

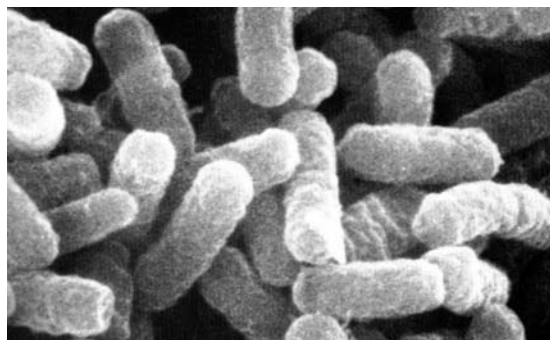
Composició Química dels Éssers Vius

Per estudiar els constituents de les cèl·lules, les unitats estructurals que componen els éssers vius, el que hauríem de fer primerament és tenir-ne certa quantitat, tant si es tracta de cèl·lules procariotes (com les dels bacteris) com si es tracta de cèl·lules eucariotes (com les cèl·lules humanes).

Les cèl·lules es poden cultivar. Només cal un medi de cultiu adequat i unes condicions ambientals també adequades al tipus cel·lular, si bé és més difícil el cultiu de les cèl·lules eucariotes d'animals perquè requereixen substàncies nutritives complexes com les vitamines que no poden sintetitzar-les o d'altres substàncies desconegudes que es posen a l'abast de les cèl·lules afegint sèrum sanguini al medi de cultiu.

Els medis de cultiu són solucions de substàncies nutritives que permeten el creixement de les cèl·lules. Generalment són constituïts per glúcids simples com la glucosa, per proteïnes de fàcil assimilació i per sals minerals inorgàniques que aportin els bioelements necessaris que són fonamentalment sofre, fòsfor, sodi, magnesi, potassi, clor i calci. Els altres bioelements són presents com a contaminants de les sals.

Sens dubte l'organisme més ben estudiat, ara per ara, és *Escherichia coli*, perquè fou en aquesta espècie en la que es realitzaren els primers experiments genètics en bacteris la qual cosa estimulà els científics a realitzar altres experiències que completessin les realitzades, però tot i essent el sistema cel·lular més ben estudiat només es coneixen entre una sisena i una tercera part dels metabòlits implicats en les seves vies metabòliques.



***Escherichia coli* - imatge obtinguda amb microscopi electrònic de rastreig**

La cèl·lula d'*Escherichia coli*, que és un bacteri que viu en el budell dels animals de sang calenta, té una forma més o menys cilíndrica, anomenada pels microbiòlegs de cocobacil, que amida 2,0-6,0 μm d'alçada i 1,1-1,5 μm de diàmetre, si bé en observar-la al microscopi òptic tenyida i deshidratada la mida és menor, 0,4-0,7 μm d'alçada i 1-3 μm de diàmetre. És unes 500 vegades més petita que la mitjana de les cèl·lules dels vegetals i dels animals (diàmetre superior als 10 μm), és mòbil mercès a la presència de flagells peritrics i el seu metabolisme és respiratori i fermentatiu. El seu pes és de 2×10^{-12} g. La seva reproducció es produeix per divisió binària.

Virus o organisme	DNA (Daltons)	Nombre de gens
Virus ϕ x174	$1,6 \times 10^6$	8
Virus λ	$30,0 \times 10^6$	45
Virus T2	130×10^6	200
<i>Escherichia coli</i>	$2,6 \times 10^6$	4000
<i>Drosophila melanogaster</i>	$0,12 \times 10^6$	200000
<i>Homo sapiens</i>	$3,6 \times 10^6$	5600000

Contingut de DNA de diferents virus o organismes amb el nombre de gens que podrien tenir quantitativament

El contingut intestinal és un ambient molt ric en bacteris, el budell presenta una autèntica flora bacteriana. Un gram de matèria fecal conté uns 100.000 milions de bacteris la majoria ja morts. Aquests bacteris col·laboren a la digestió dels aliments i a la nutrició vitamínica. *E. coli* és el bacteri anaerobi facultatiu més ben estudiat de la flora intestinal. En un gram de matèria fecal poden trobar-se 10 milions el que representa el 0,01% de la població bacteriana fecal.



