

# PROBLEMES GENÈTICS RELATIUS A L'EXPRESSIÓ FENOTÍPICA DE LA PRODUCCIÓ DE PRODIGIOSINA

per J. G. LORÉN

Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències  
(Universitat de Barcelona)

El gènere *Serratia*, descrit per Bizio el 1823, és considerat actualment compost per bacils curts, peritrics gramnegatius amb les característiques de les Enterobacteriàcies, que liquen ràpidament la gelatina, i coagulen i digereixen la llet; produeixen molt poca quantitat de gas, o no gens, en fermentar els sucres, a causa de la falta de l'enzim deshidrogenasa fòrmica; són habitants comuns de l'aigua i de la terra. Juntament amb aquestes característiques acostuma a estar lligada la propietat de produir un pigment vermell caracteritzat químicament pel fet d'ésser un derivat metènic d'un tripirrol, i que es coneix amb el nom de prodigiosina. Referent a la seva estructura taxonòmica, el gènere *Serratia* comprèn actualment una sola espècie *Serratia marcescens*, amb dues varietats: *Serratia marcescens* var. *marcescens*, considerada com varietat tipus, i *Serratia marcescens* var. *kiliensis*, que difereix de l'altra pel fet de donar la reacció de Voges-Proskauer negativa.

Com hem dit, la producció del pigment prodigiosina és una característica que ha estat considerada durant molt de temps lligada taxonòmicament al gènere *Serratia*. Actualment sabem que algunes espècies de *Streptomyces* i d'*Actinomadura* (*Nocardia*)<sup>4</sup>, tan distanciades del gènere *Serratia*, produeixen també prodigiosina; per tant, aquest caràcter deixa d'ésser exclusiu del gènere *Serratia*.

Però aquí no ens ocuparem d'aquesta exclusivament sinó de l'estabilitat de la pigmentació en *Serratia*.

Ja el 1888 WASSERZUG<sup>8</sup> publicà que, quan hom duia a terme un esgotament per estria d'una colònia pigmentada de *Serratia marcescens*, en un medi de gelatina, no totes les colònies que es produïen després de

la incubació corresponent mostraven la pigmentació característica, i establí que, quan les plaques de gelatina eren inoculades amb cultius en medi líquid, el nombre de colònies que no presentaven pigmentació era molt més gran. A més, li era possible d'aïllar algunes colònies no pigmentades, la descendència clonal de les quals no tornava a produir cap colònia pigmentada, mentre que en uns altres aïllaments aquesta descendència tornava successivament al tipus patern.

EISENBERG<sup>3</sup>, el 1914, obtingué vint-i-dues varietats de set soques de *Serratia* que diferien en el to de la pigmentació, i arribà a la conclusió que les diverses soques tenien diferents tendències per a «mutar», segons les seves paraules, «i que aquestes mutacions s'obtenien generalment de cultius vells».

DADDI, el 1932, aïllà vuit diferents tipus de coloració de cultius de tres dies, alguns d'ells eren estables i uns altres de més o menys inestables.

MARY BUNTING<sup>1</sup>, el 1946, treballant amb la soca *Serratia marcescens* ATCC 274, arribà a obtenir diferents varietats de pigmentació que es produïen amb una freqüència constant i conclougué que aquestes varietats es produïen d'una manera espontània, eren fàcilment recognoscibles, reversibles, i semblaven anàlogues a les mutacions; però es presentaven amb una freqüència molt més alta que la que havia estat establerta per a la mutació en altres microorganismes i en organismes superiors; i arribà a entreveure que aquestes variacions podien ésser degudes a algun «factor citoplasmàtic», amb el terme utilitzat per MARY BUNTING.

Hí ha nombrosos exemples de mètodes d'estudi semblants que porten a una confusió semblant.

Per a dur a terme una anàlisi eficient del problema de la producció de prodigiosina per *Serratia marcescens* crec que és indispensable de determinar-se a considerar els diferents punts de vista sota els quals pot ésser considerat aquest fenomen.

