

MODIFICACIONS DE L'ESTRUCTURA BACTERIANA DESPRÉS DEL RENTAT DELS FACTORS GENÈTICS EXTRACROMOSÒMICS AMB EL TARONJA D'ACRIDINA

per J. VIVES-REGO

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

INTRODUCCIÓ

Fins ara hom no ha dedicat massa atenció als canvis morfològics relacionats amb el *cured* o rentat dels episomes. Això ha estat degut fonamentalment a la no existència de diferències manifestables d'una manera crítica. L' objecte del present treball és de posar de manifest algunes de les diferències trobades per nosaltres en la morfologia microscòpica i l'estructura fina, entre la soca bacteriana C_3 de *Citrobacter intermedium*² i les cèl·lules de S_{-1} , obtingudes de les primeres pel rentat d'episomes amb el taronja d'acridina.

MATERIAL I MÈTODES

Soques. — Les dues soques emprades han estat obtingudes en el nostre Departament i son les següents: C_3 *Citrobacter intermedium*² i una població clonal de S_{-1} obtinguda per VALOIX⁷ a partir de les primeres per tractament amb el taronja d'acridina i en relació amb la qual hi ha evidència experimental de l'eliminació dels plàsmids presents en C_3 .

Cultiu, fixació, inclusió, seccions i contrastament. — Inoculem 100 ml del medi M_1 ² en la proporció del 10 %, i procedim a la incubació en bany metabòlic en agitació durant 12-14 hores en el cas de C_3 i de 15-16 hores en el cas de S_{-1} , a 30° C de temperatura. Al final de la incubació hom fa una fixació prèvia afegint-hi glutaraldehyd a concentració final del

4 %, bo i mantenint el cultiu a 4° C durant 12-16 h. A continuació recollim la suspensió cel·lular per centrifugació a 4000 r.p.m. durant 15 minuts i la rentem tres vegades amb tampó de fosfats pH 7,2 i 1/15 M⁶. El sediment obtingut és inclòs en agar Difco a 1,5 % amb el mateix tampó. Procedim a la fixació definitiva introduint la peça d'agar en un volum 40-70 vegades més gran d'OsO₄ a 1 % p/v amb tampó de fosfats i afegint ClNa a la concentració final del 5 %. Mantenim les peces d'agar en aquestes condicions 15 hores a 4° C. Ho rentem tres vegades amb tampó de fosfats. Un cop duta a terme la fixació definitiva, comença la deshidratació amb acetona, tot contrastant amb acetat d'uranil a la meitat de l'operació. Un cop deshidratades, són incloses en araldita. N'obtenim seccions ultrafines de 0,004 micres aproximadament amb un ultramicrotòtom Reichert Om V₂ i ho tornem a contrastar amb citrat de plom.

Observació. — Les cèl·lules de C₃ i S₁⁻ s'observen al microscopi òptic de camp clar en tincions gram i *in vivo* en contrast de fases. L'aparell emprat és un Wild M₂₀. Les preparacions ultrafines són examinades en un microscopi electrònic PHILIPS EM 200 a 60 kV.

RESULTATS

Camp clar. — Una de les primeres i més accentuades diferències entre les dues poblacions clonals és el diferent comportament davant la tinció gram. Les cèl·lules bacterianes de C₃ presenten una tinció dèbil i irregular en determinades zones que resten sense tenyir. La morfologia correspon a un bacil gram negatiu petit i una mica pleomòrfic, figura 1.

Les cèl·lules de la soca S₁⁻ presenten molt poca afinitat envers els colorants com la safranina, per exemple, molt menys que en el cas de la soca C₃. Únicament es tenyeixen d'una manera suau, després de 5-10 minuts de contacte amb el colorant, i solament resta tenyida una petita fracció de la superfície cel·lular, generalment situada en els pols de la cèl·lula; la resta roman pràcticament incolora. També és observable una dimensió sensiblement inferior en el cas de la soca S₁⁻ respecte a la soca C₃, figura 1'.

