

**REAL ACADEMIA DE FARMACIA  
DE BARCELONA**

**SESION INAUGURAL**

**1 9 7 3**

**Artículo 45 del Reglamento**

*La Academia no se hace solidaria de las opiniones científicas expuestas en sus publicaciones, especificándose esta norma en la contraportada de las mismas.*

**DISCURSO INAUGURAL  
DE CURSO**

por el Muy Ilstre. Prof. Dr. D.

**RAMON PARES - PARES**

Académico Numerario

**EL FACTOR "S" de  
CITROBACTER  
INTERMEDIUM C<sub>3</sub>**

Excmo. Sr. Presidente,  
Iltres. Sres. Académicos,  
Señoras, señores:

## P R E A M B U L O

Al recibir la notificación preceptiva del encargo del discurso inaugural correspondiente al presente Curso Académico, me apercibí que habían transcurrido prácticamente diez años desde que tuve el honor de dirigirme solemnemente a esta Real Academia con motivo de mi ingreso como miembro de número. En aquella ocasión, tuve la suerte de poder ofrecer a la misma un aspecto de mi trabajo claramente relacionado con las inquietudes de la investigación farmacéutica. En cambio, ahora resultaría mucho más difícil para mí hacer algo semejante. Creo que esto es debido principalmente al hecho de que muy poco después de aquella para mí señalada fecha, tomara posesión de la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Barcelona, con la consiguiente reorientación de mi actividad hacia un plano de investigación más básico, al que sin interrupción he venido dedicando hasta el presente mis principales esfuerzos. Por consiguiente no debe sorprender que haya elegido como tema de mi discurso, el descubrimiento de un nuevo elemento genético de las bacterias, bastante alejado de aquella «Prospección de antibacterianos de síntesis» de ayer, pero especialmente representativo de la índole del trabajo que con mis colaboradores he venido llevando a cabo en este tiempo. Por otra parte, me ha atraído la idea de ofrecer a la consideración de ustedes, la perspectiva de la investigación del factor S de *Citrobacter intermedium* porque pienso que constituye un ejemplo particularmente interesante del desarrollo de una problemática científica sorprendentemente expansiva.

### LA ACUMULACION DE AMINOACIDOS EN EL MEDIO DE CRECIMIENTO

El punto de partida de cualquier tipo de investigación científica es la toma de conciencia de determinados hechos. En el caso que nos ocupa, el inicio se encuentra en el fenómeno de la acumulación de aminoácidos en el medio de cultivo a lo largo del desarrollo bacteriano.

Se ha dicho que PASTEUR, THENARD y DUCLAUX, fueron los primeros en señalar este fenómeno (14), pero al pare-

cer no mereció especial atención hasta mucho más tarde. La acumulación directa en un medio sin aminoácidos ni precursores preexistentes no parece haber sido consignada hasta 1950, cuando DAGLEY y colaboradores, en un modesto trabajo realizado en el Departamento de Bioquímica de la Universidad de Lets, refieren que *E. coli* y *A. aerogenes*, acumulan en el medio durante el crecimiento, cantidades medibles de histidina, aspartato, glutamato y alanina (5). Con anterioridad, se había descrito la conversión bacteriana de  $\alpha$ -cetoglutarato en glutamato que se acumula en el medio (1). Posteriormente a 1950 y hasta 1955, se encuentran otras referencias parecidas con relación a distintos organismos, pero a lo largo de estos años y especialmente más tarde, toda la literatura científica al respecto queda absorbida por los trabajos relativos a la producción industrial de aminoácidos por microorganismos. Quizá el punto de partida de esta etapa lo constituya la producción de L-lisina a partir de diaminopimelato (4).

ASAI en 1957 aísla una cepa de *Micrococcus varians* que acumula hasta 3 g/l de l-glutamato, desarrollándose en un medio totalmente mineral (2). KINOSHITA (15), después de un amplio trabajo de prospección, aísla la célebre cepa de *Micrococcus glutamicus* con la que llegaría a una producción directa de aminoácido que permite alcanzar concentraciones en el medio de 20 g/l. A partir de 1958, se extiende en todo el mundo el interés por el estudio de este tipo de fenómenos, especialmente con vistas al posible desarrollo de procesos de producción de aminoácidos por fermentación, de interés económico. Son conocidos los resultados extraordinarios conseguidos en esta dirección y no me propongo insistir aquí sobre ellos.

La producción de grandes cantidades de aminoácidos durante el crecimiento bacteriano, constituía también objeto de curiosidad científica con relación a otra perspectiva. Las bacterias que se desarrollan sobre un medio mineral con glucosa como fuente de carbono y energía, producen los distintos aminoácidos necesarios para la síntesis proteica en una proporción que no excede a la capacidad de esta última, encontrándose presentes en el medio interno celular en cantidades muy pequeñas, como pone de manifiesto el análisis de la fracción ácido soluble del desarrollo bacteriano. La glucosa utilizada se resuelve armónicamente en dos fracciones: la que produce energía y la que se halla en las subunidades para la biosíntesis. Uno de los aspectos más característicos de la integración de la actividad química total de la bacteria es el que estas dos fracciones estén siempre equilibradas.

El equilibrio antes referido, presupone la existencia de mecanismos de regulación bioquímica y por lo que hace referencia

a la síntesis de aminoácidos, en la época antes aludida en la que se produjo la explosión del interés por las investigaciones sobre producción microbiana de aminoácidos, se pensaba que la adición de un aminoácido particular al medio producía la inmediata supresión de su síntesis. De este modo sólo se seguirían produciendo los aminoácidos que no forman parte del medio de cultivo.

De acuerdo con los conceptos que acabamos de referir relativos a la integración de la actividad química y regulación de la síntesis de aminoácidos por inhibición por el producto final, la liberación de grandes cantidades de uno o varios aminoácidos al medio durante el crecimiento, constituye un hecho totalmente incomprensible. ¿Cuál es la lesión bioquímica responsable de este fallo de los mecanismos de regulación y cuál es el soporte genético del mismo? En realidad fue esta la problemática que nos interesó por el fenómeno de la segregación bacteriana de aminoácidos.

#### LA CEPA C3 COMO MODELO

A mediados de 1960 iniciamos con GUINEA y CLOTET, la búsqueda de un modelo apropiado para el estudio de la segregación bacteriana de aminoácidos. En realidad esta búsqueda ponía a prueba una premisa establecida tácitamente: las bacterias segregadoras de aminoácidos no constituyen un artefacto de laboratorio ni un fenómeno rigurosamente excepcional. Por lo tanto, deberán poderse obtener con cierta probabilidad a partir de medios naturales y si esto resulta cierto, es que esta característica puede tener algún valor adaptativo, ya que de lo contrario, habría sido totalmente eliminada por selección natural. De este modo, un resultado favorable en la búsqueda de un nuevo modelo de este tipo de metabolismo, ya constituiría una ampliación de la misma perspectiva señalada como punto de partida del trabajo.

El medio de aislamiento utilizado fue el empleado con anterioridad por ASAI (2), y consta exclusivamente de glucosa (20 g/l), cloruro amónico (7 g/l), fosfato monopotásico (1 g/l) y sulfato magnésico (0,5 g/l) a un pH final de 7,5. Este medio que llamaremos en adelante M<sub>1</sub>, es parecido a muchos medios sintéticos utilizados para el estudio de bacterias fermentativas que no presentan particulares exigencias nutritivas, con la diferencia de utilizar una concentración de sal amónica muy alta, lo cual constituiría el factor de enriquecimiento más específico. Se obtuvieron fácilmente una veintena de cepas a partir de muestras de suelo de jardín y aguas de distinto origen. Todas ellas fueron convenientemente descritas y clasificadas por GUINEA.

CLOTET puso a punto un método para la determinación del nitrógeno amínico soluble, basado en el espectrofotométrico de SPIES y CHAMBERS (22). La segregación de aminoácidos sería detectada por la aparición y el incremento progresivo del nitrógeno amínico en el medio  $M_1$  que sólo contiene nitrógeno amoniacal. Evidentemente, un resultado positivo no constituía una prueba crítica de producción de aminoácidos, puesto que también podría ser el resultado de una fracción más o menos importante de autólisis. Para controlar esta última, se utilizó la determinación de la proteína soluble por el método de LAINE (17). El crecimiento se siguió por la determinación del peso seco de la masa celular.