En primer lloc, estudiarem el problema de l'expressió fenotípica de la pigmentació en *Serratia*.

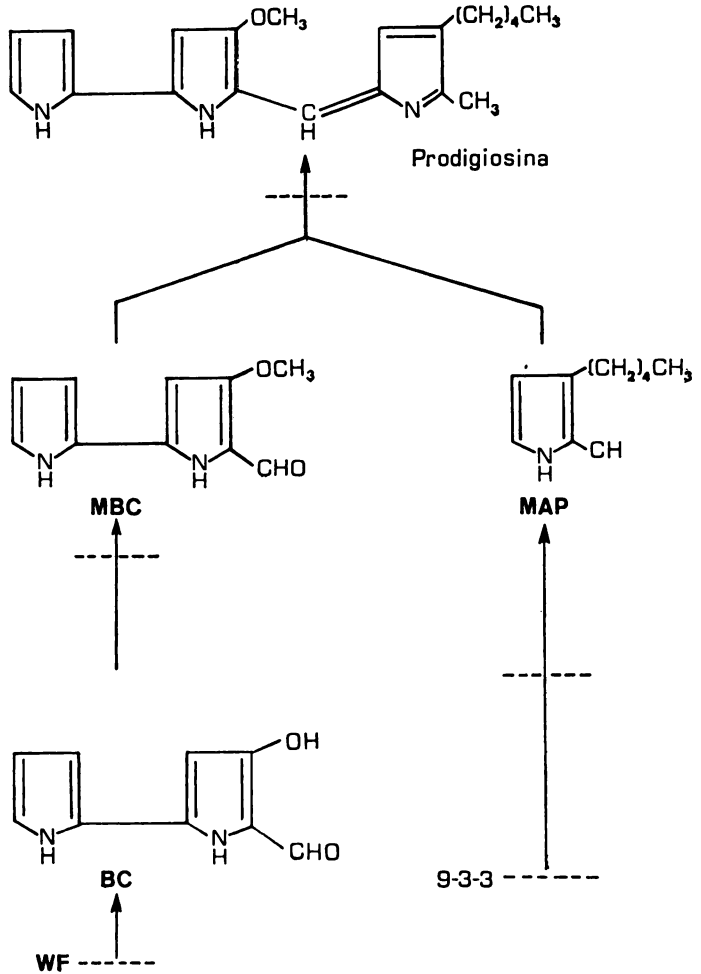
No són completament conegudes les vies metabòliques de la síntesi de prodigiosina, però podem comentar-ne algun detall.

### *Descripció de les vies*

Aquesta síntesi només pot ésser completada sota unes condicions ambientals determinades. La síntesi del pigment no té lloc si la temperatura d'incubació passa dels 37° C, ja que «l'enzim condensant», així com alguns altres enzims de la via són termolàbils. Això mateix passa si, en el medi de cultiu, la concentració de clorur sòdic ultrapassa els 8 grams per litre;

la quantitat de prodigiosina produïda varia si el pH del medi és àcid o alcalí, etc.

Recentment, en un interessant treball, WILLIAMS i GOTT<sup>5,9</sup>, han assolit de separar la producció de prodigiosina del creixement bacterià. Suspen-



ESQUEMA 1. — Descripció de les vies de biosíntesi de la prodigiosina

Adaptat de P. S. WEBB.  
«Rad. Research»,  
48, 1, 41

sions de cèl·lules no proliferants de *Serratia marcescens* han pogut ésser induïdes a produir pigment, amb l'ús de determinats aminoàcids com ara la prolina i el triptòfan com a inductors.

En segon lloc, considerarem les mutacions en sentit clàssic que poden afectar la via de síntesi de la prodigiosina.

Els diferents passos de la via metabòlica que ens ocupa poden ésser afectats per mutacions de les quals deriva la inoperància dels enzims que els catalitzen. Han estat aïllats mutants no pigmentats espontàniament o per mutagènesi artificial, i precisament del nostre coneixement d'aquests mutants deriva el disseny d'aquesta via de síntesi de la prodigiosina. Alguns d'aquests mutants aïllats per WILLIAMS i GREEN, com el WF, tenen bloquejada la síntesi dels compostos MBC i HBC però poden produir el MAP; d'altres mutants, com el 9-33, tenen bloquejada la síntesi del MAP, però poden produir MBC i, per tant, HBC.