Contrast de fases. — En contrast de fases també es manifesta una clara diferència morfològica entre C₃ i S₁⁻. Les cèl·lules de C₃ són totalment opaques i llur citoplasma és clarament homogeni des del punt de vista òptic, mentre que les cèl·lules de S₁⁻ són sensiblement més petites (com ja hem esmentat en els resultats de camp clar) i algunes zones del citoplasma apareixen com vacuoles o cossos brillants. Aquestes zones més clares estan

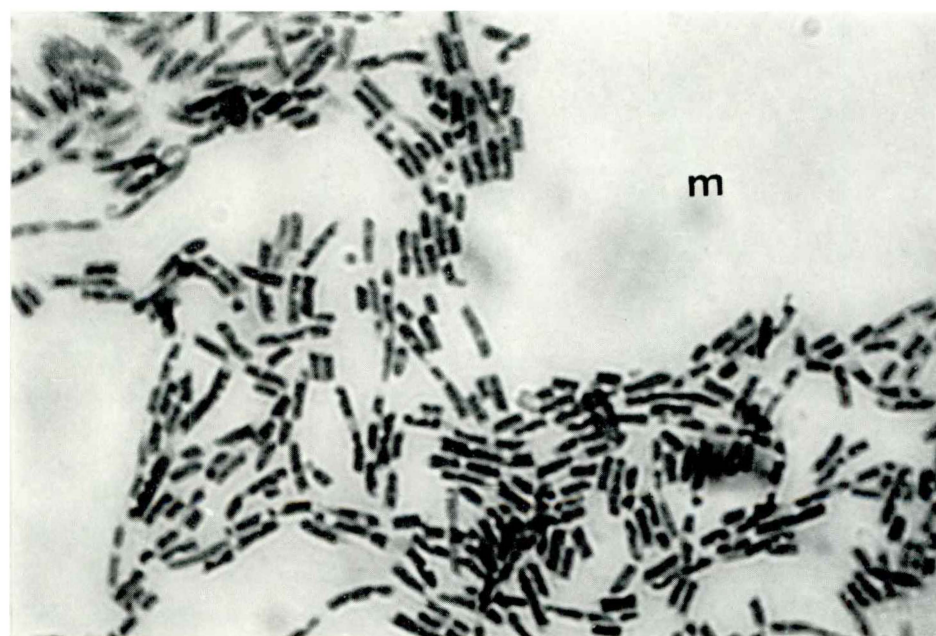
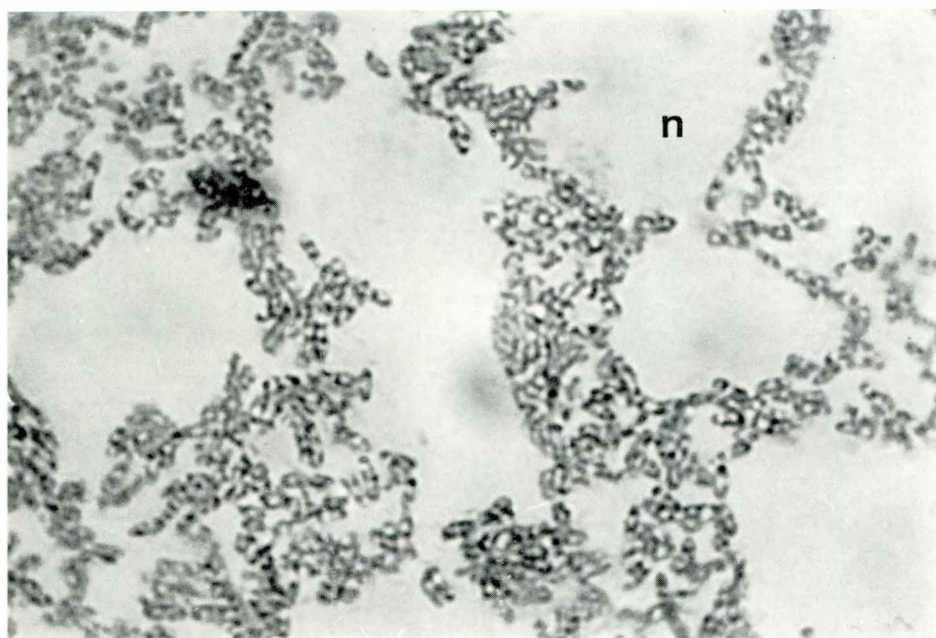