Las curvas de producción de aminoácido ( $mM-NH_2/g$  de peso seco) y de autólisis ( $g$  de proteína soluble/100  $g$  peso celular), obtenidas durante el crecimiento a  $30^\circ C$ . en  $M_1$  de las cepas aisladas, correspondieron a dos tipos distintos, incluso prescindiendo de los valores cuantitativos específicos para cada caso. Ambos ponen de manifiesto de forma completamente constante, la existencia de un máximo durante las primeras horas de cultivo, en tanto que la masa celular permanece constante o cuando experimenta solo un pequeño incremento. Las curvas de producción de aminoácidos y autólisis son sensiblemente paralelas y los valores absolutos son relativamente pequeños. La conjunción de estos hechos sugiere que en todos los casos tiene lugar un autólisis parcial del inóculo. El estudio cuantitativo de este proceso llevó a la conclusión de que la autólisis, durante la fase de latencia e inicio del crecimiento, es una fracción importante del inóculo e incluso de las células formadas en esta primera etapa de cultivo. Por otra parte, el descenso posterior de la proteína soluble revela que de un modo u otro desaparece del medio y el paralelismo de la curva de aminoácidos que éstos sean el resultado de la degradación de la proteína de autólisis y que ellos mismos sean utilizados para el crecimiento.

La segunda parte de la curva de crecimiento es la que establece la diferencia entre los dos tipos señalados. Mientras en uno sigue el paralelismo de autólisis y producción de aminoácidos a un bajo y constante nivel, en el otro la producción de aminoácidos aumenta de forma lineal con el tiempo de desarrollo hasta la fase estacionaria. Esto último constituye una prueba crítica de la producción de aminoácidos independiente de la lisis celular.

La cepa C3 de *Citrobacter intermedium* pone de manifiesto una auténtica segregación de aminoácidos durante el desarrollo en el medio  $M_1$  a diferencia del resto de las cepas estudiadas. Sin embargo a juzgar por el número relativamente re-

ducido de las mismas, cabe esperar que el fenómeno presentado por la cepa C3 no sea excepcional. Por otra parte, la cantidad de aminoácidos acumulada en el medio alcanza fácilmente  $0,3 g/l$ , referida a alamina, lo cual representa el 70 % del crecimiento.

Hacia el año 1963, teníamos a nuestra disposición un modelo apropiado para el estudio de la producción bacteriana de aminoácidos. Si comparamos la producción de esta cepa con la correspondiente a las cepas conocidas más productoras (20), concluimos que se trata de una producción relativamente pequeña. Sin embargo en condiciones normales de desarrollo, muchas de las cepas más productoras dan cantidades semejantes, tal como pudimos comprobar más tarde con GUERRERO, utilizando la cepa M 534 de *Micrococcus glutamicus*. Ello sugería que la producción absoluta podía incrementarse bajo condiciones especiales de trabajo, lo cual también fue verificado por CLOTET en la cepa C3.

CLOTET llevó a cabo un análisis de los aminoácidos segregados por la cepa C3 por purificación en columna y ulterior cromatografía ascendente sobre papel. Encontró en todos los análisis cuatro fracciones, las cuales pudieron identificarse respectivamente con alanina, glutamato, aspartato y aminoácidos básicos. La alanina es el aminoácido mayoritario seguido del glutamato. Ambos constituyen probablemente y en todo caso más del 80 % del total. Esta proporción es completamente distinta de la correspondiente a los aminoácidos del medio interno celular y a los resultantes de la autólisis. Por lo tanto constituye una comprobación adicional de que son el resultado de una liberación específica al medio.

La cromatografía sucesiva mostró que el glutamato aparece precozmente pero tiende a desaparecer en favor de la alanina. Los demás aminoácidos representan una fracción constante con respecto al total. Esto sugirió el modelo operativo de que la segregación de aminoácidos por *Citrobacter intermedium* C3, era consecuencia de una producción primaria de glutamato, en tanto que la alanina y los demás aminoácidos podrían resultar de una transformación secundaria del primero.

Después de los hechos referidos, disponíamos de un material adecuado sobre el que cabía establecer un planteo experimental con vistas a encontrar una respuesta a la pregunta de por qué el glutamato se formaba en una cantidad que no podía ser utilizado para el crecimiento y se perdía en el medio, en gran parte transformado en alanina. La pregunta en el caso concreto que nos ocupa quedaba justificada, porque la cantidad perdida en forma de aminoácidos podía exceder a todo el crecimiento bacteriano conseguido. ¿Es que había una sobrepro-

ducción del referido aminoácido o se trataba de una subutilización? La verdad es que durante algún tiempo permanecemos perplejos sin saber cómo abordar el problema. Los trabajos realizados sobre las cepas productoras de aminoácidos tomaban el fenómeno desde el punto de vista de la producción de un producto final de fermentación y se limitaban a consignar la vía bioquímica por la cual desde el sustrato se llegaba a él. Era evidente que las vías de formación de glutamato a partir de la glucosa, no tenían ningún detalle expresivo en relación a su posible sobreproducción y podían considerarse como bastante bien conocidas. Era obvio que necesitábamos nuevas ideas para abordar el problema. Por una parte y principalmente por los trabajos llevados a cabo por CLOTET, se intentó buscar algunas condiciones de desarrollo de la cepa C3, en las cuales no tuviera lugar la segregación de aminoácidos o alternativamente, en las que la misma fuera singularmente exaltada. Pero la fortuna se apiadó de nuestras tribulaciones y nos abrió la luz hacia otro camino que resultaría mucho más fructífero.

#### LA HETEROGENEIDAD COLONIAL

CLOTET consiguió una concentración 12mM de nitrógeno amínico en el medio de crecimiento de la cepa C3. Después, sin saber por qué, pasamos una serie de meses en los que las producciones de aminoácidos no se hacían nunca superiores a 3mM. Cosas de este tipo suelen ocurrir en el trabajo de laboratorio y entonces uno se siente llevado al desánimo. Sumergido completamente en el impase, se me ocurrió sugerir a GUINEA que intentara mostrar la acumulación de glutamato alrededor de las colonias de C3 creciendo en  $M_1$  sólido, vertiendo sobre las mismas una suspensión diluida de una cepa auxotrófica cuyo crecimiento dependiera de la presencia del aminoácido. Utilizamos la cepa P-60 de *Leuconostoc mesenteroides*, recomendada para la determinación microbiológica del glutamato (23). GUINEA puso la técnica a punto con éxito, mostrando que efectivamente aparecían halos de crecimiento de *Leuconostoc* bien visible alrededor de las colonias de la cepa C3. Sin embargo se encontró con un hecho imprevisto: existían también unas colonias sin halo. Este resultado no podía interpretarse más que admitiendo que en la población de la cepa C3 en  $M_1$ , habían dos tipos de individuos, unos segregadores de glutamato que daban colonias con halo por revelado con *Leuconostoc mesenteroides* y otros no segregadores, que daban colonias que no permitían el crecimiento de la cepa auxotrófica glutamato dependiente a su alrededor. Casi un año más tarde, en 1966, utilizando una cepa auxotrófica alanina dependiente de *Pediococcus cerevisiae*, HERNANDEZ pudo mostrar, quizás con algo más

de dificultad, que la acumulación de glutamato y alanina alrededor de las colonias eran fenómenos simultáneos y que cuando faltaba un aminoácido también faltaba el otro. La mayor o menor producción de aminoácidos antes señalada quedaba explicada en función de la mayor o menor proporción de individuos segregadores en la población, como probaría URGELL en 1968, cuando llegamos a controlar las condiciones de crecimiento que determinan segregaciones de aminoácidos altas o bajas.

