

SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA

FILIAL DE L'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

COL·LOQUIS - IX

BIOLOGIA MOLECULAR I
CEL·LULAR • FISIOLOGIA
I GENETICA DELS PROCARIOTES
•
FISIOLOGIA EXPERIMENTAL
I DEL DESENVOLUPAMENT

BARCELONA

1976

**COL·LOQUIS
DE LA
SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA**

IX

**BIOLOGIA MOLECULAR I CEL·LULAR · FISIOLOGIA I GENÈTICA
DELS PROCARIOTES · FISIOLOGIA EXPERIMENTAL
I DEL DESENVOLUPAMENT**

SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA
FILIAL DE L'INSTITUT D'ESTUDIS CATALANS

COL·LOQUIS - IX

**BIOLOGIA MOLECULAR I
CEL·LULAR • FISIOLOGIA
I GENETICA DELS PROCARIOTES
•
FISIOLOGIA EXPERIMENTAL
I DEL DESENVOLUPAMENT**

BARCELONA

1976

ISBN 84-7283-001-2

Dipòsit legal: B. 10.008 - 1976

Tallers Gràfics A. Núñez - París, 208 Barcelona

Els dies 28, 29 i 30 de març de 1973 tingué lloc el vuitè dels col·loquis de la SOCIETAT CATALANA DE BIOLOGIA, el qual fou dedicat a Biologia molecular i cel·lular (primera sessió), Fisiologia i Genètica dels Procariotes (segona sessió) i Fisiologia experimental i del desenvolupament (tercera sessió). Les sessions foren celebrades al Laboratori P.E.V.Y.A., a Molins de Rei (Baix Llobregat), sota la presidència del doctor RAMON PARÉS i FARRÀS.

This One



JAGO-YXA-YUPT

ESTUDIS CONFORMACIONALS DE LA HISTONA F3 DE TIMUS DE VEDELLA

per ESTEVE PADRÓS i JAUME PALAU

Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma
de Barcelona

En l'organització del cromosoma, no ha estat encara establert el paper que tenen les histones. Dues teories generals parlen d'una funció repressora de l'activitat genètica de l'ADN i d'una funció de manteniment de la superestructura de la nucleoproteïna. És, doncs, important d'arribar a establir les característiques fisico-químiques de les histones, per tal de poder conèixer amb més profunditat com s'esdevé la interacció amb l'ADN.

Actualment és coneguda l'estructura primària de 4 histones¹, la qual cosa fa que siguin ja possibles estudis físics i fisico-químics de llurs estructures secundària i terciària. En el present treball són duts a terme estudis de l'estructura terciària de la histona F₃, extreta de timus de vedella, perquè és l'única histona que conté cisteïna i és rica en arginina, i la seva seqüència és coneguda i mostra regions molt característiques²: els dos residus cisteïna estan localitzats en una regió de 29 residus no bàsics, amb un fort potencial de formació d'hèlix alfa o d'estructures plegades.

Han estat emprades bàsicament dues tècniques:

a) *Espectroscòpia de ressonància de spin electrònic (ESR)*. Consisteix a enllaçar un «marcador de *spin*»³ a la proteïna que cal estudiar. Aquest marcador de *spin*, que és en realitat un radical lliure orgànic, pot ésser elegit de tal forma que sigui enllaçat amb un tipus determinat d'aminoàcid. L'espectre d'ESR obtingut reflecteix els canvis conformationals o plegaments que tenen lloc en la regió de la molècula on el marcador de *spin* és enllaçat. En aquest treball, hom ha elegit un marcador de *spin* específic per als grups -SH, bé que reacciona, en menor proporció, amb els grups -NH₂.

b) *Pertorbació tèrmica en l'ultraviolat.* És una forma d'espectroscòpia de diferència. Hom posa la mateixa solució proteica a la cubeta de referència i a la de mostra, i després escalfa la mostra bo i mantenint la de referència a temperatura constant. Continuant el mateix procediment amb un model adequat (en el nostre cas amb l'ester metílic de la tirosina), hom treu informació sobre el percentatge de residus tirosina accessibles al dissolvent, és a dir, que estan situats a la superfície de la molècula ⁴.

Els resultats obtinguts utilitzant el marcador de *spin* específic per als grups -SH mostren que: a) existeix una cova (o unes coves) on hi ha situat un residu cisteïna ⁵; b) aquesta cova és tancada d'alguna forma en augmentar la força iònica de la solució; c) el tractament amb urea 6M no és capaç de destruir totalment aquesta estructura.

Per tal d'estudiar més de prop la topologia de la cova, han estat emprades 5 formes del mateix marcador de *spin*, variant només llur longitud. Els resultats demostren que, en solucions amortidores de fosfat 0,024 M, i pH 6,7, la cova s'eixampla ràpidament als 8-9 Å de fondària, i que després s'eixampla més lentament. Als 16 Å, pràcticament, la cova ja no es observada.

Els estudis qualitius de pertorbació tèrmica fets amb aquesta mateixa histona indiquen que, en solucions amortidores de fosfat 0,024 M, i pH 6,7, els residus de tirosina són col·locats en un embolcall hidrofòbic. A pH 3 (HCl 0,001 M) aquests residus han variat clarament d'embolcall, i són col·locats en un ambient hidrofílic. D'altra banda, la comparació dels pendents de les rectes que en resulten, en representar l'augment de densitat òptica vers l'augment de temperatura, indica la possibilitat que una part important de tirosines sigui trobada a l'interior de la molècula quan aquesta és dissolta en fosfat 0,024 M, i pH 6,7. Com pot ésser observat, tots aquests resultats estan d'acord amb un considerable plegament de la molècula en augmentar el pH i la força iònica.

Han estat duts també a terme uns experiments preliminars d'estudi de la interacció entre l'ADN i la mateixa histona, mitjançant la tècnica del marcador de *spin*. Aquests primers resultats mostren que pràcticament tota la molècula d'histona queda immobilitzada en interaccionar amb l'ADN (en solucions amortidores de fosfat 0,024); els estudis posteriors aniran dirigits a confirmar i ampliar aquests resultats encoratjadors.

BIBLIOGRAFIA

1. HNILICA, L. S. dins *The structure and biological functions of histones*. CRC Press, Cleveland, Ohio (1972).
2. DE LANGE, R. J., HOOPER, J. A. i SMITH, E. L.: *Complete Amino Acid Sequence of Calf-Thymus Histone III*, *Proc. «Nat. Acad. Sci. USA»* 69, 882-884 (1972).
3. MCCONNELL, H. M. i MCFARLAND, B. G.: *Physics and Chemistry of Spin Labels*, «*Quart. Rev. Biophys.*» 3, 91-136 (1970).
4. LEACH, S. J. i SMITH, J. A.: *Thermal Perturbation Difference Spectroscopy of Proteins*, «*Int. J. Prot. Res.*» 4, 11-19 (1972).
5. PALAU, J. i PADRÓS, E.: *Crevice Containing Cysteine in the Tertiary Structure of Calf Thymus Histone F₃*, «*FEBS Letters*», 27, 157-160 (1972).

REACCIÓ DE LA RIBONUCLEASA A DE PÀNCREAS DE BOU AMB PIRIDOXAL-FOSFAT

per D. OBACH i C. M. CUCHILLO

Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma
de Barcelona

Són diverses les tècniques utilitzades per a conèixer els aminoàcids que formen part del centre actiu d'un enzim. Citarem com a exemples més representatius les tècniques d'obtenció de derivats covalents formats entre l'enzim i el substrat, o entre l'enzim i un anàleg del substrat, així com les tècniques de reacció química controlada amb reactius específics per a uns determinats grups, etc. (KOSHLAND, 1960). D'entre aquestes tècniques, una de les més utilitzades actualment és la del marcat per afinitat. El fonament d'aquesta tècnica és obtenir una substància anàloga al substrat que tingui les dues particularitats següents: *a*) que manqui dels grups químics que donen lloc a la reacció enzimàtica amb el substrat, i *b*) que contingui un grup químic reactiu en la posició adequada, el qual reaccionarà amb l'enzim en forma irreversible.

En el marcat per afinitat, cal que es produeixi una pèrdua de l'activitat enzimàtica com a conseqüència del bloqueig d'un grup imprescindible, bé en la fixació del substrat, bé en la catàlisi pròpiament dita. L'analogia estructural permet de suposar que la reacció ha tingut lloc en el centre actiu i que, per tant, la pèrdua d'activitat no és deguda a un canvi conformacional de la proteïna enzimàtica induït per la presència del reactiu emprat (KOSHLAND, 1960; SINGER, 1967).

En alguns casos, la reacció entre el reactiu d'afinitat i el grup químic específic de l'enzim dona lloc a un compost inestable que, conseqüentment, és necessari estabilitzar per a poder conèixer el lloc de reacció. Aquest cas és el del piridoxal-fosfat, que és capaç de reaccionar amb el grup ϵ -NH₂ de les lisines i donar lloc a la formació d'una base de Schiff característica. Aquesta base de Schiff és, tanmateix, poc estable, i pot ésser hidrolitzada fàcilment. Per això cal estabilitzar el complex Piridoxal-lisina, la qual cosa és assolida per reducció de la base de Schiff

amb borohidruir de sodi, amb què hom obté l'estabilització del complex mitjançant la formació d'una amina secundària (FISHER, 1964; FISHER *et al.*, 1958).

El centre actiu dels enzims, tal com ja ha estat dit, és format no solament per aminoàcids que intervenen en la catàlisi pròpiament dita sinó també per d'altres que hi intervenen formant llocs específics per a la fixació dels substrats o dels cofactors. L'especificitat d'aquests dos processos depèn altament de l'estructura terciària local. Hom ha pogut observar en molts casos que els residus implicats presenten valors pK_a anòmals, i ha estat observat que llur reactivitat és químicament atípica en comparació amb compostos models. Aquests fets han portat a la conclusió que els residus del centre actiu poden estar preparats per a dur

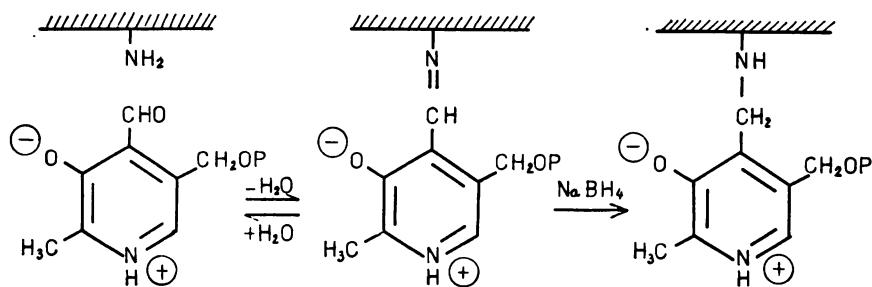


FIG. 1. — Reacció del piridoxal-fosfat amb el grup ϵ -NH₂ d'una lisina de la proteïna enzimàtica i posterior reducció de la base Schiff obtinguda

a terme llur funció en una condició localitzada d'alta energia (VALLEE i WILAILMS, 1968).

La formació de complexos entre el piridoxal-fosfat i els enzims que en són dependents per a l'activitat és un exemple de la reactivitat específica de centre actiu. Com a regla general, el grup aldehyd del cofactor forma un enllaç aldimí només amb un residu lisil del gran nombre dels que es troben a la proteïna (FASSELLA, 1967).

Els residus lisils del centre actiu que no depenen del piridoxal-fosfat per a l'activitat podrien estar condicionats en una forma que permetria la formació específica de l'aldimina amb piridoxal-fosfat, ja que un bon nombre d'enzims s'inhibeixen en la seva presència (RIPPA *et al.*, 1967; SHAPIRO *et al.*, 1968; VALLEE i RIORDAN, 1969; PISZKIEWICZ *et al.*, 1970).

La ribonucleasa A de pàncreas de bou és un enzim en el qual el piridoxal-fosfat no té funció coneguda, però que posseeix un centre fixador de fosfat molt ben caracteritzat (WYCKOFF *et al.*, 1967; KARTHA *et al.*, 1967). Quan la ribonucleasa és tractada amb piridoxal-fosfat i

borohidrur de sodi, es perd activitat catalítica. Aquesta pèrdua d'activitat és atribuïda per MEANS i FEENEY (1971) i RAETZ i AULD (1972) a la unió del piridoxal-fosfat a un residu lisil topològicament adjacent al centre actiu. Segons els primers autors, la reacció té lloc solament amb el grup ϵ -NH₂ de la lisina 7, mentre que els segons, en un treball molt més complet, mostren que la reacció té lloc amb els grups ϵ -NH₂ de les lisines 7 i 41 en una proporció de 2 a 3.

A causa del nostre interès per escatir la funció del grup lisina 7, i sospitant que podria estar implicat en la fixació de purines en el nucleòtid adjacent en 5' a l'enllaç fosfodiester hidrolitzat per la ribonucleasa (DEAVIN *et al.*, 1966, a; 1966, b; RABIN *et al.*, 1969) decidírem d'estudiar aquesta reacció amb la intenció d'analitzar el comportament cinètic del derivat en lisina 7 quan són utilitzats substrats diferents, com és ara ARN, àcid citidílic 2',3' cíclic i nucleòsids monofosfats del tipus CpX on X pot ésser qualsevol de les quatre bases pròpies de l'ARN.

La utilització del piridoxal-fosfat com a marcador d'afinitat de la ribonucleasa prové del fet que el piridoxal-fosfat inhibeix competitivament la hidròlisi de l'àcid citidílic 2',3' cíclic a pH 7,15 en tampó tris-ClH 0,05 M. La constant d'inhibició té un valor $K_i = 2,8 \times 10^{-3}$ M (MEANS i FEENEY, 1971). D'altra banda, hom considera com a evidència de reacció en el centre actiu per fixació del fosfat el fet que un excés de 35 vegades la concentració de piridoxal no té cap efecte sobre l'activitat ribonucleàsica (MEANS i FEENEY, 1971; RAETZ i AULD, 1972).

Com a comprovació adicional, s'ha pogut veure que, en les condicions de treball, el tractament de la ribonucleasa amb borohidrur de sodi sol no produeix inhibició de l'activitat enzimàtica.

En els nostres experiments, hem trobat que les condicions de treball són summament importants de cara a la interpretació final dels resultats; hi ha, però, diverses diferències, algunes de força consideració, en relació amb els treballs abans esmentats, és a dir, amb el de MEANS i FEENEY (1971) i amb el de RAETZ i AULD (1972).

Com a material de partida, ha estat utilitzada sempre la ribonucleasa A obtinguda per cromatografia sobre CM-cellulosa, a partir de ribonucleasa 5 vegades cristallitzada (Calbiochem) segons el mètode de TABORSKY (1959) i dessalinitzada amb Sephadex G-25 fine (1,8 x 81 cm) (Pharmacia).

La determinació de l'activitat enzimàtica fou feta segons el mètode de CROOK, MATHIAS i RABIN (1960) mesurant l'increment de la densitat òptica a 284 nm utilitzant àcid citidílic 2',3' cíclic com a substrat, i amb el mètode de WITZEL i BARNARD (1962) mesurant la disminució de la densitat òptica a 286 nm, emprant dinucleòsids monofosfats com a substrats.

En iniciar els experiments de modificació de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat foren emprades quantitats equimolars d'enzim i de cofactor, però els resultats demostraren que el rendiment no era massa elevat. Per aquies motiu hom augmentà la concentració de cofactor a 3 vegades la concentració d'enzim.

Hom féu reaccionar 82,2 mg de ribonucleasa A amb 4,05 mg de piridoxal-fosfat (Merck) dissolts en 8 ml de tampó d'imidazol-ClH pH 6,0, $I = 0,05$ durant 10 minuts a 25°C . L'estabilització de la base de Schiff fou feta per reducció amb borohidruir de sodi en excés fins que la so-

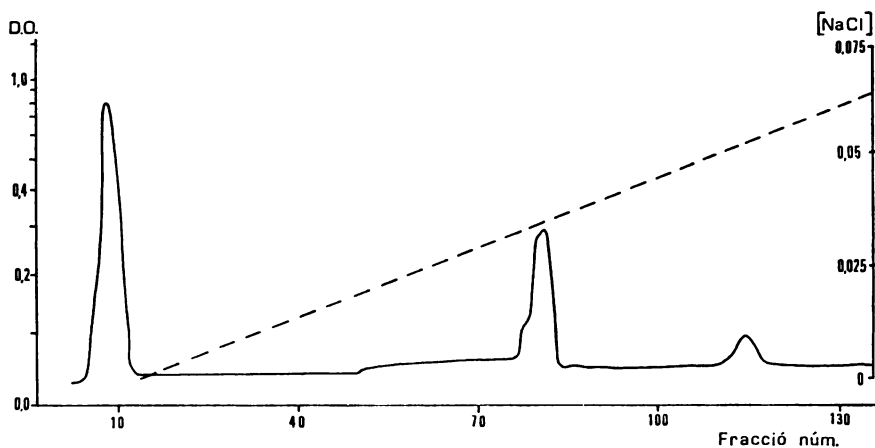


FIG. 2. — Cromatografia sobre CM-cel·lulosa dels derivats obtinguts a la reacció de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (—) D. O. 280 nm. (---) Concentració clorur sòdic. Fraccions de 2 ml

lució restà totalment descolorida. A continuació hom procedí a eliminar l'excés de reactius de baix pes molecular, cromatografiant el conjunt sobre Sephadex G-25 fine ($1,8 \times 81$ cm) equilibrat amb tampó tris-ClH 0,01 M, pH 8,0. El pic d'alt pes molecular fou cromatografiat seguidament sobre CM-cel·lulosa ($0,9 \times 25$ cm) (Whatman CM-52) equilibrada amb tampó tris-ClH 0,01 M, pH 8,0. L'elució fou duta a terme amb un gradient lineal de clorur sòdic des de 0 a 0,15 M.

Dels tres pics principals obtinguts d'aquesta cromatografia hom mesurà els espectres d'absorció a l'ultraviolat entre 230 nm i 340 nm. A la figura 3 hi ha representats els espectres d'absorció dels tres pics, i també el del producte de reducció del piridoxal-fosfat amb borohidruir de sodi. L'espectre del tercer pic presenta característiques espectrals similars a les de la ribonucleasa A nativa, bé que la relació densitat òptica

a 280 nm sobre la de 260 nm és una mica baixa. A la figura també podem observar que el quocient entre les densitats òptiques a 320 nm i 280 nm és aproximadament el doble en el cas del primer pic que en el del segon. D'això, i tenint en compte els antecedents bibliogràfics, hom deduí que el primer pic de la cromatografia devia correspondre a un derivat bisubstituit, mentre que el segon devia ésser monosubstituit.

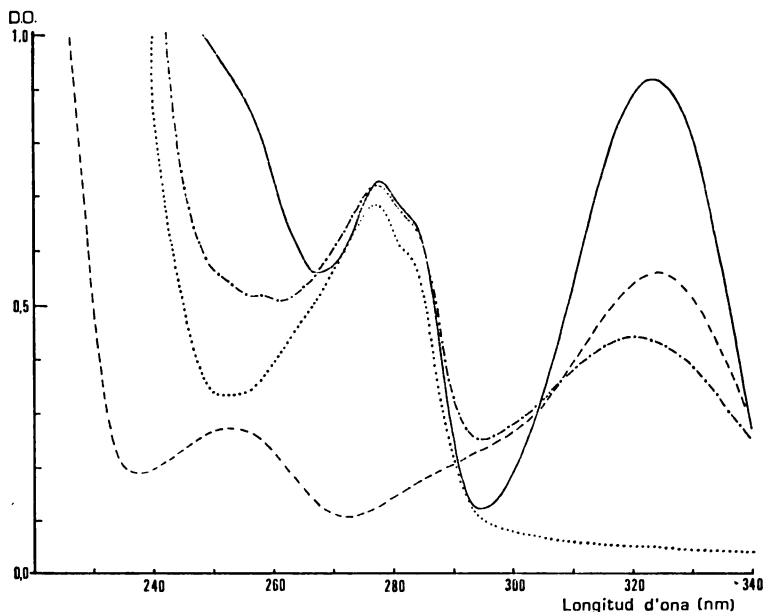


FIG. 3. — Espectres d'absorció: (—) Derivat bisubstituit de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (— · —) Derivat monosubstituit. (. . . .) Ribonucleasa no reaccionada. (— —) Producte de la reducció del piridoxal-fosfat amb borohidruir de sodi

A la cromatografia també poguérem apreciar que el segon pic era asimètric. Per aquest motiu fou recromatografiat sobre CM-cel·lulosa (0,9 × 25 cm) utilitzant un gradient format per tris-ClH 0,005 M, pH 7,2 com a tampó inicial i tris-ClH 0,1 M, pH 8,5, com a tampó final, amb un gradient de clorur sòdic de 0 a 0,1 M. El derivat fou fraccionat en dos pics clarament diferenciats un dels quals correspon als derivats que tenen el piridoxal-fosfat unit a la lisina 7, i l'altre als que el tenen unit a la lisina 41 (RAETZ i AULD, 1972).

En posteriors preparacions, fou eliminada la primera cromatografia so-

bre CM-cel·lulosa i hom procedí directament a la cromatografia, amb gradient mixt de força iònica i pH en les mateixes condicions ja descrites, del component d'alt pes molecular obtingut de la cromatografia amb Sephadex G-25 fine.

A la gràfica següent, mostrem un fraccionament típic de les ribonucleases modificades amb piridoxal-fosfat. Com pot ésser observat fàcilment, el perfil d'elució és francament complex i demostra la presència d'un gran nombre de derivats.

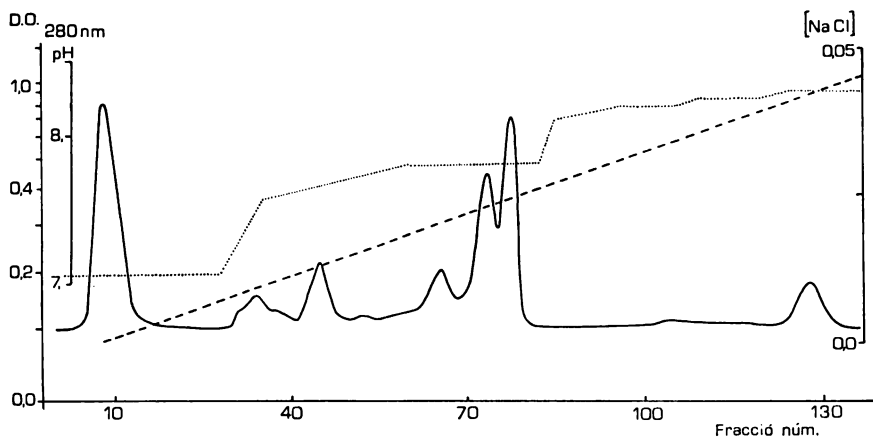


FIG. 4. — Cromatografia sobre CM-cel·lulosa dels derivats obtinguts a la reacció de la ribonucleasa amb piridoxal-fosfat. (—) D. O. 280 nm. (---) Concentració de clorur sòdic. (. . . .) pH

El primer pic presenta un espectre ultraviolat propi d'un derivat bisubstituït. L'últim pic és ribonucleasa no reaccionada. Els tres anteriors són derivats monosubstituïts i els restants són probablement bisubstituïts, bé que la proporció de densitat òptica de 320 nm a 280 nm és quelcom més petita que en el primer pic.

RAETZ i AULD (1972) dedueixen que el piridoxal-fosfat es fixa preferentment a les lisines 7 i 41 perquè els grups ϵ -NH₂ d'aquests residus deuen tenir un pK_a rebaixat en comparació amb el de les altres lisines no integrants del centre actiu. Basen llur conclusió en el fet que compostos models, com es ara N- α -acetil-D,L-lisina, no reaccionen en absolut amb el piridoxal-fosfat. D'altra banda, la impossibilitat, per part del piridoxal fosfat, d'inactivar completament la ribonucleasa, l'expliquen en funció de l'impediment estèric que presenta la reacció en la lisina 7 per a modificar la lisina 41, que és indispensable per a l'activitat. Els nos-

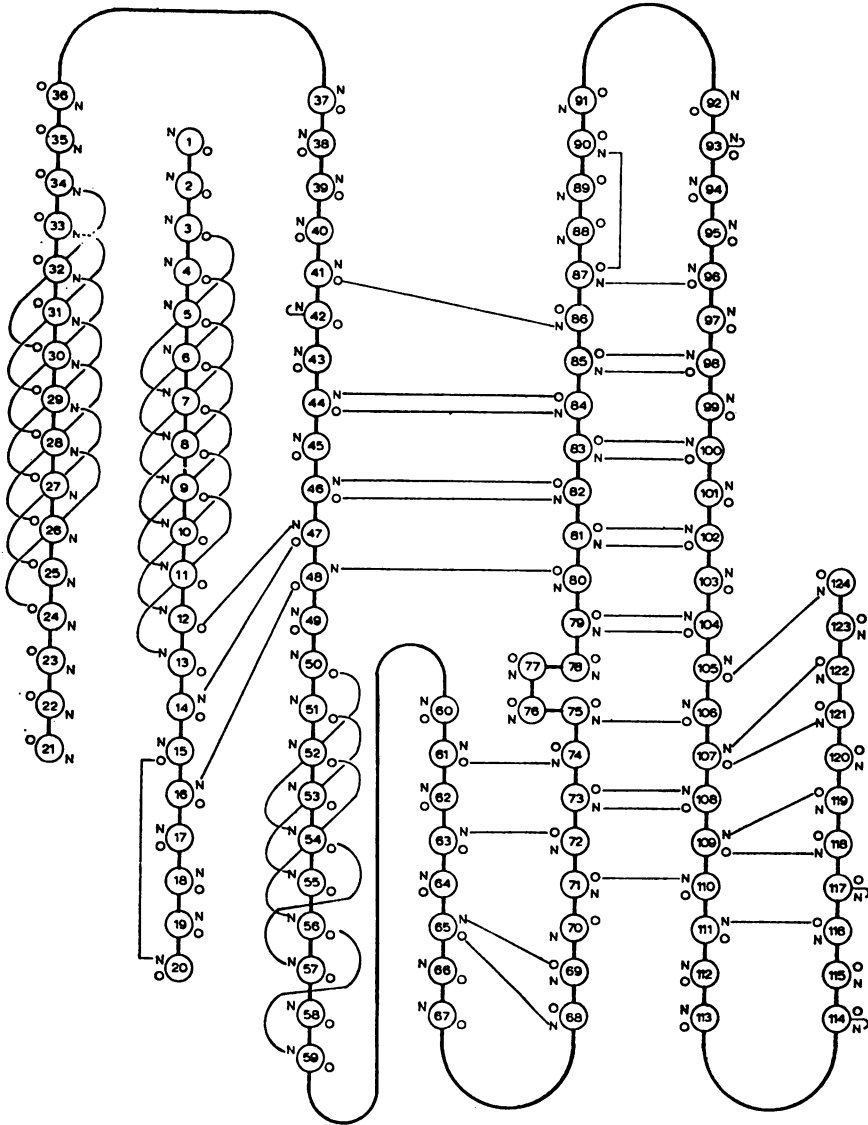


FIG. 5. — Model esquelètic de la ribonucleasa S segons Wyckoff *et al.* (1970)

tres resultats demostren que una disminució del pK_a de les lisines 7 i 41 del centre actiu únicament no és suficient per a explicar la reacció amb el piridoxal-fosfat, puix que, si bé en menys proporció, es produeix com

a mínim un tercer derivat monosubstituït. A més, si és cert que la modificació a la lisina 7 impedeix la reacció a la lisina 41, i viceversa, hom no podria explicar l'aparició, en una proporció considerable, de derivats bisubstituïts. De fet, però, és clar que han d'existir diferències, bé que molt subtils, entre els diferents microentorns de cada residu aminoàcid, ja que, en els espectres de les diferents fraccions, hom observa desplaçaments apreciables en el màxim d'absorció del piridoxamina-fosfat substituït que varien entre 317 i 325 nm. Aquestes variacions deuen ésser produïdes per la formació en diferents proporcions de diverses espècies ionitzades fosforil-piridoxil-lisil-ribonucleases.

En la figura 5 es pot observar l'estructura de la ribonucleasa S segons el model de WYCKOFF *et al.* (1970). En aquest model hom pot veure les posicions de les lisines 7 i 41, les histidines 12 i 119 i el conjunt de la cavitat que forma el centre actiu de l'enzim. Un dinucleòsid monofosfat del tipus Pir-p-Pur es col·locaria amb la pirimidina a la part més interior de la cavitat del centre actiu voltada pels residus 30 i 44, el grup fosfat entre els residus 8 i 119 i la base púrica entre 111 i 118.

L'anàlisi del comportament cinètic demostra que la unió del piridoxal-fosfat disminueix en gran manera l'activitat de la ribonucleasa A. Aquesta disminució d'activitat és diferent segons si la reacció té lloc amb la lisina 7 o amb la lisina 41, únics derivats monosubstituïts estudiats fins al moment present. La disminució d'activitat del derivat 7 és de l'ordre del 73 % utilitzant àcid citidílic 2',3' cíclic, i entre el 74 % i el 84 % utilitzant dinucleòsids monofosfats com a substrats.

En el cas del derivat en lisina 41, la disminució és de quasi el 95 % amb àcid citidílic 2',3' cíclic. Hom no observa cap tipus d'activitat amb dinucleòsids monofosfats. En aquest cas podem pensar que la substitució en lisina 41 permet un petit grau d'allotjament a un substrat petit tal com l'àcid citidílic 2',3' cíclic però que impedeix totalment l'allotjament d'un substrat de dimensions més grans. Una explicació alternativa seria que la presència del grup ϵ -NH₂ en forma lliure de la lisina 41 és absolutament necessària per a l'etapa de transesterificació catalitzada per l'enzim, mentre que la reacció d'hidròlisi podria transcórrer sense el grup lliure, bé que a una velocitat molt inferior.

BIBLIOGRAFIA

1. CROOK, E. M., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Biochem. J.» 74, 234-238 (1960).
2. DEAVIN, A., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Nature» 211, 252-255 (1966 a).
3. DEAVIN, A., MATHIAS, A. P., i RABIN, B. R.: «Biochem. J.» 101, 14c-16c (1966 b).
4. FASELLA, P.: «Ann. Rev. Biochem.» 36, 185 (1967).
5. FISCHER, E. H. dins «Structure and activity of enzymes». GOODWIN, T. W., HARRIS, J. I., i HARTLEY, B. S., Editors. Academic Press, Londres, 111-120 (1964).
6. FISCHER, E. H., KENT, A. B., SNYDER, E. R. i KREBS, E. G.: «J. Amer. Chem. Soc.» 80, 2906 (1958).
7. KARTHA, G., BELLO, J., i HARKER, D.: «Nature» 213, 862 (1967).
8. KOSHLAND, D. E. jr.: Adv. Enzymol. 22, 45-97 (1960).
9. MEANS, G. E. i FEENEY, R. E.: «J. Biol. Chem.» 246, 5532-5533 (1971).
10. PISZKIEWICZ, D., LANDEN, M. i SMITH, E. L.: «J. Biol. Chem.» 245, 2622 (1970).
11. RABIN, B.R., CUCHILLO, C. M., DEAVIN, A., KEMP, C. M. i MATHIAS, A. P.: «FEBS Symposium» Vol. 19. Academic Press, London, 203-218 (1969).
12. RAETZ, C. R. H. i AULD, D. S.: «Biochemistry» II, 2229-2236 (1972).
13. RIPPA, M., SPANIO, L. i PONTREMOLI, S.: «Arch. Biochem. Biophys.» 118, 48 (1967).
14. SHAPIRO, S., ENSER, M., PUGH, E. i HORECKER, B. L.: «Arch. Biochem. Biophys.» 128, 554 (1968).
15. SINGER, S. J.: «Adv. Protein. Chem.» 22, 1-54 (1967).
16. TABORSKY, G.: «J. Biol. Chem.» 234, 2652 (1959).
17. VALLEE, B. L. i RIORDAN, J. F.: «Ann. Rev. Biochem.» 38, 733-794 (1968).
18. VALLEE, B. L. i WILLIAMS, R. J. P.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.» 59, 498 (1968).
19. WITZE, H. i BARNARD, E. A.: «Biochem. Biophys. Res Comm.» 7, 289-294 (1962).
20. WYCKOFF, H. W., HARDMAN, K. D., ALLEWELL, N. M., INAGAMI, T., JOHNSON, L. N. i RICHARDS, F. M.: «J. Biol. Chem.» 242, 3984 (1967).
21. WYCKOFF, H. W., TSEBNOGLOU, D., HANSON, A. W., KNOX, J. R., LEE, B. i RICHARDS, F. M.: «J. Biol. Chem.» 245, 305 (1970).

CORRELACIONS ENTRE HIDROFOBICITAT I HELICITAT EN PROTEÏNES

per PERE PUIGDOMÈNECH i JAUME PALAU

Institut de Biologia Fonamental, Universitat Autònoma
de Barcelona

Hom ha establert correlacions entre l'ordenament dels aminoàcids en general, i en particular dels hidrofòbics, i l'helicitat α de determinades regions d'una proteïna. El material d'estudi ha estat el conjunt de dotze proteïnes, de les quals són conegudes les estructures primària, secundària i terciària. El nombre total d'aminoàcids analitzats és de 2.259, dels quals 790 són trobats en zones d'hèlix α .

La primera part dels resultats consisteix en un estudi de la distribució de cada aminoàcid en zones d'hèlix α i en les altres. Observem una composició diferent per a les dues zones, amb més gran abundància de Pro i Gly en zones de no-hèlix i un augment d'Ala, Leu, Gly i His en les zones d'hèlix.

A continuació ha estat estudiada la distribució dels aminoàcids hidrofòbics en els sis possibles triplets que hi poden haver en un torn d'hèlix (1-2-3, 1-2-4, 1-2-5, 1-3-4, 1-3-5, 1-4-5), tant en zones d'hèlix α com en les de no-hèlix α . La comparació del nombre d'aquests triplets-normalitzat respecte a la longitud de les zones corresponents, amb la probabilitat teòrica calculada pels triplets, indiquen un predomini suficientment clar de triplets hidrofòbics dels tipus 1-2-5 i 1-4-5 en les zones d'hèlix α .

També ha estat estudiada la concentració dels triplets en certes zones de les hèlix α . Efectivament, hi ha molts triplets 1-2-5 i 1-4-5 formant encadenaments que resulten en la formació de zones predominantment hidrofòbiques. Aquest fet ha permès la classificació de les hèlix α en tres tipus de zones: zones d'hidrofobicitat concentrada, zones pobres en aminoàcids hidrofòbics i els doblats inicial i final dels trossos d'hèlix α . La composició en aminoàcids de cada una d'aquestes zones ha estat establerta.

El conjunt d'aquests resultats permet de posar de manifest la contribució de les interaccions hidrofòbiques d'un torn a un altre de l'hèlix α en la formació i el manteniment de l'estructura secundària de les proteïnes.

Per calcular la significació de les diferents distribucions d'aminoàcids, ha estat portat a terme un test de χ^2 , el qual ha demostrat que els resultats de la distribució d'aminoàcids en zones d'hèlix α i, dintre aquestes, en les zones d'hidrofobicitat concentrada són significatius amb una seguretat del 99,9 % i en les zones terminals amb un 99 % de seguretat.

També ha estat portat a terme un altre tipus d'anàlisi. Hom tracta de calcular la significació dels resultats obtinguts amb els triplets 1-2-5 i 1-4-5 respecte a la mostra investigada. Dos tests estadístics ens demostren els límits de la significació. D'una banda, ha estat calculada l'evolució de la mitjana i de la desviació *standard* ponderada en prendre totes les combinacions possibles de les 12 proteïnes que formen la mostra en grups cada cop més petits des d'onze fins a un. La mitjana és mantinguda amb molt petites variacions i la desviació *standard* mostra un màxim vers les quatre-cinc combinacions. És mantinguda en valors molt baixos fins a 9 combinacions, límit de la significació de la mostra. D'altra banda, han estat preses vuit proteïnes a l'atzar i ha estat calculada la correlació de les sèries de mitjanes que apareixen en substituir una proteïna de les vuit per cadascuna de les altres quatre. Els coeficients de correlació en tots els casos són sempre acceptables, per sobre de 0,9 en gairebé tots els casos. La mostra presa és, doncs, significativa.

**ESTUDIS CONFORMACIONALS
DE LES PARVALBÚMINES MUSCULARS
ANALISI PER RESSONANCIA MAGNÈTICA NUCLEAR**

per JOSEP PARELLÓ *, ADRIEN CAVE *,
PERE PUIGDOMÈNECH **, JEAN-PAUL CAPONY
i JEAN-FRANÇOIS PÉCHÈRE

Département de Biochimie Macromoléculaire
du CNRS (Montpellier)

Les parvalbúmines musculars, proteïnes presents en els vertebrats inferiors, han estat estudiades tant per raigs X com per d'altres mètodes espectroscòpics. Aquests estudis han demostrat el caràcter globular d'aquestes proteïnes, el seu alt grau d'ordre (40 % d'helicitat) i una alta proporció de residus Phe en el seu interior. Recentment ha estat descobert que les parvalbúmines lliguen fortament dos ions Ca^{++} per molècula, situació que permet una possible analogia funcional d'aquestes proteïnes amb la troponina C, proteïna reguladora present en els músculs dels vertebrats superiors. L'aplicació de l'espectroscòpia RMN ha de servir per a la identificació dels canvis conformacionals associats amb els processos de captació i cessió dels ions de calci en aquestes proteïnes, la qual cosa permet una aproximació als canvis moleculars associats amb la seva funció.

En el present treball exposem els resultats d'experiments preliminars amb RMN, de protó a 100 i 270 MHz, sobre dues parvalbúmines (de carpa i lluç), amb el propòsit de visualitzar els canvis conformacionals associats amb la presència d'un agent químic desnaturalitzant, el clorur de guanidina, i amb l'eliminació progressiva dels ions de calci fortament lligats. D'altra banda, ha estat investigada la possibilitat d'utilit-

* Adreça actual: *Équipe de Biophysique, CNRS, Faculté des Sciences 34060 - Montpellier.*

** Adreça permanent: Institut de Biologia Fonamental. Nova Universitat Autònoma de Barcelona. Avda. Sant Antoni M. Claret, núm. 171 - Barcelona-13.

zar la RMN com una tècnica, juntament amb la determinació de l'estructura primària de la proteïna, per a establir la presència de grups acetils N-terminal.

RESULTATS I DISCUSSIÓ

Espectre de la proteïna desnaturalitzada. — L'espectre de la proteïna desnaturalitzada amb clorur de guanidina presenta diverses característiques interessants: en primer lloc la presència d'un senyal atribuït al grup acetil N-terminal. La seva presència ha estat confirmada posteriorment per mètodes químics.

Seguint el mètode de McDONALD i PHILLIPS, hom ha simulat l'espectre de la proteïna desnaturalitzada. En comparació amb l'espectre experimental, és observat un desplaçament general dels pics. La correcció d'aquest efecte pot ésser feta tenint en compte que és pres com a referència interna el senyal metil del DSS i que la presència de clorur de guanidina afecta el desplaçament químic.

Una altra discrepància és observada vers la zona de 2,75 ppm que hem d'atribuir als residus Asp. Aquesta diferència és deguda segurament al valor excessivament alt donat a l'amplada a mitja alçada del grup $-CH_2$ del residu Asp. Les parvalbúmines contenen un elevat nombre de residus Asp (10/108 i 14/108 en les corresponents a lluç i carpa respectivament). L'estudi per RMN d'una gran varietat de parvalbúmines podrà permetre d'obtenir un millor valor per a aquesta amplada.