FIG. 1. — Tinció Gram (1.250 diàmetres, objectiu Wild Fluotar $\times 100$):
m) població clonal de C., n) població clonal de S—

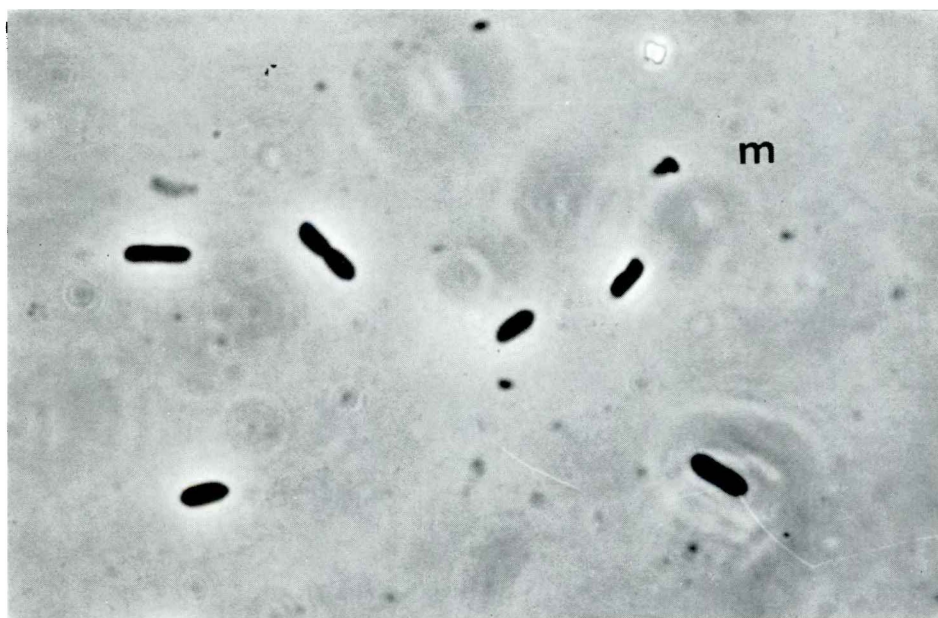


FIG. 2. — Contraste de fases de les cellules *in vivo* de : m) C₃, n) S— (1,250 diámetros)