En este momento del desenvolvimiento del trabajo (1965), se me plantearon nuevos e interesantes aspectos del problema, antes completamente imprevisibles. En efecto, el subcultivo de una colonia no segregadora daba lugar a una población con elementos segregadores y no segregadores que por análisis colonial con *Leuconostoc mesenteroides* P-60 no podía distinguirse de la población de la cepa C3 original. Lo mismo ocurría si subcultivábamos una colonia segregadora de aminoácidos. En todos los casos, llegábamos a una población que daba por análisis colonial una proporción 4:6 de colonias de uno y otro tipo. Por lo tanto debíamos llegar a la sorprendente conclusión de que una célula segregadora daba una descendencia heterogénea, al igual que otra no segregadora, lo cual está en contra del concepto generalmente admitido de cultivo puro como población uniforme derivada de una sola célula por división binaria. Era evidente que las células de un tipo se transformaban en las del otro y viceversa, sin que aparentemente el medio tuviera ninguna influencia. ¿Es que las células  $sg^+$  y  $sg^-$  de la población de la cepa C3 difieren genéticamente? Entonces, ¿cuál sería esta diferencia y qué tipo de mecanismo genético determinaría el referido cambio?

Por esta misma época, hacia 1965, se descubrió otro hecho especialmente significativo, también en relación al fenómeno de la heterogeneidad colonial. Si se añadía  $\alpha$ -cetoglutarato al medio  $M_1$  o se substituía toda la glucosa por este cetoácido, todas las colonias resultaban segregadoras. Trasladando con un tampón de terciopelo las colonias de  $M_1$  a  $M_1$  con  $\alpha$ -cetoglutarato, pudo observarse que las mismas colonias no segregadoras en el primer medio, eran segregadoras en el segundo. Este es un método análogo al utilizado por LEDERBERG para mostrar que las mutantes aparecen con independencia del medio ambiente (19). El isocitrato y el citrato, que son los otros precursores inmediatos en la biosíntesis del glutamato, no producían este efecto. En estos dos últimos casos teníamos el mismo resultado que con glucosa. Por lo tanto cabía pensar que en las células  $sg^+$  se producía mucho más rápidamente  $\alpha$ -cetoglutarato que en las  $sg^-$  y que la velocidad de giro de todo el ciclo del ácido cítrico no permitía utilizarlo en las primeras. Al acu-

mularse el cetoácido se producía glutamato y secundariamente los demás aminoácidos antes referidos.

El análisis colonial con *L. mesenteroides* nos mostró el fenómeno de la heterogeneidad colonial y a través de éste pudo abrirse una brecha para el análisis de la lesión bioquímica responsable de la segregación de aminoácidos, tanto como para la investigación del condicionante genético de esta lesión.

#### EL ANALISIS GENETICO

Está generalmente establecida la conveniencia de cuantificar los experimentos y las conclusiones obtenidas por inducción por cuanto con ello se hace mucho menos probable una coincidencia al azar entre nuestras generalizaciones y el orden causal de los hechos. Por esto, resultaba eficaz estudiar cuantitativamente la descendencia de los elementos segregadores de la población de los cultivos de la cepa C3 en  $M_1$ , tanto como la de los elementos no segregadores, en vistas al conocimiento de la distribución del carácter después de cada generación y a la aparente independencia de la misma con respecto al medio ambiente.

Practicamos diluciones de una colonia no segregadora hasta conseguir inóculos que no podían estar constituidos por más de diez células por ml de  $M_1$  líquido. La incubación ulterior a 30° C. por un periodo corto, de 12 horas por ejemplo, mostraba poblaciones con un porcentaje de colonias segregadoras muy interesante. Examinando decenas de cultivos iguales de este tipo se encontró un gran número de ellos con una fracción nula o muy pequeña de colonias segregadoras, muy pocos cultivos con una fracción próxima a la de la cepa paterna y un número bastante elevado con un 100 % ó casi un 100 % de colonias segregadoras. Esto mostraba que el cambio  $sg^- \rightarrow sg^+$  ocurría al azar, con independencia del medio y del tiempo de incubación y que una vez verificado se conservaba en la descendencia, por lo menos tanto como el carácter no segregador de las células del inóculo.

En realidad, el estudio cuantitativo correcto lleva consigo la determinación adicional de la fluctuación debida al azar del porcentaje de colonias segregadoras, lo cual se consigue haciendo muchas determinaciones de un único cultivo del mismo tiempo de incubación iniciado con el mismo inóculo pero mucho más concentrado. Este experimento es substancialmente análogo al llevado a cabo por DELBRÜK y LURIA para el análisis de las mutaciones de las bacterias virus sensibles a virus resistentes, como cambio heredable que se lleva a cabo con independencia del medio ambiente y con una pequeña y definida probabilidad por célula y generación (6). Ordinariamente a este tipo de experimento se le llama prueba de la fluctuación y es susceptible de un tratamiento matemático que

permite conocer el riesgo de error e incluso determinar el valor preciso de la velocidad del cambio genético. Los resultados obtenidos por nosotros, después de las determinaciones experimentales llevadas a cabo por GUINEA y HERNANDEZ, pusieron fuera de toda duda que las células no segregadoras daban lugar espontáneamente a células segregadoras, como en las mutaciones estudiadas primeramente por DELBRÜK y LURIA. Sin embargo existía una salvedad en cuanto a que el cambio genético tenía lugar aparentemente con una probabilidad mucho mayor que la encontrada no sólo en las mutaciones virus sensibles a virus resistentes sino en todas aquellas otras descritas para las bacterias hasta el presente (3).

Los métodos utilizados para determinar la velocidad de mutación sólo podían aplicarse de forma aproximada a nuestro modelo, precisamente debido a este valor tan alto de la velocidad del cambio genético. En efecto, la aparición de elementos segregadores sólo podía detectarse y medirse por análisis colonial con *Leuconostoc mesenteroides* P-60, lo cual suponía la formación de colonias con un número suficientemente alto de individuos para que el cambio  $sg^- \rightarrow sg^+$  ocurriera en una fracción importante de las mismas. Entonces habría dos tipos de colonias segregadoras: unas derivadas de células  $sg^+$  y otras derivadas de células  $sg^-$ . Durante mucho tiempo me esforcé en diseñar un experimento adecuado para poder subsanar el error derivado de esta posibilidad en la determinación del porcentaje de individuos segregadores que iba apareciendo en la descendencia de una célula no segregadora.

Convenía saber de antemano la probabilidad de que una célula no segregadora pudiera dar una colonia segregadora bajo unas determinadas condiciones del análisis colonial. Esta probabilidad se determinó revelando la población de pequeñas colonias no segregadoras sin que mediara tiempo alguno de incubación y bajo condiciones muy críticas. Con ello ya se podía utilizar la fórmula de DELBRÜK y LURIA.  $r = \frac{aN}{\ln^2} \ln \frac{CaN}{\ln^2}$ ,

en la que  $r$  es la fracción de colonias segregadoras,  $N$  el número total de colonias por placa,  $C$  el número de cultivos y  $a$  la velocidad del cambio fenotípico (6). Para ello bastaba substituir los valores de  $a$  por  $a(1-P)$ , siendo  $P$  la referida probabilidad de que una célula  $sg^-$  diera una colonia segregadora para unas condiciones definidas de revelado.

Pude también diseñar un nuevo tipo de experimento completamente independiente de la prueba de la fluctuación, con el cual podía determinarse correctamente el valor de  $a$ , el cual

ha sido descrito detalladamente en varias ocasiones y que quizá por su relativa complejidad, no sea apropiado hacerlo de nuevo aquí (7). Se funda en determinar la frecuencia aparente de los fenotipos cambiados simultáneamente en dos poblaciones isonómicas de distinto tiempo de generación. Entonces

$$a' = \frac{F'_2 - F'_1}{n_2 n_1} \text{ y también } a' = \frac{a}{1 - P}$$

en las que  $F'$  son las frecuencias aparentes de las células  $sg^+$  deducidas del análisis colonial,  $n$  el número de generaciones,  $a'$  la velocidad aparente del cambio  $sg^- \rightarrow sg^+$  y  $a$  y  $P$  los valores antes referidos. De este modo se encontró, coincidiendo con los resultados derivados del análisis de la fluctuación y gracias a la pericia extraordinaria puesta de manifiesto por GUINEA y HERNANDEZ, que el número de elementos segregadores de la descendencia de una célula  $sg^-$  era aproximadamente el que resulta de una probabilidad de transformación fenotípica del 1 % por célula y generación, por lo menos durante las diez primeras generaciones.