Espectre de la proteïna nativa. — L'aspecte general de l'espectre de la proteïna nativa és bastant diferent del prèviament discutit. Hi són observats un gran nombre de senyals discrets, els quals resulten de l'efecte de les diferents i específiques interaccions moleculars en les estructures natives sobre els desplaçaments químics de cada grup de protons equivalents.

A causa de l'alt contingut en Phe (10/108 residus) per a les parvalbúmines de lluç i carpa, pot ésser predit que les interaccions hidrofòbiques entre residus aromàtics i alifàtics, especialment grups metils, han d'ésser particularment fortes i determinants de la cohesió global de la molècula. Aquest cas és de les parvalbúmines de carpa, com ha estat demostrat per raigs X: 18 residus alifàtics no polars (7 Leu, 4 Ile, 3 Val i 4 Ala) són interns, i hom els troba en un embolcall aromàtic de 8 residus Phe interns. L'explicació dels desplaçaments observats en les proteïnes natives respecte a les desnaturalitzades pot ésser intentada sobre la base de la pertorbació magnètica deguda al caràcter aromàtic dels residus Phe, sobretot en les regions de l'espectre situades en camp fort.

La magnitud de l'efecte degut a un anell benzènic ha estat predita

semiquantitativament per JOHNSON i BOVEY fent servir el concepte de l'espira de corrent. El model de J. i B. ha estat aplicat satisfactòriament per predir tant els efectes inter- o intramoleculars com els deguts al solvent.

El model de J. i B. fou aplicat a la parvalbúmina de carpa utilitzant les coordenades conegudes per raigs X. L'aproximació dels residus aromàtics de la fenilalanina per un anell benzènic sembla justificada en una proteïna en què d'altres tipus de residus aromàtics no compten. Els efectes d'aquests residus són molt més importants que d'altres efectes de seqüència. Això justifica de prendre només aquests per a predir l'espectre.

L'espectre de la proteïna nativa així calculat fou comparat amb el registrat experimentalment. La concordança entre els espectres calculat i experimental és bastant satisfactòria per a desplaçaments lleugers. No hi ha concordança aparent per als grans desplaçaments, però el nombre de senyals molt desplaçats és el mateix. En particular el senyal situat més lluny és el metil de la Val 106, teòricament situat a -1.03 ppm, que en l'espectre experimental figura a -0.35 ppm.

Dues explicacions possibles poden ésser donades per a aquestes discrepàncies: 1) L'estructura en solució és diferent de la que té en el cristall. Una simple separació de dues hèlixs, possible en una estructura més disgregada, com és ara la que hom troba en solució, pot donar lloc a canvis sensibles. 2) En dissolució, l'equilibri entre rotàmers de les cadenes laterals de la valina pot estar alterat, igualment que la seva cinètica.

El model de J. i B. fa aparents dos tipus d'interaccions entre residus aromàtics i alifàtics: 1) Interaccions entre residus pròxims. En particular, interaccions entre un residu aromàtic trobat en posició d'una hèlix α i un alifàtic situat en posicions $n \pm (4 \text{ o } 5)$ en la mateixa hèlix, alterança típica en les hèlix α . 2) Interaccions entre residus llunyans en la seqüència. Són especialment interessants les que hom efectua entre residus de segments d'hèlixs diferents. Aquestes interaccions podrien tenir un paper important en el manteniment de l'estructura terciària. En la parvalbúmina estudiada, són observades tres intenses interaccions d'aquesta classe, una de les quals, la Val 106-Phe 30, podria jugar un paper important en la funció de la molècula, com a variadora de la posició del fragment d'hèlix F, adjacent a la regió EF, que és un dels dos punts d'unió del calci.

SEQÜÈNCIES D'ÀCID POLIADENÍLIC ASSOCIADES AMB ESPÈCIES D'ARN MISSATGER EN CÈL·LULES EUCARIOTES

per L. CORNUDELLA *, I. FAIFERMAN i A. O. POGO

Laboratory of Cell Biology, The New York Blood-Ctr., N. Y. 10021

El descobriment dels mecanismes pels quals l'ARN missatger en les cèl·lules eucariotes és «transcrit» en el nucli cel·lular, madurat i transferit al citoplasma per a acoblar-se en el dispositiu cel·lular de traducció genètica, és un dels problemes essencials que té avui plantejats la Biologia Cel·lular. Els darrers 3 anys han vist acumular-se una certa evidència, d'altra part poc sòlida, tendent a suggerir que les espècies missatgeres són magatzemades per la cèl·lula en el nucli en forma de partícules RNP, és a dir, complexos d'ARN i proteïnes, anomenats «informòfers» per algun grup investigador.

Nosaltres hem treballat recentment en aquesta problemàtica i, per tant, el nostre propòsit ara és simplement de comentar els nostres resultats, els quals desglossarem en tres etapes per a comprendre'n millor la significació.

- 1) En primer lloc, localització i reconeixement de partícules RNP en sistemes cel·lulars no dinàmics.
- 2) A continuació, establiment de la cinètica de transport per mitjà de complexos riboproteics particulats i integració d'aquests en un dispositiu de biosíntesi associat a reticle endoplasmàtic (RE).
- 3) Finalment, presència de segments homopolimèrics d'àcid adenílic units al terminal 3' del missatger i llur implicació en el mecanisme de transport postulat per nosaltres.

Ens limitarem a una breu exposició de les dues primeres fases a títol d'introducció i per tal de fer més entenedora la significació de la darrera.

* Adreça actual: Dpt. de Química Macromolecular - C.S.I.C. - Barcelona.

Primera fase

Esquemàticament, els trets més sobresortints de la nostra experimentació en la primera etapa foren:

- a) Establiment d'un mètode de fraccionament cel·lular —per lisi química (no mecànica)— de gran suavitat i efectiu en el manteniment de la integritat de les fraccions subcel·lulars.
- b) Aïllament d'una fracció soluble nuclear exempta d'ADN.
- c) Reconeixement en aquesta subfracció d'un grup de partícules RNP.
- d) Identificació d'una partícula —al voltant de 40 unitats de sedimentació— amb característiques de missatger, és a dir:

ARN de composició similar a ADN (baix contingut de GC).
Incorporació ràpida de precursors radioactius.

Segona fase

En la segona etapa, i donada la impossibilitat d'estudis cinètics en el sistema originàriament emprat —fetge de rata—, escollírem un nou sistema que exhibís aquesta característica. L'elecció recaigué en tumors ascítics, els quals, a més d'ésser líquids, poden ésser sincronitzats per dejuni d'aminoàcids. Els resultats assolits amb cèl·lules ascítiques de KREBS foren:

- a) Caracterització d'una població de partícules nuclears RNP similars a les de fetge de rata.
- b) Aïllament i caracterització d'una «Estructura membranosa» contenint ARN missatger i ribosomes.
- c) Reversibilitat del procés de desaparició dels ribosomes en citoplasma dependent de la presència o absència d'aminoàcids en el medi d'incubació.
- d) Confirmació addicional de la presència de ribosomes en «l'Estructura» en alliberar-ne subunitats 40S i 60S previ tractament amb EDTA.

Totes aquestes dades suggereixen que les cèl·lules ascítiques constitueixen un «complex de traducció» organitzat a nivell del RE. La possibilitat de tractar-se d'un «mecanisme universal de traducció», almenys pel que fa als organismes superiors, ens decidí a la recerca de nova evidència, i amb això encetem la darrera fase de la nostra experimentació.

Llargos segments de nucleòtids d'adenosina (Poli-A) han estat detectats recentment en ARN missatger (mARN) i ARN nuclear heterogeni (HnARN) de diversos tipus d'ARN d'eucariotes ^{4, 5, 10, 12, 14} i també vírics ^{1, 8, 9, 11, 15}. Sembla que l'addició de Poli-A al terminal 3'-OH del HnARN

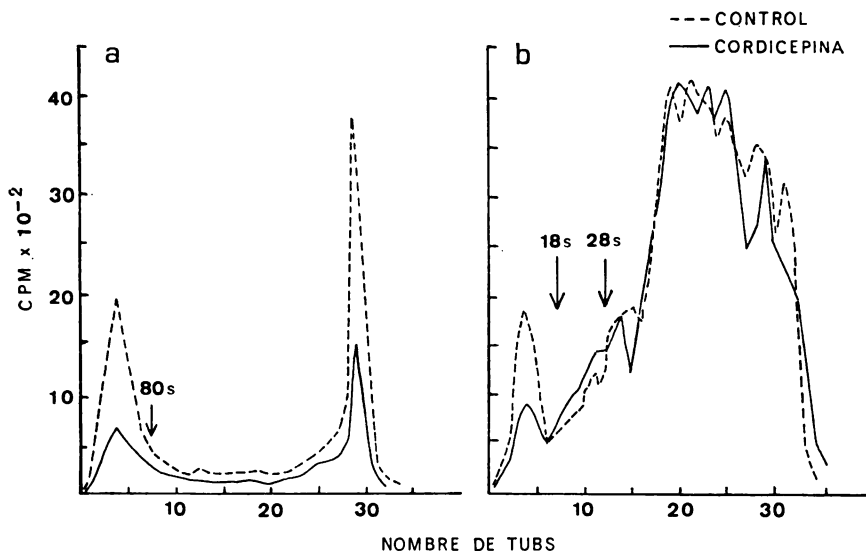


FIG. 1a. — Cèl·lules ascítiques d'Ehrlich foren extretes de ratolins una setmana després de la inoculació, rentades dues vegades en tampó salí de fosfat i incubades a una densitat de 2×10^4 cèl·lules/ml, com ha estat ja descrit¹, contenint 0,04 $\mu\text{g/ml}$ d'actinomicina-D i 1 $\mu\text{g/ml}$ de bromur d'etidi. Passats 30 minuts d'incubació, hom hi afegí 25 μg de cordicepina, seguit de 2,5 $\mu\text{Ci/ml}$ d'³H-uridina (25 Ci/mol; Schwarz/Mann) 30 minuts més tard i la incubació continuada per una altra mitja hora. La incorporació fou deturada per addició d'uridina no radioactiva en excés de 10^4 i alíquotes foren recollides després de 3 h. d'incubació. Les cèl·lules foren rentades i lisades, i la fracció nuclear crua fou rompuda mitjançant una premsa de French¹. Hom centrifugà els nuclis trencats, a 12.000 r. p. m. durant 15 minuts. El sobrenedant es diposità damunt un gradient al (10-30) % de sacarosa que contenia 50 mM Tris-HCl pH 7,5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂, preparat sobre un coixí de 2 ml de 2 M sacarosa, i fou centrifugat a 40.000 r. p. m. durant 50 minuts en el SPINCO SW-40. Els gradients foren fraccionats i cadascuna de les fraccions fou precipitada amb àcid tricloracètic al 10 % i analitzada com ha estat descrit.

FIG. 1b. — Les cèl·lules foren incubades en les mateixes condicions esmentades en la figura 1a. Al final de la incubació hom retirà ensembles alíquotes de 10 ml del cultiu-control i del tractat amb cordicepina i les vessà damunt 30 ml de solució gelada al 0,9 % de NaCl. Les cèl·lules foren rentades dues vegades en solució salina i l'ARN fou extret pel mètode del fenol-dodecilsulfat sòdic¹. L'ARN aïllat es diposità en un gradient de sacarosa al (15-30) % en 0,05 M acetat sòdic pH 5,0 i 0,1 M NaCl i fou centrifugat durant 16 h. a 25.000 r. p. m. Un cop fraccionats, les fraccions foren dissoltes en barreja de Bray i llur radioactivitat fou mesurada¹.

té lloc després del procés de transcripció i es conserva durant l'elaboració de mARN a partir de HnARN ^{3, 13}.

En publicacions prèvies ^{2, 6, 7} hem palesat que partícules nuclears aïl·lades de tumors ascítics, contenint mARN, són transportades al citoplasma cel·lular, on romanen unides a membranes del reticle endoplasmàtic o bé

els transfereixen llur mARN. Amb la finalitat d'entendre la correlació de la biosíntesi de l'HnARN amb la formació d'aquestes partícules nuclears i l'enllaçament del mARN a les membranes citoplasmàtiques, hem estudiat la cinètica de síntesi i el contingut de Poli-A en aquests components aïllats de cèl·lules de tumors ascítics.

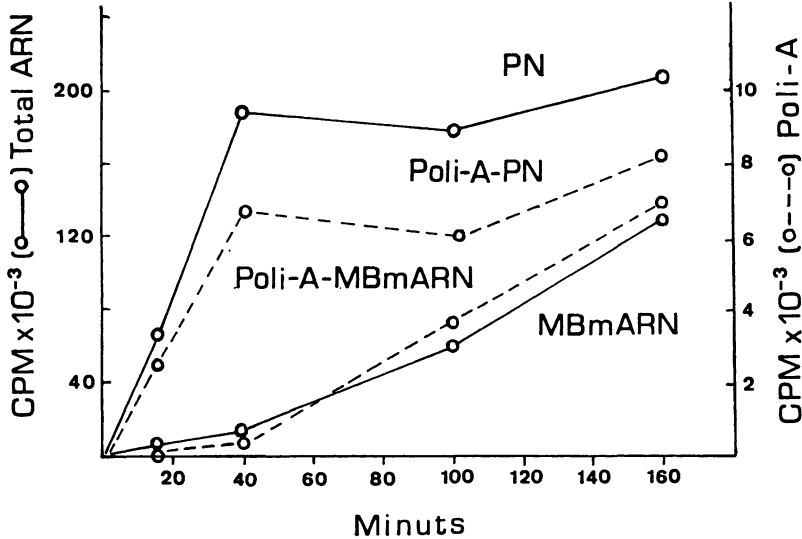


FIG. 2. — Les cèl·lules foren incubades en les condicions de la fig. 1a. A continuació hom hi afegí 3 μ Ci/ml d'³H-adenosina (25 Ci/mmol; Schwarz/Mann) i 0,7 μ Ci/ml d'¹⁴C-uridina (50 m Ci/mmol; Schwarz/Mann). Hom recollí al·lquotes en els intervals indicats. Les partícules nuclears i el mARN unit a les membranes foren obtinguts com ja ha estat indicat i llur ARN extret pel mètode esmentat en la fig. 1b. Una al·lquota de l'ARN extret fou dissolta en una solució que contenia 50 mM Tris-HCl pH=7,5, 50 mM KCl, 1 mM MgCl₂ i digerida amb DNasa I (20 μ g/ml; Worthington Biochem. Corp.) durant 15 minuts a 37 °C. L'àcid poliadenílic fou mesurat per la tècnica del Millipore ¹⁵. Cap compte de ¹⁴C-uridina no fou retintut pel filtre. En l'altra al·lquota, l'ARN extret fou precipitat per l'àcid tricloracètic al 10 % i la radioactivitat de l'³H-adenosina i ¹⁴C-uridina mesurades. Un procés similar d'incorporació fou obtingut amb els dos precursors d'ARN marcats.

³H-adenosina incorporada en ARN total.

³H-adenosina incorporada en Poli-A.

PN=partícules nuclears, MBmARN=mARN enllaçat a membranes.

Quan les cèl·lules ascítics foren incubades amb cordicepina fou inhibida la formació de partícules nuclears i de mARN enllaçat a membranes (Fig. 1a), però la síntesi d'HnARN no fou alterada (Fig. 1b). La droga, doncs, inhibeix la transformació de l'HnARN, però no la seva síntesi. O sigui, el seu efecte global consistí a deturar el flux de molècules de mARN des de l'HnARN a les partícules nuclears.

La cinètica de l'aparició d'ambdós, ARN i Poli-A, en partícules nu-

clears i membranes és apreciable a la Fig. 2. Durant els primers 40 minuts d'etiquetat, la incorporació radioactiva en ARN i Poli-A es limita a les partícules nuclears. A continuació s'assoleix un estat estacionari en la incorporació, per a produir-se finalment l'aparició d'ARN i Poli-A marcats en les membranes, probablement coincidint amb el temps precisat per a establir-se l'equilibri en la reserva cel·lular de partícules. Les anteriors observacions indiquen una relació «precursor-producte» de partícules nuclears i mARN unit a membranes, tot assenyalant una simultània entrada de Poli-A i ARN total en ambdues estructures; per tant, confirmen les nostres troballes prèvies⁷ referents a la presència de mARN en partícules nuclears i membranes citoplasmàtiques.

En definitiva, els resultats aquí esmentats suggereixen que en cèl·lules ascítiques, el flux de mARN del nucli cel·lular al citoplasma comença per l'addició de Poli-A a l'HnARN i continua amb el trencament de les molècules d'HnARN i subsegüent unió amb proteïnes (partícules nuclears 43s), per a enllaçar finalment amb membranes del reticle endoplasmàtic.

BIBLIOGRAFIA

1. ARMSTRONG, J. A., EDMONDS, M., NAKAZATO, M., PHILLIPS, B. A. i VAUGHAN, M.: «Science» 176, 526 (1972).
2. CORNUDELLA, L., FAIFERMAN, I. i POGO, A. O.: Abs. «8th FEBS Meeting» (479) Amsterdam, Agost 1972.
3. DARNELL, J. E., PHILIPSON, L., WALL, R. i ADESNIK, M.: «Science», 174, 507 (1971).
4. DARNELL, J. E., WALL, R. i TUSHINSKI, R. J.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1321 (1971).
5. EDMONDS, M., VAUGHAN, M. i NAKAZATO, H.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1336 (1971).
6. FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. i POGO, A. O.: «Fed. Proc.», 30-311, 1290 (1971).
7. FAIFERMAN, I., CORNUDELLA, L. i POGO, A. O.: «Nature New Biol.», 233, 234 (1971).
8. GILLESPIE, D., MARSHALL, S. i GALLO, R. C.: «Nature New Biol.», 236, 227 (1972).
9. JOHNSTON, R. E. i BOSE, H. R.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 69, 1514 (1972).
10. KATES, J.: «Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.», 35, 743 (1970).
11. LAI, M. M. C. i DUESBERG, P. H.: «Nature», 235, 383 (1972).
12. LEE, S. Y., MENDECKI, J. i BRAWERMAN, G.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 1331 (1971).
13. MENDECKI, J., LEE, S. Y. i BRAWERMAN, G.: «Biochem», 11, 792 (1972).
14. PEMBERTON, R. E. i BAGLIONI, C.: «J. Mol. Biol.», 65, 531 (1972).
15. PHILIPSON, L., WALL, R., GLICKMAN, G. i DARNELL, J. E.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.», 68, 2806 (1971).

CARACTERITZACIÓ QUÍMICA DE LA PROTAMINA DEL CALAMARS *LOLIGO VULGARIS* I LA SEVA INTERACCIÓ AMB L'ADN

per M. UNZETA, P. SUAU, L. PUIGJANER i J. A. SUBIRANA

Departament de Química Macromolecular - C.S.I.C. - E.T.S.I.I.

El principal objectiu d'aquest treball és el de caracteritzar químicament proteïnes bàsiques procedents del nucli de cèl·lules germinals masculines del calamars (*Loligo vulgaris*), i estudiar el complex nucleoprotèic format per la interacció de la protamina amb l'ADN.

Hom obtingué aquesta protamina de l'esperma de calamars amb extracció àcida en medi ClH 0.25N, havent estat prèviament purificats els nuclis per mitjà d'extraccions successives amb àcid acètic al 5 % i àcid sulfúric 0.2N.

Aquesta protamina fou caracteritzada per anàlisi d'aminoàcids, i posseïa més d'un 70 % d'arginina, un 10 % de serina, un 7 % de tirosina i la resta repartit entre prolina, glicina, alanina, histidina i lisina. El tret més important de l'esmentada proteïna és el gran contingut en tirosina, en comparació amb totes les protamines estudiades fins ara^{1,2}.

Hom tractà de determinar-ne la microheterogeneïtat per mètodes cromatogràfics en columna, i assolí fraccionar-la en dues subunitats per cromatografia en Biogel BP 10, 60 i eluint-la amb ClNa 0.25M en ClH 0.02N. L'anàlisi d'aminoàcids d'aquestes dues fraccions, aparentment similars, ofereix petites variants en el nombre de residus de prolina, glicina, alanina i tirosina.

Posteriorment aquestes fraccions foren sotmeses a l'atac enzimàtic amb tripsina i termolisina⁴ i hom féu llurs mapes peptídics per mitjà de l'electroforesi d'alt voltatge combinada amb cromatografia en paper en 2.^a dimensió.

Aparentment aquests mapes peptídics són similars, d'acord amb les petites variacions que presenta l'anàlisi d'aminoàcids.

De la mateixa manera, l'única forma de determinar amb certesa les

diferències entre aquestes dues fraccions seria trobar la seqüència d'aminoàcids completa de cada pèptid i arribar a conèixer la seqüència completa d'aminoàcids de la molècula de protamina.

La interacció de la protamina amb l'ADN fou estudiada per mitjà de la difracció de raigs X. Aquesta proteïna té una gran afinitat per l'ADN, i forma complexos insolubles en ClNa 2M. Aquest fet podria ésser explicat pel gran contingut en arginina i per la presència de tirosina. La nucleoprotamina fou preparada partint de nuclis purificats d'espermatozous. Les cues dels espermatozous foren eliminades per sonicació en aigua de mar, seguida per rentats successius amb sacarosa 0.25M amb Triton X-100 0.5 %, Tris-ClH 0.25M pH = 8 i ClNa 0.15M. Tot seguit la nucleoprotamina fou dissociada amb clorur de guanidina 4M. Les restes de citoplasma i la membrana nuclear foren eliminats per centrifugació. La nucleoprotamina fou reconstituïda en un gradient de diàlisi en presència de concentracions decreixents de clorur de guanidina, EDTA 10^{-3} M pH = 7.5. Finalment fou dialitzada en presència de ClNa 10^{-3} M, EDTA 10^{-3} M, pH = 7.5. Del precipitat fibrós obtingut foren estriades algunes fibres, de les quals hom féu diagrames de difracció a diferents humitats relatives.

En qualsevol cas els diagrames patentitzen una gran cristallinitat, bé que l'orientació varia en les diferents mostres. L'anàlisi dels diagrames evidencia que a la nucleoprotamina de calamars l'ADN és en forma B i que la cèhula unitària és hexagonal, amb una sola molècula per cèhula; com s'esdevé en totes les nucleoprotamines estudiades fins ara⁵. Les dimensions de la cèhula unitària són $a = 22.3 \text{ \AA}$ i $c = 33.5 \text{ \AA}$ a 92 % d'humitat relativa. La intensitat de la radiació difractada en el primer nivell, molt superior a la de l'ADN, fa suposar que la protamina es troba en el solc estret de l'ADN⁵. Per aquest motiu la doble hèlice de l'ADN ressembla una hèlice senzilla, d'una sola espira formada per les dues cadenes de fosfats i la protamina. Els estudis portats a terme a diferents humitats relatives demostren que l'accés de l'aigua a l'estructura és limitat. L'embolcallament hexagonal de les molècules i l'estabilització de l'ADN en la nucleoprotamina enfront dels canvis d'humitat relativa fan suposar que les protamines disminueixen la reactivitat química de l'ADN en el nucli espermàtic, bo i protegint-lo dels agents degradants i mutagènics.

BIBLIOGRAFIA

1. ANDO, T. i SAWADA, F.: «J. Biochemistry», 48, 6 (1960).
2. BRETZEL, G.: «Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.», 353S, 1362 (1972).
3. FEUGHELMAN, M., LANGRIDGE, R., SEEDS, W. E., STOKES, A. R., WILSON, H. R., HOOPER, C. W., WILKINS, M. H. F., BARCLAY, R. K. i HAMILTON, L. D.: «Nature», 175, 834 (1955).
4. SMYTH, D. G., dins *Methods in Enzymology*, Hirs, C. H. M. ed., 11, 214. «Academic Press», London (1967).
5. SUBIRANA, J. A. i PUIGJANER, L. C., *X-Ray Diffraction Studies of Nucleoprotamines from Molluscs*, presentat al 5th Jerusalem Symposium «Conformation of Biological Molecules and Polymers» (abril 1972).

PRODUCTES FINALS DE FERMENTACIÓ I ESTAT D'OXIDACIÓ-REDUCCIÓ DEL SUBSTRAT

per MARIA-TERESA PERDIGÓ

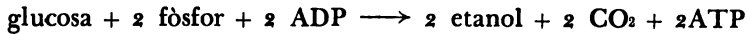
Departament de Microbiologia. Facultat de Ciències
(Universitat de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

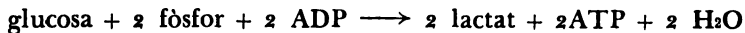
El metabolisme fermentatiu dels diferents tipus bacterians és caracteritzat fonamentalment per la natura i proporció dels productes finals diversos.

Aquests productes finals serveixen per a identificar uns patrons o vies de fermentació característics en nombre reduït, i en molts casos fins i tot ajuden a fer divisions taxonòmiques entre els bacteris. Un exemple d'això que acabem de dir es troba en les següents reaccions globals que caracteritzen una sèrie de tipus bacterians fermentatius^{7, 17}:

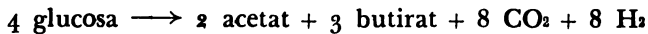
Fermentació alcohòlica:



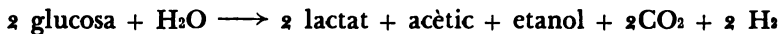
Fermentació homolàctica:



Fermentació butírica:



Fermentació àcido-mixta:



Fermentació 2,3 butilneglicòlica:

de la glucosa: acètic, làctic, etanol, acetoïna, 2,3 butilneglicol, CO₂ i H₂

La producció d'etanol és la característica de la fermentació alcohòlica, la d'àcid làctic és la característica de la fermentació làctica, el butíric de la butírica. El descens del pH fins a un nivell suficientment baix que doni positiva la prova del vermell de metil és característica de la fermentació àcido-mixta, i, quant a la fermentació 2,3 butilneglicòlica, és característica la producció d'acetoïna i de 2,3 butilneglicol a pH inferior a 6. L'acetoïna és el producte responsable de la reacció de VOGES PROSKAUER, prova molt corrent en bacteriologia, en la qual en medi alcalí reacciona l'acetoïna amb un grup guanidina i produeix un color vermell que s'incrementa encara amb l'addició de creatina i α -naftol.

Tot això es refereix, tanmateix, a la fermentació de la glucosa. En realitat, la composició i les quantitats relatives de productes finals de la fermentació d'altres substrats, fins i tot molt relacionats amb la glucosa, poden variar, i varien, de fet, en el mateix bacteri. L'única cosa que es verifica és que cada bacteri té unes possibilitats determinades derivades del seu equip d'enzims, i els productes finals que hom n'obté en cada cas depenen dels mecanismes més eficaços per a regenerar els coenzims i els acceptors d'electrons com el NAD.

El sistema general està lligat a les reaccions d'oxidació-reducció que poden mantenir una relació ATP/ADP definida. El canvi de mecanisme que porta en si el canvi de substrat està relacionat amb dues necessitats:

- a) Equilibrar el balanç $\text{NAD}_2\text{H}/\text{NAD}^+$.
- b) Assolir una màxima producció d'energia.

L'ajust òptim de la producció d'ATP, en les condicions que permet el balanç d'oxidació i reducció, constitueix la capacitat adaptativa del bacteri.

L'estat d'oxidació i reducció inicial del substrat té importància quant a les reaccions que tindran lloc per a la seva fermentació. Els substrats més oxidats o més reduïts que la glucosa han de donar unes proporcions diferents de productes finals i poden donar fins i tot productes finals diferents.

L'objecte de la present comunicació és mostrar com, en el gènere *Enterobacter*, un dels productes finals característics, la producció d'acetoïna, cessa quan el substrat passa d'ésser glucosa a ésser glicerina (substrat més reduït), i això malgrat que l'acetoïna també és un producte reduït i que el patró de fermentació per a ambdós substrats és el mateix.

En efecte, la glicerina, que és un substrat fàcilment utilitzable per molts bacteris, s'incorpora a la via d'EMBDEN MEYERHOFF, que és la que utilitza *Enterobacter* per a fermentar la glucosa, en forma de fosfat de

di-hidroxi-cetona, amb una fosforilació i una oxidació prèvies. És a dir que, a partir d'aquest punt, la utilització catabòlica de la glicerina sembla que seria la mateixa que la de la glucosa ^{7, 17}.

CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES

Han estat realitzades una sèrie de proves metabòliques ³ que han permès de classificar, entre d'altres, el bacteri estudiat com a *Enterobacter aerogenes* var. *indologenes* CCB ⁴. Aquesta soca és molt activament fermentadora de la glicerina amb producció abundant d'àcid i gas.

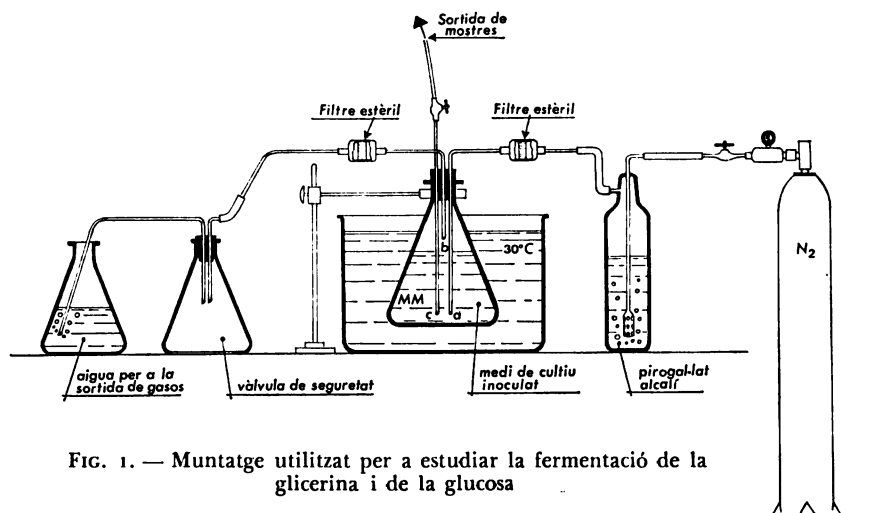


FIG. 1. — Muntatge utilitzat per a estudiar la fermentació de la glicerina i de la glucosa

Per a calcular els gasos despresos en la fermentació, CO₂ i H₂, ha estat emprat el mètode de BARCROFT WARBURG amb les cèl·lules suspeses en un medi mineral a pH 6 o 5'4.

Ha estat estudiada metabòlicament la producció d'acetoïna i 2,3 butileneglicol en glucosa i comparativament en glicerina en condicions anaeròbiques. Per a això hom ha utilitzat un muntatge que, alhora que mantenia l'anaerobiosi, permetia l'extracció de mostres a mesura que prosseguia el creixement (vegeu fig. 1).

El creixement fou mesurat valorant l'absorbància a 400 m μ . La glicerina fou valorada pel mètode d'EGGSTEIN i KREUTZ ⁴, la glucosa pel de WERNER, REY i WIELINGER ¹⁵; hom valorà l'etanol pel mètode de BUCHNER i REDENTZKI ¹, i el 2,3 butileneglicol i el trimetileneglicol per cromato-

grafia de gasos; l'acetoïna pel mètode de WESTERFELD, que és una tècnica basada en la reacció de VOGES PROSKAUER per mitjà de la qual pot ésser valorada l'acetoïna d'una manera quantitativa espectro-fotomètrica-ment ¹⁶.

La concentració del substrat per a aquests experiments fou calculada d'acord amb les idees de MONOD¹¹, cercant experimentalment que fos la quantitat de substrat allò que en limités el creixement de manera que el cultiu prosseguís en una clara fase exponencial fins a l'esgotament del substrat sense acumular productes tòxics. La concentració final escollida fou d'1 g de glicerina o de 500 mg de glucosa (quantitats equimolars en mols de triosa) per un litre de medi de cultiu exclusivament mineral. Aquesta quantitat de substrat és suficient perquè la corba sigui típica i amb producció considerable d'acetoïna en el medi amb glucosa.

El pH del medi té una gran importància en la formació d'acetoïna en el gènere *Enterobacter*⁸. En efecte, l'acetoïna no apareix si el pH és superior a 6, com hem comprovat experimentalment. Per aquest motiu el pH inicial del medi fou fixat a 5,4, i aquest tot valorat al llarg del creixement sense afegir-hi sosa ni cap altra substància per prevenir l'acidificació. Hom comprovà també que el descens del pH que proporciona la quantitat de substrat indicada en el medi tamponat no és incompatible amb la continuació del creixement i és favorable a la producció d'acetoïna. La temperatura fou fixada a 30° C, que és la temperatura òptima de creixement d'aquesta soca.

L'inòcul de 10 ml del mateix medi amb el mateix substrat que hom assaja, amb creixement bacterià de la soca que hom vol estudiar, és utilitzat sempre a la fi de la fase exponencial ¹¹.

Hi havia la possibilitat que la glicerina inhibís o reprimís la producció d'acetoïna o que la glucosa, per mitjà de la repressió catabòlica, inhibís la producció d'algun altre metabolit típic de la fermentació de la glicerina. Per això hom féu estudis metabòlics de creixement anaeròbic i anàlisi d'acetoïna en presència d'ambdós substrats. Ensem amb hom volia apreciar el possible creixement bifàsic o diàuxia, és a dir, que *Enterobacter* emprés tots dos substrats d'una manera seqüencial, primer la glucosa i després, un cop acabada la glucosa, la glicerina ^{11, 12}. Per a aquest estudi hom utilitzà el mateix muntatge ja indicat.

EXPERIÈNCIES I RESULTATS

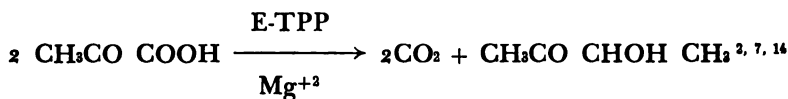
En dur a terme la prova de VOGES PROSKAUER utilitzant la glicerina en lloc de la glucosa, hom trobà que la prova resultava negativa. Aquest resultat fou assajat en 50 soques, i hom comprovà que totes les que eren

VOGES PROSKAUER positives en glucosa esdevien negatives si hom hi posava com a substrat la glicerina en lloc de la glucosa ⁶.

Amb les 12 soques més actives hom comprovà que, afegint acetat o piruvat a la glicerina, aquests acceptors d'electrons modificaven el catabolisme d'alguna manera, i el resultat era que la reacció de VOGES PROSKAUER tornava a ésser positiva.

A més hom comprovà que la glicerina no inhibia la reacció de VOGES PROSKAUER perquè, en fermentar juntament amb la glucosa, no en modificava el resultat. El que semblava era només que, en presència de glicerina com a únic substrat, deixava de formar-se el 2,3 butileneglicol i l'acetoïna.

Per comprovar la no producció d'acetoïna en glicerina, hom decidí d'estudiar el quocient CO₂/H₂ de gasos despresos en la fermentació comparativament en glucosa i en glicerina. En efecte, la producció d'acetoïna requereix dues descarboxilacions, com podem veure en la reacció global



que representa el conjunt de reaccions complicades que condueixen a la formació d'acetoïna.

Quan fermenta la glucosa a pH àcid, *Enterobacter*, com a conseqüència d'aquestes descarboxilacions, produeix un quocient de gasos despresos CO₂/H₂ compès entre 2 i 3; per contra, els bacteris del mateix grup que no produeixen acetoïna, com és ara *Escherichia* o *Citrobacter* o també *Enterobacter* a pH 7, com que no produeixen aquelles descarboxilacions, donen aproximadament igual quantitat de CO₂ que d'H₂ ¹³.

Els resultats obtinguts ens indiquen que *Enterobacter aerogenes* CCB 4, la soca estudiada, en un medi mineral amb glicerina a pH àcid desprèn CO₂ i H₂ en la proporció 1/1, la qual cosa correspon a una producció d'acetoïna nul·la. Això ens confirma la negativitat de la reacció de VOGES PROSKAUER en glicerina. En glucosa, el quocient CO₂/H₂ és al voltant de 3, com era d'esperar. La quantitat absoluta d'hidrogen correspon a una mitjana de 74,5 microlitres per a la fermentació de la glicerina, i 56,5 microlitres per a la de la glucosa. L'increment de la producció d'hidrogen en la fermentació de la glicerina respecte a la de la glucosa és, doncs, d'un 29 %.

Volguérem estudiar llavors si era possible que aquesta no producció d'acetoïna restés d'alguna manera compensada per la producció d'un altre metabolit reduït, com és ara el trimetileneglicol (1-3 propano-diol). Aquest producte, la formula del qual és CH₂OH CH₂ CH₂OH, és conegut

perquè alguns bacteris el produeixen a partir de la glicerina, reduint-la encara més. Han estat descrites experiències en les quals, en determinades condicions especials, hom ha obtingut fins el 40% de trimetilenglicol de la glicerina fermentada ^{9, 10}.

Nosaltres no trobàrem trimetilenglicol que fos produït per *Enterobacter aerogenes* en condicions d'esgotament de substrat.

Hom féu llavors un estudi dinàmic de la fermentació comparada de la glucosa i de la glicerina, valorant ensems el creixement bacterià, l'es-

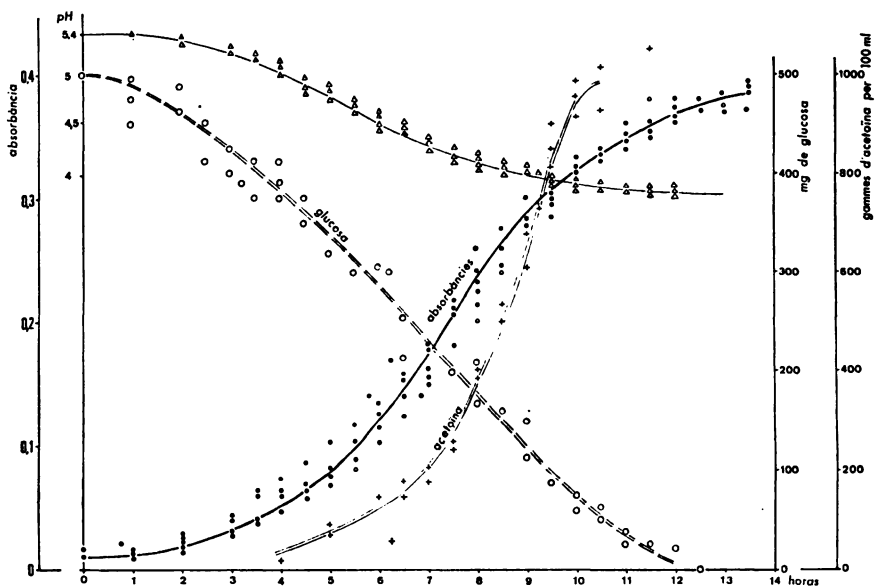


FIG. 2. — Creixement en glucosa

gotament del substrat i el descens del pH, i també els productes finals reduïts en un medi exclusivament mineral.

Cal tenir en compte que el creixement en tub és semiaeròbic; tanmateix, la presència d'oxigen que això representa és suficient per a activar la utilització de la glicerina, que, en tub, és duta a terme completament en 12 o 14 hores. Per contra, en condicions rigorosament anaeròbiques, a les 12 o 14 hores el cultiu és encara en fase de latència, com pot ésser comprovat en les figures 2 a 6. En glucosa hom no observa aquesta diferència que, en glicerina, és important.

Els resultats obtinguts en el creixement en glucosa són expressats en la fig. 2; veiem en aquesta corba que la glucosa s'esgota en 12 o 13

hores. En el mateix gràfic podem veure el creixement de la massa cel·lular en coordenades lineals, la variació del pH del medi i l'acetoïna formada en curs de cultiu.