El compost MAP és volàtil, i tant HBC com MBC semblen difusibles en el medi. Els mutants no pigmentats que tenen bloquejada la síntesi d'algun d'aquests compostos, com el WF o el 9-3-3, produiran prodigiosina, ni són incubats l'un en presència de l'altre, a causa d'un veritable procés de sintrofisme. Farem notar que la velocitat d'aparició d'aquest tipus de mutants és de l'ordre de les conegudes en d'altres casos de mutacions de microorganismes i no tenen correspondència amb les altres variants ja esmentades que es produeixen a velocitats més altes.

Considerats aquests fets, als quals cal afegir l'aïllament de soques de *Serratia* complicades en processos patològics, tant en insectes com en humans, de les quals més del 70 % no presenten pigmentació, hem de posar en dubte que la producció de prodigiosina sigui un caràcter lligat taxonòmicament al gènere *Serratia*.

Recentment, SANCHO<sup>7</sup>, en un documentat estudi sobre l'anàlisi adansoniana de l'estructura taxonòmica dels enterobacteris, ha trobat una branca de diferenciació molt delimitada composta per soques de *Serratia marcescens*. En la concepció d'aquest agrupament, hom no tingué en compte per a res el caràcter de la pigmentació i, de fet, gran part de les soques de *Serratia* que han estat incloses en aquest agrupament no han pigmentat mai; això demostra que la producció de prodigiosina, com a caràcter taxonòmic, no té tanta profunditat com havíem suposat i que no és imprescindible per a definir el tàxon.

Però un problema que sembla molt interessant i que resta sense resoldre és el següent: ¿Quina causa genètica és la responsable de la variació quant a la pigmentació en el gènere *Serratia* quan aquesta és independent del medi ambient i es presenta com un fenomen d'alta freqüència? En el Departament de Microbiologia de la Facultat de Ciències anem fent una sèrie d'experiències en relació amb aquest problema. Per això, i en primer lloc, duem a terme una prospecció entre un gran nombre de soques de *Serratia marcescens* aïllades de diferents biòtops: d'aigua, de terra i un conjunt de soques hospitalàries. D'aquestes soques, n'hem trobat un 50 % aproximadament que mai no pigmenten (la major part són soques hospitalàries).

Entre les soques pigmentades, ens trobem amb tres maneres diferents de comportament respecte a la pigmentació.

El mètode experimental que hem seguit per a estudiar aquest comportament és el següent:

Hom suspèn en Ringer 1/4 una colònia aïllada obtinguda per qualsevol dels mètodes d'esgotament; i, després d'efectuar un banc de dilucions, hom sembra per extensió, en plaques d'agar nutritiu, volums adequats de la dilució apropiada perquè el nombre de colònies en permeti el recompte.

QUADRE 1

*Experiència de dissociació colonial de Serratia marcescens SL*

Placa núm.	Colònies totals	Colònies cromogèniques	Colònies no cromogèniques
1	191	191	0
2	199	199	0
3	155	155	0
4	233	233	0
5	209	209	0
6	205	205	0
7	112	112	0
8	259	259	0
9	173	173	0
10	205	205	0
11	172	172	0
11	2113	2113	0

Les plaques són incubades a 30° C durant 48 hores, després de les quals hom n'efectua la lectura.

El primer model de comportament que exposarem és el que nosaltres denominem sistema SL. Com resta demostrat en el quadre 1, aquesta soca té una gran estabilitat de la pigmentació. El quadre, que mostra un experiment típic, ens permet de veure que, sobre dos mil cent cinc colònies, no n'apareix cap que presenti algun canvi en la pigmentació.