También se hicieron experimentos parecidos que permitieron mostrar que el cambio retrógrado  $sg^+ \rightarrow sg^-$  tenía lugar a una velocidad del mismo orden de magnitud y que partiendo de poblaciones relativamente pequeñas de células  $sg^-$ , en unas ocho a diez generaciones se alcanzaba el equilibrio entre elementos segregadores y no segregadores correspondiente a la fracción de colonias segregadoras encontrada en la población original de la cepa C3 de *C. intermedium* crecida en  $M_1$ .

A la vista de los resultados obtenidos, se planteó una nueva cuestión de tipo completamente general. ¿Era posible una mutación reversible con una velocidad del orden del 1 %, por célula y generación en los dos sentidos? Cuando nos formulamos esta pregunta, en 1966, ya se tenía conocimiento de otros tipos de cambios de alta frecuencia en las bacterias, tales como entre las dos fases de *Salmonella typhimurium*, cuya cinética mostraba una velocidad de mutación del 1 al 5 por 1.000 (24). La explicación de estos fenómenos encontró una nueva perspectiva después de la introducción del concepto de episoma por JACOB y WOLLMAN (13). Este concepto se había desarrollado sobre el estudio del factor F de fertilidad de *E. coli* K-12 y sobre el fago- $\lambda$ . Sin embargo los autores referidos vieron que estos casos debían ser ejemplos de un tipo de elemento genético mucho más general. En la definición original, se entiende como episomas a los elementos genéticos que pueden estar presentes o ausentes en la célula y que en el primer caso pueden multiplicarse bien en forma autónoma o bien integrada con el cromosoma bacteriano. Por lo tanto, la manifestación fenotípica de un carácter episómico puede estar ligada tanto a su

presencia como al tipo de su multiplicación. En este último caso se justifica la formación de una descendencia fenotípicamente heterogénea con independencia de la mutación y del medio ambiente y con un equilibrio entre las mismas, resultado de la interconversión.

La segregación de aminoácidos en *C. intermedium* C3 quedaba entonces planteada como una propiedad que podía depender de la presencia de un ADN extracromosómico, el cual según el estado de multiplicación condicionaría dos velocidades distintas de formación de  $\alpha$ -cetoglutarato y con ello los dos tipos  $sg^+$  y  $sg^-$  detectados por el análisis colonial.

Estoy convencido de que la etapa de la investigación del factor S de *C. intermedium* que estoy describiendo, constituye lo que podríamos denominar el paso a su mayoría de edad. Coincide este momento con la terminación de tres tesis doctorales al respecto, las de GUINEA, CLOTET y HERNANDEZ. Por otra parte, coincide también con el momento en que el tema y la problemática empiezan a llamar la atención fuera de nuestro ámbito de trabajo. Esto constituyó para mí una importante oportunidad que no podía desaprovechar. La secuencia experimental y la estructuración lógica de la investigación empezaban a ser verdaderamente complejas y era necesario someterse a una crítica continuada para asegurar que nuestros resultados y conclusiones pudieran ser explícitamente objetivos.

## VERIFICACION DEL MODELO EPISOMICO

### I — La eliminación del factor S

Si la segregación de aminoácidos en la cepa C3 estaba determinada por un episoma, parecía necesario admitir que se hallaba presente tanto en las formas segregadoras como en las no segregadoras. De otro modo no podía explicarse por qué los cultivos iniciados con muy pocas células  $sg^-$  daban una descendencia que terminaba por ser idéntica a la población de origen en cuanto a la fracción de elementos de uno y otro tipo. Un elemento S-, sin episoma, sería incapaz de dar ningún elemento segregador en la descendencia.

Las células  $sg^-$  y  $sg^+$  de la población de la cepa C3 en  $M_1$  debían diferir por tener en un caso el material episómico multiplicándose autónomamente y en el otro en forma integrada con el cromosoma bacteriano. Se sabía que los plásmidos o episomas en estado autónomo son más sensibles al anaranjado de acridina que el ADN cromosómico (10-11). De este modo se podían eventualmente eliminar por incubación con dicho colo-

rante a una concentración que no afectase la multiplicación cromosómica.

Pensamos que en la descendencia de una célula  $sg^-$  el número promedio de episomas por célula tendría que disminuir si se desarrollaba en presencia de anaranjado de acridina. Si esto era así, la probabilidad del cambio  $sg^- \rightarrow sg^+$  por célula y generación debía disminuir sensiblemente. Llevados por esta idea, decidimos repetir los experimentos anteriores de la determinación de la velocidad del cambio fenotípico por el método de las poblaciones isonómicas, pero incubando con  $10 \mu\text{g/ml}$  de anaranjado de acridina, encontrándonos que efectivamente el valor de  $a$  disminuía drásticamente. En realidad se hacía negativo, si bien esto sólo quería significar que la probabilidad de que una célula  $sg^-$  diera una colonia segregadora al análisis colonial se había hecho decididamente más pequeña. Teníamos un nuevo tipo de células  $sg^-$ , todavía reversible pero que necesitaba una larga incubación en el medio  $M_1$  sin colorante para dar elementos segregadores y finalmente llegar al equilibrio de la población original.

Los resultados referidos constituyen el primer apoyo experimental de la hipótesis episómica del factor S. Además, ellos sugieren que la formación de un elemento  $sg^+$  supone la integración del plásmido y que éste tiene lugar cuando el número de elementos autónomos por célula es suficientemente alto. Sobre estas ideas pude hacer un modelo episómico del factor S que puede resumirse en las siguientes dos proposiciones:

1. Las células  $sg^+$  tienen el episoma multiplicándose en estado integrado y en un locus relativamente inestable. En estas condiciones se produce más  $\alpha$ -cetoglutarato que el que puede absorber el ciclo del ácido cítrico y se elimina glutamato al exterior. En estos elementos  $sg^+$  no hay episomas autónomos.

2. El paso de la forma integrada de multiplicación a la autónoma tiene su expresión fenotípica en la conversión  $sg^+ \rightarrow sg^-$ . Una vez se encuentra el factor S en estado autónomo, se multiplica más rápidamente que el cromosoma bacteriano, con lo cual el número por célula va aumentando, haciéndose cada vez más alta la probabilidad de integración. Con anaranjado de acridina se inhibe la multiplicación autónoma y la integración sobreviene un acontecimiento mucho más raro.

De acuerdo con esta hipótesis, cabía esperar que por incubación prolongada en anaranjado de acridina pudiéramos obtener elementos  $S^-$  totalmente irreversibles, libres del episoma.

Las primeras experiencias llevadas a cabo en tal sentido por GUERRERO condujeron a un resultado insospechado: se obtuvieron poblaciones en las que el análisis colonial revelaba un incremento de las formas segregadoras. Ello era claramente contradictorio con los resultados obtenidos por GUINEA y

HERNANDEZ. Esto ocurría hacia el año 1967, cuando GUERRERO iniciaba su tesis doctoral y tardó bastante tiempo en convencerme, después de las convenientes reiteraciones, de que realmente no era el tipo de resultado atrabiliario obtenido frecuentemente por los aprendices o por ciertas personas que evidentemente no han elegido bien su actividad. Pero pudo comprobarse que efectivamente era cierto.

Estudiando todos los detalles de los experimentos contradictorios, me di cuenta de que HERNANDEZ había utilizado inóculos muy pequeños procedentes de una colonia no segregadora en relación con los utilizados por GUERRERO. Entonces la probabilidad de encontrar un elemento  $sg^+$  en la población de partida era mucho mayor. De este modo el resultado de GUERRERO sólo podía ser consecuencia de que en el medio  $M_1$  con anaranjado de acridina, se multiplicasen mucho más rápidamente las células  $sg^+$  que las células  $sg^-$ . Luego el propio GUERRERO dio la confirmación experimental completa de estos supuestos, si bien a la selección de los elementos  $sg^+$  mediante anaranjado de acridina la seguimos llamando efecto paradójico del OA.

El efecto paradójico del OA, junto al efecto normal, nos permitió obtener poblaciones tan grandes como quisiéramos, formadas fundamentalmente bien de elementos segregadores o bien no segregadores. Esto constituyó el primer fraccionamiento llevado a cabo con éxito de los dos componentes de la población de la cepa C3 y resultó de extraordinaria importancia de cara a los análisis enzimáticos que requieren suficiente material de partida. Josefina VALOIX se especializó durante algún tiempo en preparar y mantener poblaciones que daban un 100 % de colonias segregadoras y un porcentaje nulo de las mismas. Esto fue extraordinariamente útil para los trabajos que entonces estaban llevando a cabo GUERRERO y URGELL. Sin embargo no había forma de conseguir una  $sg^-$  irreversible. Como sea que las poblaciones muy tratadas con anaranjado de acridina crecían cada vez peor, pensamos que las células  $S^-$  se desarrollaban tan mal en  $M_1$  que su aislamiento resultaba poco menos que imposible.