A la fig. 3 podem veure els resultats obtinguts en el creixement en glicerina. Aquí veiem l'esgotament de la glicerina, molt lent quan l'inòcul utilitzat procedeix d'un creixement en tub i en glicerina (condicions semiaeròbiques). Això és degut, en una part bastant gran, a l'adaptació al creixement anaeròbic. Hom hi veu el creixement de la massa cel·lular

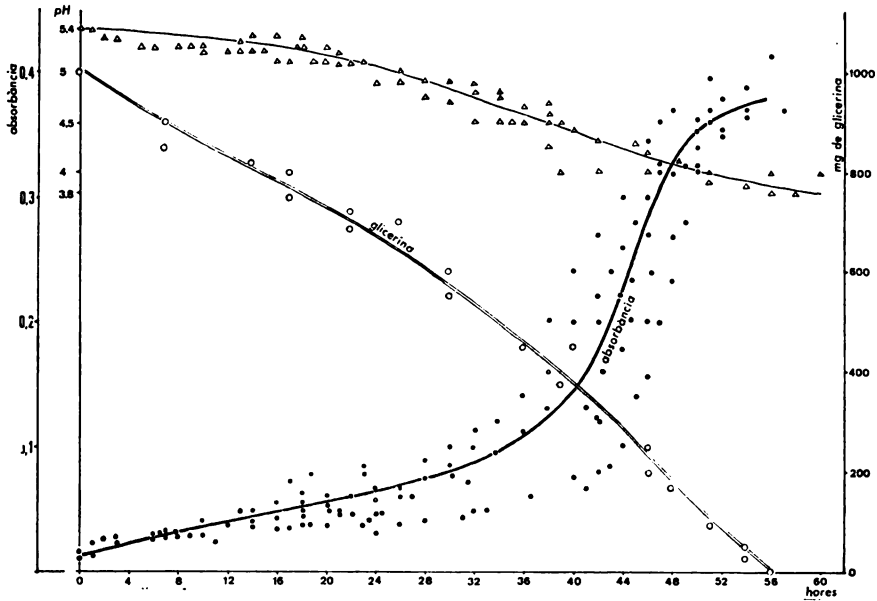


FIG. 3. — Creixement en glicerina. Inòcul en tub

en coordenades lineals i la variació del pH del medi. Els resultats finals obtinguts en ambdues magnituds són sensiblement els mateixos que en glucosa. Aquí no hi ha producció d'acetoïna.

A la fig. 4 podem veure els resultats obtinguts en idèntiques condicions que a la fig. 3, però amb un inòcul de 10 ml de cultiu ja adaptat a creixement en matràs anaeròbic. Com era d'esperar, com que l'inòcul està ja adaptat, el creixement es fa molt més ràpid. Tampoc no es produeix gens d'acetoïna. El creixement final i el pH són iguals que abans.

Ha estat analitzada la producció de 2,3 butilenglicol en les fermentacions corresponents a les corbes de glicerina en les quals hom no havia trobat producció d'acetoïna, i tampoc no hi ha estat trobada producció

de 2,3 butilenglicol, és a dir, aquesta via catabòlica no havia funcionat.

Entre els productes reduïts que havíem anomenat com a resultat del catabolisme d'*Enterobacter*, teníem també l'etanol, que és un dels productes que s'acumulen en quantitat relativament important en la fermentació 2,3 butilenglicòlica de la glucosa¹⁷.

Ja hem dit que la glicerina és més reduïda que la glucosa; per tant, era previsible que, en substituir la glucosa per la glicerina, augmentés la quantitat de productes finals reduïts. Com que no es produeix ni

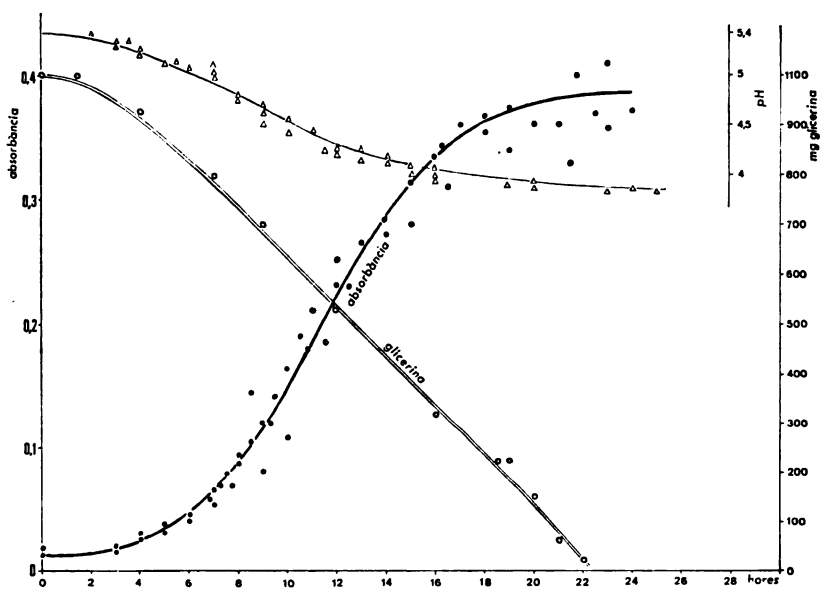


FIG. 4. — Creixement en glicerina. Inòcul de creixement anaeròbic

trimetilenglicol, ni 2,3 butilenglicol ni acetoïna, i, per contra, la producció d'hidrogen augmenta, hom va creure que era possible que augmentés igualment la quantitat d'etanol, tenint en compte que, alhora que es desprèn hidrogen, l'acetil-CoA que prové de la reacció «clàstica» del piruvat actua d'acceptor d'electrons i es forma etanol via acetaldehid⁷.

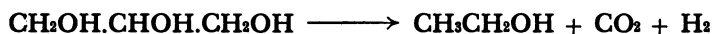
Els resultats de la producció d'etanol són:

Glucosa: 0,67 mM d'etanol per 1 mM de glucosa fermentada.

Glicerina: 0,86 mM d'etanol per 1 mM de glicerina fermentada.

Increment de la producció d'etanol de la fermentació de la glicerina respecte a la de la glucosa: 28 %.

La quantitat d'etanol trobada, doncs, en la fermentació de la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB₄ constitueix el 86 % en mols de la glicerina utilitzada, la qual cosa indica que la fermentació glicèrica en aquestes condicions és, pràcticament:



és a dir, una fermentació alcohòlica amb formació equimolecular de CO₂ i H₂. Probablement la quantitat que hom hi troba en forma d'àcids acètic o làctic no arriba ni al 14 %, però ha estat comprovat que és suficient per a produir el descens del pH observat, que és el mateix en glucosa i en glicerina, com ja havíem dit.

L'increment d'etanol obtingut en la fermentació glicèrica respecte a la de la glucosa és de 28 %, semblant a l'increment obtingut en la producció d'hidrogen (29 %). Aquest fet ens indica que es corresponen les dues produccions per a una mateixa quantitat de piruvat que ha estat catabolitzat i que es produeix etanol d'acord amb les reaccions que hem assenyalat abans. Amb glucosa, aquesta diferència es troba en 2,3 butilene-glicol i acetoïna.

Veiem, doncs, que la diferència característica entre les fermentacions de la glucosa i de la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB 4 és la producció de 2,3 butilene-glicol i acetoïna. En les condicions esmentades, la soca estudiada dona lloc, en fermentar glicerina, a una fermentació alcohòlica particular que ja hem descrit. Amb substrat en excés, es formen uns altres productes finals a través d'un procés molt complex. En la fermentació de la glucosa per *Enterobacter aerogenes* pot acumular-se fins i tot glicerina. En la fermentació de la glicerina es pot acumular trimetilene-glicol, que en condicions d'esgotament de substrat no apareix.

Passarem llavors a fer un estudi metabòlic de creixement en presència dels dos substrats, glucosa i glicerina, en les proporcions següents en mols de triosa: 1/3, 2/2 i 3/1, amb els resultats que es veuen en la figura 5.

Els dos substrats fermenten seqüencialment. En cada una de les corbes corresponent a cada una de les proporcions de substrats indicades, hom pot veure una primera fase de creixement ràpid corresponent a la fermentació de la glucosa, com ha estat demostrat amb diferents valoracions de l'esgotament dels substrats. Després ve una fase de latència deguda a l'adaptació a la fermentació del nou substrat amb els canvis químics que això comporta i la inducció d'enzims necessària. Finalment hom observa una fase de creixement lent corresponent a la fermentació de la glicerina. La longitud de cada una de les dues parts de cada corba i de la fase de repòs depenen de les quantitats relatives de substrat disponibles ¹¹

Si comparem els temps de fermentació de la glicerina en les corbes de diàuxia amb el de fermentació de la glicerina sola, en soca no adaptada, veurem que la utilització anaeròbica de la glicerina és molt més ràpida quan hi ha en el medi, a més de la glicerina, una certa quantitat de glucosa, i això amb independència de la repressió catabòlica.

A la fig. 6 es veu la producció d'acetoïna durant el creixement diàuxic. La quantitat d'aquest metabolit augmenta ràpidament mentre dura

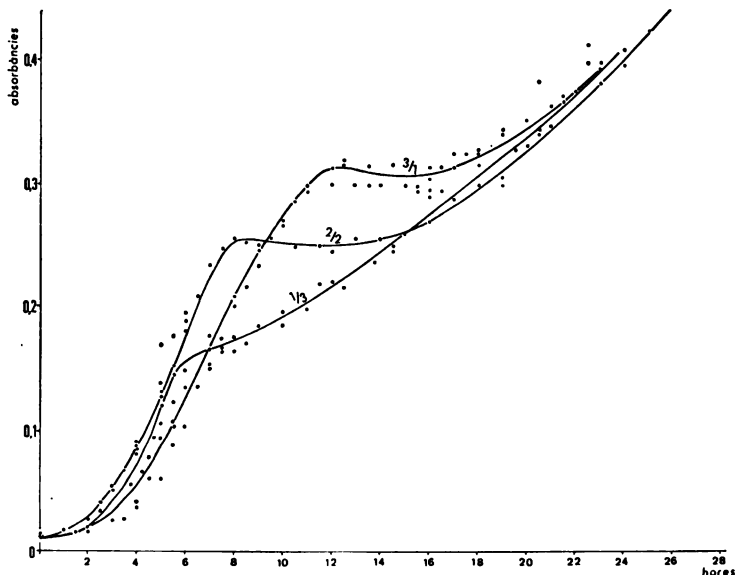


FIG. 5. — Creixement diàuxic en barreges de glucosa i glicerina

la primera fase del creixement. Després, durant la fase de repòs diàuxic, l'acetoïna disminueix. El creixement subsegüent sobre glicerina torna a augmentar el nivell d'acetoïna del medi, el qual arriba fins i tot a passar la quantitat aconseguida en el creixement en glucosa.

Aquest estudi dinàmic de la producció d'acetoïna ens fa veure que hem obtingut unes condicions en les quals podem arribar a produir acetoïna mentre es fermenta glicerina. Creiem que això és degut al fet que l'addició prèvia de glucosa proporciona un flux extra de piruvat o d'algun altre intermediari o acceptor d'electrons que, en fermentar la glicerina a continuació, encara no ha desaparegut del medi i permet la producció d'acetoïna en la fermentació de la glicerina. Aquest intermediari o ha d'ésser el piruvat o algun dels seus derivats altament reactius, com

és ara l'hidroxiètil-TPP o l'acil-TPP o l'acetat. Aquests productes, quan fermenta la glicerina sola, tant si és d'una manera ràpida (soca adaptada) com lenta, van a parar sempre a etanol, probablement perquè la producció d'aquest metabolit és compatible amb la màxima oxidació del NAD_2H . La disminució de la quantitat d'acetoïna que hom observa en les corbes de diàuxia és deguda a la seva reducció a 2,3 butilene-glicol per acció bacteriana.

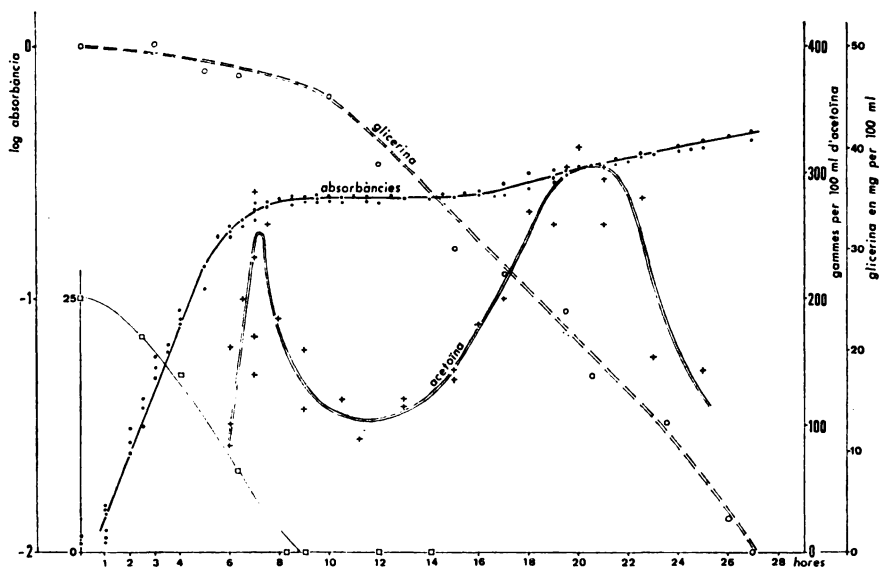


FIG. 6. — Creixement diàuxic en coordenades logarítmiques i corbes d'esgotament del substrat. Corba de producció d'acetoïna. Proporció de substrats 2/2

Fou estudiada en detall, a continuació, la formació d'acetoïna en la fermentació de la glicerina a la qual hom havia afegit piruvat o acetat com a acceptors d'electrons.

El resultat obtingut en la fermentació i en la producció d'acetoïna amb quantitats equimolars de piruvat (producte oxidat) i de glicerina (producte reduït) és sensiblement igual a l'obtingut amb una quantitat equivalent de glucosa. No hi ha diàuxia ni fase de repòs intermèdia, i els dos substrats es consumeixen alhora.

Quant a l'acetat, tot sol, no és metabolitzable per *Enterobacter aerogenes* CCB₄ en medi mineral però, si ensem fermenta glicerina, la presència d'acetat es tradueix en una producció d'acetoïna considerable⁵. L'acetat en quantitat de 250 a 500 mg per litre activa el creixe-

ment sobre glicerina, però no augmenta la quantitat absoluta d'*Enterobacter*. La producció d'acetoïna sí que depèn de la quantitat d'acetat disponible. Això ens fa pensar que l'acetat en les quantitats indicades actua només d'acceptor d'electrons, i en augmentar les disponibilitats del NAD^+ (oxidat), l'acetyl-Co A formada de la glicerina pot formar acetoïna a través del diacetyl.

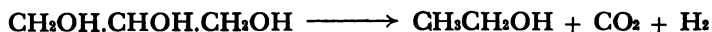
DISCUSSIÓ I CONCLUSIONS

Veiem, doncs, que a un pH de 5,4 o de 6, *Enterobacter aerogenes* CCB 4, que en fermentar la glucosa produeix abundantment acetoïna, no forma aquest producte quan fermenta glicerina. Hem demostrat que els pH a què hem treballat són favorables a la producció d'acetoïna. No pot ésser, doncs, la no formació d'acetoïna en glicerina una qüestió de pH.

L'estudi de la formació d'acetoïna en barreges de glucosa i glicerina, i també la producció d'acetoïna en barreges de piruvat i glicerina i acetat i glicerina, ens indica que les diferències observades en els productes finals de les fermentacions de la glucosa i la glicerina per *Enterobacter aerogenes* CCB 4 només poden ésser degudes a l'acumulació del NAD_2H que es produeix en la fermentació de la glicerina sola, i això degut al fet que la glicerina és un producte més reduït que la glucosa i que per a entrar en la via de fermentació requereix una oxidació prèvia amb una reducció del NAD^+ .

La fase de latència tan llarga que es produeix en la fermentació de la glicerina en la soca no adaptada no és deguda exclusivament al temps necessari per a la formació dels nous enzims induïts necessaris per a incorporar la glicerina a la via d'EMBDEN MEYERHOFF, sinó que és també conseqüència del mateix lent metabolisme que determina l'acumulació del NAD_2H i el flux tan lent de reoxidació d'aquest per la via de l'etanol. Tanmateix hi ha d'haver un fenomen d'inducció sense el qual no s'explicarien els fenòmens de diàuxia descrits.

El 86 % de la utilització de la glicerina en condicions anaeròbiques per *E. aerogenes* CCB 4 correspon a una estequiometria



Quan la glucosa fermenta, el nivell menor d'etanol i d'hidrogen que hem trobat correspon a una estequiometria:



Estudiant les reaccions d'oxidació i reducció de NAD que tenen lloc conjuntament amb aquestes transformacions químiques, veiem que aquestes reaccions proporcionen un balanç equilibrat del NAD oxidat i del reduït. Les dades experimentals que hem obtingut quant a gasos i a l'etanol concorden també amb aquestes reaccions. En ambdós casos, a més d'aquests productes, hi ha una producció d'àcids de 0,15 mols per mol de substrat fermentat, igual en glicerina que en glucosa.

Per tant, podem concloure que, per a aconseguir un balanç equilibrat de NAD oxidat i reduït, *Enterobacter aerogenes* CCB 4 no pot produir ni 2,3 butilenglicol ni acetoïna quan fermenta la glicerina. En aquest mateix cas aconsegueix l'equilibri de $\text{NAD}^+/\text{NAD}_2\text{H}$ amb l'increment de la producció d'hidrogen molecular i d'etanol i amb una producció d'àcids pràcticament igual a la que hom obté en glucosa. El nivell necessari de NAD^+ (oxidat) per a la reacció de la formació d'acetoïna en *Enterobacter aerogenes* no s'arriba a abastar mitjançant la fermentació de la glicerina. Per contra, sí que s'arriba al nivell adequat si amb la glicerina hi afegim algun acceptor d'electrons, com es ara el piruvat o l'acetat. Per aquest motiu, en la fermentació de la glicerina a la qual ha estat afegit un d'aquests acceptors d'electrons es produeix acetoïna igual que en la fermentació de la glucosa.

L'exemple que hem estudiat posa de manifest que els models fermentatius són un esquema, però no representen unes vies úniques per on poden circular els fluxos de matèria des de substrats fins a productes finals. En totes aquestes vies, hi ha implicats molts mecanismes de regulació. Genèticament, sembla que les possibles alternatives de productes finals estan molt estabilitzades i mantenen, en els bacteris, una capacitat adaptativa molt gran, de la qual hem donat una petita mostra en aquest treball.

BIBLIOGRAFIA

1. BUCHNER, TH. i REDETZKI, H.: *Eine spezifische photometrische Bestimmung von Äthylalkohol auf fermentativem Wege*, «Klin. Wschr.», 29, 615 (1951).
2. CHUANG, L. F. i COLLINS, E. B.: *Biosynthesis of Diacetyl in Bacteria and Yeast*, J. Bacteriol, 95, 6-2083-2089, (1968).
3. COLLINS, C. H.: *Microbiological methods*, segona edició. Butterworths, London (1967).
4. EGGSTEIN, M. V. i KREUTZ, F. H.: *Eine neue Bestimmung der neutralethete in Blutserum und Gewebe*, «Klin. Wschr.», 44, 262 (1966)
5. HIGGINS, T. E. i JOHNSON, M. J.: *Pathways of anaerobic acetate utilization in E. coli and A. cloacae*, «J. Bacteriol.», 101, 885-891 (1970).

6. MAGASANIK, B., BROOKE, M. S. i KARIBIAN, D.: *Metabolic pathways of glycerol dissimilation. A comparative study of two strains of A. aerogenes*, «J. Bacteriol.», 66, 611-619 (1953).
7. MAHLER, H. R. i CORDES, E. H.: *Biological chemistry*, tercera edició. Harper International Edition (1967).
8. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *Influence of pH on the dissimilation of glucose by Aerobacter indologenes*. «J. Bacteriol.», 36, 67 (1938).
9. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *Formation of trimethylene glycol from glycerol by Aerobacter*. «Enzymologia», 8, 252-256 (1940).
10. MICKELSON, M. N. i WERKMAN, C. H.: *The dissimilation of glycerol by coli-aerogenes intermediates*. «J. Bacteriol.», 39, 709-715 (1940).
11. MONOD, J.: *Recherches sur la croissance des cultures bactériennes*, segona edició. Thèse de 1942. Hermann, París (1942).
12. PAIGEN, K. i WILLIAMS, B.: *Catabolite repression and other control mechanisms in carbohydrate utilization. Advances in Microbial Physiology*. Ed. per A. ROSE i J. F. WILKINSON, Vol. 4, 251-324. Academic Press, Londres i Nova York (1970).
13. SILVERMAN, M. i WERKMAN, C. H.: *H₂/CO₂ ratios of Escherichia-Aerobacter*. «J. Bacteriol.», 36, 659 (1938).
14. SPECKMAN, R. A. i COLLINS, E. B.: *Diacetyl biosynthesis in Streptococcus diacetylactis and Leuconostoc citrovorus*. «J. Bacteriol.», 95, 174-180 (1968).
15. WERNER, W., REY, H. G. i WIELINGER, H.: «Z. analyt. Chem.», 252, 224-228 (1970).
16. WESTERFELD, W. W.: *A colorimetric determination of blood aceoin*. «J. Biol. Chem.», 161, 495-502 (1945).
17. WOOD, W. A.: *Fermentation of carbohydrates. The Bacteria*. Ed. per I. C. GUNSA-LUS i R. Y. STANIER, Vol. II, 59-149, Academic Press, Nova York i Londres (1961).

EL PROBLEMA DE LA FIXACIÓ DEL N₂ PER ORGANISMES LLIURES

per J. VIVES-REGO

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

INTRODUCCIÓ

La fixació del nitrogen elemental per bacteris no simbiòtics i aerobis és un fenomen continuadament revisat en el transcurs dels darrers 50 anys ^{4, 12, 13, 18}. Té una importància extraordinària, perquè constitueix gairebé l'únic mecanisme d'incorporació absoluta del nitrogen en la biomassa d'un ecosistema aïllat. Malgrat l'esforç dut a terme, hom no ha arribat a una situació consistent, sobretot després d'haver obtingut sistemes solubles actius, per la dificultat de mesurar el nitrogen elemental fixat.

D'altra banda, en els últims anys hi ha citacions de microorganismes aerobis i no simbiòtics, trobats reiteradament, que són capaços de créixer en medis teòricament lliures de nitrogen combinat i, per tant presumptivament fixadors ^{1, 3, 8, 10, 16, 20}, però que, en molts casos, amb les tècniques més modernes existents avui hom no demostra que siguin veritables fixadors ⁵.

L'objecte del present treball és la presentació de dues soques aïllades per nosaltres, presumptivament fixadores, i de l'estudi de llur capacitat fixadora.

MATERIAL I MÈTODES

Soques

Pseudomonas azotogensis CCB 1568 (actualment inclosa en l'ATCC núm. 25850) ¹⁶.

Pseudomonas fluorescens D-56 aïllada d'una terra de vinya de Vilafranca del Penedès ¹⁹.

Medis

El medi lliure de nitrogen combinat que és emprat, és el d'agar manitol⁶. Per fer més crític el creixement sobre plaques, hom incuba dins un dessecador que conté l'atmosfera a pressió normal, que prèviament ha estat rentada en un flascó rentador que conté sulfúric concentrat, a fi i efecte d'eliminar el nitrogen combinat contaminant.

Hom estudia la dependència del creixement de la presència de nitrogen, amb una atmosfera artificial del tipus «barreja precisa», envasada a una pressió de 150 kg/cm² i fornida per Oxígeno y Suministros S. A., que té la composició centesimal següent:

Argó	75 % ± 0,1 %	d'una riquesa del	99,996 %
Oxigen	20 % ± 0,1 %	» » »	99,995 %
CO ₂	5 % ± 0,1 %	» » »	99,998 %

Valoració de la fixació

L'increment del nitrogen total és determinat pel mètode Kjeldahl, prèviament descrit a⁹. La reducció d'acetilè com a tècnica per a determinar la presència de nitrogenasa és un mètode molt emprat en els laboratoris especialitzats, després dels treballs de DILWORTH² i de SCHÖLLHORN¹⁷. És considerat com a altament sensible i significatiu després de la revisió feta per POSTGATE¹⁴. Trametérem les dues soques al Professor Dr. J. R. Postgate (A. R. C. Unit of Nitrogen Fixation, Universitat de Sussex, Brighton BN1 9QJ, Anglaterra), per tal que dugués a terme aquest tipus d'experiències. Els assaigs de creixement difàsic han estat duts a terme sobre el medi següent:

- a) sacarosa, 20 g; Cl₂Ca.2H₂O, 0,1 g; SO₄Mg.7H₂O, 0,1 g; Cl³Fe solució aquosa a 1 %, 1 ml; MoO₃ solució aquosa a 0,1 %, 1 ml; aigua destil·lada, 600 ml.
- b) Na₂PO₄H, 12,5 g; K₂PO₄H, 1,5 g; aigua destil·lada, 400 ml.

Les parts a) i b) són esterilitzades per separat en autoclau a 120° C i ajuntades quan són fredes. El medi és inoculat amb un cultiu crescut sobre el mateix medi que a més conté 0,1 g/l de ClNH₄. La proporció de l'inòcul és de 5-10 % i la temperatura d'incubació és de 30° C. Les lectures del creixement són fetes per terbolesa a 400 nm amb un Spectrochem de la casa Hilger Watts.

RESULTATS

Ambdós microorganismes són capaços de créixer en resembres successives, incubats en un dessecador que contingui atmosfera prèviament rentada amb sulfúric.

Els increments del nitrogen total obtinguts, en cap cas no han estat superiors a 6 µg N/ml, en les dues soques estudiades. Aquest increment no pot ésser considerat significatiu, pel fet que pot ocórrer només per efecte del nitrogen combinat existent en l'atmosfera del laboratori, com ja ha estat apuntat per d'altres autors⁵.

En el quadre 1, hom copsa el grau de dependència del creixement respecte a la presència de nitrogen gasós, a 30° C. En el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 es manifesta una dependència molt més crítica que en cas de *Pseudomonas fluorescens* D-56. En aquest darrer cas, hom pot apreciar un creixement important en l'atmosfera artificial sense nitrogen, bé que sigui inferior a l'obtingut en la incubació en atmosfera normal. Això fa pensar que el creixement ha estat a les despeses del nitrogen contaminant del medi i del provinent de l'inòcul, considerant el microorganisme, aleshores, com a oligonitròfil més que no pas com a un fixador.

En el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 158, l'absència del nitrogen no en permet el creixement, i es presenta un descens de la terbolesa, atribuïble a la lisi cel·lular i a la manca de desenvolupament.

Totes dues soques foren trameses al professor Dr. J. R. POSTGATE, tal com ja ha estat esmentat, per ésser sotmeses a les proves de reducció d'acetilè. Segons ens comunicaren, ambdues soques donaren resultats negatius en totes les experiències portades a terme.

En la soca *Pseudomonas fluorescens* D-56 no ha pogut ésser observada una diàxia significativa, mentre que en el cas de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 els resultats obtinguts manifesten un creixement difàsic, tal com es representa en la figura 1.

DISCUSSIÓ

La determinació de la nitrogenasa pel mètode de la reducció de l'acetilè és considerada de molta sensibilitat i significació¹⁴. Així i tot, cal no perdre de vista que es tracta d'un mètode indirecte i que per aquest motiu hi ha la possibilitat de l'existència d'una nitrogenasa no detectable pel mètode de la reducció de l'acetilè. D'altra banda, l'existència d'una

diàuxia a concentració limitant de nitrogen combinat, es fa difícilment explicable si no s'esdevé com a conseqüència d'un període d'inducció o desrepressió de la nitrogenasa. Aquest criteri de creixement difàsic, ja ha estat emprat amb anterioritat per a demostrar la capacitat fixadora d'alguns microorganismes aerobis i facultatius^{11, 15, 21}; i restà demostrat posteriorment, pel mètode de la reducció de l'acetilè i la fixació del N¹⁵, que eren veritables fixadors.

Les dues soques presenten un creixement espectacular en el medi d'agar manitol. És un tipus de desenvolupament mucós-viscós, que ocorre

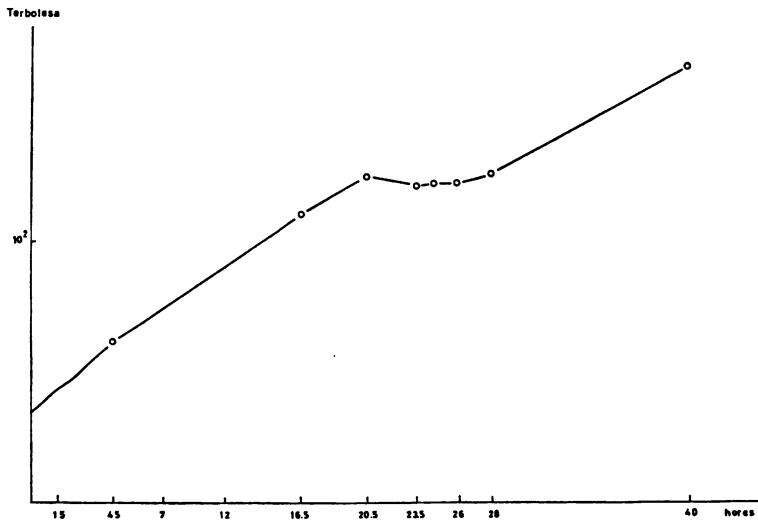


FIG. 1. — Creixement difàsic de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568

en totes les Azotobacteriàcies quan fixen N₂ i que pot ésser identificat com de polisarcàrids capsulars. Aquesta producció només s'esdevé quan les condicions del medi són adequades per a la fixació, i cal atribuir-la a un creixement no equilibrat⁷, degut a un diferent requeriment energètic per a abastar-se de nitrogen utilitzable per a la biosíntesi. Així aquest creixement de les nostres soques és clarament similar al dels veritables fixadors. En cas de no ésser-ho, caldria pensar en bacteris oligonitròfils o bé fixadors heterotròfics; és a dir que, per a créixer, poden utilitzar quantitats relativament petites de nitrogen combinat, que prenen de les contaminacions del medi o l'atmosfera i que poden arribar a ésser importants⁵

En el quadre I, hom pot apreciar també una forta evidència de la

necessitat del nitrogen elemental per al creixement de *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 especialment, bé que tampoc no pot ésser descartada la possibilitat que el creixement esdevingut en l'atmosfera normal sigui degut al nitrogen combinat contaminant. Sembla, doncs, que hi ha una certa evidència acumulada a favor de suggerir que *Pseudomonas azotogensis* CCB 1568 és capaç de fixar nitrogen elemental, bé que la nitrogenasa que sintetitzi no sigui detectable pel mètode de l'acetilè. D'altra banda, el creixement de la soca *Pseudomonas fluorescens* D-56, cal atribuir-lo a un creixement oligonitròfil, en absència d'evidència a favor de la seva capacitat fixadora; i cal fer esment, tanmateix, de la similitud d'ambdós tipus culturals en el medi d'agar manitol.

QUADRE 1

Creixement en atmosfera normal i en atmosfera artificial controlada sense nitrogen, als quatre dies d'incubació a 30 °C i a la pressió final de 760 mm de Hg. Lectures de terbolesa a 400 nm.

	Lectura inicial amb inòcul	Ar-O ₂ -CO ₂	Atmosfera normal
<i>Pseudomonas azotogensis</i> CCB 1568	0.270	0.230	0.310
<i>Pseudomonas fluorescens</i> D-56	0.140	0.300	0.390

BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSON, G. R.: *Nitrogen fixation by Pseudomonas-like soil bacteria*. «J. of Bacteriol.», 70, 129-133 (1955).
2. DILWORTH, M. J.: «Biochem. Biophys. Acta», 127, 285 (1966).
3. EVANS, H. J., CAMPBELL, N. E. R. i HILL, S.: *Asymbiotic nitrogen-fixing bacteria from the surfaces of nodules and roots of legumes*. «Can. J. Microbiol.», 18, 13-21 (1972).
4. HANIF, A. H. i ROBERTS, J. P.: *Views and reviews on Azotobacter*. «Parkistan Journal of Science», 22, 210-212 (1970).
5. HILL, S. i POSTGATE, J. R.: *Failure of putative nitrogen-fixing bacteria to fix nitrogen*. «J. of Gen. Microbiol.», 58, 277-285 (1969).
6. LORD, T. H.: *Determinative Bacteriology*. Burgess Publishing Co., Minnesota (1962).
7. MAALOE, O. i KJELDGAARD, N. O.: *Control of Molecular Synthesis*. Ed. Benjamin, Nova York (1965).
8. MEIKLEJOHN, J. i WEIR, J. B.: *Nitrogen-fixers pseudomonas and other aerobic bacteria from rhodesian soils*. «J. Gen. Microbiol.», 50, 487-496 (1968).

9. MEYNELL, M. D. i MEYNELL, E.: *Bacteriología Experimental. Teoría y Práctica*. Ed. Omega, Barcelona (1969).
10. PAUL, E. A. i NEWTON, J. D.: *Studies of aerobic nonsymbiotic nitrogen-fixing bacteria*. «Can. J. Microbiol.», 7, 7 (1961).
11. PENGRA, R. M. i WILSON, P. W.: *Physiology of nitrogen fixation by Aerobacter aerogenes*. «J. of Bacteriol.», 75, 21-25 (1958).
12. POSTGATE, J. R.: *Nitrogen fixation*. «Spectrum», 68, 14-16 (1970).
13. POSTGATE, J. R.: *Relevant aspects of the physiological chemistry of nitrogen fixation*. 21-Symposium. The Soc. for Gen. Microbiol., 287 (1971).
14. POSTGATE, J. R.: *The Acetylene Reduction Test for Nitrogen Fixation. Methods in Microbiology*, 6 B. Editat per J. R. Norris i D. W. Ribbons. Academic Press, Londres i Nova York (1972).
15. PROCTOR, M. H. i WILSON, P. W.: *Nitrogen fixation by Gram negative bacteria*. «Nature», 182, 891 (1958).
16. SANCHO, J. i PARÉS-FARRÀS, R.: *Identificación taxonómica de Pseudomonas azotogensis*. «Microbiología Española», 22, 1-5 (1969).
17. SCHÖLLHORN, R. i BURRIS, R. H.: «Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A.», 57, 213 (1967).
18. STEWART, W. D. P.: *Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free-living microorganisms*. «Proc. Roy. Soc. B.», 127, 367-388 (1969).
19. VIVES-REGO, J.: Tesi Doctoral. Facultat de Ciències. Universitat de Barcelona (1973).
20. VOETS, J. B. i DEBACHER, J.: *Pseudomonas azotogensis nov. sp. a new free living nitrogen fixing bacterium* (1965).
21. YOCH, D. C. i PENGRA, R. M.: *Effect of amino acids on the nitrogenasa sistem of Klebsiella pneumoniae*. «J. of Bacteriol.», 92, 618-622 (1966).

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*)⁴, 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 WASSERZUG⁸ 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.

EISENBERG³, 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 BUNTING¹, 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*.

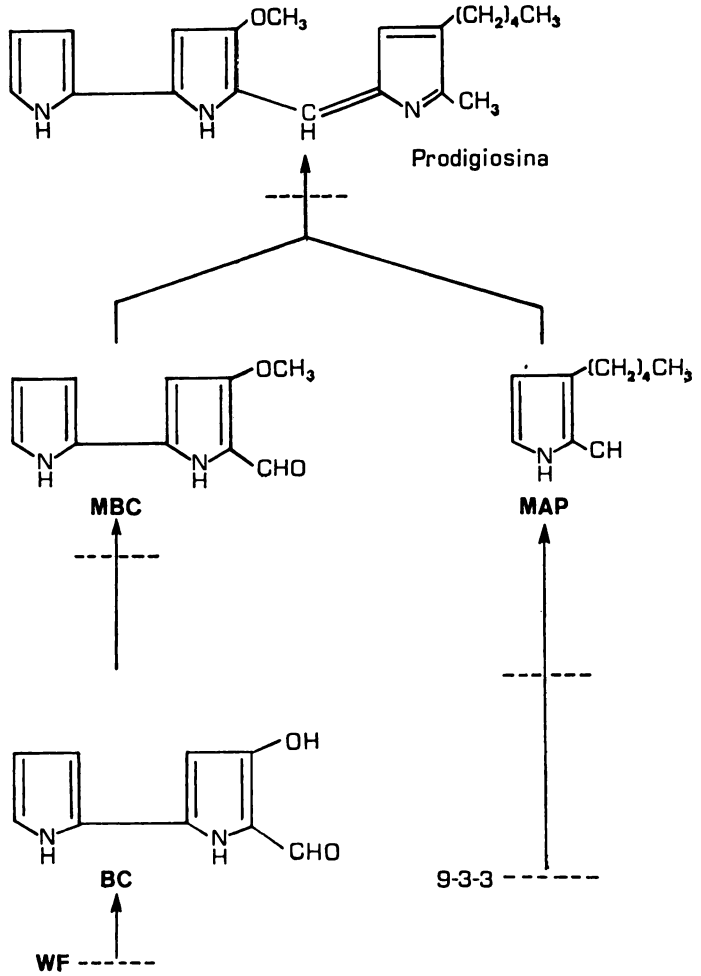
No són completament conegudes les vies metabòliques de la síntesi de prodigiosina, però podem comentar-ne algun detall.

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^{5,9}, 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, SANCHO⁷, 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 S₁₀, que nosaltres, seguint amb la terminologia anterior, denominarem sistema S₁₀.

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 S₁₀E, 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 S₁₀.

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 S₁₀H, 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 S₁₀E apareix en la tinció de Gram amb algunes diferències respecte a la S₁₀, 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 S₁ (Sistema S₁). 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 MOSMAN¹⁰, duts a terme amb una soca de comportament cromogènic semblant al de la S₁, 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 SM₄ de *Serratia*, la qual és també molt semblant al bacteriòfag transductor P₂₂ de *Salmonella tiphymurium*.

Quan provàrem la sensibilitat al bacteriòfag de les soques de *Serratia* de què disposàvem, observàrem que la soca S_{10E}, variant no pigmentada obtinguda de la S₁₀, 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 assecat, i les plaques són incubades durant 48 hores a 30° 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 MOSMANN¹⁰, 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, veiem 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.

Darrerament⁶ 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).

ELS ESTATS DEL FACTOR S I ELS FENOTIPS DE LES CÈL·LULES CORRESPONENTS

per JOAN JOFRE

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

INTRODUCCIÓ

Dues cèl·lules fenotípicament diferents es troben formant part d'una descendència clonal en una proporció constant de cadascuna quan la població és suficientment gran, sigui el que sigui dels dos tipus de cèl·lules el que dona lloc a la dita població.

Això es troba en contradicció amb alguns fets generals de la microbiologia, com és ara el concepte de cultiu pur o bé els principis generals de mutació i regulació gènica.

Aquests fenotips podrien difereixir en molts aspectes, bé que nosaltres per a llur estudi prenem un marcador definit per a diferenciar-los. Mentre que un tipus de cèl·lules excreten alanina i glutàmic al medi, l'altre no. Anomenarem EG⁺ les que excreten, i EG⁻ les que no. Dues raons fan que treballem sobre aquest marcador particular. Primerament, perquè fou estudiant la segregació d'aminoàcids quan foren trobats els dos fenotips, i, d'altra part, per la facilitat de detectar els dos tipus utilitzant la tècnica de revelat amb soques auxotròfiques, en el nostre cas concretament amb la soca P 60 de *Leuconostoc mesenteroides* segons ha estat descrit per PARÉS, GUINEA i HERNÁNDEZ^{3,7}.