Divisió binària

En el budell humà, hàbitat natural en el qual es troba normalment (bacil del colon) té un temps de duplicació aproximat de 24-48 hores i la seva funció és estabilitzar la flora microbiana, doncs juntament a d'altres bacteris anaerobis facultatius, consumeix tot l'oxigen convertint el budell en un medi anaerobi estricte en el que es realitzen diverses reaccions metabòliques, i a la vegada es sintetitzen vitamines que són aprofitades per l'organisme.

E. coli pot créixer en un medi sintètic, que és així con s'anomenen els medis preparats a partir de compostos químics ben definits, que només contingui un sucre (glucosa), algunes sals i aigua.

Medi sintètic simple per al creixement d'*E. coli. Les cèl·lules que creixen en aquest medi de cultiu a 37°C necessiten 60 minuts per duplicar-se**

NH ₄ Cl	1,0 g
MgSO ₄	0,13 g
KH ₂ PO ₄	3,0 g
Na ₂ HPO ₄	6,0 g
Glucosa	4,0 g
Aigua	1000,0 ml

*També s'hauria d'afegir Fe²⁺ i altres ions però no s'hi afegixen per separat perquè generalment es troben com a contaminants de les sals o de l'aigua.

E. coli també pot créixer amb l'anomenat brou ordinari, un medi de cultiu complex, que és així com s'anomenen els medis dels quals es desconeix exactament la seva composició, perquè es preparen amb productes naturals com extracte de carn, peptona o extracte de llevat.

Brou ordinari. Les cèl·lules d'*E. coli* que creixen en aquest medi de cultiu a 37°C necessiten només 17 minuts per duplicar-se.

Extracte de carn	3,0 g
Peptona	5,0 g
Aigua	1000 ml

Un litre de cultiu fet amb brou ordinari pot donar un rendiment aproximat d'un gram de cèl·lules d'*E. coli* que es pot recollir o concentrar mitjançant la filtració o la centrifugació del cultiu. Aquest rendiment, si suposem que partim d'una única cèl·lula, es pot aconseguir al cap de 8 hores aproximadament.

EXERCICI

Suposant que la densitat d'*E. coli* és de 1,1 g/cm³, que la seva forma és cilíndrica i que les seves mides són de 1,2 µm de diàmetre i 4 µm d'alçada, quants individus conté un gram de cèl·lules?

PES FRESC I PES SEC

Si realitzen un cultiu d'*E. coli* amb brou nutritiu indicat anteriorment i el filtrem tot pesant la part retinguda pel filtre o obtenim el sediment després de centrifugar-lo i el pesem, tindrem el que anomenem pes fresc. És un pes lleugerament equívoc doncs no és el pes exacte de les cèl·lules perquè el medi de cultiu pot quedar atrapat en els espais que resten entre les cèl·lules i per tant col·laborarà al pes.

En els treballs de bioquímica es donen els resultats referits al pes sec, això és referit al contingut sòlid. El pes sec de les cèl·lules es pot expressar en relació al pes fresc (grams de sòlids per gram de pes fresc) o en base al volum (grams de sòlids per centímetre cúbic de cèl·lules).

El pes sec i la composició química depenen de les cèl·lules considerades i de les condicions de cultiu, és per això que sempre s'hauran d'indicar per poder comparar els resultats.

El pes sec es determina dessecant la mostra al forn a 105°C fins aconseguir que tingui un pes constant.

Concentrem les cèl·lules d'un cultiu d'*E. coli*, per filtració o per centrifugació, i després les rentem amb aigua diverses vegades per eliminar les restes de medi de cultiu fins aconseguir un gram, en pes fresc, de cèl·lules. A continuació determinen el pes sec corresponent i comprovaren que és de 0,3 grams. Si sotmetem aquests 0,3 grams de sòlids a una anàlisi elemental el resultat és:

Carboni	50
Oxigen	20
Nitrogen	14
Hidrogen	8
Fòsfor	3
Sofre	1
Potassi	1
Sodi	1
Calci	0,5
Magnesi	0,5
Clor	0,5
Ferro	0,3
Tots els altres	~0,2