Afortunadamente, después de una paciente labor, Josefina VALOIX consiguió obtener cultivos no segregadores originados aparentemente de la descendencia de la cepa C3 tratada con anaranjado de acridina. La obtención de estas cepas  $S^-$  ha sido repetida por Josefina VALOIX y reproducida por VALLESPINOS y JOFRE. Realmente esto constituye un punto muy importante en la confirmación de la naturaleza episómica del factor S y como tal nos propusimos examinarlo a fondo. En primer lugar observamos que estas cepas  $S^-$  diferían de

la cepa C3 no sólo por la ausencia del carácter segregador sino por otras varias características fenotípicas. Eran tan sensibles a las sales biliares que no podían crecer en muchos medios que las contienen como factor selectivo de bacterias entéricas. El medio de HUGH-LEIFSON mostraba que las cepas S- habían perdido la capacidad de utilizar anaeróbicamente la glucosa y daban un resultado parecido al de *Acromobacter*, *Flavobacterium* y otros miembros de la familia de las acromobacteriaceas (12). GUERRERO mostró que habían perdido la sensibilidad a una serie de fagos aditivos sobre la cepa C3 y que se hacían extraordinariamente más sensibles a la radiación ultravioleta, tanto como las mutantes s-UV sensibles de *B. subtilis* (21). En realidad este aumento de la sensibilidad a la radiación ultravioleta ya tenía lugar en las poblaciones reversibles de elementos no segregadores y es un dato muy interesante que más tarde nos ha llevado a hacer experimentos con ADN fágico irradiado que muestran que el factor S en estado integrado determina una importante capacidad restauradora de las lesiones fotoquímicas producidas en la molécula de ADN. La estructura microscópica de las células S- y sus propiedades tintoriales difieren de la cepa C3. VIVES puso de manifiesto al microscopio electrónico la existencia de una gran cantidad de intrusiones membranosas que no se encuentran en la cepa paterna.

Todos los hechos referidos tenían un carácter verdaderamente espectacular: la eliminación de un factor episómico presentaba unas implicaciones taxonómicas y fisiológicas de una profundidad sin parangón con los otros episomas conocidos hasta el presente y no implícita en el concepto comunmente admitido de estos elementos genéticos.

Pronto llegué al convencimiento de que de ser ciertos, los resultados obtenidos tenían realmente un gran interés. Por ello procuré concentrar todos nuestros esfuerzos, a pesar de la natural impaciencia de algunos de mis colaboradores, en la rigurosa comprobación de los mismos. En 1969, obtuvimos las primeras cepas S- que se han seguido subcultivando hasta el presente mostrando que efectivamente el carácter segregador se ha perdido, que han sido definitivamente curadas. Ultimamente JOFRE ha obtenido nuevas cepas S- con anaranjado de acridina y con bromuro de etidio y también después de selección fágica. Todas las cepas S- tienen una fundamental uniformidad. Sin embargo, VIVES ha podido aislar del suelo cepas naturales que son fenotípicamente parecidas a las células S-. Por lo tanto, decidimos obtener una serie de mutantes auxotróficas de la cepa C3, con marcadores cromosómicos que permitieran seguir sin lugar a dudas toda su descendencia. Estas cepas fueron tratadas por los métodos anteriores para eliminar

el factor S y obtener cepas S- que se podían identificar sin duda alguna como descendientes de la cepa paterna por los correspondientes marcadores. Todo este trabajo ha sido realizado brillantemente por JOFRE, uno de los últimos investigadores enrolados en la aventura del C3.

## VERIFICACION DEL MODELO EPISOMICO

### II — Transferencia infecciosa

En el primitivo concepto de JACOB y WOLLMAN (13), la manifestación fenotípica de un carácter episómico en la población puede depender tanto de su presencia o ausencia como de su multiplicación en estado autónomo o integrado. Los factores R de resistencia acoplada a los antibióticos son elementos de tipo episómico que solamente se han encontrado en estado autónomo y al parecer este caso no es único (25). Por esto, HAYES ha considerado la conveniencia de restaurar la denominación de plásmidos establecida primeramente por LEDERBERG (18), para designar a cualquier tipo de elemento genético extracromosómico, reservando el nombre de episomas para aquellos que pueden alternativamente multiplicarse en estado integrado y autónomo (8-9).

Aunque no se incluye en la definición inicial de episoma, una de las características más conspicuas de este tipo de elementos genéticos es la de poderse transmitir como un carácter infeccioso. Una forma simple de definir la herencia de tipo infeccioso sería la de aquellos caracteres cuya penetración en la población se hace con independencia del tiempo de generación. La denominación de herencia infecciosa corresponde a la semejanza con los fenómenos epidémicos, pero resulta también semejante a la difusión de las características culturales, la cual corresponde a un tipo de mecanismo distinto al del fenómeno infeccioso.

El factor F de *E. coli* K-12, el fago- $\lambda$ , los factores R y muchos factores col, dan lugar a fenómenos de herencia infecciosa. Se conocen otros caracteres de tipo episómico que no presentan fenómenos de herencia infecciosa e incluso esta propiedad puede perderse para un tipo definido de episoma. Como la integración, la capacidad de transferencia infecciosa es una propiedad facultativa de los plásmidos. Sin embargo, todos los fenómenos de herencia infecciosa en las bacterias, conocidos hasta el presente, son debidos a plásmidos. La recombinación genética por conjugación está vehiculizada por un factor episómico de transferencia y puede considerarse formalmente como un caso particular de herencia episómica.

En el análisis genético del factor S de *Citrobacter intermedium* C3 se llevó a cabo la determinación de la velocidad a con la cual aparecen elementos segregadores en la descendencia de un elemento no segregador. Ya he señalado que utilizando dos caminos independientes se llega a la conclusión de que esta velocidad es del orden de 1 por cada 100 células en cada generación. Entonces cabía preguntarse si en esta rápida aparición de elementos segregadores intervenía o no un fenómeno de tipo infeccioso. Para ello hicimos nuevas determinaciones del valor de  $a$  bajo condiciones en las cuales la infección pudiera ser excluida o drásticamente disminuída. Se sabe que para la transferencia infecciosa de los plásmidos se requiere la formación de un puente intercelular o fimbria sexual entre dador y aceptor, lábil a la agitación mecánica. Por ello se aplicó el mismo método de las poblaciones isonómicas, sometiendo los cultivos a una fuerte agitación no turbulenta durante la incubación. Encontramos que para tiempos de alrededor de diez generaciones, el valor de  $a$  se había hecho prácticamente nulo y, como era de esperar, sin que se modificara el valor de  $P$ . Esto suministraba una evidencia notable en favor de la intervención de un fenómeno infeccioso en la formación de elementos segregadores y con ello una nueva e independiente evidencia de la naturaleza episómica del carácter.

Ante el resultado referido se me desveló una pertinaz obsesión por conseguir la transferencia infecciosa de la propiedad de segregar aminoácidos a una cepa bacteriana distinta y con evidencia de que nunca pudiera presentar por sí misma dicha propiedad. Después de una prospección relativamente tediosa, encontramos que la cepa ATCC 11066 de *Paracolobactrum intermedium* podía constituir un material adecuado.