Els primers estudis fets a la soca *Citrobacter intermedium* C₃ per PARÉS, GUINEA i HERNÁNDEZ feren pensar en la presència d'un factor episòmic, que fou anomenat factor S. Aquesta suposició no era sinó la base d'un model de treball que, des d'un punt de vista especulatiu, plantejava la possibilitat formal de relacionar una sèrie de situacions d'aquest factor S. Hom ha de tenir en compte que molts experiments han hagut d'ésser fets amb poblacions no uniformes, tant pel que fa als fenotips com

al factor S. Aquest fet ens portarà a un nombre definit de fenotips molt més petits que el nombre de poblacions diferents.

Per tant, calien uns experiments que permetessin d'interpretar cada població real. Per això el primer problema que es plantejà fou el de l'eliminació del factor S, que havia de portar-nos a l'obtenció d'una població homogènia.

Després d'evidències indirectes de l'acció del taronja d'acridina, hom assajà l'esmentada eliminació amb aquest colorant. VALOIX obtingué, després del tractament amb taronja d'acridina, soques que donaven sempre poblacions uniformes i que mai no excretaven aminoàcids al medi després de quasi dos anys de subcultiu.

Hi ha una sèrie de raons que feren que es plantegés el problema de si realment aquests tipus de soques eren descendents d'una sola bactèria que inicialment tenia el factor S.

Aquestes possibilitats d'error a la troballa de soques S⁻ són les següents:

Presenten diferències fenotípiques molt importants en relació amb la soca original. A més, entre elles també presenten algunes diferències, bé que no entre les qualitats més significatives.

Malgrat que són uns quants els diversos investigadors que han aconseguit soques S⁻, aquestes no són obtingudes regularment en tots els experiments, sinó que llur obtenció depèn en gran part de l'atzar.

El taronja d'acridina és també un agent mutagen important. No podem, doncs, excloure la possibilitat que aquestes soques que anomenem S⁻ hagin sofert un dany general en llur material hereditari i que deixin d'excretar per alguna mutació en particular que no tingui cap relació amb la pèrdua del factor S, i que aquest romangui present a l'interior de les cèl·lules, bé que cap d'elles no excreti aminoàcids.

La selecció és indirecta, puix que seleccionem les possibles soques que han estat deslliurades del factor S, per la dimensió de les colònies, basant-nos en el fet que les cèl·lules no segregadores tenen un temps de generació més llarg que les segregadores. No seleccionem directament no segregadores, per la impossibilitat experimental de diferenciar d'entre les colònies no segregadores les que han perdut el factor S.

Finalment, si pensem que la ciència ha d'ésser explícitament objectiva i que, per tant (malgrat que les nostres experiències són objectives), un treball com aquest (que ha arribat a uns alts nivells de sofisticació) requereix un alt nivell d'exigència formal, no és absurd de pensar en una possibilitat de contaminació.

Aleshores, davant totes aquestes possibilitats, hom establí uns criteris que fessin vàlides les nostres experiències. El primer punt era tenir la seguretat que realment fossin descendents d'una cèl·lula determinada, i el

segon, poder saber que es tractava de la pèrdua del factor S i no d'una mutació.

La primera part es resol fàcilment obtenint cèl·lules amb un marcador genètic que ens permeti de seguir d'una forma clara una descència clonal. Pensàrem que les mutants auxotròfiques eren un material idoni per a aquest tipus d'estudis.

Hom pot solventar el segon problema mitjançant dos tipus d'experiències. D'una banda es fa necessària l'obtenció de soques S⁻ per altres procediments diferents del taronja d'acridina, la qual cosa redueix la possibilitat de causar el mateix dany al material cromosòmic. D'altra part, si aconseguim que per herència infecciosa es recuperi altra vegada el caràcter excretor, resta pràcticament exclosa la possibilitat que l'efecte del taronja d'acridina sigui una mutació i no l'eliminació del factor S.

Amb els experiments que esmentem a continuació deixem resolts aquests problemes.

CONSIDERACIONS METODOLÒGIQUES I RESULTATS

Obtenció de mutants auxotròfiques. — Ha estat duta a terme d'acord amb els procediments generals descrits a la literatura. Pot ésser dividida en tres parts: mutagènesi, contraselecció i identificació.

Mutagènesi. — Ha estat emprat un fort element mutagen com és ara la N-metil-N-nitro-N-nitroso-guanidina (NTG).

Sobre una suspensió d'aproximadament 10^7 - 10^8 cèl./ml. en amortidor trismaleic, 1/20 molar i a pH = 6, afegim NTG de manera que aconseguim una concentració de 100 µg/ml. Aquesta és una innovació que ens indicà el professor GRAHAM⁵ quan vingué a Barcelona amb motiu del 3.^{er} Congrés Nacional de Microbiologia, ja que fins aleshores el tractament es feia arreu amb brou ordinari i concentracions més febles de NTG (30 µg./ml.), puix que era generalment acceptada la idea que aquest agent mutagen semblava que actuava sobre les cèl·lules amb divisió i, per tant, el seu tractament s'havia de fer sobre un medi de creixement de les bacteries. Cal incubar-ho a 37° C, durant 30 minuts i amb agitació.

Hom ho filtra per tal de concentrar la població bacteriana que ha sobreviscut al tractament de NTG, i ho renta per eliminar les restes de l'agent mutagen.

Contraselecció. — Les cèl·lules sobrevivents són incubades una nit a 30° C. Després hom ho filtra, renta i torna a suspendre en M₁ i s'hi afegeixen 20.000 U.I./ml. de penicil·lina. Com que el M₁ és un medi mínim,

les cèl·lules auxotròfiques per algun aminoàcid o nucleòtid no es divideixen. D'aquesta manera, en actuar la penicil·lina únicament sobre les cèl·lules que es van dividint, enriqueim extraordinàriament de bacteries auxotròfiques la població bacteriana amb què treballem.

Hom filtra, renta i torna a suspendre la població sobrevivent al tractament amb penicil·lina en 10 ml de R 1/4.

Identificació. — De la suspensió en R 1/4, hom n'espargeix sobre plaques d'agar ordinari. D'aquelles plaques en què creix un nombre adequat de colònies, de 20 a 50, hom fa una rèplica sobre plaques de medi mínim M₁, utilitzant un tampó de vellut segons va descriure Ledelberg.

Les colònies que creixen sobre agar ordinari i no sobre M₁ són considerades auxotròfiques.

Seguint un enginyós sistema descrit per HOLIDAY⁴, a base de fer uns medis amb unes barreges d'aminoàcids convenients, s'arriba fàcilment a determinar quins són llurs requeriments.

Resultats. — Seguint aquest sistema, hem obtingut un bon nombre de mutants auxotròfiques per a diferents metabòlits, entre ells per a: metionina, cisteïna, vitamines, prolina, guanosina, histidina, diaminopimèlic, serina-glicocol·la, aminoàcids aromàtics, lisina, purines, ileucina-valina, arginina i treonina.

OBTENCIÓ DE SOQUES S⁻ PER DIFERENTS PROCEDIMENTS

Eliminació o curat per taronja d'acridina. — Aquest colorant és considerat un agent eficaç per a la curació d'alguns episomes, no de tots, puix que se sap que alguns factors són resistents a ésser eliminats per ell.

El camí seguit és el següent: Hom posa en suspensió una colònia C (no segregadora) procedent d'un revelat de C₃ en 10 ml. de R 1/4.

En un tub amb M₁ més 40γ de taronja d'acridina per ml., de manera que la població inicial oscil·li entre 10 i 100 cèl./ml., hom incuba 12-18 hores a 30° C, amb agitació i amb el medi protegit de la llum, puix que el taronja d'acridina és fotolàbil.

A les 12-18 hores hom n'agafa una part al·lòtota i la porta altra vegada a M₁ més 40γ d'OA/ml., de manera que la població inicial sigui del mateix ordre que en el primer tractament.

Es repeteix fins a 8-10 tractaments, i finalment hom ho sembla damunt plaques de M₁-Agar. Al cap de dos o tres dies d'incubació a 30° C apareix un nou tipus de colònia de la qual farem una dissociació i anàlisi colonial.

Com hem dit abans, no sempre hom n'obté resultats positius. Probablement aquest fet és degut que moltes vegades hom selecciona formes amb el factor S integrat, que creixen més ràpidament, i probablement també degut que les soques S⁻ creixen molt dificultosament sobre M₁ més OA.

Curat per bromur d'etidi (BE). — Per tal de complementar els estudis fets amb OA, pensàrem en el BE, puix que és considerat un dels reactius químics més efectius per a la curació d'episomes¹.

Com en el cas anterior, partim d'una colònia C, i en un tub amb M₁ més BE ($7,5 \times 10^{-5}$ M) inoculem una població inicial de 10^2 - 10^3 cèl./ml. És incubada 24 hores amb forta agitació, que hom millora mitjançant dues barretes de vidre de diferent diàmetre i llargada. En aquest cas és més eficient el tractament en presència de llum.

Tot seguit hom procedeix de la mateixa manera que en el cas anterior.

Tampoc ací hom no troba sempre resultats positius. Creiem que les raons són les mateixes que en el cas anterior.

Enriquiment de cèl·lules S⁻ en una població de la soca salvatge de C₃. — Pensàrem que, si el model inicial que havia estat proposat per a explicar el comportament del factor S era correcte, hi havia d'haver una petita possibilitat que en una població de la soca salvatge C₃ hom trobés per accident alguna cèl·lula S⁻. Aleshores, com que totes les soques S⁻ que teníem eren resistents al bacteriòfag F₁ (bacteriòfag específic de *C. intermedium* C₃ aïllat d'aigua residual de paperera), si sotmetíem la població bacteriana a una forta pressió selectiva a favor de les resistents al bacteriòfag, algun dels diferents tipus de resistents al bacteriòfag seria el corresponent a les cèl·lules S⁻.

El procediment és senzill, ja que no cal sinó afegir una forta quantitat de bacteriòfags a una població bacteriana que és a la fase de creixement exponencial, i hom les incuba conjuntament durant una nit. Després hom sembla les cèl·lules sobrevivents sobre plaques de M₁.

El procés continua com en els casos anteriors i hom n'obté els mateixos resultats.

Resultats. — En els tres casos han estat obtingudes soques S⁻, bé marcades per algun aminoàcid, bé sense marcar. Amb taronja d'acridina, VALOIX, VALLESPINÓS i l'autor obtingueren soques sense marcar; últimament, FUSTÉ n'ha obtingudes de marcades per histidina.

Amb BE han estat obtingudes soques S⁻ marcades per arginina.

Per selecció amb bacteriòfag, han estat obtingudes soques S⁻ sense marcar i d'altres de marcades per arginina.

Totes elles presenten una sèrie de característiques comunes, com és ara la pèrdua del metabolisme fermentatiu, pèrdua de sensibilitat al bacteriòfag F₁, canvis morfològics, etc.

REVERSIÓ S⁻ → S⁺ PER TRANSFERÈNCIA INFECCIOSA

Després d'unes primeres dades obtingudes per VALOIX, emprenguérem la tasca d'aconseguir experiments de reversió totalment crítics amb donadors que tinguessin diferent marcador que l'acceptor i així poder-los diferenciar fàcilment.

El mètode emprat fou el mateix que havia estat descrit per als experiments de transferència a *P. intermedium* ATCC 11606 per GUINEA i PARÈS. Hom va introduir-hi una lleugera modificació, que consistí a inocular una part alíquota de la barreja entre dadors i acceptors després de les dues hores d'incubació conjunta en un medi on només creixia la soca acceptadora. D'aquesta manera hom donava temps a les cèl·lules que haguessin rebut el factor S a multiplicar-lo i integrar-lo, i d'aquesta manera augmentaria el nombre de cèl·lules que l'haurien rebut i el de les que excretarien aminoàcids. Hom ho espargí sobre M₁, de manera que només cresquessin les cèl·lules de la soca acceptora, i hom n'escollí les colònies que tenien el creixement més ràpid.

Els resultats d'aquestes experiències estan relacionats a la taula I.

CONCLUSIONS

Primerament resta provat que hom pot eliminar el factor S pels mètodes usuals d'una manera irreversible, no incompatible amb la viabilitat cel·lular.

En segon lloc, veiem que és transmissible per infecció, bé interspecífica, com ha estat provat amb *P. intermedium*, bé intraspecífica, com resta demostrat per les experiències de reversió S⁻ → S⁺.

Tenint en compte els criteris de selecció seguits per a l'obtenció, tant de soques S⁻ com de soques revertides, hom no pot assegurar que el fenotip que ens donen les soques S⁻ sigui unívoc. Podem pensar que se'ns presenti un fenomen semblant als factors F'. El fet que la velocitat de transferència que obtenim en la reversió sigui més petita que l'obtinguda per la transferència a *P. intermedium*, dóna una certa base per a pensar en aquesta possibilitat.

Aquests fets concrets ens donen una base molt ferma per a explicar la relació entre els diferents fenotips de les diverses poblacions i el model

TAULA I. — *Experiments de reversió S⁻ → S⁺*

Experiments de reversió S ⁻ → S ⁺	Experiments Soca dadora	Soca S ⁻	Comportament especial	Velocitat de reversió	Nombre de colònies comptades	Experiments independents
1	3 MA7 (Ileu ⁻)	S ₁ ⁻ (curat per AO)	MC (CMS Oxoid)	0	7550	3
2	»	S _π ⁻ (curat per AO)		2,3 × 10 ⁻⁴	8725	3
3	»	S _{rt} ⁻ (obtingut per selecció fàgica)		1,8 × 10 ⁻³	2750	2
4	»	Arg ⁻ 439 (curat per EB)	Arg ⁻	1,5 × 10 ⁻⁴	5802	2
5	5 MA1 (His ⁻)	S ₁ ⁻	MC (CMS Oxoid)	0	16530	3
6	»	S _π ⁻		0	10530	3
7	»	S _{rt} ⁻		1,3 × 10 ⁻⁴	14520	3
8	»	Arg ⁻ 439	Arg ⁻	0	6486	3
9	<i>C. intermedium</i> C3	<i>P. intermedium</i> 11606	lac ⁻ a 24 h.	8,8 × 10 ⁻²	540	6

QUADRE I

Estats possibles del factor S i fenotips de les cèl·lules corresponents a les diferents poblacions bacterianes.

Estat del factor S	Obtenció	Tipus de població	Excreció de glutamat	O/F	Lactosa	Sensibilitat a les sals biliars	Sensibilitat UV	KCN	Sensibilitat al bacteriòfag	Temps de en M ₁ generació
C ₃ (1)	Tipus salvatge. Després de regressió espontània de (2) i (3). Després de la reversió infecciosa de (4).	Integrat o autònom. En el primer cas, preferentment en un <i>locus</i> làbil. En el segon, amb un nombre variable per cèl·lula.	0,6	+/+	+	baixa	1	+	+	1
S ⁺ sg ⁺ (2)	Enriquida amb AO o estreptomicina.	Integrada preferentment en un <i>locus</i> més estable.	0,9-1	+/+	+	baixa	< 1	+	+	< 1
S ⁺ sg ⁻ (3)	Curació parcial amb AO o EB.	Cèl·lules amb pocs elements autònoms.	0	+/+	+	baixa	> 1	+	+	> 1
S ⁻ (4)	Curat amb AO, EB, fag F1.	Absent.	0	+/-	-	alta	>> 1	±	-	>> 1
<i>P. intermedium</i> (5)	ATCC 11606.	Absent.	0	+/+	retardada	baixa	no provada	+	-	1
<i>P. intermedium</i> (6)	Després de la infecció dels donants C ₃ .	Integrat en un <i>locus</i> relativament estable.	1	+/+	retardada	baixa	no provada	+	-	1

proposat segons estudis fets anteriorment per PARÉS, GUINEA, HERNÁNDEZ i GUERRERO.

Vegem ara els diferents estats que hom postula per al factor S, i després veurem els fenotips corresponents reunits en un quadre.

Hom ha aconseguit integració permanent després d'infecció en *P. intermedium* i selecció de les S⁺. Segons dades de VALOIX, si hom fa l'anàlisi d'una colònia segregadora, troba meitat i meitat d'elements excretors i no excretors. Però si hom fa una anàlisi colonial de la descendència d'aquests excretors, trobem que el 100 % alliberen aminoàcids al medi i així continuen comportant-se després de subcultius usccessius. Així, doncs, cal pensar que en *P. intermedium* s'integra en un *locus* molt estable.

Ha estat obtinguda integració quasi permanent a *C. intermedium* C₃ després de selecció d'excretors resistents a estreptomicona.

Hom aconsegueix fàcilment amb OA poblacions enriquides amb elements excretors, si comença el tractament amb un inòcul elevat. Això es basa en el fet que, a l'estat integrat del factor S, les cèl·lules es multipliquen més ràpidament, i el factor S, a l'estat integrat, no té sensibilitat diferencial a l'OA. En aquest tipus de població es planteja el problema que, segons els estudis cinètics portats a terme per GUINEA i HERNÁNDEZ⁸, el pas EG⁺ → EG⁻ és de l'ordre d'un 1 %, la qual cosa fa que al cap de 8-10 generacions arribin a l'equilibri. Aquest fet, junt amb el dels excretors resistents a l'estreptomicona, fa pensar en l'existència de diferents *loci* d'integració amb diferents graus d'estabilitat. És possible que els més estables siguin zones de més feble homologia, que podrien estar lligades a l'existència de factors S' tal i com hem esmentat abans. En aquest cas els *loci* més estables serien els seleccionats.

Dins una població de la soca salvatge C₃, el factor S es trobaria en un equilibri integració-desintegració. De l'estudi de la cinètica de canvi, deduïm que seria integrat preferentment en un *locus* poc estable. En el cas que es trobi en estat autònom, es dividiria independentment del cromosoma i també més ràpidament, puix que, si no, la població aviat es veuria rentada. En arribar a un nombre determinat dins el citoplasma bacterià, hi hauria una alta probabilitat d'integració; en passar a l'estat integrat, hi hauria un rentat de la resta d'elements autònoms.

Hom pot obtenir, per tractament amb OA de petits inòculs, poblacions enriquides amb elements no excretors. De fet això no seria sinó una etapa en el camí de rentat total que hem esmentat abans.

Al quadre I esmentem les diferències fenotípiques que hom troba entre aquestes diferents poblacions.

Així doncs, a les diferents poblacions de C₃ estudiades, resta coherent el model que hom havia proposat inicialment per explicar el comportament de la població de la soca C₃.

DISCUSSIÓ

Davant tots aquests fets, hom planteja dues preguntes. La primera és si, com assenyala DAVIS, en el concepte inicial de JACOB i WOLLMAN resta implicada la intranscendència dels factors episòmics enfront de la viabilitat del bacteri, de què la resistència episòmica als antibiòtics no representa una excepció formal.

El segon punt, molt lligat amb aquest, és preguntar-nos si és possible que continuem veient el fenomen de la variabilitat bacteriana com a resultat d'un grup d'acoblament que anomenem cromosoma. El nombre creixent de fenòmens coneguts independents del cromosoma bacterià fa pensar que l'esmentat cromosoma és com una mena de fórmula de compromís amb un paper semblant al que tenen les lleis de Mendel en la genètica dels organismes superiors.

Podem pensar que la genètica bacteriana realment sempre ha estat molt lluny de la genètica dels organismes eucariotes i que, de fet, caldria, considerar-la com a molt més diversificada; tot i que el seu emparellament amb la genètica dels eucariotes, després dels descobriments de BEADLE i TATUM, DELBRÜCK i LURIA i LEDELBERG, fou molt favorable per al seu desenvolupament, i també per al de la genètica dels eucariotes. Pensem que un fet semblant es donà en els estudis de metabolisme bacterià; al principi hom pensava només en un metabolisme de tipus oxidatiu com en els éssers superiors, però després hom anà veient uns altres tipus metabòlics, o sigui que, de fet, en els bacteris, les possibilitats d'adaptació en aquest sentit són molt més grans.

Aquest fet d'una pluralitat de mecanismes en els procariotes és força explicable, si els acceptem com a precursors dels eucariotes i, per tant, hem de pensar que han de tenir un nombre molt més gran de camins per a resoldre els mateixos problemes.

És realment molt excitant per a nosaltres l'estudi de l'herència extracromosòmica, puix que veiem la importància creixent que hom dóna als plàsmids i episomes, no solament pel nombre de fenòmens que actualment controlen a les poblacions bacterianes, sinó també pel paper que poden haver representat en l'evolució dins el pas de procariotes a eucariotes. En aquest segon aspecte ha estat llançada una hipòtesi, potser una mica atrevida, però molt suggeridora, que complementa la idea que els diferents orgànuls de les cèl·lules eucariotes haurien estat originats per simbiosi de diferents procariotes^{2, 6}; però aquesta teoria no és suficient per a explicar l'acumulació inicial d'àcids nucleics per a formar el nucli

primitiu. Adeshores sembla que una acumulació de plàsmids en els avantpassats dels eucariotes dóna una solució força versemblant a aquest problema⁸.

BIBLIOGRAFIA

1. BOUANCHAUD, D. H., SCAVIZZI, M. R. i CHABBERT, Y. A.: *Elimination by E.B. of Antibiotics Resistance in Enterobacteria and Staphylococci*. «J. Gen. Microbiol.», 54, 417-425 (1969).
2. FLAVELL, R.: *Mitochondria and Chloroplast as Descendants of Prokaryotes*. «Biochemical Genetics», Vol. 6, núm. 4 (1972).
3. HERNÁNDEZ, S.: *Segregación de glutamato en C. intermedium C₃ como propiedad determinada por la presencia de un factor episómico*. Tesi doctoral. Universitat de Barcelona (1968).
4. HOLIDAY, R.: *A new method for the identification of biochemical mutants of microorganisms*. «Nature» (1956).
5. INGRAHAM, J.: Comunicació personal.
6. MARGULIS, L.: *Symbiosis and Evolution*. «Scientific American» (1971).
7. PARÉS, R.: *El factor S de Citrobacter intermedium C₃*. Real Academia de Farmacia. Sesión inaugural (1973).
8. SONEA, S.: *Bacterial plasmid instrumental in the origin of eucariotes?* «Rev. Can Biol.» (1972).

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 C₃ de *Citrobacter intermedium*² i les cèl·lules de S₁⁻, 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: C₃ *Citrobacter intermedium*² i una població clonal de S₁⁻ 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 C₃.

Cultiu, fixació, inclusió, seccions i contrastament. — Inoculem 100 ml del medi M₁² en la proporció del 10 %, i procedim a la incubació en bany metabòlic en agitació durant 12-14 hores en el cas de C₃ i de 15-16 hores en el cas de S₁⁻, 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 ultramiacròtom 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

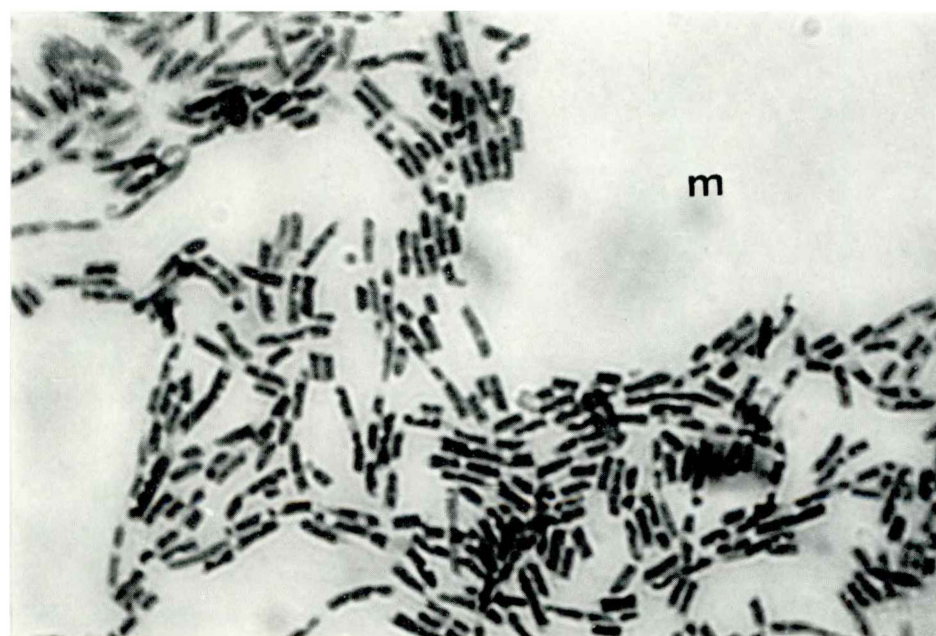
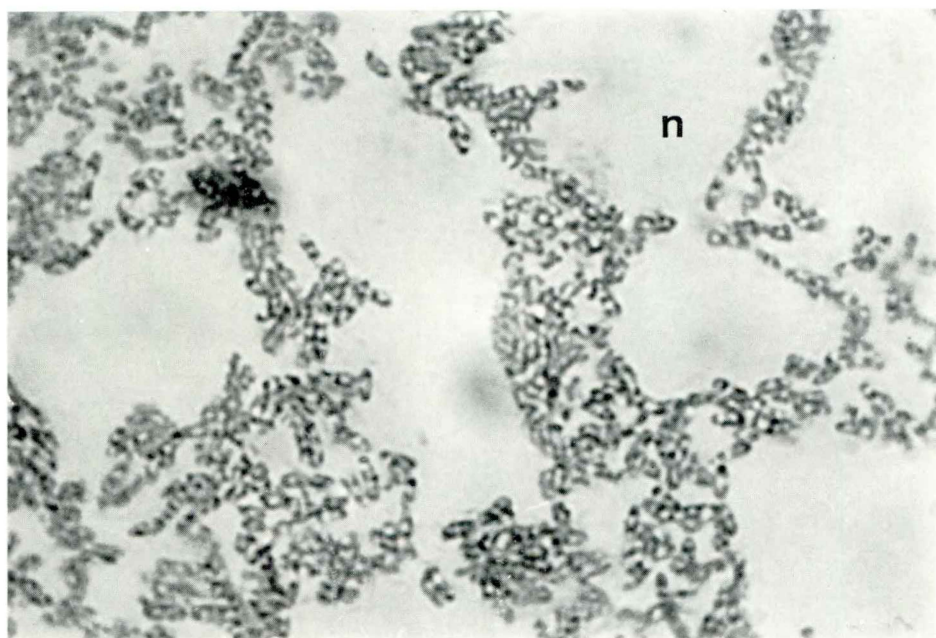


FIG. 1. — Tinció Gram (1.250 diàmetres, objectiu Wild Fluotar $\times 100$):
m) població clonal de C., n) població clonal de S—

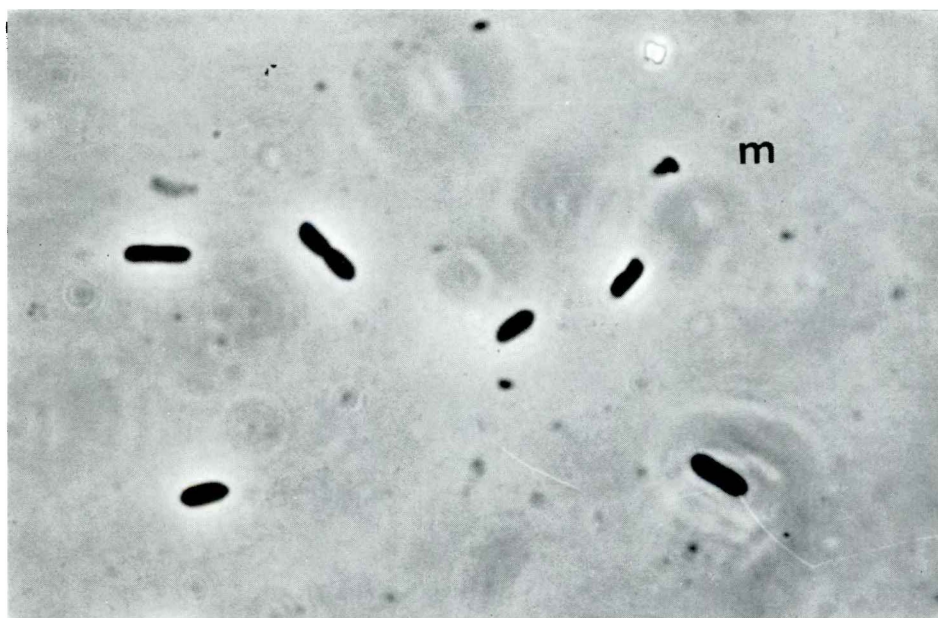


FIG. 2. — Contraste de fases de les cellules *in vivo* de : m) C₃, n) S— (1,250 diámetros)

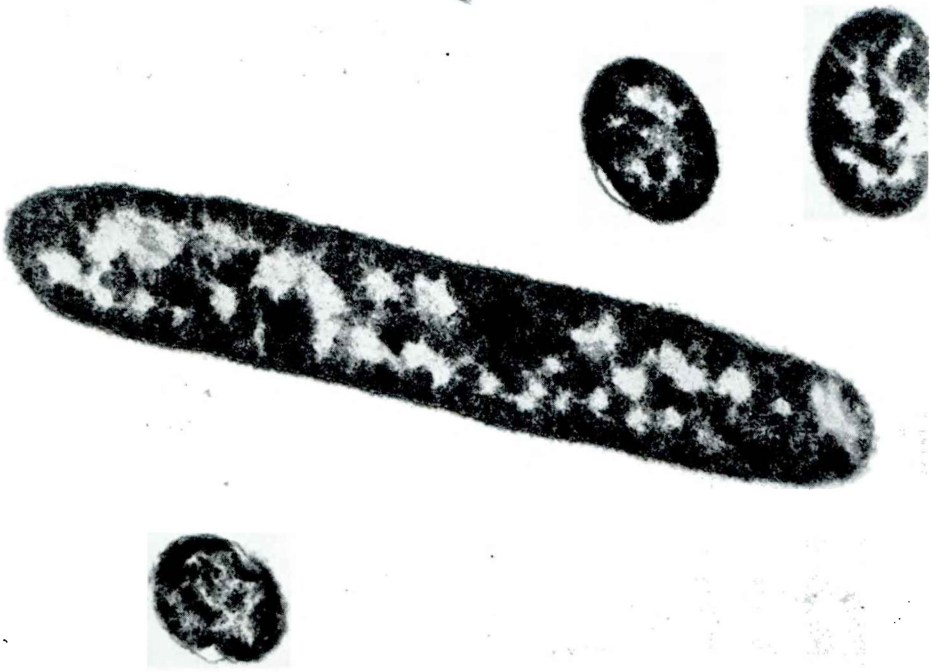


Fig. 2. Microelectrografia d'una secció transversal i longitudinal de *C.* (20,500 diàmetres)

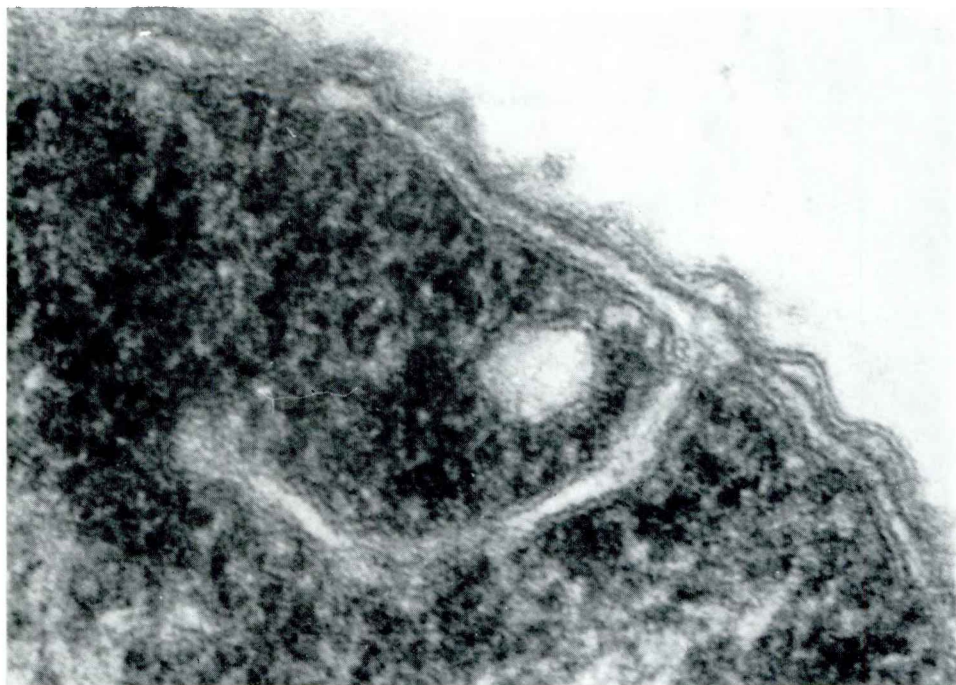


FIG. 4. — Aspectre de la paret celular, membrana celular i membrana intrusiva de S— (131.800 diàmetres)



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).

ETANOL COM A REPRESSOR DE L'OXIDACIÓ DE L'ÀCID ACÈTIC PER *ACETOBACTER*

per R. CLOTET i BALLÚS

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

Els bacteris del gènere *Acetobacter* són capaços d'oxidar totalment l'alcohol a anhidrid carbònic i aigua passant per àcid acètic. El fet anterior serveix de mètode diferencial entre *Acetobacter* i *Acetomonas*, i hom observa amb claredat els dos graus d'oxidació en fer créixer *Acetobacter* sobre un medi de: extracte de llevat, 3 %; alcohol, 2 %; verd de cromocresol (1 ml d'una solució al 2,2 %, per litre); agar, 2 %¹. El medi, inicialment verd, vira per acció del creixement a groc amb motiu de la disminució del pH conseqüent a l'oxidació de l'etanol a àcid acètic, s'hi manté un cert temps i torna després al color verd inicial per la progressiva destrucció de l'àcid. Hem observat aquest comportament, característic dels cultius d'*Acetobacter* en el referit medi, en *Acetobacter aceti* 8303 (ATCC) per exemple. En el creixement sobre agar inclinat a 30° C, el viratge a groc es produeix aproximadament a les 48 h, i la segona neutralitat al voltant de les 96 hores.

Tant aquest assaig com els fets coneguts de la fermentació acètica per a l'obtenció de vinagre assenyalen que l'oxidació de l'acètic no és simultània amb la seva formació, sinó posterior. Tot i així, aquest punt no ha estat mai estudiat en relació amb el possible mecanisme diàuxic que pot suposar. Efectivament, hi ha la possibilitat que l'etanol actuï de corepressor del sistema oxidador de l'acetat, talment que, a l'oxidació d'aquest darrer, li caldria una fase de latència on se sintetitzessin l'enzim o enzims reprimits. En el present treball mostrem com la successiva utilització d'etanol i acètic per *Acetobacter* és un fenomen de diàuxia anàleg al trobat per MONOD en la utilització de glucosa i altres sucres per *E. coli* i *B. subtilis*².

Han estat obtinguts creixements d'*Acetobacter aceti* 8303 (ATCC) sobre els següents medis:

	A	B	C
Extracte de llevat	2 %	2 %	2 %
Alcohol etílic	0,50 %	0,37 %	0,25 %
Acid acètic	0,25 %	0,37 %	0,50 %

L' extracte de llevat ha estat esterilitzat en autoclau (20 minuts a 120° C) i hi han estat afegits l'alcohol o l'àcid acètic prèvia esterilització

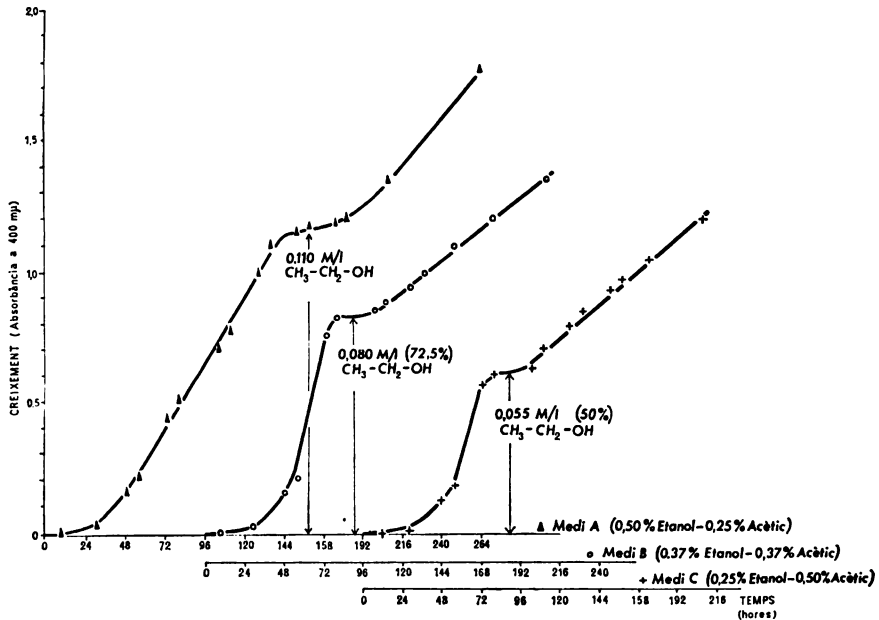


FIG. 1. — Creixement d'*Acetobacter aceti* 8303 (ATCC) en barreges etanol-acètic (amb extracte de llevat)

per filtració. Han estat inoculats, simultàniament, els tres medis amb 2 ml d'un cultiu del microorganisme en: extracte de llevat, 3 %; alcohol, 2 %. El desenvolupament del creixement ha tingut lloc a 20° C, en Erlenmeyer de 500 ml amb 100 ml de medi. El creixement ha estat controlat seguint l'absorció a 400 mμ. Els valors obtinguts són representats a les gràfiques de la figura 1.

L'estudi de la figura 1 mostra un fenomen evident de diàuxia: en presència d'alcohol, *Acetobacter* no és capaç d'utilitzar acètic, i hom de-

dueix del graó diàuxic que no hi ha inhibició de l'equip enzimàtic involucrat, sinó repressió de la seva producció. Les relacions de creixements entre els punts de diàuxia són idèntics a les relacions molars d'etanol present en cada medi. La durada de la fase de latència del creixement és molt semblant en tots tres casos. Expressat en esquema bioquímic, podem assenyalar-ho com la repressió per l'alcohol de l'enzim responsable de l'oxidació de l'acètic (acetil-CoA-intetasa).

La repressió indicada no és del tipus *feed back*; no depèn del producte final sinó del substrat inicial. Cal assenyalar també que, diferentment dels fenòmens de diàuxia citats fins ara, no es tracta de dos substrats independents sinó que, en aquest cas, la diàuxia es presenta al llarg d'una via oxidativa entre el substrat inicial i un dels intermedis que es formen.