Composició elemental d'*E. coli* en percentatge del pes sec

EL CULTIU DE CÈL·LULES EUCARIÒTIQUES

Les tècniques necessàries per al cultiu de cèl·lules eucariòtiques s'han desenvolupat al llarg d'aquest segle. Fou Harrison, als Estats Units el 1907, el primer en aconseguir cultivar teixits d'amfibis en sèrum sanguini. Fou però més tard que el metge francès Alexis Carrel aconseguí cultivar fibroblasts de cor d'embrió de gallina. Alguns d'aquests cultius, iniciats el 1912, seguien actius el 1939 en que s'extingiren accidentalment. Aquest experiment li valgué per aconseguir el premi Nobel l'any 1935.

Durant la primera meitat del segle els cultius cel·lulars només s'aconseguien si eren de masses de teixits extirpats i si s'implantaven en sèrum o en extractes embrionaris. Aquests "cultius de teixits" només es multiplicaven indefinidament si s'evitava la contaminació bacteriana i si es canviava periòdicament el medi de cultiu.

El 1952, també als Estats Units, Earle descobrí que la tripsina, un enzim digestiu, trencava els enllaços intracel·lulars obtenint-se cèl·lules soltes, anomenades cèl·lules primàries, que podien seguir essent cultivades com les cèl·lules bacterianes es podien fer doncs, es podien sembrar a diferents concentracions, es podien comptar, es podia observar el seu creixement, etc.

Les cèl·lules dels cultius cel·lulars, que s'originen per la multiplicació de cèl·lules primàries, s'anomenen cèl·lules secundàries, que no viuen indefinidament sinó que es divideixen un número de vegades abans de morir. Aquest número de vegades coincideix amb el de les divisions d'aquestes cèl·lules durant la vida del vertebrat corresponent. Aquesta "mort cel·lular programada" tindria per tant relació amb el procés d'envelliment. Per sort, això que es dona a les nostres cèl·lules, no és igual per tots els animals ni per algunes de les nostres "cèl·lules anormals". Dites cèl·lules després d'un període crític adquireixen la capacitat de multiplicar-se indefinidament. Constitueixen el que s'anomenen línies cel·lulars que s'han utilitzat per exemple per comprovar l'efecte de diferents substàncies químiques.

Els estudis mostren que gairebé totes les cèl·lules de mamífers, cultivades al laboratori, moren després d'un nombre limitat de divisions. Quan cultivem fibroblasts normals de mamífer, unes cèl·lules del teixit connectiu, es divideixen entre 20 i 50 vegades per terme mitjà, segons l'animal del qual procedeixin. Quan més vell és un cultiu d'aquest tipus, més triguem les cèl·lules a completar el cicle de divisió i, amb el temps, la població deixa de

dividir-se i mor. Les cèl·lules extretes d'animals vells es divideixen menys vegades que les extretes d'animals joves, la qual cosa suggereix que les cèl·lules velles han "gastat", mentre eren a l'animal, moltes de les divisions assignades.

L'experimentació dona resultats semblants quan es cultiven cèl·lules diferents (de la pell, sanguínies, hepàtiques...) el que permet pensar que hi ha una relació directa entre la vida d'una espècie i la capacitat de divisió de les seves cèl·lules, les quals després de formar-se a l'embrió, quedarien programades per morir després d'un cert nombre de divisions. Això, que en podem dir "mort cel·lular programada", serviria per impedir el creixement esbojarrat de qualsevol cèl·lula. El que vol dir que les cèl·lules, que s'escapin dels controls normals de la divisió cel·lular, només podran donar lloc a un nombre relativament reduït de cèl·lules abans que tota la població descendent mori.

Malgrat tot el control de la divisió cel·lular i la mort cel·lular programada no s'acompleixen en les cèl·lules canceroses.

Fa més de 30 anys que es cultiven en els laboratoris de molts països cèl·lules dels teixits d'una dona que morí víctima d'un càncer del coll de l'úter. Aquesta soca de cèl·lules canceroses, anomenada HeLa (el nom de la dona era Henrietta Lacks), constitueix un excel·lent medi per al cultiu de virus i per a l'estudi de les reaccions davant dels productes anticancerígens. Aquestes cèl·lules, per motius no coneguts, estan dotades d'un vigor excepcional, continuen proliferant i la seva quantitat ultrapassa el nombre de cèl·lules de l'organisme sencer. Es podria dir que són immortals.