La cepa referida de *Paracolobactrum* es capaz de crecer en el mismo medio  $M_1$  y es susceptible de análisis colonial con *Leuconostoc mesenteroides* P-60, dando regular y constantemente colonias que nunca acumulan glutamato a su alrededor. Por otra parte, un cultivo mixto de *P. intermedium* y *C. intermedium* C3 se puede separar fácilmente sobre el medio de *Mc. Conkey*, debido a que la fermentación de la lactosa se lleva a cabo a una velocidad muy diferente en uno y otro caso. Todos estos datos fueron establecidos por SANCHO y GUERRERO y con ellos pudimos llevar a cabo con GUINEA el deseado experimento crítico. Después de la incubación mixta de las dos cepas bacterianas referidas, separamos las colonias de *Paracolobactrum* sobre *Mc. Conkey*, trasladándolas a placas con  $M_1$  y allí se llevó a cabo el análisis colonial con la cepa auxotrófica P-60. Analizamos varios miles de colonias, encontrando un gran número de ellas que acumulaban glutamato a

su alrededor. El subcultivo de estas colonias mostró que estaban constituidas por individuos segregadores y no segregadores, pero a diferencia de lo que ocurría en la cepa C3, el nuevo subcultivo de las colonias segregadoras daba lugar a poblaciones homogéneas de individuos segregadores.

La transferencia del factor S a *Paracolobactrum* es un experimento de gran valor para la confirmación del modelo episómico. En primer lugar porque como todo buen experimento de contraprueba, reduce al absurdo toda alternativa de la hipótesis de partida. Pero además, es que resulta ser uno de aquellos experimentos afortunados que salen siempre limpiamente bien. Tanto es así que desde el año 1969, todos los alumnos que cursan Ampliación de Microbiología conmigo, han tenido la oportunidad de hacerlo repetidamente con éxito.

La transferencia del factor S por vía infecciosa, nos hizo pensar en la posibilidad de revertir las cepas  $S^-$  de *C. intermedium* C3 al tipo salvaje. En los primeros experimentos, Josefina VALOIX intentó utilizar como dador la misma cepa salvaje muerta con estreptomycinina o muerta por el calor. La gran resistencia a la estreptomycinina de la cepa C3 hizo inútil la primera posibilidad, si bien nos condujo a la obtención de cepas  $sg^+$  con un locus de integración mucho más estable que el correspondiente a las células  $sg^+$  de la población paterna y probablemente análogas a las cepas  $sg^+$  de las poblaciones enriquecidas con anaranjado de acridina. Con dadores muertos por el calor se obtuvieron cepas que aparentemente resultaban de la reversión  $S^- \rightarrow S^+$ . Sin embargo los resultados no podían considerarse completamente críticos porque el efecto letal no es rigurosamente el 100 %. La reversión crítica ha sido conseguida más tarde por JOFRE, utilizando cepas dadoras y aceptoras con marcadores cromosómicos distintos, obtenidas previamente por tratamiento con nitrosoguanidina.

La propiedad de la cepa C3 de acumular aminoácidos en el medio es una característica cuya expresión depende de la presencia de un elemento genético en un definido estado de multiplicación dentro de la célula, por cuanto en otro estado puede hallarse dentro de la misma sin manifestarse. Puede eliminarse sin afectar la viabilidad de la célula bacteriana. Finalmente puede transferirse por vía infecciosa. En consecuencia, después de unos diez años, podíamos concluir que sin lugar a dudas el factor S era un nuevo tipo de episoma.

#### EL MECANISMO BIOQUIMICO

Ya he señalado que desde el año 1965, sabíamos que el  $\alpha$ -cetoglutarato en el medio hacía que todas las colonias se mostraran uniformemente segregadoras de glutamato. Aparen-

temente los elementos  $sg^+$  y  $sg^-$  no diferían en esta característica fenotípica en presencia del cetoácido, dando lugar a lo que se llama una fenocopia. Esta hipótesis abría una posibilidad a la explicación bioquímica del mecanismo de segregación, pero su fundamento no era completamente crítico, ya que el crecimiento podía tener lugar sobre elementos  $sg^+$  que se forman muy rápidamente a partir de poblaciones pequeñas de  $sg^-$ . Desde las célebres discusiones de HINSELWOOD y RYAN acerca del origen de la variación bacteriana (16), todos los microbiólogos sabemos cuán difícil es eliminar un crecimiento basal capaz de dar lugar a las formas que seguirán desarrollándose. Recientemente JOFRE, ha podido mostrar la autenticidad de la fenocopia inducida por el  $\alpha$ -cetoglutarato al verificar que todas las cepas  $S^-$  también segregan glutamato en su presencia. Este resultado excluye asimismo la posibilidad de que la diferencia entre las células  $sg^+$  y  $sg^-$  se derive de una distinta capacidad de utilizar el aminoácido.

En las células  $sg^+$  hay una sobreproducción relativa de glutamato que sólo parece depender de la conversión de isocitrato a  $\alpha$ -cetoglutarato por el sistema de la isocitrato deshidrogenasa. O bien se produce más enzima, o bien una isoenzima más eficaz.

En 1968, URGELL puso a punto la determinación de la actividad ICDH-asa  $NADP^+$  dependiente en preparados solubles de *C. intermedium* C3. Entonces pudo poner brillantemente de manifiesto que de acuerdo a lo que se había previsto, la actividad específica de esta enzima presentaba una estricta correlación con la fracción de elementos segregadores de la población. La actividad de las poblaciones enriquecidas en elementos segregadores era más de dos veces superior a la de las cepas  $S^-$ , siendo intermedia la correspondiente a la cepa C3. El trabajo de URGELL fue sólo posible después de desarrollar las técnicas de fraccionamiento de la población de la cepa C3 y de la obtención de las cepas  $S^-$ . En realidad constituye una feliz incidencia del análisis genético y bioquímico de la segregación de aminoácidos por la cepa C3, que durante varios años se llevaron a cabo en líneas independientes de investigación. Pero, el experimento crítico más brillante llevado a cabo por URGELL está constituido por el análisis enzimático en *Paracolobactrum intermedium* ATCC 11066, antes y después de la transferencia infecciosa del factor S. También en este caso junto a la adquisición de la propiedad de segregar glutamato se doblaba la actividad ICDH-asa  $NADP^+$  dependiente específica.

Josefina VALOIX continuó el análisis enzimático iniciado por URGELL, pudiendo aportar considerable evidencia en favor

de la conclusión sugerida por el primero acerca de que en *C. intermedium* C3 y posiblemente en todas las bacterias no se encuentre ICDH-asa  $NAD^+$  dependiente, a diferencia de los organismos superiores que tienen las dos enzimas. También se dejó sentada la base de un polimorfismo enzimático en el sistema de la ICDH-asa  $NADP^+$  dependiente en el grupo entérico, dentro del cual se encontrarían las correspondientes enzimas de los elementos  $sg^+$  y  $sg^-$  que difieren ligeramente en el pH óptimo, que son innuidas en distinto grado por la fuerza iónica del medio y que tienen distinta sensibilidad al glutamato y a la alanina como correpresores.

Al parecer, en la cepa C3 sólo puede conseguirse una eficaz reoxidación del  $NADPH+H^+$  en condiciones anaeróbicas, cuando coexiste un exceso de  $\alpha$ -cetoglutarato capaz de reducirse a glutamato. De lo contrario, la fermentación de los azúcares no puede proseguir y posiblemente ésta es una buena razón para comprender que el factor S se haya estabilizado en poblaciones naturales de *C. intermedium* C3.

En realidad, el factor S sólo es activo cuando se multiplica en estado integrado. En estas condiciones induce la formación de una ICDH-asa  $NADP^+$  dependiente capaz de desarrollar una actividad específica mayor. Esto permitía excluir un cambio de alelos estructurales y llevaba a pensar en la intervención de genes del tipo del operador (O) o del promotor (p), que sólo pueden ser efectivos cuando se hallan en el mismo cromosoma que los genes estructurales del mismo operon, esto es, cuando se encuentran en la llamada posición *cis*. En posición *trans*, cuando se multiplican autónomicamente, no son efectivos.

Como en el operon de la ICDH-asa  $NADP^+$  dependiente de las células  $S^-$  ya deben haber los genes O y P cromosómicos normales, cabe pensar que la integración del factor S llevaría a cabo la sustitución de uno u otro de ellos respectivamente por los O' o p' transportados por el mismo. Como el factor S no es activo en estado autónomo, no puede contener el gen estructural y probablemente tampoco el gen p' adyacente. Este razonamiento me llevó a concluir que probablemente el cambio enzimático sería consecuencia de un efecto *cis* del factor S por sustitución epistática del gen O por el O'.