Els dos punts anteriors són determinatius per a fixar la importància d'aquesta diàuxia en *Acetobacter* i són punt de partida per a noves recerques cap a l'aclariment total del fet. L'aspecte bioquímic d'aquests treballs es dirigirà a determinar *in vitro* la repressió de l'acetil-CoA-sintetasa per l'alcohol, mentre que en el microbiològic planteja el problema que una lesió genètica sobre *Acetobacter* que afecti l'acetil-CoA-sintetasa podria donar lloc a un pseudo-*Acetomonas* que no seria distingible per l'assaig de total oxidació de l'etanol ni, evidentment, per l'existència del cicle del citrat. És d'esperar, però, que es mantindria la diferenciació flagellar, i aquesta diferenciació morfològica és la que s'hauria de prendre com a determinativa. En microbiologia industrial, el graó diàuxic i la repressió de l'equip enzimàtic involucrat explica la possibilitat real de poder oxidar tot l'alcohol a acètic, utilitzant *Acetobacter*, sense pèrdua del rendiment estequiomètric d'alcohol a àcid. Aquest fet constatat des dels inicis de la sistematització de la fermentació acètica no havia trobat fins ara un raonament bioquímic.

BIBLIOGRAFIA

1. CARR, J. G.: *Methods for Identifying Acetic Acid Bacteria. Identification Methods for Microbiologists*. Ed. B. M. Gibbs i D. A. Supton. Ac. Press. Londres (1968).
2. CLOTET, R.: *Tesi doctoral. Universidad de Madrid* (1968).
3. MONOD, J.: *Recherches sur les croissance des cultures bactériennes. Tesi doctoral*, Editorial Hermann, París (1942).

MORT PER CARENCIA DE TIMINA I REGULACIÓ GENÈTICA DE LA SÍNTESI DE PRECURSORS DE L'ADN

per RICARD GUERRERO

Professor Agregat de Microbiologia. Departament de Microbiologia, Facultat de Ciències
i Institut de Biologia Fonamental (Nova Universitat Autònoma de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

La timina (5-metil, 2,4-dioxipirimidina), la timidina (1-β-D-2-desoxi-ribofuranosiltimina) i els seus nucleòtids normals (5' mono-, di- i trifosfat de desoxiribosiltimina) presenten la particularitat que llurs ribosil-derivats equivalents no són metabòlits normals de les cèl·lules. La timina és, doncs, l'única base nitrogenada distintiva de l'ADN, i això ha de tenir unes raons evolutives concretes i determinables¹¹. Hi ha, però, excepcions d'aquesta regla quasi universal: l'ADN d'alguns bacteriòfags de *Bacillus subtilis*^{2, 20} té uracil en comptes de timina, i els ARN de transferència¹⁰ tenen alguns monòmers de ribotimina (figura 1).

L'absència al *pool* cel·lular de quantitats significatives de nucleòtids de ribotimina implica que la biosíntesi dels fosfats de la desoxitimidina deu requerir mecanismes particulars, on no participa l'enzim ribonucleòsid-difosfat reductasa, que catalitza la reducció dels quatre difosfats de ribonucleòsid més comuns (ADP, GDP, UDP i CDP) en els 2'-desoxiribosil corresponents.

Ja el 1957, Friedkin i Kornberg descriviren a *Escherichia coli* un enzim, timidilat sintetasa, que catalitzava una metilació del monofosfat desoxiribouracil (dUMP) en el monofosfat de timidina (TMP), dependent de l'àcid tetrahidrofòlic:



* Treball dut a terme al Departament de Bacteriologia de la Universitat de Califòrnia, a Davis.

Durant la transferència, l'unitat d'un carboni és reduïda al grup metil de la timina, i resta dihidrofolat com a segon producte de la reacció. El tetrahidrofolat actua, en conseqüència, tant com a portador de la unitat C_1 com d'agent reductor. La metilació de l'àcid desoxiüridílic ha estat objecte d'una investigació intensiva per FRIEDKIN i col·laboradors⁹

Les lletres cursives sota alguns dels canvis químics dels intermediaris simbolitzen els gens que codifiquen l'enzim que catalitza la reacció, i que han estat localitzats al mapa cromosòmic bacterià. Per a llur denomina-

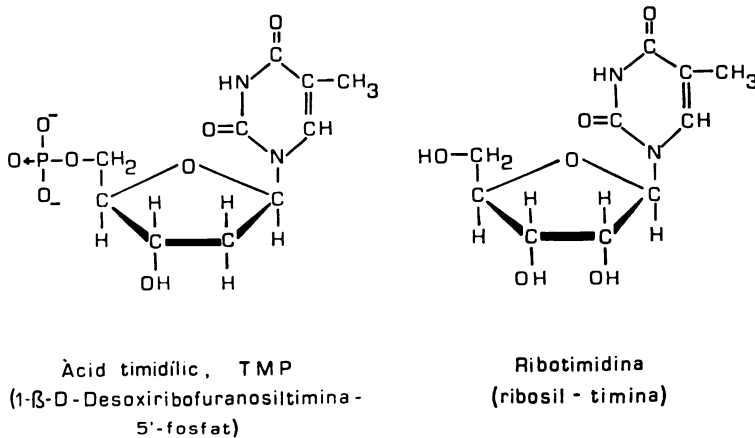


FIG. 1. — A l'esquerra, estructura del nucleòtid de timina que forma part de la cadena de l'ADN per mitjà de la polimerització 5' → 3' de molècules similars. A la dreta, estructura del nucleòtid de ribosil-timidina, que es troba als ARN de transferència

ció hom segueix, com per a la resta de la nomenclatura gènica d'aquest treball, les indicacions de DEMEREC *et al.*⁷

Genètica de la síntesi del monofosfat de timidina

La principal diferenciació entre les vies metabòliques que produeixen els nucleòtids de purina o pirimidina és el moment de síntesi de l'enllaç N-glucosídic. Mentre que en el cas de les purines és establert aviat (i abans de la síntesi de l'anell purínic), en el de les pirimidines cal la prèvia síntesi de l'anell (àcil oròtic) per l'acoblament de la ribosa activada. El procés és controlat a *E. coli* i *Salmonella typhimurium* per sis enzims codificats pels gens *pyrA*, *pyrB*, *pyrC*, *pyrE* i *pyrF*, l'últim dels quals descarboxila l'orotidina 5'-fosfat a àcid uridílic (UMP), el producte central de les pirimidines com a substrats dels àcids nucleics.

L'àcid timidílic podria ésser sintetitzat a partir d'UMP, bé per una reducció a la ribosa seguida d'una metilació a l'anell pirimídic o bé per una metilació seguida de reducció. El descobriment de FRIEDKIN i la resta d'investigadors de les vies d'interconversió de les pirimidines¹⁵ mostra la validesa de la primera alternativa (figura 2). La via acomplerta *de novo* per l'àcid timidílic a *S. typhimurium* comprèn la formació prè-

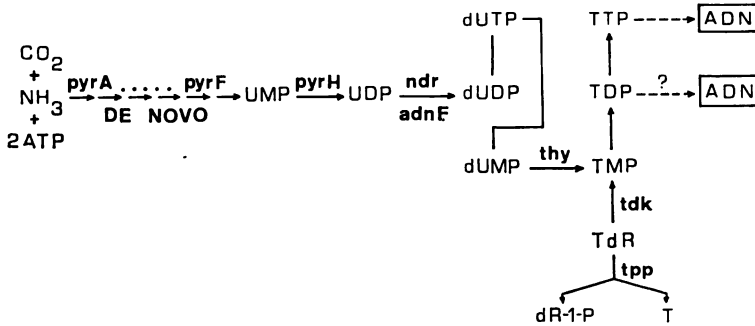
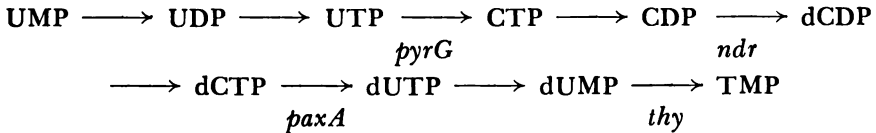
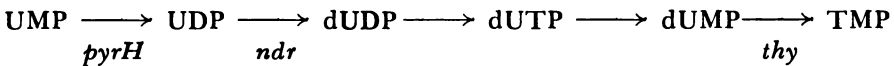


FIG. 2. — Intermediaris i *loci* que intervenen en la producció de monofosfat i trifosfat de timidina. Explicació al text

via del trifosfat de desoxicitidina, almenys pel que fa al 80 % del TMP produït:



ja que l'única via coneguda per a la formació de nucleòtids de citidina comprèn l'aminació d'UTP per l'enzim CTP-sintetasa, producte de *pyrG* a *S. typhimurium*. Una via alternativa més curta, que proporciona una petita part del TMP, comprèn la reducció directa de l'UDP a dUDP:



Indubtablement, als diferents organismes i en diferents condicions metabòliques existeixen possibles derivats d'aquestes vies. Per exemple, *E. coli*, després de la infecció pels bacteriòfags T-pars, pot manifestar una elevada activitat desaminàsica convertint directament el dCMP a dUMP^{8, 18}.

Mort per carència de timina

El fenomen de la mort bacteriana per manca de timina (*thymineless death*) és conegut fa temps⁶ a *E. coli*, però encara no ha estat explicat satisfactoriament. Quan soques auxòtrofes per a la timina són privades d'aquest substrat en un medi complet pel que fa als altres nutrients, les cèl·lules comencen a morir en nombre cada vegada més gran. És un fenomen exclusiu de la timina, puix que les soques auxòtrofes per a d'altres substàncies (incloent-hi totes les altres pirimidines i purines, aminoàcids i vitamines) no poden créixer en medis dels quals ha estat retirat el factor en qüestió, però poden recobrar la capacitat de creixement quan hi és afegit de nou. MALOE¹² utilitzà soques auxòtrofes en les quals era possible de bloquejar selectivament i independentment la síntesi d'ADN, o de proteïna o d'ARN, per exemple *E. coli* 15TAU (la qual requereix timina, arginina i uracil). Si les cèl·lules són privades alhora dels tres factors, una fracció important d'elles és immune a la mort per carència de timina. Dit d'una altra manera: sota condicions de síntesi inhibida de proteïna i ARN, alguna part de la població no resulta afectada. Aquesta fracció immune presenta dues característiques importants: 1) si els supervivents són incubats durant un temps curt en un medi complet i després transferits a un altre sense suplement, la majoria són ara sensibles a la mort per carència de timina; i 2) després de tornar al medi complet, la població presenta un grau elevat de sincronia divisional. Aquests foren els experiments capitals¹³ per a afirmar que la síntesi proteica era necessària per a iniciar la nova replicació de l'ADN, però no perquè aquesta continués una vegada iniciada. Hom postulà que la mort per carència de timina era ocasionada per «algun error irreparable durant l'intent de síntesi de l'ADN». Aquesta solució, més aviat semàntica, no ha pogut ésser superada, puix que l'absència de timina solament és letal per a l'ADN que ja es va dividint, i no per les cèl·lules que han interromput la síntesi d'ADN en el punt de començament per la manca de les proteïnes necessàries per a la iniciació.

Localització genètica de la mort per carència de timina

Poc després del descobriment del timidilat sintetasa hom demostrà³ que els dos únics mutants que requerien timina a l'abast en aquell moment, *E. coli* 15 T i *E. coli* B₃, no tenien actiu l'esmentat enzim. En els mutants condicionals sensibles al calor aïllats posteriorment, ha pogut ésser demostrada¹⁶ una disminució de fins el 98-99 % de l'activitat enzimàtica, a temperatura restrictiva (37° C). Bé que han estat citats dos loci,

thyA i *thyB*, com a responsables de la auxotròfia per a la timina, és únicament el primer, denominat en l'actualitat *thy* o bé *thyA*, el que codifica la proteïna timidilat sintetasa i determina requeriments alts de timina (uns 10 µg/ml).

El gen *thy* es troba entre les 7 i les 8 hores dels mapes genètics d'*E. coli* i *S. typhimurium*, al minut 55 d'*E. coli* i al 91 de *S. typhimurium*^{17, 19}, i fins ara era l'únic les mutacions del qual originaven auxo-

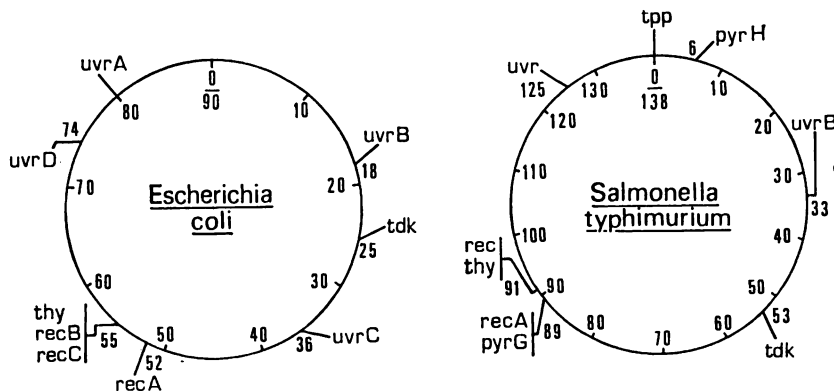


FIG. 3. — Localització aproximada al mapa d'*Escherichia coli* i *Salmonella typhimurium* d'alguns dels loci que controlen les vies metabòliques de síntesi de TMP i d'altres que intervenen directament en la síntesi o reparació de l'ADN. Les xifres indiquen la distància en minuts des de l'origen convencional

tròfia per a quantitats importants de timina; l'absència d'aquestes determinava la mort per carència.

Evidentment, l'aïllament de mutants *thy* no pot tenir lloc per contra-selecció en poblacions mutagenitzades, puix que els mutants també moririen per manca de timina. Aquesta dificultat resultà superada quan hom descobrí que una gran part dels mutants espontanis resistents a l'aminopterina o trimetoprina (antagonistes del folat) amb timina o timidina present en el medi, eren mutants *thy*. Aquests antagonistes són potents inhibidors del dihidrofolat reductasa, enzim que catalitza la formació de tetrahidrofolat a partir de dihidrofolat. El timidilat sintetasa és l'únic enzim, d'entre els que intervenen en reaccions de transferència de C₁, que consumeix (oxidant-lo) tetrahidrofolat. Per tant, l'acció continuada de l'enzim en presència de l'inhibidor esgota ràpidament les disponibilitats de tetrahidrofolat. I com que aquesta substància (o els seus derivats) és necessària en diverses vies metabòliques (iniciació de la síntesi

proteica, biosíntesi de purines, metabolisme d'alguns aminoàcids, entre altres), el tractament amb aminopterina o trimetoprima determina la interrupció de les activitats cel·lulars. Però si al medi hi ha timidina, aquells mutants espontanis amb inactivació del timidilat sintetasa redueixen enormement llur necessitat de tetrahidrofolat, i el dihidrofolat-reductasa (que no sofreix una inhibició total) pot sintetitzar les quantitats catalítiques de tetrahidrofolat requerides per a la resta del metabolisme¹⁵. L'aminopterina —per raons ben allunyades de la genètica bacteriana— ha deixat d'emprar-se, i actualment hom utilitza generalment els medis amb trimetoprima (8 µg/ml) i timidina (20-40 µg/ml) per a l'aïllament de mutants *thy*.

MATERIAL I MÈTODES

Medis de cultiu

Durant els diversos experiments, hom utilitzà un medi mínim de glucosa i sals minerals descrit per CLARK i MAALOE⁵, completament amb els substrats necessaris. Hom emprà, també, Nutrient Broth (Difco) i Nutrient Agar (Difco) com a medis complets, principalment després de la mutagènesi.

Aïllament de mutants thy i soques utilitzades

Plaques amb 40 µg/ml de timidina (Sigma) i 8 µg/ml de trimetoprima (2,4-Diamino-5-[3,4,5-Trimetoxibencil] Pirimidina) (Calbiochem) foren sembrades amb uns 10⁸ bacteris per placa. Després de dos dies foren aïllades les colònies resistents a la trimetoprima, i hom provà llur resistència a la droga i dependència de la timidina. D'aquesta manera hom pot aïllar tant mutants absoluts *thy* (que ho són a qualsevol temperatura) com mutants condicionals (que ho són solament a unes temperatures dites restrictives). Foren aïllats mutants *thy* CS (sensibles al fred, que podien créixer sense timidina a 37° C i 42° C, però no per sota dels 30° C) i *thy* HS (sensibles a la calor, que no poden créixer sense timidina per sobre dels 30° C).

La mutació *thy* conseguida a *Salmonella typhimurium* LT₂ (tipus salvatge) pot ésser passada a qualsevol altra soca per transducció amb diversos bacteriòfags.

En aquests experiments hom emprà les soques indicades a la taula I, pertanyents a la col·lecció del Departament de Bacteriologia de la Universitat de Califòrnia, a Davis.

TAULA I

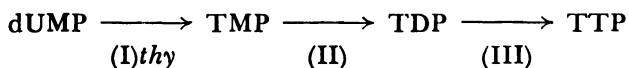
Soques de *S. typhimurium* emprades per a la selecció de mutants *thy* i en loci després de la formació de TMP

Soca núm.	Genotip	Fenotip
JL 1205	<i>pyrC1502, cdd9, cod8, tpp1, udp11, thy1388</i>	Auxòtrof per a l'uracil per damunt de 30° C Auxòtrof per a la timidina a qualsevol temperatura
JL 1233	<i>thy1392</i>	Auxòtrof per a la timidina per damunt dels 30° C. A 30° C i temperatures inferiors, tipus salvatge
LT ₂	Salvatge (LT ₂)	Salvatge

Selecció de mutants defectius en trifosfat de timidina

El procediment de selecció es basava en la tècnica de BONHOEFFER i SCHAEFFER⁴, amb les modificacions adients per a evitar la mort per carència de timina.

El darrers passos metabòlics que condueixen a la síntesi de trifosfat de timidina (TTP) són:



Al pas (I) hom coneix mutants *thy*, i ha estat purificat l'enzim i determinada la seva activitat, tal com ha estat esmentat. Al pas (II) hom coneix l'enzim¹⁴, però no hi han estat citats mutants. Al pas (III) hom no coneix l'activitat de l'hipotètic enzim (timidina 5'-difosfatkinasa), ni hi han estat citats mutants. Prèviament al present treball, en els bacteris no havien estat citats enzims (5'-nucleotidasa) que específicament degradesin qualsevol dels esmentats intermediaris.

El mètode utilitzat per a la selecció és el següent:

1. Incubació en medi mínim 37° C.
2. Mutagènesi amb nitrosoguanidina (Eastman-Kodak) 100 µg/ml, 20 min., en les condicions descrites per ADELBERG i col·lab.¹.
3. Expressió fenotípica dels mutants per incubació d'una nit.
4. Incorporació de 5-bromo-desoxiüridina (50 µg/ml), un poderós anàleg de la timidina. Per evitar la mort per carència, hom ha assa-

jat amb èxit l'addició de 2 a 5 $\mu\text{g/ml}$ de timidina. La incorporació de l'anàleg és molt bona en el cas de JL 1205, a causa dels seus marcadors *udp* (no pot degradar la uridina) i *tpp* (vegeu fig. 2).

5. Irradiació amb llum UV d'ona llarga (313 nm). Les cèl·lules que contenen l'anàleg en llur ADN són molt més sensibles que les que hi tenen només timidina. Aquest fet ofereix la possibilitat de seleccionar positivament mutants entre una població amb un gran nombre de cèl·lules salvatges. Temps d'irradiació: 15, 30 i 45 minuts.

6. Extensió en plaques amb medi mínim de la fracció supervivent. Incubació: 36 hores a 30° C.

7. Còpia en plaques (*replica plating*) a 20°, 30° i 37° C.

8. Tria dels mutants condicionals morts per carència de timina.

RESULTATS I CONCLUSIONS

Foren aïllats diversos mutants condicionals a la temperatura, tant HS com CS. Tots ells presentaven el següent fenotip a temperatura restrictiva: 1) no podien créixer àdhuc amb timidina; 2) no solament no creixien sinó que morien, puix que tornats a temperatura permissiva no podien recobrar-se; i 3) els *pools* cel·lulars de TTP eren anormalment baixos (mesurats per mitjà de la cromatografia de capa prima).

Entre el mutants sensibles al fred, un (JL 1301) tenia el fenotip descrit, però les activitats *in vitro* de les seves TMP-cinasa i TDP-cinasa eren similars a la soca mare (JL 1205). L'aparent concentració final quasi nul·la de TTP (vegeu taula II) al mutant és en realitat efecte d'una desaparició dels productes formats, puix que en els primers minuts la síntesi de TDP i TTP té una cinètica enzimàtica semblant (taula II).

Aquesta baixa concentració de TTP i subsegüent mort per carència de timina és produïda per l'activitat d'una TMP 5'-nucleotidasa específica (E.C. 3.1.3.—) que amb la seva activitat supera la capacitat sintètica de la timidina-cinasa i fa decreixer significativament la quantitat de TMP que va cap a l'ADN. El TMP 5'-nucleotidasa és també present a la soca mare, però amb una activitat molt més baixa, i compatible amb la vida normal de les cèl·lules. El temps de generació del mutant a temperatura permissiva és molt més llarg. A temperatura restrictiva n'aturen el creixement i moren.

Aquesta nova mutació, denominada provisionalment *tmf* (mnemotècnica: TMP fosfatasa), pot ésser afegida gràficament a la figura 2, suposant que el TMP és degradat ràpidament a timidina (la qual cosa fou demostrada experimentalment per cromatografia de capa prima, on els extrems de JL 1301 feien aparèixer una taca de timidina a partir del TMP mar-

TAULA II

Activitat enzimàtica dels extrems de *S. typhimurium* JL 1205 (soca original) i JL 1301 (mutant) emprant TMP marcat com a substrat. Les xifres indiquen la radioactivitat (cpm) mesurada sobre cromatogrames

Soca	Temps de reacció	TMP	TDP	TTP	Total	Diferència
JL 1205	0 min.	19500	0	0	19500	0
	5	18175	226	948	19349	151
	10	17559	493	1227	19279	221
	20	15837	894	1674	18405	1095
	40	12935	1400	2073	16408	3092
	80	9925	2218	2224	14367	5133
	120	7148	2728	1758	11634	7866
JL 1301	0 min.	19500	0	0	19500	0
	5	16899	116	488	17503	1997
	10	13223	250	692	14165	5335
	20	10050	518	821	11389	8111
	40	6600	880	816	8296	11204
	80	3623	1004	523	5150	14350
	120	2035	634	174	2843	16657

cat) i té, per tant, un efecte oposat al cinasa de la timidina (codificada per *tdk*, vegeu fig. 2).

La mutació és reversible per transducció amb el bacteriòfag P22(L4) o per reversió espontània. L'activitat de la TMP 5'-nucleotidasa en aquests revertents és la mateixa que a la soca mare. Per contra, quan el *locus thy* és el curat per transducció, les cèl·lules que tenen la nova mutació (*tmf*) encara no poden créixer a temperatura baixa (20° C).

Per tant, una soca amb una activitat normal de la timidilato-sintetasa pot resultar morta per carència de timina en presència d'aquesta. Aquest fenotip pot ésser explicat per una nova mutació que codifica una alta velocitat de degradació del TMP sintetitzat per les cèl·lules.

Agraïments

L'autor agraeix el gran ajut del senyor Enric Herrero i Perpiñán, sobretot pel que fa a la preparació de les figures i a la recerca bibliogràfica.

BIBLIOGRAFIA

1. ADELBERG, E. A., MANDEL, M. i CHEIN CHING CHEN, G.: *Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in Escherichia coli K 12*. «Biochem. Biophys. Res. Com. 18: 788-795 (1965).
2. APOSHIAN, H. V., *A dTMPase found after infection of Bacillus subtilis with phage SP5C*. «Biochem. Biophys. Res. Com.», 18: 230-235 (1965).
3. BARNER, H. D. i COHEN, S. S., *Virus-induced acquisition of metabolic function. IV. Thymidilate synthetase in thymine-requiring Escherichia coli infected by T2 and T5 bacteriophages*. «J. Biol. Chem.», 234: 2987-2991 (1959).
4. BONHOEFFER, F. i SHAELEER, H., *A method for selective enrichment of mutants based on the high UV sensitivity of DNA containing 5-BU*. «Biochem. Biophys. Res. Com.», 20: 93-97 (1965).
5. CLARK, D. J. i MAALOE, O., *DNA replication and the division cycle in Escherichia coli*. «J. Mol. Biol.», 23: 99-112 (1967).
6. COHEN, S. S. i BARNER, H. D., *Studies on unbalanced growth in E. coli*. «Proc. Nat. Acad. Sci. USA», 40: 885-893 (1954).
7. DEMEREC, M., ADELBERG, E. A., CLARK, A. J. i HARTMAN P. E., *A proposal for an uniform nomenclature in bacterial genetics*. «Genetics», 54: 61-76 (1966).
8. FLEMING, W. H. i BESSMAN, M. J., *The enzymology of virus-infected bacteria. IX. Purification and properties of the deoxycytidilate deaminase of T6-infected Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 242: 363-371 (1967).
9. FRIEDKIN, M. i KORNBURG, A., *The enzymatic conversion of deoxyuridilic acid to thymidilic acid and the participation of tetrahydrofolic acid*, 609-613. A W. D. McElroy i B. Glass (eds.), *A symposium on the chemical basis of heredity*. John Hopkins Press, Baltimore 1957.
10. HOLLEY, R. W., APGAR, J., EVERETT, G. A., MADISON, J. T., MARQUISSE, M., MERRILL, S. H., PENSWICK, J. R. i ZAMIR, A., *Structure of a ribonucleic acid*. «Science», 147: 1462-1465 (1965).
11. LESK, A. M., *Why does DNA contain thymine and RNA uracil?* «J. Theoret. Biol.», 22: 537-540 (1969).
12. MAALOE, O., *The control of normal DNA replication in bacteria*. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 26: 45-52 (1961).
13. MAALOE, O. i HANAWALT, P. C., *Thymine deficiency and the normal DNA replication cycle. I*. «J. Mol. Biol.», 3: 144-155 (1961).
14. NELSON, D. J. i CARTER, C. E., *Purification and characterization of thymidine 5'-monophosphate kinase from Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 244: 5354-5262 (1969).
15. O'DONOVAN, G. i NEUDHARD, J., *Pyrimidine metabolism in microorganisms*. «Bacteriol. Rev.», 34: 278-343 (1970).
16. ROODMAN, S. T. i GREENBERG, G. R., *A temperature-sensitive thy mutant blocked in the synthesis of thymidilate synthetase*. «J. Biol. Chem.», 246: 2609-2617 (1971).
17. SANDERSON, K. E., *Linkage map of Salmonella typhimurium*. Edition IV. «Bacteriol. Rev.», 36: 558-586 (1972).
18. SCOCCA, J. J., PANNY, S. R. i BESSMAN, M. J., *Studies of deoxycytidilase deaminase from T4-infected Escherichia coli*. «J. Biol. Chem.», 244: 3698-3706 (1969).
19. TAYLOR, A. L. i TROTTER, C. D., *Linkage map of Escherichia coli Strain K-12*. «Bacteriol. Rev.», 36: 504-524 (1972).
20. TOMITA, F. i TAKAHASHI, I., *A novel enzyme, dCTP deaminase, found in Bacillus subtilis infected with phage PBS1*. (Biochem. Biophys. Acta), 179: 18-27 (1969).

PRODUCCIÓ D'EMFISEMA PULMONAR EXPERIMENTAL EN EL GOS *

per B. VICENS

Servei d'Asmatologia i Al·lèrgia. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
(Dr. R. Frouchtman).

G. PALACIOS

Càtedra d'Histologia, Facultat de Medicina de la Universitat Autònoma
de Barcelona.

i

A. SITGES, X. RIUS, J. BOFILL i J. REVENTÓS

Servei de Cirurgia Experimental. Hospital de la Santa Creu i Sant Pau.
(Dr. J. Reventós).

INTRODUCCIÓ

La definició d'emfisema és basada en l'actualitat en una constatació anatomo-patològica. És així que l'O.M.S. la defineix com «una sobredensió dels espais aeris amb trencament dels septes intraalveolars»¹³.

Un dels mètodes utilitzats avui dia per a la producció de l'emfisema experimental, possiblement el més interessant en l'actualitat, és el basat en la destrucció del teixit elàstic pulmonar, mitjançant l'administració local d'enzims proteolítics, dotats d'acció elastolítica. La possibilitat de produir un quadre similar al de l'emfisema centrolobellar o panlobellar, mitjançant l'administració de papaïna fou demostrada en la rata per GROSS i col·lab. el 1965⁴, i per JOHANSON jr. i col·lab. el 1971⁶, i en el gos per MARCO i col·lab. el 1969⁸, i per PUSHPAKOM i col·lab. el 1970¹². Un efecte similar al de la papaïna fou aconseguit amb l'elastasa pancreàtica per JOHANSON jr. i col·lab. el 1972⁵, bé que en el curs dels mateixos experiments aquest autor fracassà amb la colagenasa clostridial i, abans que ell, GROSS i col·lab.⁴ també fracassaren amb l' α -quimiotripsina.

* Aquest treball ha estat possible gràcies a l'ajut de la Fundació «Maria Francesca Roviralta» de Barcelona.

MATERIAL I MÈTODE

Dotze gossos foren sotmesos al protocol experimental següent: foren anestesiats amb pentotal sòdic (20 mg/kg) i intubats. En 8 foren col·locats dos catèters per via retrògrada, un a l'artèria pulmonar i un altre a l'aorta, per a mesurar pressions, mitjançant un electromanòmetre. A tots els animals fou practicada una biòpsia pulmonar mitjançant toracotomia. Immediatament després, fou injectada, per tub endotraqueal una solució de 2 mg/kg de pes de papaïna i connectat tot seguit l'esmentat tub al respirador (bomba de Starling). Durant tres setmanes seguides fou repetida aquesta injecció endotraqueal a la mateixa dosi, amb l'animal adormit.

A més d'haver estat administrada la primera dosi de papaïna, fou practicada una nova biòpsia pulmonar, per toracotomia al costat oposat, i foren preses de nou les pressions a l'aorta i a l'artèria pulmonar. Al cap de 4-6 mesos després de la primera biòpsia, hom en féu la tercera, indiferentment en un costat o en l'altre.

RESULTATS

a) *Anatomia patològica.* En cap de les biòpsies practicades prèviament a la inhalació de papaïna no aparegueren alteracions anatomo-patològiques compatibles amb l'emfisema pulmonar. En tots els animals, als quals ha estat efectuada biòpsia pulmonar després de les administracions de papaïna, apareix macroscòpicament un parènquima similar al de l'emfisema hipertròfic del lactant. Microscòpicament hi foren vistes lesions emfisematoses, bé que la intensitat de les lesions esmentades varià d'uns animals a uns altres. Les lesions emfisematoses predominaren en les zones subpleurals. També hi foren vistes d'altres lesions, com edema i hemorràgia intraalveolars i focus pneumònics (figs. 1, 2, 3).

En les biòpsies efectuades tardanament, al cap de 4-6 mesos d'iniciat l'experiment, hi foren observades alteracions anatomo-patològiques de tipus emfisematós del mateix grau que les observades en la segona biòpsia. En les biòpsies tardanes foren vistes també, alguna vegada, zones d'edema i pneumònia en regressió (taula II i fig. 4).

b) En cap dels casos estudiats no pogué ésser constatada una elevació significant de la pressió de l'artèria pulmonar, tot tenint-ne en compte una d'aòrtica similar, en els mesuraments fets, tant en la segona biòpsia com en la tercera (taula I).

TAULA I

Valors manomètrics

Abans de la papaïna			Després de la papaïna Precoç, abans de 4 setmanes		Després de la papaïna Tardà, després de 3 mesos	
693	A	160/80	A	175/90	—	
	AP	35/8	AP	50/15	—	
709	A	50/15	A	85/60	—	
	AP	40/25	AP	50/20	—	
712	A	130/105	A	170/80	—	
	AP	125/100	AP	105/80	—	
713	A	145/100	A	160/125	—	
	AP	20/5	AP	35/20	—	
721	A	160/100	—	—	A	130/100
	AP	20/12	—	—	AP	27/8
730	A	60/10	A	45/20	A	123/70
	AP	10/5	AP	10/5	AP	35/20
734	A	130/80	—	—	A	92/62
	AP	20/5	—	—	AP	55/5
735	A	130/50	A	92/62	A	140/80
	AP	55/5	AP	65/10	AP	60/18
793	A	110/50	A	160/130	—	
	AP	15/5	AP	30/15	—	

A Pressió a l'aorta
AP Pressió a l'artèria pulmonar

DISCUSSIÓ

Els mètodes assajats per a obtenir emfisema pulmonar en l'animal de laboratori han estat múltiples: obstrucció traqueal i sobredistensió pulmonar¹⁰, immobilització i descens del diafragma¹⁰, alteració de la forma de la gàbia toràctica⁹, sobredistensió d'una àrea per resecció de la veïna⁹, hipòxia crònica^{1, 11}, broncospasme del llit vascular pulmonar¹⁴, insult químic per òxid de nitrogen⁷, inhalació de pols de quars⁴, exposició del

TAULA II

Cronologia de les injeccions traqueals de papaina relacionades amb el resultat anatomopatològic de les biòpsies pulmonars.

Núm.	1.ª Inhal.	2.ª Inhal.	3.ª Inhal.	Biòpsia prèvia papaina	1.ª Biòpsia	2.ª Biòpsia
692	5-X-71	13-X-71	20-X-71	Pulmó normal 5-X-71	25-X-71 Emfisema +++ Focus pneumònic Edema. Hepatització	13-III-72 Emfisema +++ Atelèctasi Edema
693	8-X-71	14-X-71	20-X-71	Pulmó normal 8-X-71	28-X-71 Emfisema + en zones subpleurals	14-III-72 Emfisema + en zones subpleurals
697	18-X-71	25-X-71	31-X-71	Pulmó normal 18-X-71	6-XI-71 Emfisema +++ Quistos aeris Edema	7-XI-71 Mort.
702	22-X-71	29-X-71	5-XI-71	Pulmó normal 22-X-71	12-XI-71 Emfisema + Infiltrats pneumònics. Edema	9-III-72 Emfisema + subpleural
709	29-X-71	5-XI-71	12-XI-71	Pulmó normal 29-X-71	19-XI-71 Emfisema +++ Quistos aeris Atelèctasi Focus pneumònics	2-IV-72 Emfisema +++ Quistos aeris Edema
712	4-XI-71	11-XI-71	18-XI-71	Pulmó normal 4-XI-71	7-XII-71 Emfisema ++ Quistos Edema Focus pneumònics Atelèctasi	16-III-72 Emfisema ++ Quistos Focus pneumònics en resolució Atelèctasi
713	5-XI-71	12-XI-71	19-XI-71	Pulmó normal 5-XI-71	6-XII-71 Emfisema +++ sobretot subpleural Edema	13-III-72 Emfisema +++ subpleural Edema
721	12-XI-71	19-XI-71	27-XI-71 2-XII-71 16-XII-71	Pulmó normal 12-XI-71	16-XII-71 Emfisema ++ sobretot subpleural Atelèctasi	1-VI-72 Emfisema ++ Atelèctasi Focus pneumònics en resolució
730	25-XI-71	1-XII-71	7-XII-71 14-XII-71 24-XII-71	Pulmó normal 25-XI-71	24-XII-71 Emfisema ++ Quistos aeris Focus pneumònics	23-III-72 Emfisema +++ sobretot subpleural
734	3-XII-71	9-XII-71	15-XII-71	Pulmó normal 3-XII-71	14-I-72 Emfisema + Edema	10-III-72 Emfisema ++ Edema
735	10-XII-71	15-XII-71	24-XII-71	Pulmó normal 10-XII-71	14-I-72 Emfisema +++ Zones atelectàsiques	10-III-72 Emfisema ++ subpleural Focus pneumònics en resolució
793	16-III-72	20-III-72	24-III-72	Pulmó normal 16-III-72	21-IV-72 Emfisema +++ Quistos aeris Atelèctasi	1-IV-72 Emfisema +++ Quistos aeris Atelèctasi

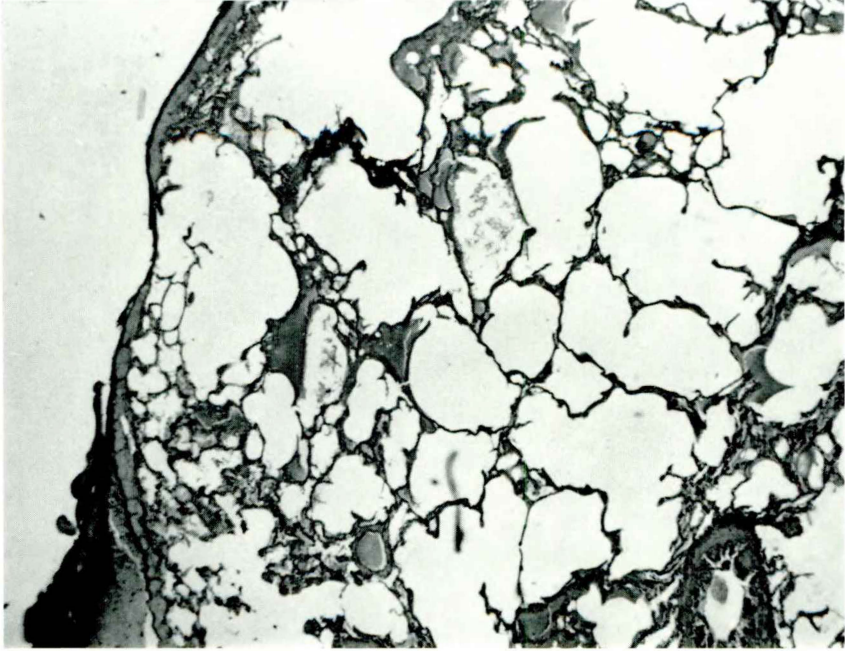


FIG. 1. — Imatge típica d'emfisema pulmonar provocat per papaïna al cap de quatre setmanes d'haver estat instil·lat per la tràquea. Observen la seva situació subpleural, així com la ruptura dels septes

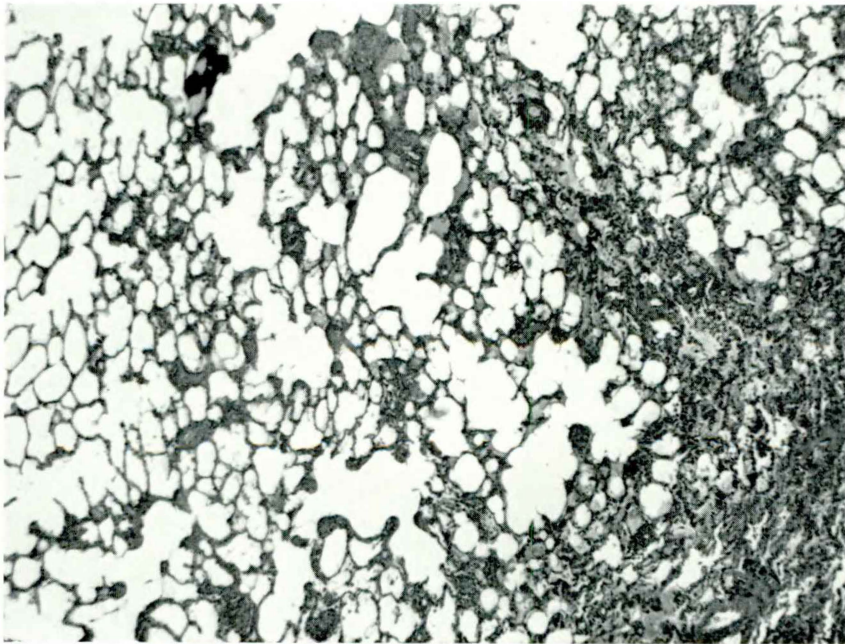


FIG. 2. — Una altra imatge característica d'emfisema pulmonar provocat al cap de quatre setmanes d'iniciada la instil·lació traqueal de papaïna. Observen l'edema intraalveolar i els focus pneumònics

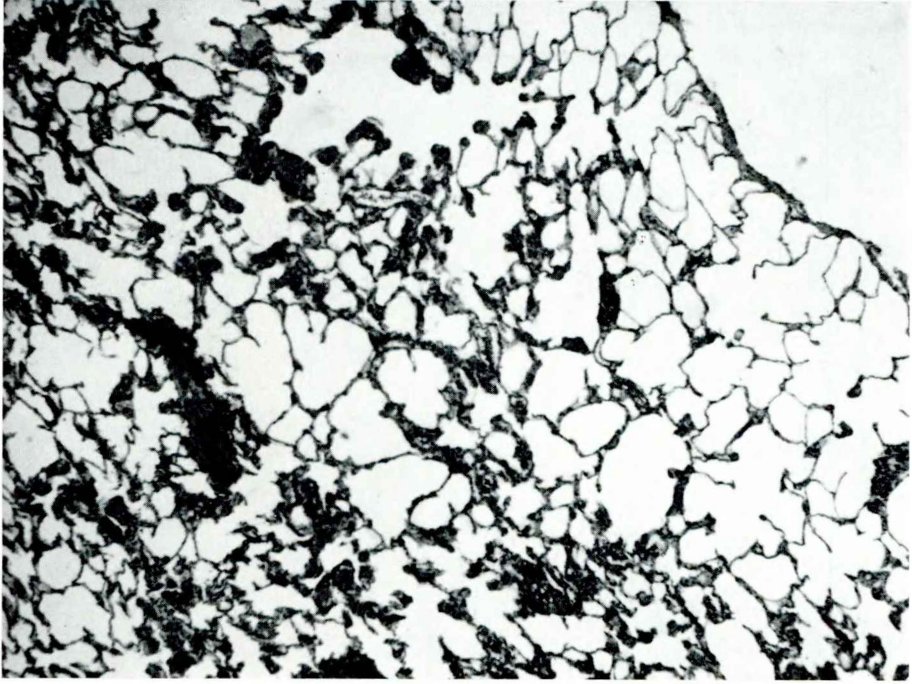


FIG. 3. — Imatge d'emfisema pulmonar en localització subpleural al cap de set mesos d'iniciades les instil·lacions traqueals (tres en total, practicades setmanalment)

tòrax als raigs X³ i sensibilització enfront del mateix teixit pulmonar³, i finalment destrucció química del teixit pulmonar mitjançant enzims proteolítics^{4, 5, 6, 8, 12}.