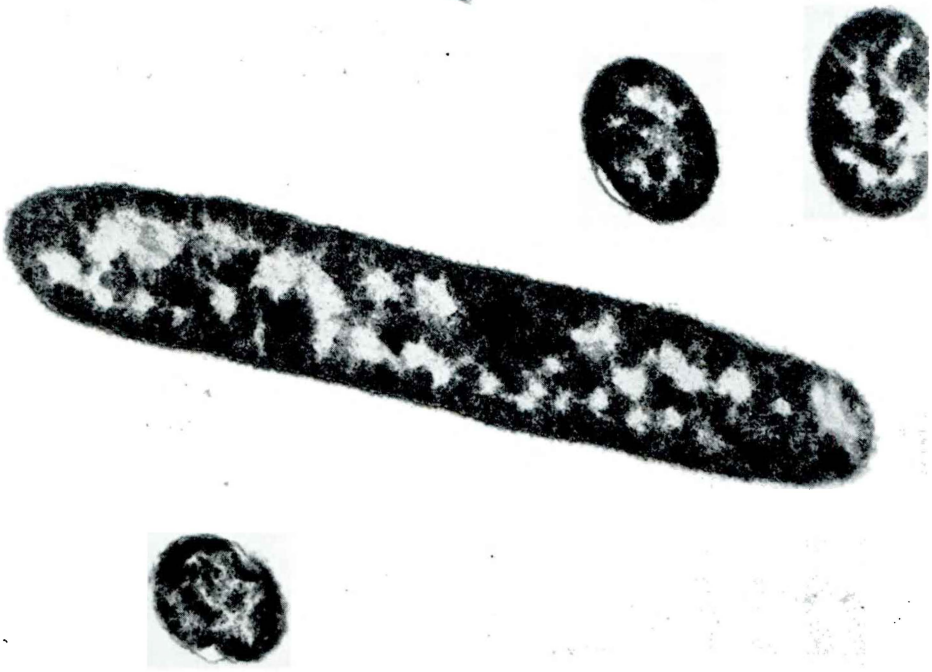


Fig. 2. Microelectrografia d'una secció transversal i longitudinal de C₃ (20.500 diàmetres)

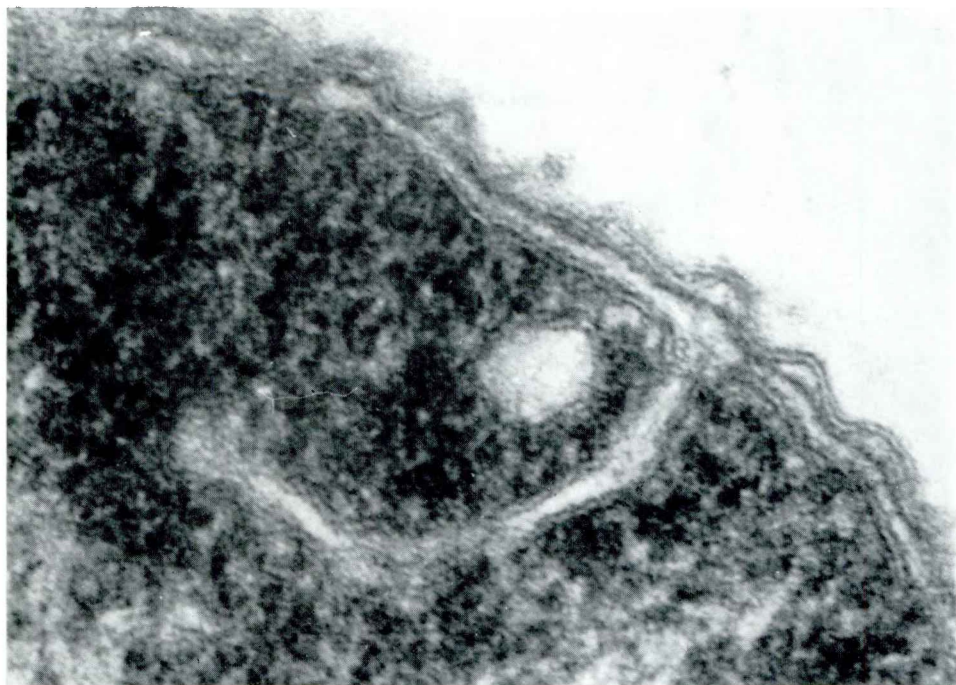


FIG. 4. — Aspectre de la paret celular, membrana celular i membrana intrusiva de S— (131.800 diàmetres)



FIG. 5. — Membrana intrusiva de S— (62.000 diàmetres)



FIG. 6. — Sacs aplanats prop de l'envà de divisió cel·lular de S- (420.700 diàmetres)



FIG. 7. — Estructures membranoses aplanades en S- (42.700 diàmetres)

repartides d'una manera irregular en el citoplasma. De vegades representen un 60-70 % de la secció òptica, i d'altres només un 10-20 %, figura 2.

