarament separats dels altres.

Altrament: que dins una mateixa colònia del que hom considera cultiu pur hi ha bactèries amb caràcters físico-químics diferents, ens ho diu prou bé l'electroforesi. Amb aquesta tècnica poden separar-se dues menes de bactèries, les quals, ultra tenir càrregues elèctriques superficials de distinta valor, fan colònies de diferent aspecte macroscòpic, per bé que una tal separació és momentània i no acostuma a mantenir-se indefinidament.

Pel que fa a la individualitat de cada colònia, hi ha un fet experimental que ho demostra a bastament. Quan dues o més colònies d'una mateixa sembra arriben a posar-se en contacte, poden deformar-se, imbricar-se i àdhuc encastar-se mútuament, però mai no es fusionen per tal de constituir una mateixa colònia més grossa, malgrat que llurs bactèries siguin germanes i tinguin el mateix temps de vida. És com si llurs cèl·lules estiguessin contingudes i empresonades dins una mena de cutícula limitant que contribueix, encara més, a donar autonomia a cada colònia. Si hom punxa estèrilment la vorera d'una colònia que tingui límits ben definits procurant, és clar, de no tocar després el medi de cultiu del seu voltant per tal de no inocular-lo, les bactèries presoneres surten de vegades per aquell forat i colonitzen al defora. Un altre argument a favor d'aquesta personal individualitat de cada colònia, ens el forneix el constant fracàs que he tingut en els intents de fer empelts de fragments de colònies germanes, malgrat que eren ben viables les bactèries respectives.

Considerem ara un altre fet estretament relacionat amb la sociologia bacteriana. He dit abans que la mida de les colònies és regida per condicions internes, però també depèn de circumstàncies ambientals, bé siguin químiques —influència adversa o afavoridora de la presència accidental de bolets— o bé altres condicions més costoses de valorar, com, per exemple, l'espai vital que tinguin a llur disposició. En inocular un mateix nombre de bactèries viables es formen sempre més colònies si la placa és grossa, que no pas si és de superfície més petita.

I bé; ¿per quina raó unes quantes bactèries del mateix cultiu s'ajunten en forma de colònies ben diferenciades, i les altres no? ¿Els reporta això algun avantatge o, almenys, aquesta nova situació social les diferencia de les bactèries germanes que romanen aïllades? ¿Pot tenir algun paper

en llurs propietats patògenes o antigèniques? Recordem que en els cultius de teixits superiors no totes les cèl·lules formen «agregats», sinó que moltes queden aïllades; recordem també que la mida i el nombre d'aquests agregats depenen de la concentració cel·lular i de les condicions ambientals, fortament influïdes afegint substàncies diverses, les quals no cal que siguin precisament tòxiques. Les cèl·lules superiors tenen, igual que les bacteries, una «consciència d'espècie» que les fa agrupar específicament en els cultius mixtos.

Tot plegat suggereix que l'associació colonial de les bacteries els confereix avantatges en el sentit d'una major homeostasi interna, alliberant-les de les inevitables i continuades variacions ambientals i facilitant moltíssim una panmixia genètica que condueix a diferenciacions —potser estabilitzacions— individuals i collectives amb caràcters biològics més estables i definits, àdhuc diferents. La principal diferència entre les cèl·lules apilades i les que estan lliures és que, en aquestes darreres, una gran proporció dels metabolits finals o intermedis que elles sintetitzen es perden per difusió cap al defora; aquesta pèrdua pot depassar llur capacitat sintetitzant, i cal, doncs, afegir al medi de cultiu els susdits metabolits per tal que cultivin i es reproduïxin. Es produeix, per tant, una dependència nutritiva paradoxal que només podrà compensar-se si la densitat cel·lular augmenta en formar colònies a l'interior de les quals la concentració de nutrients sintetitzats allà mateix depassi les pèrdues per difusió, fent-les, aleshores, independents de l'aportació exterior.

La cenosi bacteriana condiona també la sincronització reproductiva fornint una major concentració d'enzims en el moment més convenient, atès que les bacteries es troben aleshores en una fase de creixement molt semblant. Les onades de creixement, tan visibles en algunes colònies i que no tenen pas un ritme circadià, estan condicionades bioquímicament per l'acumulació d'alguna substància que governa cada nou ritme de sincronització genètica.

També pot succeir que aquesta integració cronològica en les síntesis corporals comporti durant períodes cíclics una major activitat antigènica o patògena que no haurien tingut, si les bacteries estiguessin aïllades i reproduint-se asincrònicament. És quan estan en millors condicions per a desbordar el llindar de convivència pacífica amb l'hoste i començar la lluita visible que anomenem malaltia. En el terreny purament bacteriològic ho he comprovat amb el següent dispositiu experimental: si hom fa un cultiu simultani de *Tyrothrix* i de *B. coli* en els medis líquids ordinaris, les dues espècies conviuen pacíficament tant de temps com hom vulgui, sense molestar-se l'una a l'altra. Per contra, en les colònies sobre medis sòlids es produeixen fenòmens de canibalisme alternant; de bell antuvi les colònies del *Tyrothrix* ataquen les colònies del *B. coli* com si les rose-

guessin, i les envaeixen progressivament. Al cap d'algunes hores, aquesta fase invasora s'atura, i les colònies atacants del *Tyrothrix* perden ràpidament llur característica estructura tubular i queden reduïdes a una fina membrana transparent, com de vidre, al voltant de llur centre originari. La impressió visual és d'una colònia morta, però no és pas així: la ressembla en brou peptonat dóna un creixement normal de gèrmens també normals. S'havia perdut, doncs, només l'arquitectura de la colònia, però no la vida de les bactèries associades. El més curiós és que per molt que hom perllongui després la incubació, cap de les colònies enemigues no torna a refer la seva prèvia forma arrodonida.

Amb tot el que acabeu de veure n'hi ha prou per a confirmar l'existència d'una sociologia bacteriana que segueix les mateixes lleis i els mateixos costums que totes les altres associacions organitzades i vives, tant del regne animal com del vegetal. Deixeu-me afegir-hi encara, per acabar, dos altres arguments ben demostratius. El primer, el trobem en aquelles colònies giratòries i les que caminen en bloc durant llargs trajectes i fent giragonses per sobre l'agar on cultiven, cosa comprovada repetidament per diferents observadors. El segon argument és que mai no pot desorganitzar-se una cosa, si no estava prèviament organitzada. I he pogut destorbar, voluntàriament i per via química, la biologia de les bactèries associades i l'arquitectura de llurs colònies, fins a constituir veritables teratologies absolutament comparables a la degeneració cancerosa. Aquesta, però, és una altra història que potser us explicaré algun dia.

DISCUSSIÓ

Dr. L. VALLMITJANA

Fa constar l'elevat mèrit i els importants detalls i fets nous, aportats pel Dr. Xalabarder.

Els distints aspectes, no coneguts, que presenten les bactèries (individualment o en grups), segons les referides investigacions, semblen presentar-se com a resposta a determinats agents o factors (colorants, acció del suport, sinergisme o inhibició, per acció mútua), sense que pugui assegurar-se si es tracta d'una mutació, adaptació reactiva o altra variació o transformació.

Com a conclusió hom pot admetre que, bé que avui els coneixements en morfologia i bioquímica bacteriana són importants, amb referències als interessants fets exposats no hi ha altra possibilitat que reconèixer que els nostres coneixements de Biologia bacteriana són nuls. Les delicades i enginyoses experiències del doctor Xalabarder tenen l'alt mèrit d'iniciar-nos en el camí i la problemàtica de la Biologia i l'Ecologia bacteriana.