Només alguns d'aquests mètodes s'han mostrat realment eficaços en la producció de lesions anatomo-patològiques similars a les de l'emfisema: la hipòxia crònica, l'alteració del llit vascular pulmonar, la inhalació d'òxid de nitrogen, l'exposició als raigs X i l'administració intrapulmonar de papaïna o elastasa pancreàtica.

El fet que únicament dos dels quatre enzims proteolítics assajats hagin estat capaços de reproduir lesions semblants a les de l'emfisema, i que siguin precisament els que tenen un poder elastolític, sembla confirmar que l'etiopatogènia està relacionada amb l'elastòlisi. Poden ésser fetes, però, unes certes objeccions a aquesta tesi, puix que els gossos tractats per GROSS i col·lab.⁴, amb α -quimiotripsina, no acusaren l'aparició de signes d'inflamació, i això podria ésser degut al fet que l' α -quimiotripsina hagués pogut ésser neutralitzada abans d'haver pogut exercir cap mena d'acció irritant, si és que en té. Els resultats obtinguts *in vitro* amb papaïna, elastasa i collagenasa per JOHANSON jr. (1972)⁵, són dificultosos de valorar, perquè els mecanismes de resposta de l'ésser vivent eren absents. En els nostres gossos, les imatges de pneumònia eren tan evidents, que creiem que el resultat anatomo-patològic final podria ésser degut no pas únicament a l'acció elastolítica de la papaïna, sinó també a la resolució de la brutal pneumònia química que es produeix, i possiblement a la degradació de la substància tensoactiva pulmonar amb alteració de l'estabilitat dels sacs alveolars.

Considerem, per tant, que l'emfisema és una lesió a què podem arribar per diversos camins i que la seva producció experimental en el gos mitjançant l'administració intrapulmonar de papaïna, bé que no ens aclareix res sobre el discutit paper del dèficit d' α -antitripsina en la gènesi de l'emfisema essencial de l'home, ens obre un camí per a estudis ulteriors que potser seran més resolutius.

SUMARI

En 12 gossos hom provocà emfisema pulmonar, mitjançant l'administració intratraqueal de papaïna, a dosi de 2 mg/kg setmanals durant un mes. Al cap de 5 setmanes fou efectuada la biòpsia pulmonar, i hom hi trobà emfisema en tots els casos, bé que en un grau variable. No pogueren ésser detectades elevacions conspícues en la pressió de l'artèria pulmonar. Entre 4-6 mesos després d'haver cessat l'administració de papaïna, hom tornà a practicar una nova biòpsia pulmonar al costat oposat

d'on havia estat practicada l'anterior. Les lesions emfisematoses persistien i eren del mateix grau que en la biòpsia primitiva.

Reconeixement.—Desitgem donar les gràcies a la Srta. M. L. Martínez, perquè ens ha assistit en els nostres experiments, especialment per haver practicat les inhalacions de papaïna als gossos. També agraïm al Sr. M. A. López el seu ajut en les tasques de secretaria.

BIBLIOGRAFIA

1. CABELL, J. A., *Note on some pathological changes in the tissues during an attempted acclimatization to alterations of oxygen pressure in the air.* «Brit. J. Exper. Path.», 3, 347 (1927).
2. DE VILLIERS, A. J., *The morphologic changes induced in the lungs of hamsters and rats by external radiation (X-rays).* «A study of experimental carcinogenesis». Dissertation Submitted to the Graduate School of Public Health, University of Pittsburg, in partial fulfillment of the requirements for the Degree of Doctor of Science (1964).
3. EISEMAN, B., PETTY, T. i SILEN, W., *Experimental Emphysema.* «Am. Rev. Resp. Dis.», 80, 147 (1959).
4. GROSS, P., BABYAK, B. S., TOLKER, E. K. i KASCHAK, M., *Enzymatically Produced Pulmonary Emphysema A Preliminary Report.* «Jour. of Occupational Medicine», 6, 481 (1964).
5. JOHANSON, W. G. jr. i PIERCE, A. K., *Effects of Elastase Collagenase and Papain on Structure and Function of Rat lungs in Vitro.* «The Jour. of Clinical Investigation», 51, 288 (1972).
6. JOHANSON, W. G. jr., PIERCE, A. K. i REYNOLDS, R. C., *The evolution of Papain Emphysema in the Rat.* «J. Lab. Clin. Med.», 78, 599 (1971).
7. KLEINERMAN, J. i WRIGHT, G. W., *Experimental production of a lesions resembling human microbullous emphysema.* «Fed. Proc.» 21, 439 (1962).
8. MARCO, V., MERANZE, L. R., BENTIVOGLIO, G. i KIMBEL, PH., *Papain induced Emphysema in the Dog.* «Physiology» (1480-1483) 526.
9. NISSEN, R., *Experimentelle Untersuchungen zur Theorie der Entstehung des Lungen Emphysems.* «Deutsche Ztschr. f. Chir.», 200, 177 (1927).
10. PAINE, J. R., *Studies in the Experimental production of pulmonary emphysema in animal.* «Jour. Thor. Surg.», 10, 150 (1940).
11. PRINZMETAL, M., *The relation of inspiratory distention of the lungs to emphysema.* «J. Allergy», 5, 493 (1933-1934).
12. PUSHPAKOM, S., HOGG, J. C., WOOLCOCK, A. J., MACKLEM, D. T. i THURLBECK, W. M., *Experimental Papain-Induced Emphysema in Dogs.* «Amer. Rev. Resp. Dis.», 102, 778 (1970).
13. W. H. O., *Report of an Expert Committee on Chronic Cor Pulmonate.* «Techn. Rep. Serv.», 213, 15 (1961).
14. WDKOWICZ, L. i ARMSTRONG, J. B., *The bronchial arteries in pulmonary emphysema.* «Thorax», 8, 46 (1953).

VALOR MORFOLÒGIC DE LA PALINGÈNESI I LA CENOGENÈSI

per ENRIC GADEA i BUISAN

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

Mentre l'organisme en formació viu i es desenvolupa a despeses de les reserves vitel·lines de l'ou, participa de la condició d'embrió; però si passa a la vida lliure abans de completar el desenvolupament, el període de llibertat durant el qual l'organisme creix i evoluciona morfològicament constitueix la seva vida larvària. S'esdevé sovint que, en aquestes circumstàncies, l'animal revesteix uns certs aspectes especials o particulars que es conserven durant un cert temps i que assenyalen en l'evolució larvària estadis o moments definibles morfològicament (formes larvàries). Aquests estats o formes plantegen la qüestió de saber si són el resultat accidental de la vida postembrionària, tal com és acomplerta actualment, o bé si són determinats per les qualitats anteriors o ancestrals de l'animal i són precisament la causa del gènere de vida que porten.

Des de la formulació per HAECKEL (1866) de l'anomenada llei de recapitulació, un bon nombre de zoòlegs i morfòlegs han mostrat tendència a considerar les formes larvàries (i àdhuc embrionàries) com si fossin repeticions ontogèniques d'estats ancestrals pels quals els animals que les presenten han passat anteriorment i els han viscuts com adults, abans d'adquirir la forma i organització que actualment ofereixen. L'argument d'aquest punt de vista rau en el fet que, en certs casos, les formes larvàries en qüestió apareixen ja als ous, sense que hagi mitjançat cap mena de vida lliure per a determinar-les.

Hi ha, però, larves en què no sembla acomplir-se la condició anterior, sinó que llurs caràcters morfològics es manifesten en el transcurs de l'ontogènia sota la influència de la vida postembrionària actual, després que l'organisme ha adquirit la forma adulta que el caracteritza. Les larves dels insectes holometàbols corresponen a aquest tipus, mentre que les dels crustacis decàpodes pertanyen a les del tipus anterior.

En aquestes dues maneres de comportar-se el procés ontogènic va implícita respectivament la idea de la palingènesi i de la cenogènesi, de tanta transcendència filogenètica. Els caràcters palingenètics són els únics que tenen significació en l'evolució morfològica i la filogènia, puix que representen —sempre dins uns determinats límits imposats per modificacions secundàries, desviacions, abreviacions, etc.— estats o formes de recapitulació en el procés de l'ontogènia. Per contra, els caràcters cenogenètics, pel fet d'ésser de nova adquisició (transitoris o definitius), no tenen cap significació ancestral per a la interpretació morfològica.

Cal tenir en compte que considerar el curs del desenvolupament com un procés exclusivament palingenètic és un error, com ho és tanmateix (i més i tot encara) no discernir els caràcters cenogenètics dels deguts a la palingènesi. Així i tot, ambdós són errors en què hom ha incorregut sovint. En realitat, ambdós processos s'impliquen mútuament i cal saber-los dilucidar. El desenvolupament d'un organisme és degut a una suma de causes històriques i de causes actuals. En els processos ontogènics, les disposicions ancestrals es modifiquen o se simplifiquen, i poden arribar fins i tot a perdre's, i quedar-ne només rudiments o vestigis com a únic testimoni, ensems que d'altres caràcters nous es desenvolupen i moltes vegades emmascaren els anteriors.

Aquesta manera d'entendre el significat de les formes larvàries i els estats embrionaris és l'únic que té sentit morfològicament i que en permet l'aplicació racional a la filogènia. Amb magistral claredat, alguns autors del segle passat com SERRES (1824), VON BAER (1828), MÜLLER (1866) i el mateix HAECKEL (1866), i posteriorment WEISSMANN (1904), MCBRIDE (1914), SABBADIN (1963), DE BEER (1971) i d'altres, exposaren ja aquests punts de vista.

La qüestió de la palingènesi morfològica resta estretament lligada a la de l'homologia, base de tota disquisició morfològica ferma. Com que el desenvolupament filogenètic de molts òrgans i organismes no pot ésser estudiat directament, el procés ontogènic és el que pot proporcionar-ne les relacions d'afinitat i les homologies. En molts casos, els estudis d'aquesta natura han resultat molt valuosos; però n'hi ha d'altres, per contra, que han conduït a conseqüències absurdes: això és, precisament, el que cal evitar.

BIBLIOGRAFIA

1. BAER, K. E. VON, *Über Entwicklungsgeschichte del Tiere. Beobachtung und Reflexions* (Koenigsberg 1828).
2. BEER, G., *Homology, an unsolved problem*. «Oxford Biology Readtr», 11 (1971).
3. GADEA, E., *La ley biogenética fundamental a los cien años de su enunciado*. «Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. (Biol.)», 64 (1966).

4. GARSTANG, W., *The theory of recapitulation. A critical restatement of biogenetic laws.* «*Jour. Linn. Soc. London, Zool.*», 35 (1922).
5. HAECKEL, E., *Generelle Morphologie der Organismen* (Berlin 1866).
6. JEANNEL, R., *La marche de l'évolution* (Paris 1950).
7. MCBRIDE, E. W., *Textbook of embryology* (Londres 1914).
8. MÜLLER, F., *Für Darwin* (Leipzig 1864).
9. SABBADIN, A., *L'anatomia comparata nel suo sviluppo e nel suo significato attuale.* «*Mem. Acc. Patav. S.L.A.*», 75, (1963).
10. SERRES, M., *Recherches sur l'anatomie comparée des animaux invertébrés.* «*Ann. Sc. Nat. (Zool.)*» (Paris 1824).
11. WEISMANN, A., *The evolution theory* (trad. angl.) (Londres 1904).

ANOMALIES DEL CREIXEMENT FETAL

per CARLES CARCELLER i BLAY

Director de l'Institut de Maternologia de la Diputació
de Barcelona

Creixement normal del fetus

Des del punt de vista biològic, el creixement és un procés complex que condueix a un augment de grandària, de talla o de massa d'un ésser viu i ensems origina una diferenciació que permet unes funcions que el portaran a una plenitud o maduresa.

Aquest procés aplicat a un òrgan concret o a un animal determina un augment de massa corporal i resulta d'una aportació ininterrompuda de proteïnes i, en alguns casos, de lípids. Per tant, l'índex de síntesi neta de proteïnes regeix la rapidesa del creixement i, com que és lineal, podríem pensar que és homogeni; però això és tan sols un aspecte del procés, puix que ara hi intervé un altre factor: el nombre de cèl·lules i llur mida (WINICK)¹². Cal distingir, doncs, tres graus fonamentals: l'augment del nombre de cèl·lules, l'augment de la mida cel·lular i l'aplegament de material intercel·lular, no viu. En conseqüència hi ha en el creixement tres fases:

1. Augment progressiu de pes, proteïnes i concentració d'ADN. (hiperplàsia).
2. Augment més lent d'ADN que el de proteïnes i pes (hiperplàsia i hipertròfia).
3. Manca d'augment d'ADN, però augment de proteïnes i pes (hipertròfia).

Cal acceptar, doncs, que el creixement no és un fenomen homogeni des del punt de vista cel·lular, per la qual cosa els estímuls que retarden o empenyent el creixement tindran diferents efectes segons que influeixin sobre l'índex de divisió cel·lular (síntesi d'ADN) o afectin l'augment ulterior del volum cel·lular.

Entre els diversos paràmetres per a avaluar el creixement, el més pràctic és la corba de pes que utilitzem a la clínica, però no hem d'ignorar tampoc la complexitat del procés, per tal de comprendre'n les variacions.

Durant la gestació, la massa del fetus es multiplica per $6 \cdot 10^9$. El creixement no és uniforme, augmenta ràpidament a mesura que la gestació avança. La corba s'atura entre la setmana 32 i la 36 (GIBSON)³. L'estructura orgànica s'origina per una diferenciació cel·lular en la fase embrionària, però gran part de l'augment de grandària esdevé en el període fetal. Després del lent període inicial, que dura fins a l'aparició del solc primitiu (que correspon a l'època en què s'estableix la funció placentària), la taxa de creixement s'adapta a una llei cúbica referida al temps. L'equació és: $W = a (t-t')^3$. W és el pes del fetus en una determinada època de gestació, a és una constant que expressa la taxa d'elements nutricis per unitat de superfície fetal, t és el nombre de dies de gestació transcorreguts i t' és la durada (en dies) del període inicial. En l'home la vàlua de a és $0,24 \times 10^6$ i el valor de t' és 36 (PAYNE i WHEELER)¹¹.

Les reserves de greix del teixit adipós, acumulades pel fetus humà durant el tercer trimestre (balanç energètic positiu), donen una font essencial d'energia en el període crític d'adaptació metabòlica que s'esdevindrà en les hores que seguiran el naixement (balanç energètic negatiu). El paper de la glucosa és essencial per a la síntesi fetal de triglicèrids i llur dipòsit en el teixit adipós; també ho és la producció de la insulina fetal (HARDING)⁵.

La regularitat de l'intercanvi placentari és primordial per al normal desenvolupament del fetus. Hi ha quatre mecanismes de transport a través de la placenta: a) difusió simple (per gradients químics o electroquímics) expressada per l'equació de FICK:

$$\frac{Q}{t} = \frac{K A (C_1 - C_2)}{L}$$

b) difusió facilitada (*down-hill rapid transit*), com és el cas de la glucosa; c) transport actiu (aminoàcids), i d) pinocitosi (a través de conductes ultramicroscòpics) (PAGE)¹⁰.

Finalment, en aquests intercanvis placentaris cada vegada es dona més importància al lactogen humà placentari (HPL), sintetitzat a la placenta i secretat principalment en direcció a la mare.

Considerant el pes corporal com el paràmetre més pràctic per a avaluar el creixement del fetus en una determinada època de gestació, són notables les diferències individuals (sexe, nombre de gestacions, raça, superfície placentària, etc.). Han estat establertes corbes de creixement,

basades en estudis estadístics, per tal d'escatir les variacions de distribució anormal (GRUENWALD⁴, LUBCHENCO⁸, HOSEMAN⁷, HARNACK⁶, etc.).

Alteracions del creixement fetal

La complexitat dels factors que intervenen en el creixement del fetus i la possibilitat que diverses causes morbosos interfereixin aquest procés biològic dóna lloc a dos tipus de desviació de gran interès en l'actual medicina perinatal: A) creixement fetal retardat, i B) creixement fetal accelerat.

A) El *creixement fetal retardat* pressuposa una condició uterina defectuosa pel que fa a la nutrició fetal. Segons la causa i el moment en què es manifesti, les conseqüències per a l'infant seran més importants. Per tal de comptabilitzar la freqüència del problema, ha estat avaluat el nombre d'infants de menys de 2.500 grams en néixer, passada la 38^a setmana de gestació. Diversos estudis (BUTTLER¹, GRUENWALD⁴ i els nostres³) demostren que la tercera part dels fetus de menys de 2.500 grams són de més de 38 setmanes.

La situació creada per la síndrome de creixement fetal retardat és una resultant de l'actuació de diversos factors capaços de modificar la taxa de la nutrició fetal per diversos mecanismes: a) minva de la taxa d'utilització per unitat del pes fetal, b) concentració reduïda d'alguns factors nutritius essencials en l'artèria uterina, c) reducció crònica del doll hemàtic umbilical, d) menys velocitat en el transport placentari actiu, e) augment de l'àrea total de la superfície fetal, f) descens en l'àrea placentària efectiva per al transport i g) reducció de la taxa d'irrigació sanguínia uterina.

Cal comptar, com a causes, un cert grau de desnutrició materna, alteracions patològiques placentàries (infarts, avascularitat, pilositats, dipòsit excessiu de fibrina, etc.), impediments de la circulació fetoplacentària, determinats factors endocrins, hipòxia materna crònica, anomalies congènites, etc. Hi ha factors menys visibles que caldrà investigar: dones fumadores, deficient nivell econòmic-social, poc desenvolupament cardíac matern i d'altres que ocasionen una reducció del valor a de l'equació: $W = a (t-t')^3$.

B) El *creixement fetal accelerat* representa la desviació oposada. En resulta un desenvolupament molt superior a l'època de gestació. Això s'observa en els fills de mares diabètiques, per l'elevació més marcada dels nivells d'insulinèmia i pel fet que la resposta insulínica a la hipogluquèmia és molt superior a la del fetus normal. Els infants de mares diabètiques de vegades presenten una acceleració del creixement, l'origen de la qual hom creu que ve d'episodis recurrents d'hipergluquèmia, al costat d'una hipersecreció d'insulina.

L'excés de pes és degut a l'augment de dipòsit de greix (OSLER)⁹, estimulat per una més gran quantitat de glucosa utilitzable, que prové de la mare. Aquests fetus tenen un pes corporal i una llargària vertex-taló superiors a llur edat gestacional, i un ritme de creixement superior al normal. Això representa un greu desavantatge, puix que són infants que tenen una gran patologia (membrana hialina, icterícia, trastorns del metabolisme dels hidrats de carboni, etc., que poden tornar-los hipoglucèmics).

Els nadons nascuts amb transposició de grans vasos presenten també un ritme de creixement més gran, bé que hom n'ignora el mecanisme biològic. Cal posar a la llista els gegants afectes de la síndrome de BECKWITH, els hipermadurs grossos i els que ho són per fets constitucionals.

En aquest breu esquema del creixement fetal i les seves alteracions hem pretès d'assenyalar l'interès biològic que té aquest capítol tan actual de la medicina perinatal.

BIBLIOGRAFIA

1. BUTLER, N. R. i ALBERMAN, E. D., *Perinatal problems*. Ed Livingstone (Edimburg 1969).
2. CARCELLER, C., BERNAL, V., GARCÍA SIMON, M. A. i HORNO GONZÁLEZ, M., *Aspectos clínicos del síndrome de crecimiento fetal retardado*. «Med. clínica», 56, 539 (1971).
3. GIBSON, J. R. i MCKEOWN, T., *Observations on all births (23.970) in Birmingham, 1947; birthweight, duration of gestation and survival related to sex*. «Brit. J. Soc. Med.», 6, 152 (1952).
4. GRUENWALD, P., *Growth of the human fetus*. «Am. J. Obst. Gynec.», 94, 1108 (1965).
5. HARDING, P. G. R., *Metabolismo del tejido adiposo pardo y blanco en feto y neonato*. «Clínicas Obstétricas y Ginecológicas», 685 (1971).
6. VON HARNACK, G. A., «Monatsschr. Kinderh.», 108, 412 (1960).
7. HOSEMAN, H., «Arch. Gynäk.», 176, 109 (1948).
8. LUBCHENCO, L. O., HANSMAN, C., DRESSLER, M. i BOYD, E., *Intrauterine growth as estimated from liveborn birthweight data at 24 to 42 weeks of gestation*. «Pediatrics», 32, 793 (1963).
9. OSLER, M., *On the Nature and Treatment of Diabetes*. «Excerpta Medica Foundation», 692 (1965).
10. PAGE, E. W., VILLEE, C. A. i VILLEE, D. B., *Human Reproduction*. Ed. Saunders, 187 (Filadèlfia 1972).
11. PAYNE, P. R. i WHEELER, E. F., «Nature», 215, 1134 (1967).
12. WINICK, M., *Crecimiento celular en la desnutrición uterina*. «Clínicas Pediátricas de Norteamérica», 69 (1970).

CAPTURA D'UN *CHLOPSIS BICOLOR* A BLANES

per M. T. SASAL i LASAOSA, J. L. SOLER i QUETGLAS
i M. RUBIÓ

L'estiu de l'any 1972 fou recollit, amb l'art de bou, un peix d'aspecte anguilliforme. La captura havia estat feta al matí, vora la desembocadura de la Tordera, en un lloc sorrenc i de 30 m de fondària aproximadament.

És una femella d'uns 38 cm de llargada. El cap representa una desena part d'aquesta mida i la part posterior es troba dilatada per a albergar la cambra branquial.

A l'extrem anterior del cap hi ha els orificis nasals anteriors, que tenen forma de tubs incurvats. Els posteriors es troben damunt el llavi superior i guarnits per un plec de pell; són molt a prop de la vora anteroinferior de l'ull.

Les dents són irregulars i agudes a les mandíbules; té també dents vomerianes, que són un caràcter taxonòmic.

Al mig del front, entre els ulls, hi ha una depressió longitudinal força marcada.

L'orifici branquial és una senzilla fenedura arquejada, recoberta d'un retall dèrmic, sense cap mena d'opercle rígid.

El cos és subcilíndric, comprimit lateralment, i la meitat anterior es troba dilatada pel fet d'ésser plena d'ous.

És àpode: està mancat d'aletes parelles. L'aleta imparella es continua, i no s'hi diferencia ni dorsal, ni caudal, ni anal. L'alçada aproximada de l'aleta és de 2,5 mm. mesurats sobre un radi; tota l'aleta té la mateixa amplada. La totalitat dels radis són tous. En general l'aleta és despigmentada.

L'anus es troba davant la base de l'aleta anal, bé que la seva posició exacta no es pot determinar, puix que tota aquesta regió es troba esquinçada i amb una massa d'ous aglutinada, que penja a l'exterior.

Una mostra aleatòria de quinze d'aquests ous presenta una mitjana de diàmetres màxim i mínim d'1,44 mm \times 1,31 mm.

La pell és nua, totalment desproveïda d'escates. Tot al llarg de la línia lateral hi ha una sèrie de papil·les aplanades que apareixen en una observació directa com a punts blancs. Tota la part dorsal és de color bru, mentre que la ventral és despigmentada. La pigmentació no s'acaba de cop, sinó que existeix una franja lateral d'1 mm d'amplada d'un to intermedi. A la part anterior del cos, aquesta regió intermèdia es troba dilatada, i arriba a tenir uns 7 mm. La regió dorsal, de pigmentació també densa, té una amplada constant de 8 mm (fig. 1).



FIG. 1. — Detall de la pigmentació de *Chloopsis bicolor*

És una espècie desconeguda fins ara en aigües ibèriques i, per tant, LOZANO no en parla ni l'esmenta en cap de les seves monografies sobre ictiologia.

Amb l'ajuda de TORTONESE⁶ trobarem una sèrie de punts de contacte amb *Chloopsis bicolor* Rafinesque, única espècie mediterrània de la família *Xenocoagridae*.

Posteriorment utilitzarem el treball de BOHLKE¹, que és la revisió més recent de la sistemàtica d'aquesta família. També fou utilitzat un treball de ROBINS⁵; i arribarem a la conclusió que l'exemplar és efectivament un *C. bicolor*; bé que existeix una discordança pel que fa a les mides absolutes, les proporcions són les mateixes.

La taula següent compara les mides del nostre exemplar amb els tres de ROBINS² trobats a l'estret de Florida (UMML-16634-16635-17377) i els dos exemplars trobats a Itàlia (ANSP-67695-USNM-92240), únics exemplars adults dels quals tenim coneixença:

Distribució geogràfica

Els exemplars adults han estat trobats (fig. 2) a:

- Messina (RAFINESQUE 1810)
- Golf de Tarent (PARENZAN⁴ 1956)
- Estrets de Florida (ROBINS⁵ 1967)
- Blanes

TAULA

	UMML 16634	UMML 16635	UMML 17377	ANSP 67695	USNM 92240	BLANES VIII - 72
Llargada total (mm)	173,7	108,6	159,0	193,5	207,9	380,0
Gruix a l'opercle	6,4	4,4	6,0	6,8	5,5	16,0
x	(3,7)	(4,0)	(3,8)	(3,5)	(2,6)	(4,2)
Gruix a l'anus	5,4	3,8	6,3	5,5	4,7	11,0
x	(3,1)	(3,5)	(4,0)	(2,8)	(2,2)	(2,8)
Distància extrem anterior del cap-dorsal	25,5	15,8	23,1	26,7	30,9	50,0
x	(14,7)	(14,5)	(14,5)	(13,8)	(14,9)	(13,1)
Distància extrem anterior del cap-anus	61,9	37,1	56,2	68,0	75,3	138,0
x	(35,6)	(34,2)	(35,3)	(35,1)	(36,2)	(36,3)
Distància anus-caudal	109,9	70,1	100,9	125,5	132,6	240,0
x	(63,3)	(64,5)	(63,4)	(64,8)	(63,7)	(63,1)
Llargada del cap	20,7	12,8	16,9	19,6	19,1	38,0
x	(11,9)	(11,8)	(10,6)	(10,1)	(9,2)	(10,0)
Distància interorbital mínima	3,2	2,0	3,0	2,8	2,2	6,0
o	(15,4)	(15,6)	(17,8)	(14,2)	(11,5)	(15,8)
Llargada morro	5,3	3,4	4,3	4,4	4,5	7,7
o	(25,6)	(26,6)	(25,4)	(22,5)	(23,4)	(20,2)
Gruix angle boca	8,4	6,6	7,8	6,6	6,6	8,0
o	(40,6)	(51,6)	(46,2)	(33,2)	(34,8)	(21,0)
Diàmetre ocular	2,1	1,2	1,9	2,1	2,1	2,5
o	(10,1)	(9,4)	(11,2)	(10,7)	(11,5)	(6,6)
Nombre de vèrtebres	127	132	129	129	134	136

x Els nombres entre parèntesis són % de la llargada total

o Els nombres entre parèntesis són % de la llargada del cap

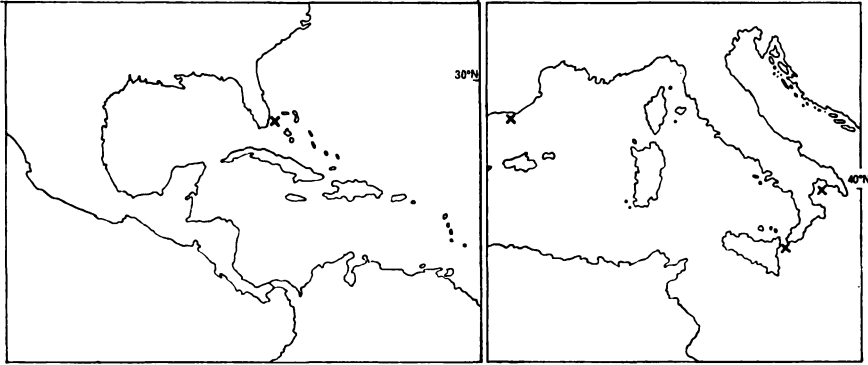


FIG. 2. — Situació dels exemplars adults de *Chlopsis bicolor*

En estat larvari han estat trobats també a:

Golf de Tarent (GRASSI 1897)

Costa occidental africana (CASTLE³ 1966)

i, segons SCHMIDT (1912), són molt freqüents a totes les cubetes laterals del Mediterrani.

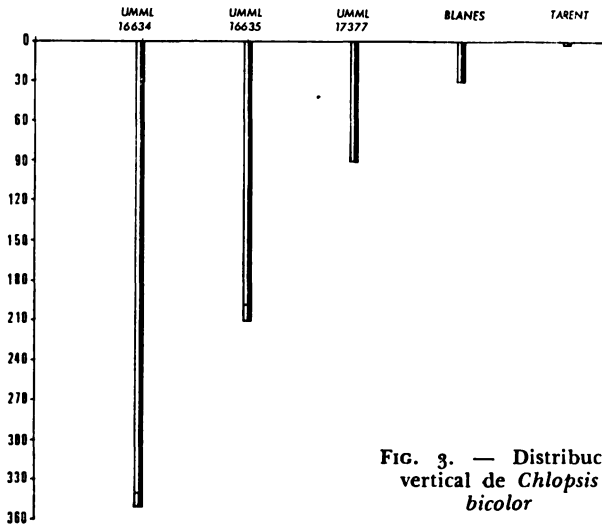


FIG. 3. — Distribució vertical de *Chlopsis bicolor*

Distribució vertical

La distribució vertical d'aquest peix és molt variada: n'han estat trobats exemplars des d'uns 0 m de fondària fins a uns 350 m (fig. 3).

Fondària de les captures:	}	Exemplar	UMML - 16634	341-351 m
		»	UMML - 16635	200-210 m
		»	UMML - 17377	90 m
		»	Blanes	30 m
		»	Tarent	0 m

Els tres primers (UMML 16634, UMML 16635, UMML 17377) són exemplars trobats a l'Estret de Florida entre Key Largo i les Bermudes; l'exemplar següent és el trobat a Blanes i el darrer (el de menys profunditat) és el capturat a Tarent (fig. 3).

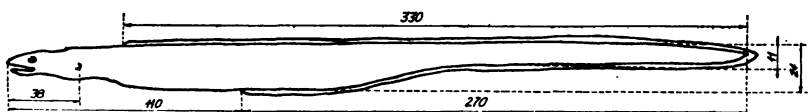


FIG. 4. — Esquema de les mides de *Chlopsis bicolor*

És interessant el fet que els tres exemplars capturats més propers a la superfície són femelles amb ous.

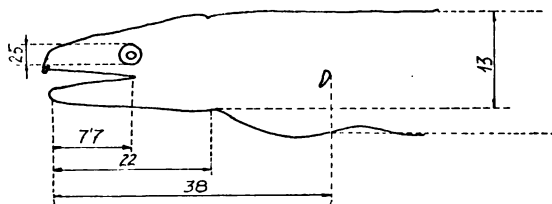


FIG. 5. — Detall de les mides del cap

RESUM

El primer exemplar de *Chlopsis bicolor* Raf. citat en aigües de la Península Ibèrica, fou capturat a Blanes a 30 m de profunditat l'agost de 1972. És una femella amb ous, de 38 cm de llargària, la mida més gran de tots els individus coneguts. Hom dona totes les dades referents a aquest peix en comparació amb les dels altres exemplars.

SUMMARY

The first specimen of Chlopsis bicolor Raf. quoted in Iberian Peninsula waters was caught in Blanes at 30 m depth in August 1972. This is

a female with roe, of 38 cm length, being this one the biggest of all the specimens known. There are given all the data of this fish comparatively to the other specimen.

BIBLIOGRAFIA

1. BÖHLKE, J., *A Synopsis of the Eels of the family Xencongridae*. «Proc. Acad. Nat. Sci. Philadelphia», vol. 108, 77-80, fig. 4 (1956).
2. CARUS, J. V., *Prodromus faunae mediterraneae*, 1, 545 (Stuttgart 1893).
3. CASTLE, P. H. J., *Die ichtyologische Ausbeute der ersten Westafrikafahrt des fischtechnischen Forschungsschiffes. «Walter Herwing», III. The Eel Larvae (Leptocephali)*. «Archiv. F. Fischrei», 17 (1), 19-35 (1966).
4. PARENZAN, P., *Un reperto interessante nei mari di Taranto. Prima captura di Chlopsis bicolor Raf. (piscis)*. «Boll. Pesca ecc. Roma», XI (2), 297 (1965).
5. ROBINS, C. H., *The Xencongrid Eel Chlopsis bicolor in the Western North Atlantic*. «Bull. Mar. Sci. Miami», 17 (1), 233-248 (1967).
6. TORTONESE, E., *Fauna d'Italia. Osteichthyes*, vol. X, Edit. Calderrini, 316-318, fig. 125 (1970).

UN AVANÇ DE LA CAPACITAT D'APRENENTATGE PERCEPTIU EN *MANDRILLUS SPHINX* I *CERCOPITHECUS NICTITANS*

per J. BALASCH, T. PADROSA i J. SABATER-PI

Departament de Fisiologia Animal. Facultat de Ciències
(Universitat de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

La capacitat d'aprenentatge dels primats superiors és quelcom ple d'interès, tant per a l'etòleg com per al psicòleg experimental. Hi ha molts mètodes susceptibles de fornir-nos-en dades interessants.

Un d'aquests, considerat com un test de la capacitat d'aprenentatge perceptiu, és el que hom anomena «test de les cadenes». Nombrosos autors l'han emprat amb ximpanzés (FINCH, 1941), gorilles joves (RIESEN i col·laboradors, 1953), *rhesus* adults (HARLOW i SETTLAGE, 1934) i gorilles joves i orangutans (FISCHER i KITCHENER, 1965).

Com hom pot veure, llevat de les del *rhesus*, la majoria de dades existents fan referència als pòngids. Aquesta fou la motivació primària que ens empenyí a iniciar la recollida de dades referents a la capacitat de resoldre problemes de *Mandrillus sphinx* i *Cercopithecus nictitans*. Aquests animals força oblidats, en especial *M. sphinx*, han estat estudiats escassament i no hem pogut trobar dades respecte al test de les cadenes. És per això que aquest estudi és una novetat. També ho és per la introducció del paràmetre temps esmerçat en la solució dels problemes, puix que no figura en el test clàssic convencional.

MATERIAL I MÈTODES

L'aparell utilitzat i el procediment seguit són, en essència, iguals als descrits per RIESEN i col·lab. (1953). És a dir: hom aprofita la safata corredissa, anomenada Klüver, per a subjectar-hi unes cadenetes. Hom pot

construir-hi diverses formes geomètriques, la qual cosa constitueix el fons del problema que el subjecte haurà de solucionar.

En la figura I hom pot veure els 17 problemes que hem utilitzat. Són els mateixos que feren servir FISCHER i KITCHENER (1965).

Foren fets 100 assaigs per a cada problema, en dos conjunts de 50 assaigs (1-50 i 51-100), i, per tant, foren 1700 assaigs per a cada animal.

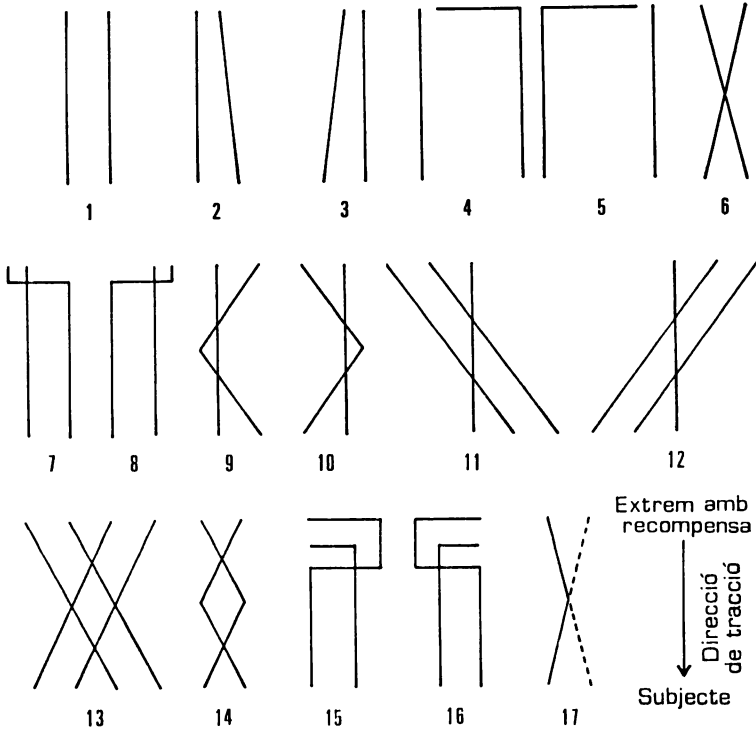


FIG. 1. — Cadenes amb recompensa en un extrem, les quals han d'ésser estirades pel subjecte

Hi foren considerats el nombre d'errors comesos, el temps esmerçat a solucionar els problemes, i la mà utilitzada.

Els subjectes sotmesos a la prova foren: Un *Mandrillus sphinx* mascle, de 10 anys. Un *Cercopithecus nictitans* mascle, de dos anys. Un *Mandrillus leucophaeus* mascle ja vell, de més de quinze anys. Tots tres nasqueren en estat salvatge, i, després d'ésser capturats, passaren la infantesa en el si de famílies humanes. Ja adults foren transferits al Zoològic

de Barcelona, on foren sotmesos a assaig. En cada cas fou necessària una adaptació prèvia al test, diferent segons l'animal, a fi d'assegurar-ne la cooperació.