Composició del medi de cultiu per desenvolupar línies cel·lulars HeLa

L-Aminoàcids g/L		Vitamines g/L		Sals g/L		Altres	
Arginina	0,1	Biotina	10 ⁻³	NaCl	100	Glucosa	5 g/L
Cisteïna	0,05	Colina	10 ⁻³	KCl	5	Penicil·lina	0,005%*
Glutamina	2,0	Àcid fólic	10 ⁻³	NaH ₂ PO ₄ xH ₂ O	1	Estreptomicina	0,005%*
Histidina	0,05	Nicotinamida	10 ⁻³	NaHCO ₃	20	Sèrum humà	5%
Isoleucina	0,2	Àcid pantotènic	10 ⁻³	CaCl ₂	1		
Leucina	0,2	Piridoxal	10 ⁻³	MgCl ₂	0,5		
Lisina	0,2	Tiamina	10 ⁻³				
Metionina	0,05	Riboflavina	10 ⁻³				
Fenilalanina	0,1						
Treonina	0,2						
Triptòfan	0,02						
Tirosina	0,1						
Valina	0,2						

*Per prevenir la contaminació bacteriana

LA DINÀMICA DEL CREIXEMENT D'*Escherichia coli*

Ecològicament es defineix la població com una comunitat uniespecífica, o sigui el conjunt d'individus de la mateixa espècie que viuen en una àrea i en un període de temps determinats. Des d'un punt de vista dinàmic una població es caracteritza entre d'altres pel nombre d'individus per unitat de superfície o mida de la població, i per la natalitat, la mortalitat i la migració que augmenten o disminueixen el nombre d'individus.

La variació del nombre d'individus d'una població respon a l'equació:

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} = \frac{N_t - N_0}{t - t_0} = P - M + I - E = pN - nN + iN - eN$$

en la que **N** és el nombre d' individus, **t** és el temps, **P** la natalitat, **M** la mortalitat, **I** la immigració, **E** l'emigració, **p** la taxa de natalitat, **m** la taxa de mortalitat, **i** la taxa d'immigració i **e** la taxa d'emigració. Per simplificar l'expressió substituïrem **p**, **m**, i **e** pel valor **r** que anomenarem taxa de creixement que també s'anomena potencial biòtic.

$$\frac{\Delta N}{\Delta t} = rN$$

En el cultiu d'*E. coli* que proposem, en el que creix per tant una sola espècie, en un ambient completament favorable sense cap tipus de restricció nutritiva, la mida de la població després d'un període de creixement, **x_t**, depèn de la població inicial, **x₀**, del temps transcorregut, **t**, i del temps de duplicació, **t_d**. Matemàticament es pot formular l'equació següent:

$$x_t = x_0 2^{t/t_d} \quad (1)$$

funció exponencial del creixement de la població en un medi ideal, que correspon a les dades de la taula següent:

Nº de Generacions	0	1	2	3	4	5	n
	X	2x	4x	8x	16x	32x	ax
Nº d'individus	2 ⁰ x	2 ¹ x	2 ² x	2 ³ x	2 ⁴ x	2 ⁵ x	2 ⁿ x

Si a l'equació **(1)** prenem logaritmes la corba del creixement exponencial es converteix en una recta en fer la representació gràfica del **lnx_t** respecte del temps **t** o del nombre de generacions, en la que la intersecció amb l'eix de les abscisses correspon a la mida inicial de la població i el pendent de la recta és 0.693/t_d

$$\ln x_t = \ln x_0 + \ln 2(t/t_d) \text{ o } \ln x_t = \ln x_0 + \mu t$$

$$\text{pendent} = \mu = \frac{\ln 2}{t_d} = \frac{\ln x_t - \ln x_0}{t_t - t_0}$$

El pendent **μ** és l'equivalent a la taxa de creixement **r** i es defineix com la taxa o constant del creixement específic, de creixement exponencial o com a velocitat de creixement doncs