Yo pienso que ustedes se habrán podido apercebir del cambio de nivel lógico que se ha experimentado a lo largo de la investigación del factor S de *Citrobacter intermedium* C3, de acuerdo a como acabo de referirla. Como en otros muchos casos y quizá en general en toda evolución del conocimiento científico, el progreso en nuestra comprensión de los hechos va unido

a una abstracción creciente de nuestras ideas. Con los modelos abstractos podemos realmente llegar a un control sutil de las relaciones causales. Pero al mismo tiempo aumenta la dificultad intelectual de comprensión, sobre todo para las personas no especializadas. Cabe incluso preguntarse si entonces el conocimiento científico se escapa de lo que puede denominarse nuestra realidad subjetiva. Los progresos que en general se han hecho por el camino de la abstracción científica son conocidos de todo el mundo, pero uno se resiste a admitir la disociación entre nuestra visión existencial del mundo exterior y el mundo abstracto de la ciencia. Como sea, no parece haber duda que la realidad exterior sólo se doblé a este último.

### EPILOGO

La investigación del factor S de *Citrobacter intermedium* puede ser una buena historia, precisamente porque ahora nos estamos aperciendo que las consecuencias de los hechos e ideas contenidos en la misma son ya realmente otras historias. En ella se han vivido distintas y diversas emociones. Particularmente para mí, las de mayor intensidad intelectual han sido las relativas al análisis de la fluctuación, al desarrollo del método de las poblaciones isonómicas, al del mecanismo genético y al de alguno de los otros aspectos más esotéricos de la misma. Me acuerdo que, cuando en mis años de estudiante, poco antes de entrar en la Universidad, leí los experimentos de MILLIKAN relativos a la determinación de la carga absoluta del electrón, quedé emotivamente conmocionado. Luego pensé que nada habría de más hermoso que poder llegar a hacer cosas semejantes, por lo menos semejantes en el estilo—esta mágica conjunción de profecía, lógica e ingenio—, aunque no alcanzaran la magnitud y trascendencia de aquel célebre trabajo. Quizá es ésta la razón de que en los aspectos antes referidos de la investigación sobre el factor S encontrara las más íntimas satisfacciones. Otras facetas del trabajo me han proporcionado singular e insólita sensación de poder: pensando como unas bacterias al multiplicarse segregan aminoácidos al medio, encuentro el procedimiento de curarlas definitivamente y, a la vez, me hago capaz de comunicar a voluntad esta «enfermedad» a otras bacterias que nunca la habían presentado; creo que esto es sencillamente maravilloso. Finalmente debo confesar que otros aspectos han sido bastante duros y fastidiosos, como la descripción inicial del fenómeno, el análisis enzimático y el fraccionamiento de la población con anaranjado de acridina.

No se habrá escapado a ustedes que todo el trabajo ha sido mayormente consecuencia de una deliberada estrategia educacional. Buena prueba de ello la constituyen las siete Tesis Doctorales que se han llevado a cabo en el curso del mismo y el número relativamente elevado de post-graduados que se han formado, algunos de los cuales ya tienen, según creo y como vulgarmente se dice, buenas alas para volar. Con ellos ha sido posible vivir experiencias humanas extraordinarias, no todas agradables ciertamente, pero reconfortantes en su mayoría y en algún caso verdaderamente fascinantes, como en la confesión espontánea y sincera de que seguir haciendo cosas como esta sería su camino.

Los colaboradores constituyen una fuente inestimable de inspiración, pero a veces es también necesaria la que proviene de un nivel más superior, como en este trabajo lo ha sido particularmente la que ha llegado de los profesores PREVOSTI en cuanto al análisis genético, SOLS en relación al mecanismo bioquímico e INGRAHAM con respecto a la verificación del modelo episómico. Pienso que sin ellos en algunos momentos no hubiera podido salvar por mí mismo el riesgo de que la investigación decayera y se estancara. En todo caso estas interacciones entre maestros y discípulos han sido para mí muy favorables si no imprescindibles para alcanzar el grado de tensión intelectual que requiere la creatividad científica.

Es posible pensar que los factores F de fertilidad, R de resistencia a los antibióticos y las colicinas sean ejemplos muy particulares de episomas, a través de los cuales haya resultado más fácil llegar al conocimiento de la misma existencia de estos particulares elementos genéticos de las bacterias. Existen ahora crecientes indicios de que los episomas puedan tener un alcance mucho más general para la flexible fisiología bacteriana. En este caso, yo espero que la historia del factor S de *Citrobacter intermedium* C3 que acabo de relatar, pueda representar para ustedes una perspectiva convincente en relación al desarrollo de estas nuevas ideas.

Muchas gracias.

## CRONOLOGIA DE LAS PUBLICACIONES SOBRE EL FACTOR S

1962

CLOTET, R. - R. PARES. Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. I Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

PARES, R. - J. GUINEA. Utilización de azúcares por bacterias del suelo. I Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

1963

PARES, R. - R. CLOTET. Producción de aminoácidos por bacterias del suelo. VII Jornadas Bioquímicas Latinas, Santa Margharita Ligure (Génova).

PARES, R. - R. CLOTET. Producción de aminoácidos por microorganismos. «Química e Industria», 10, 98-99.

1965

PARES, R. Proteínas extracelulares en la fase de latencia del crecimiento bacteriano. Comunicación Real Academia de Farmacia de Barcelona.

PARES, R. - J. GUINEA - R. CLOTET. Excreción de aminoácidos por un coliforme (*E. intermedia* C3). III Reunión de Bioquímicos Españoles. Oviedo.

1966

GUINEA, J. Estudios sobre la segregación de aminoácidos por *E. intermedium* C3 y su condicionamiento genético. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

GUINEA, J. - R. PARES. Naturaleza mutacional de un dualismo metabólico en un coliforme. III Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Madrid.

PARES, R. Análisis genético de la segregación de aminoácidos por *E. intermedium* C3. Conferencia presentada en el Instituto de Investigaciones Biológicas. «Gregorio Marañón». Madrid.

1967

CLOTET, R. Producción directa de alanina por *C. intermedium* C3. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Madrid.

CLOTET, R. - R. PARES. Dos tipos de segregación d'aminoàcids per un coliform. (*Escherichia intermedia* C3). «T. Soc. Cat. Biol.», 27, 83-87.

1968

CLOTET, R. - J. GUINEA - R. PARES. Segregación de aminoácidos por una cepa de «*C. intermedium*». «Microbiol. españ.», 21, 155-173.

HERNANDEZ, S. Estudios sobre la segregación de aminoácidos por *E. intermedia* C3 y su condicionamiento genético. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

PARES, R. Genética de segregación de aminoácidos. Conferencia presentada en la Universidad de Navarra.

PARES, R. - J. GUINEA - S. HERNANDEZ. Inestabilidad genética de la producción de ácido glutámico en *C. intermedium* C3. Conferencia presentada en el Centro de Investigaciones Biológicas. Instituto «Jaime Ferrán». Madrid.

1969

CLOTET, R. - J. GUINEA, R. PARES. Producción de alanina por fermentación con *Citrobacter intermedium* C3. «Rev. españ. fisiol.», 25, 1, 41-54.

GUERRERO, R. - R. PARES. Efecto del anaranjado de acridina sobre un episoma integrado por *C. intermedium* C3. VI Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Coimbra.

GUERRERO, R. - R. PARES. Efecte paradoxal del taronja d'acridina envers l'acció d'un factor episòmic de *C. intermedium* C3. «T. Soc. Cat. Biol.», 27, 83-87.

GUERRERO, R. - R. PARES. Segregación de glutamato en *C. intermedium* C3 como consecuencia de un episoma en estado integrado. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

GUINEA, J. - R. PARES. El factor S de *Citrobacter intermedium* C3 como un nuevo tipo de plásmido. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

GUINEA, J. - R. PARES. Segregación de glutamato en *C. intermedium* C3 como característica genética que puede adquirirse por infección. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

HERNANDEZ, S. - R. PARES. Interconversió genetica de formes segregadores i no segregadores d'aminoàcids en poblaciones de «*C. intermedium*» C3. «T. Soc. Cat. Biol.», 27, 71-80.

LORET, M. - R. CLOTET. Factor inhibidor del crecimiento bacteriano en medios con nitrógeno mineral. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

PARES, R. Caracteres genéticos de tipo episómico. Conferencia presentada en la Academia de Ciencias Médicas de Barcelona.