RESULTATS

Mandrillus sphinx. — El nombre d'errors i el temps requerit per a solucionar els problemes, figuren gràficament en la figura 2.

Pel que fa al primer bloc del problema 7, el subjecte no intentà de resoldre'l, sinó que hi aplicà una solució més simple, estirant sempre la mateixa cadena sense pensar-s'hi. El subjecte es trobava (observable àdhuc en les seves reaccions generals de comportament) en la capacitat límit de discriminació.

En els 1700 assaigs del test el subjecte emprà la mà dreta un 86 % de les vegades, l'esquerra un 11 %, i les dues alhora un 3 %.

Cercopithecus nictitans. — En la figura 3 podem veure el nombre d'errors comesos i el temps esmerçat a resoldre els problemes.

En el segon bloc dels problemes 7, 14 i 15, i en els dos blocs del 16, el subjecte no intentà de resoldre'ls, sinó que cercà de simplificar la solució estirant les cadenes a l'atzar i sense pensar-s'hi.

En els 1700 assaigs d'estirar cadenes propis del test, féu servir la mà dreta un 17 % de vegades, l'esquerra un 35 %, i ambdues un 48 % de vegades.

Mandrillus leucophaeus. — El període d'adaptació al test fou llarg i dur. Quan finalment semblà estar-hi ben disposat, començarem les proves. El seu caràcter fou sempre aspre i agressiu. Després de començar el test, i quan portàvem ja fets 9 problemes, calgué abandonar, a causa d'un augment de les manifestacions intemperants i la carència d'interès o cooperació envers el test.

Com ha estat reflectit en la figura 4 després dels 5 primers problemes fàcils, l'animal refusà de fer cap esforç per a discriminar, i es negà rotundament a continuar la prova.

En els dos blocs dels problemes 6, 7, 8 i 9, i fins que hom parà el test, el subjecte aplicà sempre la solució simplista, bo i estirant les cadenes a l'atzar, sense assajar cap altra solució. A més es tornava molt aspre i agressiu cada vegada que, intentant de trobar la solució, s'equivocava i no obtenia recompensa en estirar la cadena.

En els 900 assaigs fets, la mà dreta fou emprada el 62 % de les vegades, l'esquerra el 28 % i ambdues el 10 %.

DISCUSSIÓ

La sola observació de les gràfiques de percentatges d'errors i del temps esmerçat a resoldre els problemes pel *Mandrillus sphinx* (figura 2) i pel

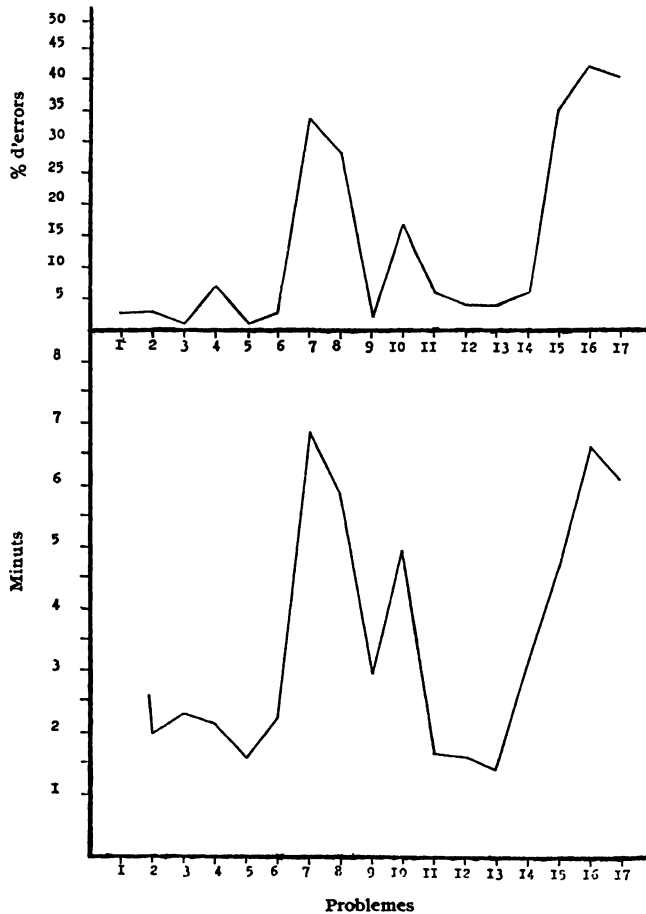


FIG. 2. — Percentatge d'errors i temps esmerçat a resoldre els problemes (*Mandrillus sphinx*)

Cercopithecus nictitans (figura 3), ja ens indica que hi ha una correlació entre el nombre d'errors i el temps utilitzat, puix que ambdós augmenten o disminueixen ensems, i aquests canvis són l'expressió del grau de

dificultat trobat pel subjecte. Potser només el problema 9 en *Cercopithecus nictitans* (figura 3) no mostra la dita correlació.

Hem calculat el coeficient de correlació entre errors i temps. Per a *Mandrillus sphinx* $r = 0,7452$ ($0,01 < P < 0,001$). Per a *Cercopithecus nictitans* $r = 0,7014$ ($0,01 < P < 0,001$). Apareix, per tant, matemàticament

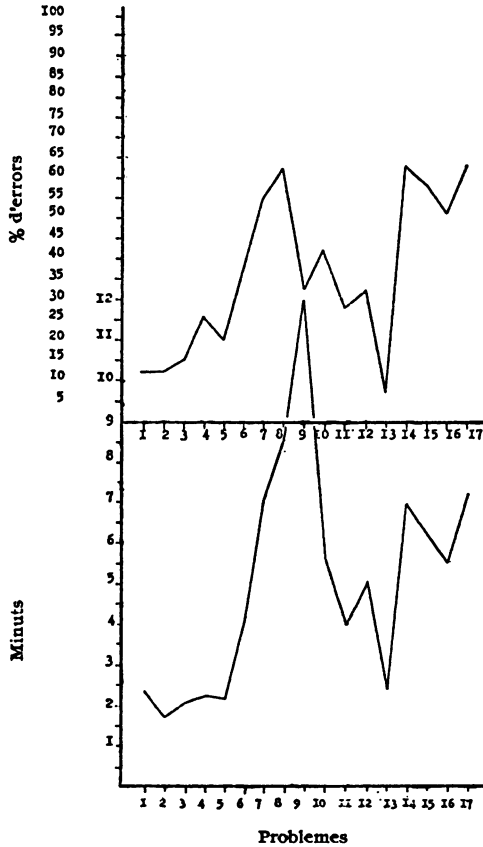


FIG. 3. — Percentatge d'errors i temps esmerçat a resoldre els problemes (*Cercopithecus nictitans*)

que hi ha correlació entre ambdues variables considerades, les quals resten modificades segons el grau de dificultat.

La consideració del factor temps, que pot ésser d'interès, puix que apareix la correlació esmentada, no figura en treballs clàssics que utilitzen el test de les cadenes (HARLOW i SETTLAGE 1934; FINCH 1941; RIESEN i col·laboradors 1953; FISCHER i KITCHENER 1965). Aquests autors només consideren els percentatges d'errors comesos. Nosaltres creiem que la me-

sura del temps que cal per a la solució dels problemes podrà ésser un nou paràmetre que donarà dades interessants sobre les capacitats d'aprenentatge i la discriminació.

Si ens referim a la mà utilitzada amb preferència, poc podem dir encara. *Mandrillus sphinx* utilitzà principalment la mà dreta. *C. nictitans*

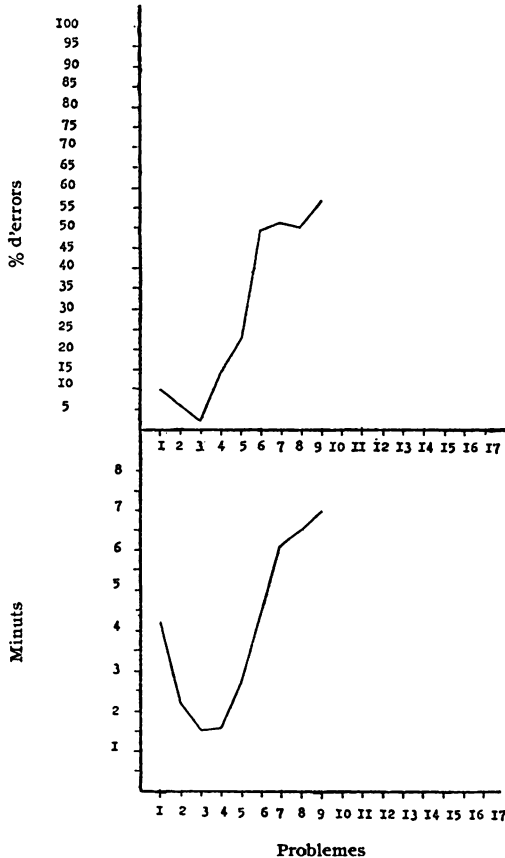


FIG. 4. — Percentatge d'errors i temps esmerçat a resoldre els problemes (*Mandrillus leucophaeus*)

ambdues indistintament. Fins que no poguem fer les proves amb un nombre major d'animals (experiències en curs), aquestes dades no tindran significació.

Pel que fa a les dificultats trobades per cada subjecte en la solució de cada problema concret, veiem en la figura 5 les gràfiques dels errors comesos; quant als problemes, hi són representats en ordre creixent de % d'errors.

En el gràfic concernent *Mandrillus sphinx* hom pot veure clarament que hi ha dos grups de problemes pel que fa al grau de dificultat. El primer grup és format per 11 problemes en els quals no és ultrapassat el 7 % d'error; és a dir, que es tracta d'un grup solucionat amb bona efectivitat. El segon grup és format per 5 problemes que van d'un 28 % a un

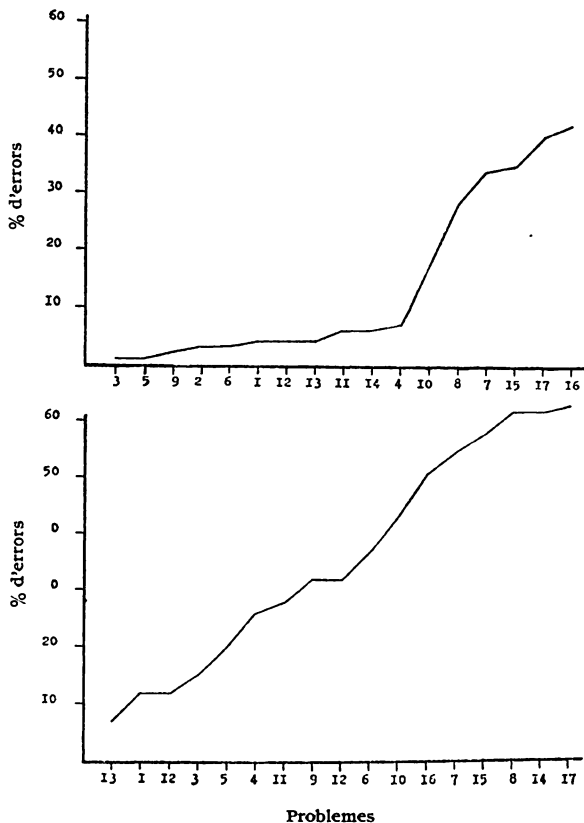


FIG. 5. — Els problemes són representats en ordre creixent de percentatges d'error

42 % d'errors. El problema 10 és solucionat totalment amb eficàcia mitjana (17 %).

Els cinc problemes solucionats amb menys eficàcia pertanyen a formes o figures on les cadenes s'encreuen o pseudoencreuen d'una manera complexa, i l'una o totes dues segueixen una línia trencada. Aquestes formes o figures poques vegades ocorren en l'hàbitat natural d'aquests animals (SABATER-P1). El primer grup de problemes té formes més simples, tret dels problemes 9 i 14.

La conclusió que per a *Mandrillus sphinx* les dificultats majors es troben en les formes complicades abans dites, està d'acord amb les dades trobades en gorilles joves i orangutans (FISCHER i KITCHENER 1965), i en ximpanzés (FINCH 1941). Comparant *Mandrillus sphinx* amb els *Ponginae* (estudiats per aquests autors), apareix que *Mandrillus* no en difereix àmpliament, però sí que s'aparta bastant del *rhesus* (HARLOW i SETTLAGE 1934), que mostra menys capacitat.

L'existència de dos grups de problemes és més difícil de veure en el gràfic que fa referència a *Cercopithecus nictitans*, bé que els problemes més difícils amb errors màxims són els mateixos que per a *Mandrillus sphinx*. En *Cercopithecus nictitans* augmenta el nombre de problemes solucionats pobrement, com podem veure fàcilment en els gràfics, que ens indiquen que la capacitat de resolució d'almenys 8 problemes mostra un grau d'ineficàcia més aviat alt. A més, tot el traçat del gràfic de *Cercopithecus nictitans* comparat amb *Mandrillus sphinx* mostra un notable augment en els errors, i indica una habilitat remarcablement menor en la resolució dels problemes. L'eficiència és així mateix més petita en aquest *C. nictitans* que en *rhesus*.

Des d'un altre punt de vista ens podem preguntar sobre la capacitat d'aprenentatge d'aquests animals, bo i prenent com a test la comparació del primer bloc d'assaigs respecte al segon bloc. Hom hi pot observar que ambdós subjectes són capaços d'aprenentatge. El % d'aprenentatge fóra de 23,2 % en *Mandrillus sphinx* (134 errors contra 103), i de 17,3 % en *Cercopithecus nictitans* (342 contra 283). Però, com que disposem d'un sol exemplar de cada espècie, els nivells d'errors són tan diferents, i a vegades els subjectes han arribat a llur límit de capacitat de discriminació, esperem a provar més animals (experiències en curs) abans d'intentar una comparació amb *Ponginae* o d'establir algunes conclusions més precises.

Excloem d'aquestes consideracions el *Mandrillus leucophaeus*, perquè es tracta probablement d'un exemplar vell, no representatiu.

BIBLIOGRAFIA

1. FINCH, G., *The solution of patterned string problems by chimpanzees*. «J. Comp. Psychol.», 32, 83-90 (1941).
2. FISCHER, G. J. i KITCHENER, S. L., *Comparative learning in young gorillas and orangutans*. «The J. of Genetic Psychol.», 107, 337-48 (1965).
3. HARLOW, H. F. i SETTLAGE, P. H., *Comparative behavior of primates. VII. Capacity of monkeys to solve patterned string tests*. «J. Comp. Psychol.», 18, 423-35 (1934).
4. RIESEN, A. H., GREENBERG, B., GRANSTON, A. S. i FANTZ, R. L., *Solutions of patterned string problems by young gorillas*. «J. Comp. Physiol. Psychol.», 46, 19-22 (1953).
5. SABATER-PI, J., Comunicació personal.

.

EL COMPORTAMENT DE L'ASSOCIACIÓ *DARDANUS ARROSOR* I *CALLIACTIS PARASITICA* EN HÀBITATS ARTIFICIALS

per J. BALASCH i V. MENGUAL

Departament de Fisiologia Animal. Facultat de Ciències
(Universitat de Barcelona)

INTRODUCCIÓ

JOHNSTON (1848) i GOSSE (1860) resumiren els fets que hom coneixia sobre *Adamsia palliata* i *Calliactis parasitica*, però foren FAUROT (1910), (1932), BRUNELLI (1910) i BROCK (1927) els qui començaren observacions rigoroses envers diverses associacions entre anemones de mar i bernats ermitans.

Més tard ROSS (1960) i ROSS i SUTTON (1961 a) emprengueren estudis experimentals amb espècies atlàntiques, i també mediterrànies (ROSS i SUTTON 1961 b). D'aquests estudis i dels de DAVENPORT, ROSS i SUTTON (1961) sorgí el coneixement del patró de comportament segons el qual les anemones de mar es transfereixen a les closques dels bernats ermitans; també fou coneguda l'activitat relativa del cranc i de l'anemone en l'establiment de l'associació. ROSS (1967); CUTRESS i ROSS (1969); CUTRESS, ROSS i SUTTON (1970), i ROSS (1970) feren noves descripcions en diferents tipus d'associacions, que viuen en diversos oceans.

Per tal que les transferències provocades i ajudades pel cranc tinguin èxit, cal generalment la cooperació de l'anemone. Aquest comportament cooperatiu és provocat per un factor present en la closca del berrat ermità, creat pel mollusc que prèviament l'habitava. El que és més freqüent és que el cranc mostri un patró actiu de comportament ajudant a la transferència de l'anemone a la seva closca, però hi ha descrites unes associacions en les quals el cranc no fa res perquè siguin establertes (ROSS 1960, ROSS i SUTTON 1961 a)

En una altra línia, HAZLETT (1968) (1969) (1970 a), HAZLETT i BOSSERT (1965) i REESE (1962) descripiren el comportament agonístic dels bernats ermitans, les actituds d'amenaça i apaivagament, i els *displays* de comunicació social entre els pagúrids.

Nosaltres, a l'Aquari de l'Institut d'Investigacions Pesqueres, de Barcelona, observàrem l'associació *Dardanus arrosor-Calliactis parastica*. En animals capturats de fresc observàrem un intens comportament agonístic concordant amb les descripcions de HAZLETT, i també molts casos de canibalisme d'acord amb dades fornides ja per COTTE el 1922. Sobretot ens cridà l'atenció el fet que, com a conseqüència de les agressions i de la competència entre els crancs, apareixen anemones lesionades, algunes vegades pel disc pedal, de resultes de l'activitat del cranc en provocar la transferència de l'anemone a la seva closca, lesions que tenien lloc amb descàrrega d'*acontia*. D'altres vegades la lesió era a la zona oral, amb els tentacles trencats en part. El cranc amb els seus quelípeds feia per manera d'esqueixar la boca de *Calliactis*, i de resultes d'això l'anemone es moria. En tots dos tipus de lesió, l'anemone era quasi sempre menjada pels crancs.

Aquests fets d'agressió a anemones i desaparició d'aquestes, ens interessaren perquè l'associació entre *Dardanus arrosor* i *Calliactis parastica* és vista tradicionalment com un exemple de mutualisme; i l'agressió a *Calliactis* seria un comportament anòmal.

També a l'Aquari del Laboratori Aragó (Banyuls de la Marenda) observàrem que els crancs es menjaven anemones lesionades.

Observacions fetes a l'Aquari de Blanes de l'Institut d'Investigacions Pesqueres donaren resultats contradictoris. Allí no hi havia agressions a anemones. I, a més, el fet ben conegut de progressiva pèrdua d'interès del cranc a tenir anemones a la seva closca —la qual cosa obliga els aquaris a canviar freqüentment els crancs perquè el públic els pugui veure plens d'anemones—, no succeïa a Blanes, on els crancs sempre tenien la closca plena de *Calliactis*.

Considerant aquesta disparitat de resultats entre els aquaris, observàrem que hi havia diferències entre ells quant a: densitat de població per tanc; freqüència i quantitat d'alimentació; i, a Blanes, diversos pops (depredadors) vivien en el mateix tanc que *Dardanus arrosor-Calliactis parastica*, cosa que no passava ni a Barcelona ni a Banyuls.

Per tot el que hem dit, començarem experiències sistemàtiques bo i considerant les variables: influència de l'alimentació; densitat de població i presència d'un depredador.

MATERIAL I MÈTODES

Treballàrem amb *Dardanus arrosor* i *Calliactis parasitica*. Les closques habitades per *Dardanus* foren: *Murex brandaris*, *M. trunculus*, *Cassidaria echinophora*, *Cassis undulata*, *Natica haebraea*, *Purpura haemastona* i *Ranella gigantea*.

Observàrem grups que eren alimentats cada dia, o dia per altre, i grups que no reberen aliment durant tota l'experiència.

Treballàrem amb unes poblacions de 30 crancs/m² i amb unes altres de 12 crancs/m².

Experimentàrem sobre poblacions col·locades en presència o absència d'un depredador (*Eledone*).

EXPERIÈNCIES I RESULTATS

1. *Influència de l'alimentació.* — Separàrem diversos grups de bernats ermitans. Els uns foren alimentats dia per altre; els altres no reberen aliment mentre durà l'experiència. D'aquests grups, els uns eren formats per *Dardanus* de la mateixa mida, i els altres amb crancs de mides ben diferents. Per això, en uns grups, a causa de la dominància, hi havia agressions, mentre que els individus dels altres grups eren passius en comparació d'aquells.

Quan en els crancs no hi ha comportament agonístic, la influència de l'alimentació sobre la desaparició d'anemones és petita. Quan hi ha lluita i competència entre els crancs, apareix la influència de l'alimentació, com podem veure en els resultats de la taula I.

La diferència entre grups alimentats i no alimentats, aplicant el test de «t» de Student dona valors significatius, tant en un mes com en un mes i mig ($0,001 < P < 0,01$).

2. *Influència de la densitat de població i de l'alimentació.* — Treballàrem amb grups de 12 crancs/m² i amb uns altres lots de 30 crancs/m². Alhora, uns grups reberen aliment i uns altres no foren alimentats. Cada grup era format per 30 *Dardanus*. El nombre inicial d'anemones per grup oscil·là entre 90 i 103.

Els resultats poden ésser vistos a la taula II.

Com que el comportament de *Dardanus* influeix sobre la supervivència de *Calliactis*, el % de supervivència de *Dardanus* fou estudiat en la mateixa experiència. Els resultats figuren a la taula III.

TAULA I. — % de permanència de *Calliactis* funció del temps en grups alimentats i no alimentats. Els grups de crancs eren formats amb individus amb activitat competitiva.

Grups alimentats	% de permanència de <i>Calliactis</i> en un mes	% de permanència de <i>Calliactis</i> en un mes i mig
1	61,53	46,15
2	76,92	76,92
3	71,42	64,28
4	84,61	84,61
<i>Mitjana</i>	<i>73,62</i>	<i>68,00</i>
Grups no alimentats		
1	50,00	25,00
2	54,54	27,27
3	50,00	20,00
<i>Mitjana</i>	<i>51,51</i>	<i>24,09</i>

Alimentats: 4 grups alimentats amb sardina dia per altre durant el mes i mig. Nombre total de crancs: 24.
No aliments: 3 grups sense rebre aliment en un mes i mig. Nombre total de crancs: 20.

TAULA II. — % de permanència de *Calliactis* en els dos mesos de l'experiència en crancs d'alta i baixa densitat de població, i alimentats i no alimentats.

DENSITAT DE POBLACIO

	Grup de 12 crancs/m ²	Grup de 30 crancs/m ²
Grup alimentat	57 %	25 %
Grup no alimentat	63 %	11 %

3. *Influència de la presència d'un depredador sobre la permanència de Calliactis.* — Un grup de 30 crancs/m², alimentat, fou guardat 2 mesos, amb un *Eledone* en el mateix tanc.

El % de permanència de *Calliactis* fou del 93 %, la qual cosa contrasta amb els resultats de la taula II, on, sota condicions idèntiques, però sense l'*Eledone*, el percentatge de permanència fou només del 25 %.

TAULA III. — % de supervivència de *Dardanus* en la mateixa experiència de la taula II.

	Grup de 12 crancs/m ²	Grup de 30 crancs /m ²
Grup alimentat	92 %	63 %
Grup no alimentat	59 %	43 %

Observàrem atacs fets per l'*Eledone*, amb la mort d'alguns crancs, així com frenada del canibalisme entre *Dardanus*.

Els crancs, en presència d'*Eledone*, mostraren un gran interès i activitat a procurar-se anemones. Alguns finiren l'experiència amb més *Calliactis* de les que tenien al començament.

TAULA IV. — Anemones transferides en *Dardanus* capturats de fresc.

Nombre de crancs	Nombre d'anemones a la closca abans de l'experiència	Anemones presentades (closca nua)	Anemones transferides	Anemones menjades
28	111	139	120	0

Els crancs (taula II) en les mateixes condicions esmentades, però sense *Eledone*, perderen, a mesura que passava el temps, interès a tenir anemones en la closca.

4. *Pèrdua progressiva de l'interès i activitat del cranc a tenir anemones a la closca, a causa de la permanència en aquari.* — El grau d'activitat del cranc a procurar la transferència de l'anemone, és mesurat comptant el nombre d'anemones que *Dardanus* amb closques nues (anemones prèviament despreses) és capaç de transferir-se, quan hom li dóna anemones que estan enganxades en unes plaques de plàstic. Hom pren com a dada el nombre d'anemones transferides en relació amb el nombre d'anemones presentades (taula IV).

Aquest tipus d'assaig d'activitat fou fet amb crancs capturats de fresc (1-2 dies) i amb crancs que duïen dos mesos d'estada en aquari. Els grups eren de 30 crancs/m² i ben alimentats.

En els crancs capturats de fresc, prèviament privats de les anemones que portaven, l'actitud fou de palpar-se les pròpies closques amb el segon parell d'apèndixs i el tercer, i, en adonar-se que no tenien anemones, començaren la transferència d'anemones desplegant el patró de comportament actiu que ajuda a la transferència descrit per ROSS i SUTTON el 1961.

L'activitat transferidora del crancs no es deturà després de la primera anemone transferida, sinó que el comportament actiu continuà fins que tingué tota la closca plena d'anemones, i fins i tot a vegades hi hagué anemones col·locades sobre d'altres anemones.

La taula IV és un resum dels registres individuals.

Hom no observà diferències entre l'un sexe i l'altre en l'activitat dels crancs. Tots foren actius en la transferència.

Amb els mateixos animals fou repetida l'experiència després de dos mesos de viure en aquari. Hom mesurà novament el comportament actiu

TAULA V. — *Anemones transferides am els mateixos animals de la taula IV, però després de passar dos mesos a l'aquari.*

Nombre de crancs	Nombre d'anemones a la closca abans de l'experiència	Anemones presentades (closca nua)	Anemones transferides	Anemones menjades
20	28	104	40	32

del cranc afavorint la transferència. Els resultats obtinguts poden ésser vistos en la taula V. Alguns havien mort per canibalisme, sobretot durant la muda.

La taula V és un resum dels resultats individuals. El comportament fou completament irregular: uns pocs crancs actius, uns altres actius en part, i la major part inactius. En resum, amb l'estada en aquari els crancs perden interès a tenir *Calliactis*, però en aquesta modificació hi ha una àmplia variabilitat individual.

5. *Influència de la presència d'un depredador (Eledone) sobre crancs amb una llarga estada en aquari.* — 19 *Dardanus* amb 4 o 5 mesos de vida en aquari, i sense anemones en llurs closques a causa precisament de la llarga estada en l'aquari, foren col·locats en un tanc amb anemones a llur disposició, enganxades aquestes en plaques de plàstic. A cada *Dardanus* li foren presentades 5 *Calliactis*.

Els resultats figuren a la taula VI.

Després, i amb els mateixos animals, hom féu una experiència idèntica, però aquesta vegada amb un *Eledone* dins el tanc. L'actitud de *Dardanus* enfront d'*Eledone* fou de fugida, i s'amagà dins la closca.

TAULA VI. — *Transferències degudes al comportament actiu de Dardanus, fetes per crancs amb 4 ó 5 mesos d'estada en aquari.*
Cada cranc tenia 5 anemones a la seva disposició.

Cranc	Actitud inicial	Anemones transferides pel cranc	Anemones menjades pel cranc
1	Actiu	2	3
2	Indiferent	0	0
3	Indiferent	0 (1)	1
4	Indiferent	0	0
5	Actiu	2	0
6	Indiferent	0	0
7	Indiferent	0	0
8	Indiferent	0 (1)	0
9	Indiferent	0	1
10	Indiferent	0 (1)	1
11	Indiferent	0	0
12	Indiferent	0 (1)	0
13	Indiferent	0 (1)	0
14	Actiu	4	0
15	Menja anemones	0	3
16	Indiferent	0	0
17	Indiferent	0	0
18	Indiferent	0	2
19	Indiferent	0	0

Les xifres entre parèntesis representen anemones transferides, però degut a la sola activitat de *Calliactis*, sense comportament actiu per part del cranc.

L'*Eledone* atacà els crancs i alguns d'aquests foren morts. (Resultats d'encontres entre *Octopus* i *Dardanus* amb anemones a la closca foren descrits per Ross, 1971.)

A la taula VII hom pot veure dotze *Dardanus* de la taula VI però en presència del depredador.

A la taula VIII hi ha la comparació entre les taules VI i VII.

TAULA VII. — *Transferències provocades pel cranc en 12 Dardanus de la taula VI, però col·locats amb un Eledone en el mateix tanc. Després de la primera transferència, les que seguiren foren dutes a terme ràpidament i sense interrupció.*

Cranc	Anemones transferides pel cranc	Temps transcorregut abans de la primera transferència	Sexe
4	3	24 hores	♀
7	7	12 »	♂
8	5	24 »	♀
9	3	48 »	♀
11	2	24 »	♀
12	5	72 »	♀
13	4	48 »	♀
15	4	24 »	♂
16	5	12 »	♂
17	3	24 »	♂
18	6	48 »	♂
19	5	24 »	♂

TAULA VIII. — *Resultats comparatius de transferències provocades per l'activitat del cranc, considerant cada animal abans i després d'èsser col·locat junt amb Eledome.*

Cranc	Anemones transferides abans d'Eledome	Anemones transferides amb Eledome	Sexe
4	0	3	♀
7	0	7	♂
8	0 (1)	5	♀
9	0	3	♀
11	0	2	♀
12	0 (1)	5	♀
13	0 (1)	4	♀
15	0	4	♂
16	0	5	♂
17	0	3	♂
18	0	6	♂
19	0	5	♂

Les xifres entre parèntesis representen anemones transferides, però degut només a l'activitat de *Calliactis*.

DISCUSSIÓ

Dels resultats, sembla possible dir que la carència d'alimentació és un factor que influeix sobre la desaparició d'anemones, almenys quan hi ha un cert comportament agonístic entre els crancs.

Dels resultats obtinguts comparant les anemones que desapareixen quan els crancs es troben en la proporció de 12 crancs/m² o de 30 crancs/m², pot ésser vist que, quan la densitat de població és alta, la pèrdua d'anemones augmenta notablement. Aquesta experiència relativa a la densitat de població fou feta paral·lelament amb grups d'animals alimentats i amb d'altres de no alimentats. En poblacions de baixa densitat, la carència d'alimentació no comporta la pèrdua d'anemones. En poblacions amb alta densitat la carència alimentària fa que la desaparició d'anemones augmenti notablement.

Sembla que el comportament agonístic augmenta amb la densitat de la població, i com a conseqüència augmenten també les lesions d'anemones. Juntament amb això, la carència d'alimentació fa que les anemones lesionades siguin menjades.

La presència d'un depredador (*Eledone*) en un grup d'alta densitat de població ben alimentada, produeix que no desapareguin anemones en comparació amb les que es perden en un grup idèntic d'alta població ben alimentada però sense depredador.

El comportament actiu de *Dardanus* provocant la transferència d'anemones fou provat primerament en animals capturats de fresc, i després quan aquests animals feia 2 mesos que eren a l'aquari. Bé que el comportament individual ofereix molta variabilitat, com a regla general, hi ha amb el temps una pèrdua progressiva d'interès del cranc a tenir anemones a la seva closca. A més, amb el temps sembla que augmenta l'acció de menjarse les *Calliactis* lesionades o poc agafades a la closca.

No observarem cap diferència de comportament per raó del sexe. Els crancs mascles foren tan actius com les femelles.

19 *Dardanus* amb 4-5 mesos d'estada a l'aquari, i ja indiferents a tenir *Calliactis* a la closca, foren posats juntament amb un depredador.

Poguérem observar que els crancs, després d'un curt període de latència, readquirien enèrgicament l'interès perdut per la possessió d'anemones. Adhuc s'establí entre ells competència per a tenir les *Calliactis*.

D'entre tots els factors estudiats potser el més interessant és l'efecte de la presència del depredador.

El comportament de *Dardanus* en aquari, d'acord amb l'alimentació i amb la densitat de població, tal com hem vist a les experiències, sem-

bla que probablement té poca relació respecte al comportament d'aquests animals en llur hàbitat natural. *Dardanus* normalment ocuparia un territori més gran i l'explotaria de forma que hi hauria suficient aliment per a cada individu. Sembla, doncs, que en l'hàbitat natural aquests dos factors (alimentació i densitat de població) tindrien poc paper en la desaparició d'anemones deguda als crancs.

Més interessant ens sembla el fet que els crancs capturats de fresc tenen interès a posseir anemoses a llurs closques, i això suggereix que aquest deu ésser el comportament que tenen en llur hàbitat natural. El comportament diríem normal, el perden en passar temps a l'aquari, i la indiferència per les anemones augmenta a mesura que el temps transcorre. En introduir-hi un depredador, l'interès envers les anemones i el comportament actiu que en provoca la transferència a la closca tornen vigorosament. Això suggereix que, en l'hàbitat natural, la depredació ha d'ésser almenys un dels factors responsables de l'interès del cranc a tenir la closca plena d'anemones. Un treball recent de Ross (1971) fa pensar que realment el cranc vol anemones perquè el protegeixen contra els depredadors. Ross enfrontà *Octopus* amb *Dardanus* amb closca nua i *Dardanus* amb closca plena d'anemones. Molts dels primers foren morts per l'atac del pop; els segons resistiren l'atac de l'*Octopus*, el qual donava mostres d'incomoditat quan els seus tentacles tocaven anemones.

El que hem dit es veritable per a l'associació mediterrània *D. arrosor* - *C. parasitica* i potser no per a d'altres associacions atlàntiques, on, en tot cas, caldria comprovar si el comportament del *Pagurus bernhardus* canvia per la presència d'un depredador.

BIBLIOGRAFIA

1. BROCK, F., *Das Verhalten des Einsidlerkrebse Pagurus arrosor während des Aufsuchens, Ablösens und Aufpflanzens seiner Seerose Sagatia parasitica*. «Roux Arch. Entw. Mech. Organ», 112, 205-238 (1927).
2. BRUNELLI, G., *Ricerche etologiche. Osservazioni ed esperienze sulla simbiosi dei Paguridi e delle Attinie*. «Zool. Jb. (Abt. Zool.)», 34, 1-26 (1913).
3. COTTE, J., *Études sur le comportement et les réactions des actinies*. «Bull. Inst. Océanograf. Monaco», 410, 44 (1922).
4. CUTRESS, C. E. i ROSS, D. M., *The sea anemone Calliactis tricolor and its association with the hermit crab Dardanus venosus*. «Journal of Zoology». Proc. Zool. Soc. London, vol. 158, part. 2, 225-42 (1969).
5. CUTRESS, C. E., ROSS, D. M. i SUTTON, L., *The association of Calliactis tricolor with its pagurid, calappid and majid partners in the Caribbean*. «Canadian Journal of Zoology», vol. 48, 2, 371-76 (1970).
6. DAVENPORT, D., ROSS, D. M. i SUTTON, L., *The remote control of nematocyst-discharge in the attachment of Calliactis parasitica to shells of hermit crabs*. «Vie et Milieu» (1961).

7. FAUROT, L., *Études sur les associations entre les Pagures et les Actinies*. «Arch. Zool.», exp. gen., 5, 421-86 (1910).
8. FAUROT, L., *Actinies et Pagures. Étude de psychologie animales*. «Arch. Zool.», exp. gen., 74, 139-54 (1932).
9. GOSSE, P. H., *A history of the British sea-anemones and corals* (Londres 1860).
10. HAZLETT, B. A., *Communicatory effect of body position in Pagurus bernhardus*, L. «Crustaceana», 14, 210-214 (1968).
11. HAZLETT, B. A., *Further investigations of the cheliped presentation display in Pagurus bernhardus*. «Crustaceana», 17, 31-34 (1969).
12. HAZLETT, B. A., *Tactile stimuli in the social behaviour of Pagurus bernhardus*. «Behaviour Nether», 36, n.º 1-2, 20-48 (1970a).
13. HAZLETT, B. A., *Stimuli involved in the feeding behaviour of the hermit crab Clibanarius vittatus*. «Crustaceana», 15, 305-11 (1970a).
14. HAMLETT, B. A. i BOSSERT, W. H., *A statistical analysis of the aggressive communications systems of some hermit crabs*. «Animal behaviour», 13, 357-73 (1965).
15. JOHNSTON, G., *A history of the British zoophytes*. (Londres 1847).
16. REESE, E. S., *Submissive posture as an adaptation to aggressive behaviour in hermit crabs*. «Zeitschr. Tierpsych.», 19, 645-51 (1962).
17. ROSS, D. M., *The association between the hermit crab Eupagurus bernhardus*. (L) *and the sea anemone Calliactis parasitica* (Couch). «Proc. Zool. Soc. London», 134, 43-57 (1960).
18. ROSS, D. M., *Behavioural and ecological relationships between anemones and other invertebrates*. «Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.», 5, 292-316 (1967).
19. ROSS, D. M., *The comensal association of Calliactis polypus and the hermit crab Dardanus gemmatus in Hawaii*. «Canadian Journal of Zoology», vol. 48, 2, 351-57 (1970).
20. ROSS, D. M., *Protection of Hermit Crabs from Octopus by comensal sea anemones*. Nature, 230, 401-402 (1971).
21. ROSS, D. M. i SUTTON, L., *The response of the sea anemone Calliactis parasitica to shells of the hermit crab Pagurus bernhardus*. «Proc. Roy. Soc. B.», 155, 266-282 (1961a).
22. ROSS, D. M. i SUTTON, L., *The association between the hermit crab Dardanus arrosor and the sea anemone Calliactis parasitica*. «Proc. Roy. Soc. B.», 155, 282-291 (1961b).

VALORS HEMATOLÒGICS COMPARATIUS ENTRE GAL·LIFORMES I OCELLS CABUSSADORS I GRANS VOLADORS

per J. BALASCH, J. PALOMEQUE, L. PALACIOS,
S. MUSQUERA i M. JIMÉNEZ

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

INTRODUCCIÓ

Malgrat l'existència de nombroses dades de bibliografia referents a moltes espècies d'ocells, la major part eren agrupades en taules, però procedint de diversos autors i obtingudes amb mètodes d'anàlisi molt diferents. Això és observable en MARSHALL¹, ALTMAN¹, STURKIE² i BELL i FREEMAN⁴.

A causa del fet esmentat, iniciarem determinacions sistemàtiques i comparatives dels valors hematològics de sis galliformes a fi d'observar si hom podia obtenir unes dades que responguessin a un galliforme tipus, que possibilités ulteriors comparacions fisiològiques o filogenètiques amb altres ordres d'ocells.

Els sis galliformes escollits foren animals comuns propis d'empresa avícola, i d'altres de més rars o salvatges procedents del parc zoològic de Barcelona. Les dades obtingudes foren publicades (BALASCH i collab.³), però n'inclourem aquí les taules corresponents a fi de facilitar-ne la comparació.

L'objectiu, ací, fou de fer determinacions hematològiques en ocells cabussadors i grans voladors, amb el propòsit d'investigar si hom podia establir distincions clares a nivells hematològics descriptius, comparant ocells amb requeriments d'oxigen i energètics tan diferents.

MATERIAL I MÈTODES

Els galliformes estudiats foren: 10 *Alectoris graeca* (perdiu de roca); 12 *Phasianus colchicus* (faisà); 10 *Numida meleagris* (gallina pintada); 10 *Pavo cristatus* (paó); 11 *Gallus gallus gallus* (bankiva); i 4 *Penelope wagnerii* (penèlope).