és una mesura de la quantitat de nous organismes produïts per unitat de temps. És per això que també podem escriure l'equació

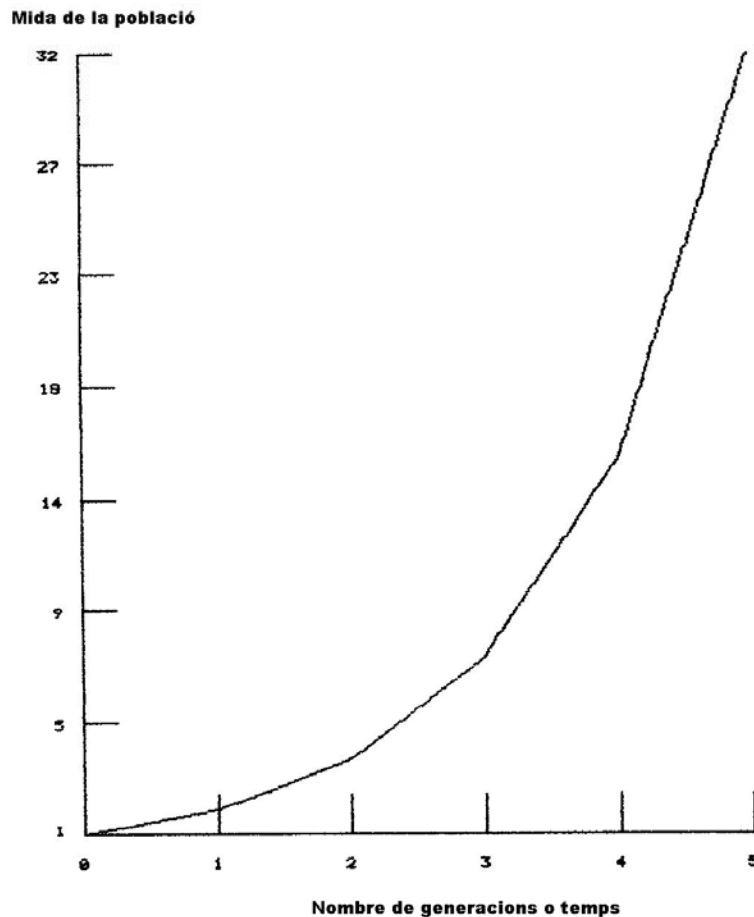
$$\frac{dx}{dt} = \mu x_0$$

la solució de la qual és

$$x_t = x_0 e^{\mu t} \quad (2)$$

que és anàloga a l'equació (1), coneixent-se ambdues (1) i (2) com a equacions bàsiques del creixement.