Com a segon model de comportament, comentarem el de la soca S<sub>10</sub>, que nosaltres, seguint amb la terminologia anterior, denominarem sistema S<sub>10</sub>.

En aquesta soca, quan se segueix el protocol experimental esmentat i com podem veure en el quadre 2, apareix una heterogeneïtat colonial

molt clara. Un 60,2 % de les colònies totals no pigmenten per més que hom en prolongui la incubació. Tots els subcultius duts a terme amb colònies no cromogèniques donen poblacions no pigmentades; d'aquestes hem aïllat la soca S<sub>10</sub>E, que fins ara, després de nombrosos subcultius, no

QUADRE 2

*Anàlisi clonal d'una colònia no cromogènica de S. marcescens S-10*

Placa núm.	Colònies totals	Colònies cromogèniques	Colònies no cromogèniques
1	113	113	0
2	101	101	0
3	126	126	0
4	130	130	0
5	127	127	0
6	135	135	0
7	178	178	0
8	139	139	0
9	154	154	0
10	102	102	0
10	1305	1305	0

Regressió: 0,0 %

QUADRE 2-1

*Experiència de dissociació colonial de Serratia marcescens S-10*

Placa núm.	Colònies totals	Colònies cromogèniques	Colònies no cromogèniques
1	219	212	7
2	374	91	283
3	298	171	127
4	297	70	227
5	314	77	237
6	280	88	192
6	1782	709	1073

Percentatge de dissociació: 60,2 %

ha tornat mai al tipus patern. El quadre 3 mostra un experiment típic amb la soca S<sub>10</sub>.

Així mateix, algunes de les colònies pigmentades donen lloc a poblacions cromogèniques en la seva totalitat. D'aquestes darreres hem aïllat

QUADRE 3

*Experiència de dissociació colonial de Serratia marcescens S-1*

Placa núm.	Colònies totals	Colònies cromogèniques	Colònies no cromogèniques
1	26	24	2
2	37	34	3
3	52	45	7
4	69	60	9
5	75	63	12
6	88	73	15
7	57	54	3
8	47	45	2
8	451	398	53
Dissociació: 11,5 %			
1	65	57	8
2	66	58	8
3	47	34	13
4	96	85	11
5	58	54	4
6	55	48	7
7	46	35	11
8	93	80	13
8	526	451	75

la soca S<sub>10</sub>H, la qual, després de diversos subcultius, ha presentat sempre una gran homogeneïtat colonial respecte a la pigmentació.

Un estudi de les reaccions bioquímiques d'aquestes soques no ens ha permès de descobrir cap diferència respecte al tipus de la soca original. No obstant això, llur morfologia presenta, al microscopi, algunes petites diferències de detall. D'aquesta manera, la soca S<sub>10</sub>E apareix en la tinció de Gram amb algunes diferències respecte a la S<sub>10</sub>, potser degudes a afi-

nitat diferencial pel colorant. També es presenten algunes diferències de velocitat de creixement en brou ordinari entre ambdues soques.

Un tercer tipus de comportament és representat pel model donat per la soca S<sub>1</sub> (Sistema S<sub>1</sub>). Aquesta soca, que mostra un percentatge de dissociació del 13% aproximadament, presenta, a més, unes variacions quant al to de pigmentació que fan que, en aquest sistema, hi hagi una heterogeneïtat colonial molt més clara i espectacular. Quadre 3.

En una placa sembrada amb un nombre de cèl·lules apropiat, després de 48 hores d'incubació, apareixen quatre tipus colonials diferents: unes colònies vermelles, unes altres de color taronja, unes altres de color rosa brillant i, finalment, hi ha colònies en què no apareix cap pigmentació.

El resultat de l'anàlisi clonal dels diferents tipus de colònies és expressat en el quadre 3.

Segons els resultats de WOODS i MOSMAN<sup>10</sup>, duts a terme amb una soca de comportament cromogènic semblant al de la S<sub>1</sub>, les diferències de pigment són atribuïbles a la presència de diferents quantitats d'aquest i no a l'existència de pigments diferents.