Les mostres de sang foren preses de la vena de l'ala, mitjançant una xeringa heparinitzada. La temperatura, la dieta, el confinament, l'edat, etc., foren estandarditzats.

Els grans voladors i cabussadors estudiats foren:

12 *Larus argentatus* (gavià argentat); 12 *Larus ridibundus* (gavina vulgar); 10 *Columba livia* (colom); 6 *Corvus corax* (corb); 2 *Sula bassana* (mascarell); 3 *Pelecanus occidentalis thagus* (pelicà d'Amèrica del Sud); 3 *Pelecanus occidentalis occidentalis* (pelicà d'Amèrica del Nord); 4 *Aythya ferina* (ànec cap-roig); i 13 *Phalacrocorax carbo* (corb marí gros).

Hom pot veure que, entre aquests animals, hi ha grans voladors d'ordres diferents: Caradriiformes (*Larus*); Columbiformes (*Columba*); Passeriformes (*Corvus*). Hi ha cabussadors amb immersió veritable, que neden un cert temps per sota l'aigua: Pelecaniformes (*Phalacrocorax*) i Anseriformes (*Aythia*). I finalment hi ha Pelecaniformes (*Sula* i *Pelecanus*) que tenen un vol fàcil i poderós, i que capturen les preses principalment per cabussament, bo i fet a gran velocitat des d'una alçada considerable, i mantenint el cos submergit diversos segons.

El confinament, dieta, estat de no posta, edat, temperatura, presa de mostres, etc., fou estandarditzat.

En tots els animals esmentats foren determinats: P_{CO_2} , P_{O_2} i pH, amb un aparell Astrup (Radiometer BMS-3); hematòcrit (micromètode); hemoglobina (Drabkin); nombre d'eritròcits (Thoma); velocitat de sedimentació (micromètode); proteïnes del plasma, mitjançant electroforesi en acetat de cel·lulosa (Cello-gel, i les lectures en un lector automàtic Cello-matic C.G.A. Atom); glucosa (glucosa oxidasa); glúcids totals (Antrona); proteïnes totals (Biuret); urea (Ureasa); àcid làctic (LDM/NAD); Cl^- , Na^+ i K^+ del plasma (aparell Aminco-Cotlove i fotòmetre de flama Beckman).

Els resultats foren processats, i n'obtinguérem la mitjana i la desviació standard.

RESULTATS

Referent a galliformes, en la taula I hi ha els resultats de les determinacions fetes en sang total; en la taula II els resultats de les determinacions plasmàtiques, i la taula III mostra les fraccions plasmàtiques, que són presentades gràficament a la figura 1 (perfils tipus).

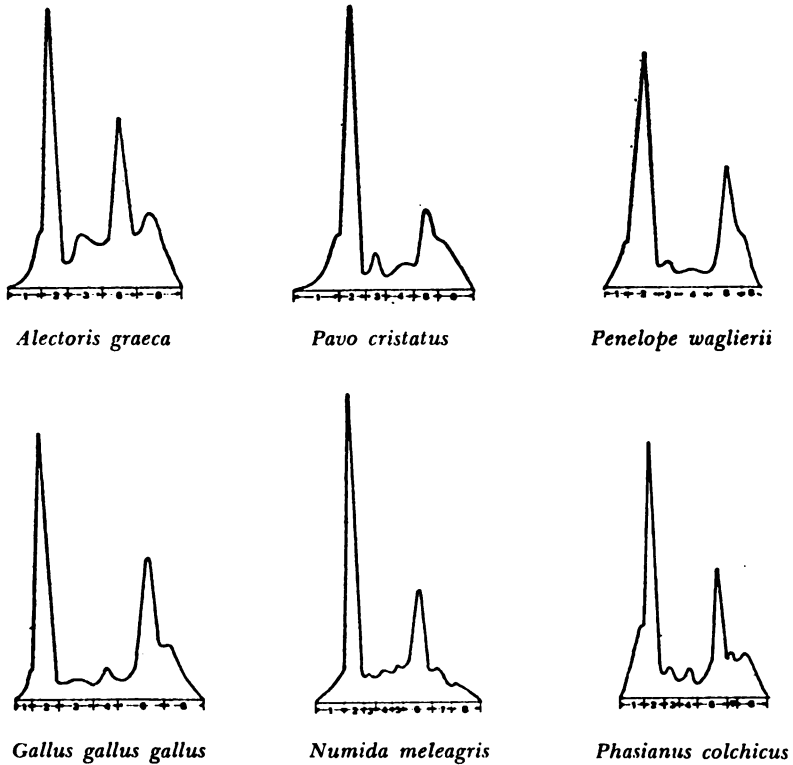


FIG. 1. — Perfils electroforètics en galliformes

<u>Fracció</u>	<u>Possible identificació</u>
1	pre-albúmina
2	albúmina
3	α_1
4	α_2
5	α_3
6	β
7	post- β
8	γ

TAULA I. — *Valors en sang total en galliformes*

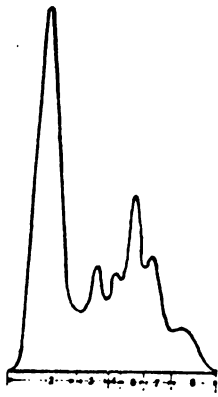
Espècies	Nombre	HC	Hb g/100 ml	Eritròcits × 10 ⁶	Totals Sedimen- tació	Longitud cel·lular μ	Amplària cel·lular μ	Longitud nuclear μ	Amplària nuclear μ	P _{o2} mmHg	P _{o2} mmHg	P _{co2}
<i>Numida</i>	10	43,0*	14,9	2,82	2,2	11,96	5,96	4,57	2,25	51,2	47,9	7,36
<i>meleagris</i>		± 4,02	± 1,72	± 0,47	± 1,40	± 1,04	± 0,42	± 0,51	± 0,29	± 6,69	± 7,19	± 0,06
<i>Alectoris</i>	9	37,2	11,1	2,62	1,8	11,26	6,40	4,69	2,56	44,2	50,1	7,29
<i>graeca</i>		± 5,50	± 1,98	± 0,52	± 0,55	± 0,71	± 0,57	± 0,41	± 0,28	± 9,10	± 9,90	± 0,05
<i>Phasianus</i>	12	41,5	18,9	3,26	1,6	10,64	6,77	4,57	2,55	63,2	50,5	7,35
<i>colchicus</i>		± 4,37	± 1,87	± 0,43	± 0,60	± 0,71	± 0,62	± 0,49	± 0,25	± 5,27	± 8,65	± 0,05
<i>Pavo</i>	10	36,9	12,0	2,07	2,45	12,55	6,97	4,81	2,58	55,3	51,33	7,36
<i>cristatus</i>		± 3,98	± 1,29	± 0,38	± 0,70	± 1,02	± 0,59	± 0,41	± 0,33	± 6,36	± 12,3	± 0,07
<i>Gallus</i>	10	36,15	12,20	2,63	2,66	10,71	7,06	4,70	2,64	53,4	44,32	7,41
<i>gallus gallus</i>		± 6,22	± 2,88	± 0,54	± 1,25	± 0,90	± 0,71	± 0,59	± 0,31	± 7,20	± 9,62	± 0,11
<i>Penelope</i>	4	39,7	13,1	2,68	1,87	11,08	6,80	5,22	2,51	55,7	48,0	7,34
<i>waglierii</i>		± 5,06	± 2,65	± 0,36	± 0,48	± 0,85	± 0,76	± 0,61	± 0,13	± 5,80	± 10,3	± 0,15

* mitjana ± desviació standard.

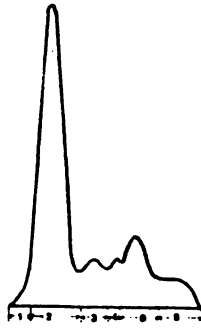
TAULA II. — *Valors plasmàtics d'ions i metabòlits en galliformes*

Espècies	Nombre	Cl ^{-*}	Na ⁺	K ⁺	Acid làctic	Glucosa	Glúcids mm per h.	Proteïnes	Urea	Acid úric
<i>Numida meleagris</i>	10	112,8° ± 2,82	153,9 ± 4,02	3,16 ± 0,48	47,56 ± 8,76	287,5 ± 26,64	439,3 ± 71,7	3520 ± 650	2,59 ± 0,67	6,70 ± 1,97
<i>Alectoris graeca</i>	9	120,44 ± 6,04	154,78 ± 8,88	3,29 ± 0,62	52,01 ± 12,27	291,12 ± 20,73	362,37 ± 28,31	4900 ± 760	5,38 ± 1,33	5,64 ± 1,48
<i>Phasianus colchicus</i>	12	122,5 ± 3,08	168,17 ± 4,36	2,25 ± 0,27	49,33 ± 13,11	366,87 ± 30,90	431,29 ± 77,18	4430 ± 410	4,22 ± 0,77	5,03 ± 1,06
<i>Gallus gallus gallus</i>	10	119,0 ± 1,73	156,8 ± 3,03	3,52 ± 0,40	38,64 ± 11,49	255,8 ± 39,37	305,12 ± 25,77	4660 ± 380	6,08 ± 2,19	2,85 ± 1,26
<i>Pavo cristatus</i>	10	114,0 ± 2,93	158,6 ± 4,81	3,58 ± 0,41	29,34 ± 9,17	315,7 ± 42,36	357,5 ± 44,19	4360 ± 1050	16,56 ± 3,12	3,11 ± 1,62
<i>Penelope wagleri</i>	4	109,5 ± 0,50	161,0 ± 3,00	2,40 ± 0,20	59,3 ± 20,09	290,25 ± 54,90	344,25 ± 65,36	3690 ± 490	6,25 ± 0,79	5,78 ± 2,09

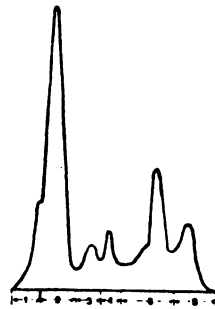
* Els valors són donats en mg/100 ml, menys els ions (mEq/)
 ° mitjana ± σ



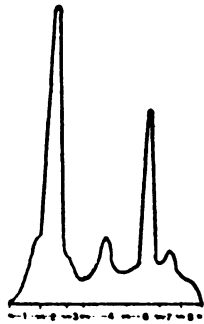
Larus argentatus



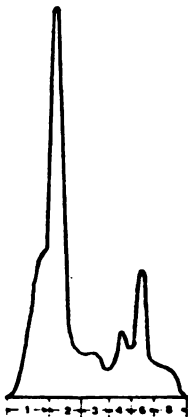
Larus ridibundus



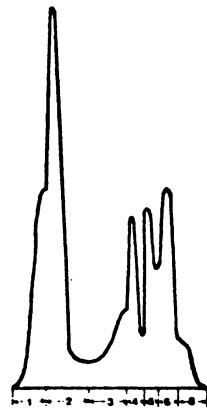
Pelecanus occidentalis thagus



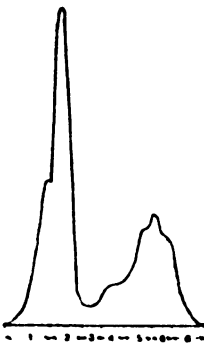
Sula bassana



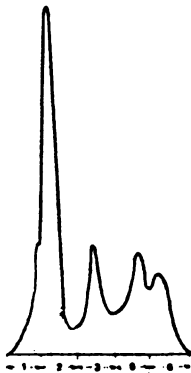
Aythya ferina



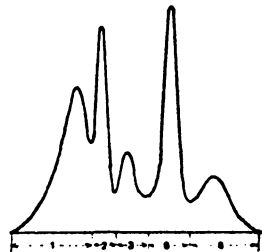
Phalacrocorax carbo



Corvus ocrax



Pelecanus occidentalis occidentalis



Columba livia

FIG. 2. — Perfils electroforètics d'ocells cabussadors i voladors

<i>Fracció</i>	<i>Possible identificació</i>
1	pre-albúmina
2	albúmina
3	α_1
4	α_2
5	α_3
6	β
7	post- β
8	γ

La taula IV és una elaboració estadística de les taules I i II.

Referent als voladors i cabussadors, la taula V és on s'expressen els resultats de les determinacions fetes en sang total; la taula VI, els resultats de les determinacions plasmàtiques; i la taula VII mostra les frac-

TAULA III. — *Valors comparatius de les mitjanes i de les desviacions standard, dels paràmetres de les taules I i II.*

Paràmetres	Mitjana	Desviació standard	Desv. st. en % de la mitjana
Hematòcrit	39,07	2,77	7,08
Hemoglobina	13,70	2,85	20,83
Eritròcits (en milions)	2,68	0,38	14,29
Vel. de sedim. mm. per h.	2,09	0,40	19,53
Long. cel·lular	11,37	0,75	6,58
Ampl. cel·lular	6,66	0,41	6,17
Long. nuclear	4,76	0,24	5,09
Ampl. nuclear	2,51	0,14	5,43
P_{O_2}	53,83	6,22	11,54
P_{CO_2}	48,69	2,55	5,23
pH	7,35	0,0386	0,52
Cl ⁻	116,37	5,03	4,32
Na ⁺	158,87	5,23	3,29
K ⁺	3,03	0,57	18,83
Àcid làctic	46,03	10,57	22,95
Glucosa	301,21	37,40	12,41
Glúcids totals	382,40	68,22	17,84
Proteïnes	4260,00	544,24	12,77
Urea	6,85	4,95	72,28
Àcid úric	4,85	1,55	31,89

TAULA IV. — Fraccions de les proteïnes plasmàtiques en galliformes

Fracció número		1	2	3	4	5	6	7	8
Possible identificació		pre-alb.	alb.	α_1	α_2	α_3	β	post- β	γ
Espècies	Nombre								
<i>Numida</i>	10	4,30 *	37,0	4,45	6,45	5,55	22,8	10,5	6,6
<i>meleagris</i>		± 1,32	± 5,17	± 1,08	± 0,55	± 1,29	± 3,56	± 4,26	± 2,40
<i>Phasianus</i>	12	9,15	37,5	6,18	8,79		20,7	5,68	12,2
<i>colchicus</i>		± 1,51	± 5,48	± 1,28	± 1,78		± 2,33	± 1,11	± 3,04
<i>Gallus</i>	10	1,70	42,4	7,05	6,4		22,9		19,5
<i>gallus gallus</i>		± 0,82	± 3,77	± 2,11	± 0,94		± 3,21		± 1,21
<i>Alectoris</i>	9	4,83	30,9	13,5			26,2		24,3
<i>graeca</i>		± 2,04	± 5,69	± 2,37			± 3,52		± 5,61
<i>Pavo</i>	10	4,40	50,8	6,3	6,7		16,7		14,8
<i>cristatus</i>		± 1,56	± 5,10	± 1,43	± 1,78		± 2,96		± 4,50
<i>Penelope</i>	4	1,62	53,4	7,12	9,0		16,5		12,5
<i>waglieri</i>		± 0,27	± 6,09	± 1,98	± 1,58		± 2,83		± 2,37

TAULA V. — *Valors en sang total en voladors i cabussadors*

Espècies	Nombre	Hc	Hb g/100 ml	Eritròcits × 10 ⁶	Veloc. de sedim. mm 1 h.	mm 2 h.	pH	P _{co2} mm Hg	P _{o2} mm Hg	MCV (μ ³)	MCHb γγ/ceH.	MCHbC %
<i>Larus ridibundus</i>	12	43,9 ± 1,82	15,9 ± 0,8	3,16 ± 0,29	1,81 ± 0,78	3,68 ± 1,5	7,397 ± 0,07	36,3 ± 6,3	49,2 ± 7,8	143,70 ± 7,8	50,52 ± 5,0	36,17 ± 1,47
<i>Larus argentatus</i>	12	43,2 ± 1,88	15,9 ± 1,2	2,92 ± 0,314	2,09 ± 0,66	5,1 ± 1,5	7,35 ± 0,1	38,5 ± 7,7	60,3 ± 7,2	145,17 ± 9,33	55,03 ± 6,47	36,85 ± 3,44
<i>Corvus corax</i>	6	40,7 ± 5,9	16,07 ± 2,44	3,19 ± 0,37	1,3 ± 0,8	2,9 ± 0,9	7,43 ± 0,07	27,5 ± 4,0	60,2 ± 5,8	127,61 ± 9,9	50,35 ± 3,77	39,61 ± 4,70
<i>Columba livia</i>	9	50,2 ± 3,1	16,5 ± 1,6	3,74 ± 0,5	0,63 ± 0,48	1,3 ± 1,6	7,35 ± 0,06	43,0 ± 6,9	49,7 ± 7,3	135,50 ± 14,74	44,93 ± 3,25	32,91 ± 2,04
<i>Sula bassana</i>	2	41	14,0	2,64	0,75	1,5	7,34	49,5	49,5	156,2 16,7	50,71 ± 5,07	32,80 ± 6,72
<i>Pelecanus occidentalis thagus</i>	3	44,5 ± 0,8	15,3 ± 0,9	2,49 ± 0,338	1,3 ± 0,6	3,0 ± 0,8	7,47 ± 0,03	30,6 ± 4,1	55,6 ± 12,0	180,75 ± 23,02	62,59 ± 11,51	34,45 ± 2,00
<i>Pelecanus occidentalis occid.</i>	3	39,3 ± 1,04	13,03 ± 0,4	2,836 ± 0,26	1,66 ± 0,57	3,33 ± 0,76	7,35 ± 0,1	36,3 ± 2,3	60,6 ± 22,2	139,48 ± 13,57	46,14 ± 3,30	33,14 ± 0,86
<i>Pool Pelecanus</i>	6	41,9 ± 2,9	14,18 ± 1,4	2,66 ± 0,33	1,5 ± 0,5	3,1 ± 0,7	7,40 ± 0,06	32,5 ± 4,2	58,1 ± 16,2	160,11 ± 28,23	54,37 ± 11,77	33,80 ± 1,5
<i>Aythya ferina</i> (2 ♂ + 2 ♀)	4	43,7 ± 4,6	14,6 ± 1,1	3,25 ± 0,346	1,4 ± 0,25	2,6 ± 0,5	7,38 ± 0,08	39,7 ± 8,0	50,0 ± 10,4	134,32 ± 1,60	45,30 ± 2,44	33,71 ± 1,62
<i>Phalacrocorax</i>	7	43,5 ± 2,4	13,77 ± 0,99	2,905 ± 0,19	0,8 ± 0,8	2,2 ± 2,3	7,47 ± 0,03	28,33 ± 3,8	57,83 ± 4,4	150,62 ± 14,04	47,46 ± 3,09	31,38 ± 2,78
<i>carbo</i> ♂	6	47,3 ± 1,8	15,3 ± 0,9	3,148 ± 0,36	0,7 ± 0,7	2,3 ± 1,35	7,43 ± 0,11	33,8 ± 6,4	54,0 ± 6,7	151,73 ± 14,96	49,15 ± 6,34	32,36 ± 2,2
<i>Pool</i> ♀	13	45,3 ± 2,8	14,5 ± 1,2	3,02 ± 0,3	0,75 ± 0,75	2,3 ± 1,9	7,45 ± 0,08	31,1 ± 5,8	55,9 ± 5,7	151,13 ± 13,86	48,24 ± 4,73	31,99 ± 2,45

* mitjana ± desviació standard.

TAULA VI. — *Valors plasmàtics d'ions i metabòlits en grans voladors i cabussadors.*

Espècies	Nombre	Cl ⁻	Na ⁺	K ⁺	Àcid làctic	Glucosa	Glúcids totals	Proteïna	Urea	
<i>Larus ridibundus</i>	12	119,5 ± 9,0	160,1 ± 3,5	1,64 ± 0,3	17,24 ± 3,14	265,5 ± 56,5	365,9 ± 77,3	3.669,4 ± 562,4	11,54 ± 2,39	
<i>Larus argentatus</i>	12	121,3 ± 5,6	157,5 ± 3,4	1,79 ± 0,2	17,89 ± 5,04	356,5 ± 62,4	468,4 ± 64,8	3.061,2 ± 548,8	9,94 ± 1,68	
<i>Corvus corax</i>	6				18,20 ± 7,8	360,2 ± 30,2	360,2 ± 23,3	3.798,8 ± 253,9	6,22 ± 0,9	
<i>Columba livia</i>	9				16,3 ± 5,3	341,1 ± 46,6	389,5 ± 31,3	2.657,4 ± 547,3	7,36 ± 2,14	
<i>Sula bascana</i>	2	124,0	153,5	3,05	36,3 ± 9,1	216,5 ± 33,2	227,0 ± 15,5	4.499,9 ± 681,7	9,62 ± 0,18	
<i>Pelecanus occidentalis thagus</i>	3	109,8 ± 2,6	149,3 ± 3,2	3,83 ± 0,25	21,2 ± 10,1	174,6 ± 6,0	200,6 ± 17,0	2.862,0 ± 737,2	10,8 ± 2,2	
<i>Pelecanus occidentalis occident.</i>	3	107,6 ± 10,7	147,16 ± 6,3	3,86 ± 0,15	28,2 ± 2,6	170,4 ± 15,5	212,6 ± 19,7	2.033,6 ± 329,2	6,5 ± 0,87	
<i>Pool Pelecanus</i>	6	108,75 ± 7,05	148,2 ± 4,6	3,85 ± 0,18	25,43 ± 6,5	172,5 ± 12,8	206,6 ± 17,7	2.447,8 ± 683,1	8,66 ± 2,8	
<i>Aythya ferina</i> (2 ♂ + 2 ♀)	4	120,0 ± 5,8	150,2 ± 2,5	2,07 ± 0,3	27,42 ± 7,75	273,75 ± 45,25	288,5 ± 35,0	1.785,6 ± 510,4	3,75 ± 0,61	
<i>Phalacrocorax carbo</i>	♂	7	119,3 ± 9,7	154,5 ± 3,3	2,6 ± 3,3	32,3 ± 6,0	238,2 ± 54,6	367,9 ± 107,9	3.118,5 ± 227,3	8,9 ± 2,2
	♀	6	119,1 ± 3,7	156,7 ± 6,13	2,37 ± 0,4	29,2 ± 9,0	216,4 ± 36,6	369,9 ± 81,4	3.488,5 ± 365,3	9,35 ± 1,7
<i>Pool</i>	13	119,2 ± 7,0	155,6 ± 4,7	2,5 ± 0,5	30,44 ± 7,7	226,2 ± 44,5	368,9 ± 90,1	3.320,3 ± 353,2	9,12 ± 1,8	

* Els valors són donats en mg/100 ml, menys els ions (mEq/l).
 • mitjana ± σ

TAULA VII. — Fraccions de proteïnes plasmàtiques en voladors i cabussadors

Fracció número	1	2	3	4	5	6	7	8
Possible identificació	pre-alb.	alb.	α_1	α_2	α_3	β	post- β	γ
Espècies	Nombre							
<i>Larus</i>	6							
<i>argentatus</i>		53,4	12,1	6,4		11,5	10,5	5,9
		± 3,2	± 5,8	± 2,3	± 1	± 2,5	± 2	± 1,2
<i>Larus</i>	6							
<i>ridibundus</i>		52,3	11,2	5,4		18,9		12,6
		± 1,1	± 3,7	± 2	± 1,4	± 1,9		± 2,6
<i>Pelecanus</i>	3							
<i>occidentalis thagus</i>		38,5	7	9,5		21,1		12,6
		± 0,7	± 0,5	± 0,9	± 7,7	± 4,3		± 3,4
<i>Pelecanus</i>	3							
<i>occidentalis occiden-</i>		45,6	17			15,66		16,16
<i>talis</i>		± 0,62	± 0,40			± 0,47		± 0,84
		2,7	36	10,25	12,5	19,75	3,25	10,75
<i>Sula</i>	2							
<i>bassana</i>		± 0,75	± 3,5	± 1,75	± 2,5	± 4,75	± 1,25	± 1,25
		14	44,6	10,8	9	14		7,6
<i>Aythya</i>	4							
<i>ferina</i>		± 4,1	± 7,1	± 5,3	± 1,5	1,4	± 1,6	± 1,7
		13,3	38,4	6,4	12,4	7	16,2	4,25
<i>Phalacrocorax</i>	12							
<i>carbo</i>		± 4,6	± 5,9	± 2	± 1,5	± 1,2	± 1,9	± 0,8
		12,5	35,7	4,2	5,7		17,9	16,75
<i>Corvus</i>	4							
<i>corax</i>		± 2,26	± 3,75	± 0,8	± 1		± 0,21	± 1,82
		27,3	21,3	12,8			23,3	14,1
<i>Columba</i>	7							
<i>livia</i>		± 4	± 3,25	± 2,3			± 5,6	± 1,78

cions plasmàtiques que, en forma gràfica, hom pot veure també a la figura 2 (perfils tipus).

DISCUSSION

Com podem veure a la taula IV, els valors dels galliformes són molt similars, per tal com només hi ha lleugeres diferències. Podem, doncs, agafar-ne les dades per a establir comparacions.

Observem que no hi ha grans canvis en la PO_2 . Els valors oscil·len entre 49 i 60 mmHg en tots els ocells considerats.

La P_{CO_2} i el pH estan relacionats. Així, els animals amb P_{CO_2} elevada tenen un pH baix, i viceversa. Com que tots dos paràmetres són molt sensibles al petit, però inevitable, *stress* respiratori degut a la manipulació de l'animal per a l'extracció de sang, no els tindrem en compte en la discussió.

Referent a l'àcid làctic, els voladors (*Larus argentatus*; *Larus ridibundus*; *Corvus*; *Columba*) mostren valors més baixos (de 16,3 a 18,2) que els cabussadors (de 25,4 a 36,3). I tots dos grups, valors més baixos que els dels galliformes (valor mitjà = 46,03). Potser això té relació amb una millor utilització de l'oxigen a la via glicolítica per part dels ocells amb requeriments metabòlics més alts. El *test* de «t» de Student dona diferències significatives entre voladors i galliformes ($t = 4,832$; $\epsilon = 0,0005$); també entre cabussadors i galliformes ($t = 2,55$; $\epsilon = 0,05$).

Per a l'hemoglobina, els quatre voladors tenen els valors més alts (de 15,9 a 16,5); els cabussadors, valors un xic més baixos (de 14,0 a 14,6); però tots dos grups, valors més alts que els galliformes. A més, si ordenem les espècies de cada grup d'acord amb la quantitat d'hemoglobina, apareix que hi ha una relació entre l'hemoglobina i les dimensions de l'animal. Les espècies més petites en tindrien una quantitat major. La «t» de Student dona diferències significatives entre voladors i cabussadors ($t = 6,8$; $\epsilon = 0,0005$). Hi ha diferències significatives entre voladors i galliformes ($t = 1,901$; $\epsilon = 0,05$), i no apareix significació entre cabussadors i galliformes.

El nombre d'eritròcits és un xic més alt en els voladors-cabussadors que en els galliformes. També per aquest paràmetre, si ordenem les espècies d'acord amb els valors, apareix una relació amb les dimensions de l'animal. Les espècies de menor dimensió corporal tenen la concentració d'eritròcits més alta. El colom és el que en té el valor més alt ($3,74 \times 10^6$), amb força diferència de la resta.

L'hematòcrit és més alt en els voladors i cabussadors que en els galliformes, però els valors estan sobreposats, i no és possible de diferenciar dos grups separats. Com s'esdevenia amb la concentració d'hemoglobina

i el nombre d'eritròcits, també aquí el colom té el valor més alt (50,2) amb una acusada diferència.

La velocitat de sedimentació és molt igual entre totes les espècies estudiades.

Excepte en el mascarell, la quantitat de proteïnes plasmàtiques és més baixa en els voladors i cabussadors que no pas en els galliformes. En *Aythia*, *Pelecanus* i *Columba* els valors oscil·laren entre 1.787 i 2.657 mg %. En les altres, de 3.061 a 3.98 mg %. La mitjana de les sis espècies de galliformes fou de 4.260 mg %. Hom no pot separar grups, puix que els valors se sobreposen. No hi veiem relació amb la dimensió corporal.

Els valors d'urea mostren diferències petites entre els ocells considerats.

La glucosa i els glúcids totals del plasma estan sempre a nivells molt més alts que els dels mamífers i els altres vertebrats. No s'hi poden diferenciar grups, i les variacions que apareixen entre els animals són d'interpretació difícil en termes de requeriments energètics per a volar i nedar, puix que tenen dietes alimentàries i aports glucídics molt diferents.

Els ions plasmàtics són molt constants entre totes les espècies.

Les fraccions de les proteïnes plasmàtiques i llurs perfils corresponents són valors poc susceptibles de comparació. Més aviat són propis i identificatius de cada espècie.

Les dades trobades es corresponen amb les publicades per diversos autors, i recollides en llibres especialitzats, com ALTMAN¹, MARSHALL⁷, STURKIE⁸ o en d'altres publicacions^{2, 5, 6}. Però hem trobat molt poques dades respecte a les espècies aquí estudiades, i encara obtingudes aplicant mètodes d'anàlisi molt diferents, amb una àmplia dispersió entre els valors trobats.

Finalment, i en resum, sembla que hi ha diferències significatives en àcid làctic, nombre d'eritròcits, hematòcrit i quantitat d'hemoglobina entre voladors, cabussadors i d'altres tipus d'ocells com és ara els galliformes; diferències degudes potser a les adaptacions per a la progressió subaquàtica o per a llargues volades.

En d'altres paràmetres les diferències no són tan clares o no existeixen en absolut. D'altra part, les diferències abans esmentades són més petites que algunes estimacions fetes considerant només el colom com a gran volador⁵, ja que el colom, entre els grans voladors està situat en un extrem dels valors, a causa probablement del fet que les dimensions corporals influeixen ensems sobre els paràmetres plasmàtics i sanguinis.

Hem d'acabar dient que el propòsit d'establir que els requeriments metabòlics per al vol (o les adaptacions per a la immersió) es posen de manifest a nivell hematològic descriptiu, potser perd una mica de força per la relativa uniformitat que hi ha entre tots els ocells estudiats (cosa

explicable en homeotermes amb acusada homeòstasi); però creiem que les dades obtingudes són interessants. És possible que els mecanismes que co breixen les diferències d'exigència metabòlica i d'estalvi d'oxigen que sens dubte hi ha, es puguin posar de manifest amb tècniques més elaborades. I pot ésser per a nosaltres una línia de treball.

Actualment, i amb l'intent de veure si un mosaic més ample de dades ens ofereix més possibilitats d'elaboracions fisiològiques o filogenètiques, continuem investigant d'altres ordres d'ocells; concretament estudiem un grup de falconiformes, incloent-hi menjadors de carronya, com és ara còndors i voltors de diverses espècies, i menjadors de carn-caçadors com ara àguiles, milans, falcons, etc.

BIBLIOGRAFIA

1. ALTMAN, P. L., *Blood and other body fluids*. «Biological Handbooks». Federation of American Societies for Experimental Biology (1961).
2. BALASCH, J. i PLANAS, J., *Hematological values in poultry*. «Rev. Esp. Fisiol.», 27, 191 (1971).
3. BALASCH, J. i col·lab. (en premsa), *Poultry Science*.
4. BELL, D. J. i FREEMAN, B. M., *Physiology and Biochemistry of the domestic fowl*. Acad. Press. (1971).
5. BOND, C. F. i GILBERT, P. W., *Comparative study of blood volume in representative aquatic and nonaquatic birds*. «Am. J. of Physiol.», 194, 519 (1958).
6. KOCAN, R. M., *Some physiologic blood values of wild diving ducks*. «J. of Wildlife Diseases», 8, 115 (1972).
7. MASHALL, A. J., *Biology and comparative physiology of birds*. Acad. Press (1960).
8. STURKIE, P. D., *Avian Physiology*. 2nd. edition, Cornell University Press (1968).

AVALUACIÓ DE LA SUTURA EVERTIDA PER A LA CISTORRÀFIA

per J. FERRÉ i F. AGUILÓ

Darrerament han estat presentats alguns treballs experimentals i clínics proposant per a la cistorràfia la pràctica d'anastomosi intestinal amb eversió de la mucosa. Aquesta tècnica va contra els conceptes uniformement admesos per tots els cirurgians, i hi ha opinions diferents en la valoració dels avantatges.

Nosaltres hem volgut valorar experimentalment la possible aplicació d'aquesta tècnica a les sutures de paret vesical.

MATERIAL

Han estat emprats 8 gossos: 4 mascles i 4 femelles, de pesos variables entre 10 i 12 quilograms, i un de 26.

Un d'aquestes animals havia estat ja operat 33 dies abans de l'experiment. Hom li havia fet una doble resecció intestinal amb anastomosi entre els dos extrems lliures. Seguí un període postoperatori normal, i hom el considerà adequat per a la cistorràfia.

MÈTODE

Els animals foren anestesiats segons la pauta que habitualment seguim, amb pentobarbital (25 mg/quilo) endovenós i èter per intubació endotraqueal.

Laparotomia mitjana baixa. Cistotomia mitjana longitudinal, en una extensió aproximadament a $\frac{2}{3}$ de la longitud de la bufeta. Aquesta mida fou molt variable, i depengué de l'estat de contracció vesical. Sutura de la incisió a punts separats en U amb seda 00 i agulla recta

atraumàtica. Els punts foren donats ben pròxims, deixant no més de 2-3 mm entre un punt i el següent.

Sutura de paret per plans amb catgut i pell amb Ili. Durant la intervenció hom els administrà Ringer en gota a gota endovenós. No els foren deixades sondes ni drenatges. En el període postoperatori no els foren administrats antibiòtics. L'endemà els animals menjaven normalment.

Hom controlà els animals fins a la mort, seguida d'autòpsia, i els supervivents foren mantinguts en observació.

Com a controls, serveixen el gran nombre de sutures vesicals fetes al nostre Laboratori, pel mètode clàssic de la sutura invaginant amb dos plans de catgut i que ens ha donat uns resultats excel·lents, sense sondes ni drenatges; podem valorar la proporció de complicacions tingudes amb aquest mètode, com inferior a un 5 %.

RESULTATS

5 dels 8 gossos han mort als 3, 4, 6, 7 i 11 dies postoperatoris.

A l'autòpsia trobarem en 4 una peritonitis aguda amb líquid seropurulent d'aspecte urinós a la cavitat abdominal. Un altre tenia un extens abscess de paret abdominal.

La resta són tres animals amb supervivències de 42, 44 i 58 dies. Aquest darrer fou reoperat per a fer una cistectomia parcial ressecant la línia de sutura.

CONCLUSIONS

En les condicions experimentals dels treballs portats a terme, ha resultat una mortalitat molt elevada després de la cistorràfia amb eversió mucosa. Histològicament ha estat comprovada l'absència d'unió entre les superfícies mucoses al cap de 7 i 11 dies de la intervenció.

Els resultats uniformement satisfactoris de la cistorràfia clàssica, invertint la mucosa en suturar, fan que desaconsellem formalment la sutura evertida en cirurgia vesical.

PARTICIPANTS

AGUILÓ, F.	151	PALACIOS, L.	137
BALASCH, J.	117, 125, 137	PALAU, J.	7, 21
BOFILL, J.	97	PALOMEQUE, J.	137
CARCELLER, C.	107	PARELLÓ, J.	23
CAPONY, J.-P.	23	PÉCHÈRE, J.-F.	23
CAVE, A.	23	PERDIGÓ, M.-T.	37
CLOTET, R.	83	POGO, A. O.	27
CORUNDELLA, L.	27	PUIGDOMÈNECH, P.	21, 23
CUCHILLO, C. M.	11	PUIGJANER, L.	33
FAIFERMAN, I.	27	REVENTÓS, J.	97
FERRÉ, J.	151	RIUS, X.	97
GUERRERO, R.	87	RUBIÓ, M.	111
JIMÉNEZ, M.	137	SABATER-PI, J.	117
JOFRE, J.	67	SASAL, M. T.	111
LOREN, J. G.	57	SITGES, A.	97
MENGUAL, V.	125	SOLER, J. L.	111
MUSQUERA S.	137	SUAU, P.	33
OBACH, D.	11	SUBIRANA, J. A.	33
PADRÓS, E.	7	UNZETA, M.	33
PADROSA, T.	117	VICENS, B.	97
PALACIOS, G.	97	VIVES-REGO, J.	51, 79

T A U L A

<i>Estudis conformacionals de la histona F₃ de timus de vedella</i> , per E. PADRÓS i J. PALAU	7
<i>Reacció de la ribonucleasa A de pàncreas de bou amb pirodoxal-fosfat</i> , per D. OBACH i C. M. CUCHILLO	11
<i>Correlacions entre hidrofobicitat i helicitat en proteïnes</i> , per P. PUIGDOMÈNECH i J. PALAU	21
<i>Estudis conformacionals de les parvalbúmines musculars. Anàlisi per ressonància magnètica nuclear</i> , per J. PARELLÓ, A. CAVE, P. PUIGDOMÈNECH, J.-P. CAPONY i J.-F. PÉCHÈRE	23
<i>Seqüències d'àcid poliadenilic associades amb espècies d'ARN missatger en cèl·lules eucariotes</i> , per L. CORNUDELLA, I. FAIFERMAN i A. O. POGO	27
<i>Caracterització química de la protamina del calamars Loligo vulgaris i la seva interacció amb l'ADN</i> , per M. UNZETA, P. SUAU, L. PUIGJANER i J. A. SUBIRANA	33
<i>Productes finals de fermentació i estat d'oxidació-reducció del substrat</i> , per M.-T. PERDIGÓ	37
<i>El problema de la fixació del N₂ per organismes lliures</i> , per J. VIVES-REGO	51
<i>Problemes genètics relatius a l'expressió genotípica de la producció de prodigiosina</i> , per J. G. LOREN	57
<i>Els estats del factor S i els fenotips de les cèl·lules corresponents</i> , per J. JOFRE	67
<i>Modificacions de l'estructura bacteriana després del rentat dels factors genètics extracromosòmics amb el taronja d'acridina</i> , per J. VIVES-REGO	79
<i>Etanol com a repressor de l'oxidació de l'àcid acètic per Acetobacter</i> , per R. CLOTET	83
<i>Mort per carència de timina i regulació genètica de la síntesi de precursors de l'ADN</i> , per R. GUERRERO	87
<i>Producció d'emfisema pulmonar experimental en el gos</i> , per B. VICENS, G. PALACIOS, A. SITGES, X. RIUS, J. BOFILL i J. REVENTÓS	97
<i>Valor morfològic de la palingènesi i la cenogènesi</i> , per E. GADEA	103
<i>Anomalies del creixement fetal</i> , per C. CARCELLER	107
<i>Captura d'un Chloopsis bicolor a Blanes</i> , per M. T. SASAL, J. L. SOLER i M. RUBIÓ	111
<i>Un avanç de la capacitat d'aprenentatge perceptiu en Mandrillus sphinx i Cercopithecus nictitans</i> , per J. BALASCH, T. PADROSA i J. SABATER-PI	117
<i>El comportament de l'associació Dardanus aitrosor i Calliactis parasítica en hàbitats artificials</i> , per J. BALASCH i V. MENGUAL	125
<i>Valors hematològics comparatius entre galliformes i ocells cabusadors i grans voladors</i> , per J. BALASCH, J. PALOMEQUE, L. PALACIOS, S. MUSQUERA i M. JIMÉNEZ	137
<i>Avaluació de la sutura evertida per a la cistirràfia</i> , per J. FERRÉ i F. AGUILÓ	151
<i>Participants</i>	153

ACABAT D'IMPRIMIR ALS
TALLERS GRÀFICS A. NÚÑEZ
DE BARCELONA
EL 31 DE MAIG DE 1976
GRAVATS DE J. M. LLOVET