Corba de creixement exponencial



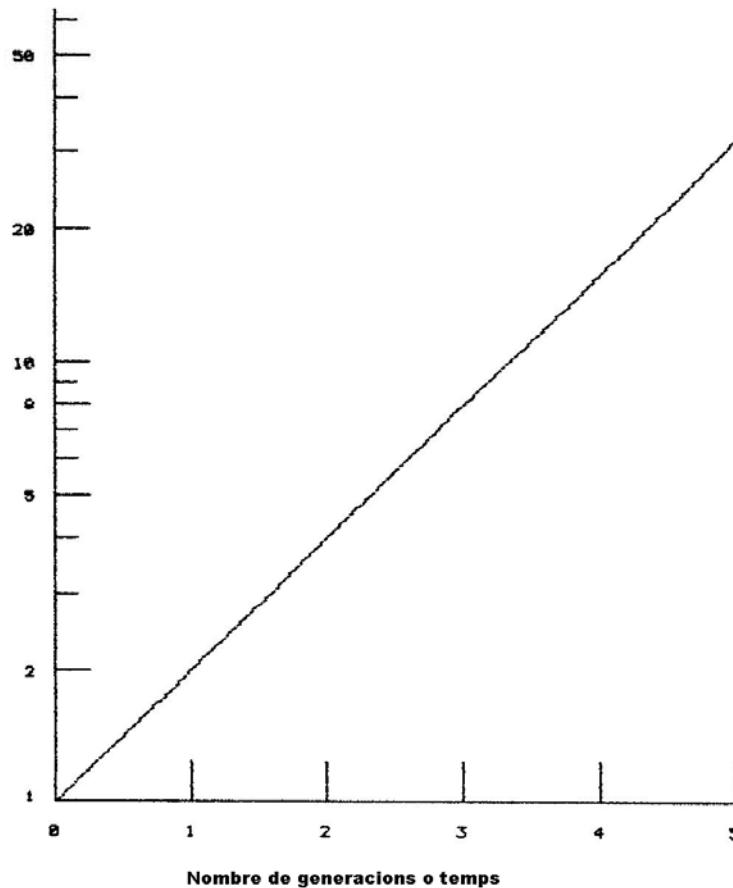
EXERCICIS

1. En un determinat medi de cultiu un bacteri té un temps de duplicació de 0,33 h. Si comencem el cultiu amb una sola cèl·lula, quantes cèl·lules tindrem a les 48 h?
2. Si el pes sec d'una cèl·lula del bacteri de l'exercici anterior és de 10g, quin pes tindrà la població final? Quina relació hi ha entre aquest pes i el pes de la Terra?

3. En un determinat medi de cultiu un bacteri té un temps de duplicació de 0,5 h, mentre que un mutant de la mateixa espècie té un temps de duplicació de 1 h. Si comencem un cultiu mesclant N cèl·lules de creixement ràpid amb $16N$ cèl·lules de creixement lent, quant temps tardarem a tenir tantes cèl·lules de creixement ràpid com de creixement lent?

Corba de creixement logarítmica

Logaritme de la mida de la població



FRACCIONAMENT QUÍMIC

Una vegada realitzat el cultiu d' *E. coli* que abans consideràvem, el centrifuguem per eliminar el medi de cultiu, tota vegada que volem estudiar la composició química de les cèl·lules i per tant volem evitar les possibles contaminacions. Suposàvem que teníem 1 g de bacteris (pes fresc) que, després d'eliminar-ne l'aigua correspondrien a 0,3 g (pes sec).

Una vegada eliminat el medi de cultiu i resuspeses les cèl·lules en una mica d'aigua acidificada, a $\text{pH} = 1$, s'observa que les petites molècules resten en solució perquè en tenir càrrega elèctrica estableixen competència per l'aigua amb els ions H^+ de l'àcid. Són per tant solubles en l'àcid mentre que les grans molècules no ho són.

Aproximadament un 20% del pes sec de la cèl·lula correspon a molècules solubles en l'àcid (sals minerals, monosacàrids, aminoàcids, etc.). La part insoluble es compon de grans

molècules de quatre classes: proteïnes, àcids nucleics, polisacàrids i lípids, les quals es poden separar mitjançant les tècniques de fraccionament químic. Així, per exemple, es poden extreure els lípids, mesclant la fracció insoluble en l'àcid amb un dissolvent no polar, com el cloroform. La majoria dels lípids fugirien de l'aigua i passarien fàcilment al dissolvent no polar.

Composició química obtinguda en el fraccionament d'1 g d'*E. Coli*

H₂O	0,7 g	70%
Proteïnes	0,15 g	15%
Ions, monòmers, aminoàcids, monosacàrids, nucleòtids, etc.), i petites molècules resultants de la degradació d'altres molècules	0,06 g	6%
Àcids nucleics	0,045 g	4,5%
Lípids	0,022 g	2,2%
Polisacàrids	0,022 g	2,2%

Elements més comuns a la matèria viva		
Element		% en pes
Bioelements		
Oxigen	O	20
Carboni	C	50
Hidrogen	H	15
Nitrogen	N	10
Calci	Ca	2
Fòsfor	P	1
Oligoelements		
Potassi	K	0.35
Sofre	S	0.25
Sodi	Na	0.15
Clor	Cl	0.15
Magnesi	Mg	0.1
Ferro	Fe	
Coure	Cu	
Manganès	Mn	
Iode	I	
Cobalt	Co	
Zenc	Zn	
Bor	B	
Alumini	Al	
Vanadi	V	
Molibdè	Mo	
Silici	Si	