Aquests resultats semblarien atribuïbles, si això fos possible, a una herència mendeliana del tipus d'un al·lomorfisme múltiple, bé que, parlant de sistemes bacterians, això sigui un absurd. Tanmateix, si bé no poden ésser explicats completament, aquests fets indiquen, al nostre judici, l'existència, en algunes soques de *Serratia*, d'una heterogeneïtat colonial independent del medi ambient, ja que es donen en una mateixa placa de Petri i en condicions de cultiu rigorosament idèntiques; que en les variants no pigmentades no es presenta cap tipus de sintrofisme dels esmentats abans i que la velocitat amb què es presenta aquesta heterogeneïtat colonial és tan alta que permet d'excloure un model mutacional clàssic.

La prospecció de les característiques d'aquestes soques ens porta a l'aïllament de bacteriòfags als quals foren sensibles aquestes.

Dels diversos aïllaments duts a terme n'hi ha un que ens permeté d'obtenir un bacteriòfag, que denominem SLP, utilitzant com a soca d'enriquiment la SL, que donava una resposta lisogènica important. Això ens portà a aïllar algunes soques lisogenitzades amb el SLP, derivades del SL.

Aquest bacteriòfag SLP presenta al microscopi electrònic una morfologia molt semblant al SM<sub>4</sub> de *Serratia*, la qual és també molt semblant al bacteriòfag transductor P<sub>22</sub> de *Salmonella tiphymurium*.

Quan provàrem la sensibilitat al bacteriòfag de les soques de *Serratia* de què disposàvem, observàrem que la soca S<sub>10E</sub>, variant no pigmentada obtinguda de la S<sub>10</sub>, era sensible al SLP, però que al centre dels claps hi havia colònies resistents que presentaven uns certs canvis en la pig-



mentació. Amb la finalitat d'aclarir el fenomen i analitzar una fracció més important de la població, idearem el següent esquema experimental:

En plaques d'agar nutritiu hom estén 1 ml d'un cultiu en brou d'una nit de la soca  $S_{10}$  que conté aproximadament  $6 \cdot 10^8$  cèl·lules per ml; cal retirar el volum que sobra, com quan hom duu a terme un antibiograma. Una vegada que aquesta extensió s'ha assecat, hom hi aboca 0,5 ml d'una suspensió de bacteriòfag que conté, més o menys,  $6 \cdot 10^6$  p.f.u.; hom ho deixa assecar, i les plaques són incubades durant 48 hores a  $30^\circ$  C. El resultat és que a les plaques apareix una fracció de colònies resistents al bacteriòfag, mentre que la resta de la població és lisada per aquest. De les colònies resistents, n'hi ha algunes que apareixen pigmentades de manera semblant a la soca original. La freqüència amb què apareixen aquestes colònies depèn de la multiplicitat d'infecció, però de tota manera és superior a  $1 \cdot 10^{-8}$ .

En un altre experiment, hom segueix el mateix esquema experimental, però utilitzant la soca  $S_{10}H$ , la qual, recordem que és una varietat pigmentada i estable derivada de la  $S_{10}$ . En aquest cas, les plaques mostren que una fracció de la població resistent és no cromogènica.

Aquests resultats, que no ens expliquem en llur totalitat, semblen indicar que, per l'acció del bacteriòfag, dues poblacions estables quant a llur pigmentació tornen a mostrar una inestabilitat cromogènica que porta a una heterogeneïtat colonial semblant a la soca originària d'aquestes dues poblacions.

Dissortadament, no podem assajar l'acció d'aquest bacteriòfag sobre la soca  $S_1$ , de comportament cromogènic tan interessant, per tal com es mostra resistent al bacteriòfag.

Noves dades en la bibliografia ens han aportat un punt de base per a una idea de treball que tenfem quan iniciarem l'estudi d'aquestes soques de *Serratia*. WOODS i MOSMANN, el 1971, estudiaren en una soca de *Serratia* l'efecte de l'acriflavina, que, com és sabut, té una acció sobre l'ADN extracromosòmic, i obtingueren poblacions sobrevivents que presentaven una coloració diferent a la de la població de què s'havien originat. Segons es desprèn de les dades de WOODS i MOSMANN<sup>10</sup>, la coloració estable d'una població després del tractament amb acriflavina és de color taronja.