Microscopi electrònic.— Al microscopi electrònic les cèl·lules de C₃ presenten un aspecte típic de bacil gramnegatiu, amb una distribució del cos nuclear molt irregular (potser una mica més d'allò que és habitual) i el citoplasma homogeni, figura 3. La diferència morfològica observable en S-1 és la presència d'estructures laminars molt freqüents, que en cap cas no han estat observades en les cèl·lules de C₃. Aquestes estructures estan directament relacionades amb la membrana cel·lular en alguns casos, figura 4, i formen com uns sacs aplanats que podrien relacionar-se amb mesosomes o simples intrusions membranoses, per llur proximitat a la membrana cel·lular o a l'envà de divisió de la cèl·lula, figures 5 i 6. En alguns casos es presenta un replegament múltiple, figura 7.

DISCUSSIÓ

Les diferències morfològiques trobades entre els dos tipus de soques bacterianes són molt acusades. En els tres nivells d'observació: camp clar, contrast de fases i microscòpia electrònica, les diferències són notòries. Les anomalies existents en la tinció gram suggereixen en principi canvis importants en la constitució química de la paret cel·lular. D'altra banda, la diferent opacitat en el contrast de fases pot ésser deguda tant a canvis en la paret cel·lular com a l'estructura del citoplasma.

En les microelectrografies obtingudes, en cap moment no poden ésser observades diferències estructurals en la constitució de la paret o membrana cel·lular de C₃ i S-1, ni tampoc en l'estructura fina del citoplasma. Es manifesten molt freqüentment estructures membranoses intrusives en el cas de S-1 que suggereixen la possibilitat que siguin les responsables de les diferències de densitat òptica manifestades en contrast de fases.

Aquests efectes atribuïts al rentat d'episomes, després del tractament amb la taronja d'acridina, poden ésser també conseqüència de canvis o lesions de l'ADN fonamental i no solament de l'extracromosòmic. Cal assenyalar la semblança de les intrusions membranoses abans esmentades, amb les que apareixen en el creixement no equilibrat³ d' *Azotobacter*^{4, 8} i de *Bacillus*¹ quan el primer creix utilitzant N₂ com a font de nitrogen i el segon esporula.

Agraïments: Vull agrair al Servei de Microscòpia Electrònica de la Universitat de Barcelona les facilitats donades en tot moment per a l'obtenció de les microelectrografies.

BIBLIOGRAFIA

1. FREESE, E.: *Unusual membranous structures in cytochrome a-deficient mutants of Bacillus subtilis*. «J. Gen. Microbiol.», 75, 187-190 (1973).
2. GUINEA, J., HERNÁNDEZ, S. i PARÉS, R.: *Análisis genético del equilibrio entre individuos segregadores y no segregadores de glutamato en las poblaciones de Citrobacter intermedium C₃*. «Microbiol. Españ.», 25, 117-123 (1972).
3. MAALOE, O. i KJELDGAARN, N. O.: *Control of Macromolecular Synthesis*. Ed. Benjamin. Nova York (1965).
4. OPPENHEIM, J. i MARCUS, L.: *Correlation of ultrastructure in Azotobacter vinelandii with nitrogen source for growth*. «J. of Bacteriol.», 101, 286-291 (1970).
5. PARÉS-FARRÁS, R.: *Discurso inaugural del Curso*. Real Academia de Farmacia de Barcelona (1973).
6. SORENSEN, S. P. C.: «Biochem. Z.», 22, 352 (1909).
7. VALOIX, J.: *Tesi Doctoral (pendent de lectura)*. Facultat de Ciències. Universitat de Barcelona (1973).
8. VELA, G. R. i ROSENTHAL, R. S.: *Effect of peptone on Azobacter morphology*. «J. of Bacteriol.», 111, 260-266 (1972).