PARES, R. - J. GUINEA. Transferencia interespecifica del factor episómico que condiciona la segregación de glutamato en *Citrobacter intermedium* C3. «Anales de la Estación Experimental de Aula Dei», 9 (2-4), 287-296.

RAMOS, A. - J. GUINEA - R. PARES. The transfer of a factor which determines glutamate secretion from *C. intermedium* C3 to *Paracolobactrum* (ATCC 11066). «J. gen. microbiol.», 12, 55.

URGELL, J. Bta. - R. PARES. Activitat isocitricdeshidrogenasica en preparats solubles de diferents poblacions de *Citrobacter intermedium* C3. «T. Soc. Cat. Biol.», 27, 91-97.

VALOIX, J. - R. PARES. Los dos efectos selectivos del anaranjado de acridina (OA) sobre la frecuencia de células segregadoras de glutamato en *C. intermedium* C3. II Congreso Nacional de Microbiología. Madrid.

1970

GUERRERO, R. Multiplicación en estado integrado y efecto protector frente a la irradiación ultravioleta del factor S de *C. intermedium* C3. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

GUERRERO, R. - J. VALOIX - R. PARES. Efecto protector del factor S de *C. intermedium* C3 frente a la acción letal de la radiación ultravioleta. VII Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Pamplona.

GUINEA, J. Análisis colonial de la producción del ácido glutámico por *C. intermedium* C3. «Microbiol. españ.», 23, 13-22.

HERNANDEZ, S. Heterogeneidad colonial de *C. intermedium* C3 en relación a la segregación de alanina. «Microbiol. españ.», 23, 139-147.

VALOIX, J. - R. PARES - R. GUERRERO. Cambio de correpressor en la regulación freed-back de la isocitrato deshidrogenasa NADP+ como consecuencia de la integración del factor S. VII Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Pamplona.

1971

GUERRERO, R. Acción diferencial de la radiación ultravioleta sobre el cromosoma bacteriano, episoma y bacteriófago, en un mismo sistema fagohúsped. VIII Jornadas Genéticas Luso-Españolas. Oeiras (Portugal).

GUERRERO, R. Inactivación por activación ultravioleta y reparación de los daños en *C. intermedium* C3. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.

GUERRERO, R. Restauración del ADN fágico por un episoma en *Citrobacter intermedium* C3. V Congreso Nacional de Bioquímica. Barcelona.

GUERRERO, R. - J. G. LOREN - M. T. ESTEVE. Influencia del factor S sobre la infección fágica en *C. intermedium* C3. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.

HERNANDEZ, S. - R. GUERRERO. Efecto del anaranjado de acridina sobre la velocidad de transferencia episómica en *C. intermedium* C3. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.

PARES, R. - J. GUINEA. Herencia infecciosa en *C. intermedium* C3. Simposium sobre genética bacteriana. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.

URGELL, J. Bta. Drenaje del ciclo del ácido cítrico por un efecto cis del factor episómico. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

URGELL, J. Bta. Sistema de la isocitrato deshidrogenasa NADP+ dependiente en *Paracolobactrum intermedium* 11066 con factor S episómico. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona.

VALOIX, J. - J. GUINEA. Eliminación y recuperación absolutas del factor S. de *C. intermedium* y *P. intermedium* ATCC 11066. III Congreso Nacional de Microbiología.

VALOIX, J. - F. VALLESPINOS. El sistema de ICDH-NADP+ dependiente en *C. intermedium* C3. III Congreso Nacional de Microbiología. Barcelona. 1972

GUINEA, J. - S. HERNANDEZ - R. PARES. Análisis genético del equilibrio entre individuos segregadores y no segregadores de glutamato en las poblaciones de *C. intermedium* C3. «Microbiol. españ.», 25, 117-123.

HERNANDEZ, S. - R. PARES. Carácter episómico del factor que determina la segregación de glutamato en *C. intermedium* C3. «Microbiol. Españ.». En prensa.

JOFRE, J. Integración del factor S. de *Citrobacter intermedium* C3 en distintos cromosomas bacterianos. Tesis doctoral. En curso.

LLORET, M. Inhibición en el crecimiento bacteriano por desproporción de aminoácidos en el medio. Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona. Pendiente de lectura.

PARES-FARRAS, R. - J. GUINEA - S. HERNANDEZ - J. Bta. URGELL - Josefina VALOIX. A new episomic element controlling fermentative metabolism and the segregation of aminoacids in *Citrobacter intermedium* C3. Presentado para admisión en «J. Bacteriol.».

VALOIX, Josefina. Análisis de un factor episómico de *Citrobacter intermedium* C3, Tesis doctoral. Facultad de Ciencias. Universidad de Barcelona.

- (17) LAYNE, E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins. METHODS IN ENZYMOLOGY. (Ed. S. P. Colowick N. O. Kaplan) III, Academic Press, Inc., New York.
- (18) LEDERBERG, J. 1952. *Physiol. rev.*, 32, 403.
- (19) LEDERBERG, J. - E. M. LEDERBERG. 1952. Replica plasmids and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63, 399-406.
- (20) PARES, R. - R. CLOTET. 1963. Producción de aminoácidos por microorganismos. *Química e Industria*, 10, 98-99.
- (21) SMITH, K. C. - P. C. HANAWALT. 1969. Molecular photobiology. Academic Press, London.
- (22) SPIES, J. R. 1957. Colorimetric procedures for amino-acids. METHODS IN ENZYMOLOGY. (Ed. S. P. Colowick - N. O. Kaplan) III, Academic Press, Inc., New York.
- (23) STEEL, B. B. - SAUBERLICH - M. S. REYNOLDS - C. A. BAUMAN, 1949. *J. Biol. Chem.*, 177, 553.
- (24) STOCKER, B. A. D. 1949, *J. Hyg.*, 47, 398.
- (25) WATANABE, T. 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriol. Rev.*, 27, 87-115.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- (1) ADLER, E. - V. HELLSTROM - G. GUNTHER - H. von EULER. 1938. *Z. physiol. chem.*, 225, 14.
- (2) ASAI, T. - K. AIDA - K. CISHI. 1957. *Bull. Agri. Chem. Soc. (Japan)*, 21, 134.
- (3) BRAUN, Werner. 1965. Bacterial genetics, W. B. Saunders Company, Philadelphia.
- (4) CASIDA, L. F. 1956. U. S. Patent, 2, 771, 396.
- (5) DAGLEY, S. - E. A. DAVES - G. A. MORRISON. 1950. *Nature*, 165, 437.
- (6) DELBRUK, M. - S. E. LURIA. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*, 28, 491-511.
- (7) GUINEA, J. - S. HERNANDEZ - P. PARES. 1972. Análisis genético del equilibrio entre individuos segregadores y no segregadores de glutamato en las poblaciones de «*C. intermedium* C3». *Microbiol. españ.*, 25, 117-123.
- (8) HAYES, W. 1968. Introduction to Symposium on extrachromosomal genetics in bacteria. Society for General Microbiology, Edinburg.
- (9) HAYES, W. 1969. What are episomes and plasmids? Bacterial episomes and plasmids. (Ed. G. E. W. Wolstenholme, Haave O'Connor). Churchill Ltd., London.
- (10) HIROTA, Y. 1960. The effect of acridine dyes on mating type in «*Escherichia coli*». *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S.*, 46, 57-64.
- (11) HIROTA, Y. - T. IJIMA. 1957. Acriflavine as an effective agent for eliminating F factor in «*Escherichia coli*». *Nature*, 180, 655.
- (12) HUGH, R. - E. LEIFSON. 1953. The taxonomic significance of fermentative versus oxidative metabolism of carbohydrates by various Gram-negative bacteria. *J. Bact.*, 66, 24.
- (13) F. JACOB - E. L. WOLLMAN, 1958. Episomes, added genetic elements. *Comptes rendus des séances de l'Académie des Sciences*, 247, 154-156.
- (14) KINHOSITA, S. 1959. The production of amino-acids by fermentation processes. *Adv. in appl. microbiol.*, V, 1.
- (15) KINHOSITA, S - K. NAKAYAMA - S. AKITA. 1958. *Chem. Soc. Japan*, 22, 176.
- (16) KLUYVER, A. J. - C. B. van NIEHL. 1956. The microbe's contribution to biology. Cambridge Press, London.