Amb aquesta idea, i repassant els treballs de Mary Bunting, veiérem que emprà en els seus experiments el dodecil-sulfat com a detergent per a lisar les cèl·lules, i obtingué una disminució en les variants vermelles de les poblacions. Aquest efecte li era inexplicable.

Darrerament<sup>6</sup> ha estat demostrada la possibilitat d'eliminació dels factors extracromosòmics per mitjà del dodecil-sulfat, i així ha estat comprovat amb els factors F i Col d'*Escherichia coli*.

Considerant l'alta freqüència de les variacions en la pigmentació en algunes soques de *Serratia marcescens*, això ens porta a establir com a hipòtesi de treball la següent:

- a) Que, en algunes soques de *Serratia*, la pigmentació pot ser controlada per un factor extracromosòmic.
- b) Que aquest factor extracromosòmic pot impedir la infecció per un determinat bacteriòfag (SLP).

L'estat actual del nostre treball no ens permet, fins al moment, sinó exposar aquesta hipòtesi de treball.

És obvi que els problemes que planteja la pigmentació en el gènere *Serratia* són de diferents tipus; especialment d'expressió fenotípica i de mutació clàssica, tenint en compte l'existència de fenòmens de sintrofisme entre alguns d'aquests mutants.

Però, a més, és un fet cert que, considerant únicament aquests punts, el caràcter cromogènic de la descendència d'una soca determinada de *Serratia* no pot ésser previst en tots els casos. La nostra hipòtesi de treball exposada aquí intenta de portar a cap una comprensió del comportament cromogènic d'aquestes soques no previsible amb l'ajuda única de les altres hipòtesis.

#### BIBLIOGRAFIA

1. BUNTING, MARY I.: *The inheritance of color in bacteria*. Cold Spring Harbour Symposium Quant. Biol. 11, 25-32 (1946).
2. DADDI, G.: *Sur la variabilité de B. prodigiosum*. «Boll. Sez. Ital. ist. Microbiol.», 4, 377-379 (1932).
3. EINSENBURG, P.: *Untersuchungen über den Variabilität der Bakterien. IV Ueber den Variationskreis der B. prodigiosum und B. violaceum*. «Zbl. Bakt. I, Orig.», 73, 448-449 (1914).
4. GERBER, N. N.: *Prodigiosin-like pigment from Actinomadura (Nocardia) pelletteri and Actinomadura madurae*. «Appl. Microbiol.», 18, 1-3 (1969).
5. HUSSAIN QUADRI, S. M. i WILLIAMS, R. P.: *Biosynthesis of the Tripyrrol Bacterial Pigment prodigiosin, by Non Proliferating Cells of Serratia marcescens*. «Texas Reports on Biology and Medicine», 30, 73-83 (1972).
6. INOZUKA, N. i NAKAMURA, G.: *Specific Action of Sodium Dodecyl Sulfate on the Sex Factor of E. coli K-12 Hfr Strains*. «J. Bacteriol.», 100, 827-835 (1969).
7. SANCHO VALLS, J.: *Los Coliformes Exóctonos del Agua y Suelo*. Tesi Doctoral. Facultat de Ciències. Univ. de Barcelona (1973).
8. WASSERZUG, E.: *Variation de forme chez les bactéries M. prodigiosus*. «Ann. Inst. Pasteur», 2, 75-83 (1888).
9. WILLIAMS, R. P., GOTT, C. L. i QUADRI, S. M. H.: *Induction of Pigmentation in non proliferating cells of Serratia marcescens*. «J. Bacteriol.», 106 438-443 (1971).
10. WOODS, D. S. i MOSMAN, N. N.: *Pigmentation and Acriflavine Resistance in Serratia marcescens*. «J. Bacteriol.», 108, 765-769 (1971).