

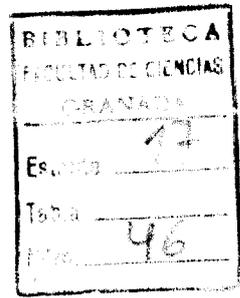
R.35.658



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 8 SET. 1988
SALIDA NUM. 908

T
12
8

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA

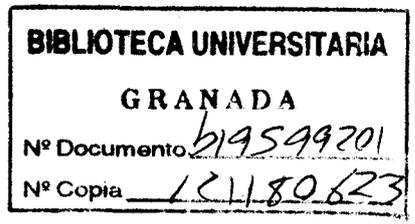


ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS Y DE ASPECTOS DEL METABOLISMO DEL
FOSFATO EN *Myxococcus coralloides* D

Francisco González García

UNIVERSIDAD DE GRANADA

1988



ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS Y DE ASPECTOS DEL METABOLISMO DEL
FOSFATO EN *Myxococcus coralloides* D

Memoria presentada para aspirar al grado de
DOCTOR EN CIENCIAS



Edo: Francisco González García

El Director de la Tesis



José María Arias Peñalver
Catedrático de Microbiología
Facultad de Ciencias.

Granada, Mayo de 1988

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 1986-1988, siendo Becario del Plan de Formación del Personal Investigador.

Esta Memoria fue leída y defendida ante el tribunal formado por D. Enrique Montoya Gómez, D. Francisco Murillo Araujo, Dña. Josefa L. Segovia Parra, D. José María Ortega Ruiz y D. Antonio Luis Extremera León el 7 de Mayo de 1988, obteniendo por unanimidad la calificación de Apto "*cum laude*".

Mi agradecimiento:

A Malema y José por su infinita paciencia.

A Antonio Luis por enseñarme lo que debe y no debe de hacerse.

A Kika por todos los cafés y su contenido.

Al destino

A Pjotr Ilich Tschaikowsky y su música

A Paqui

INDICE

	Pag
INTRODUCCION.....	6
1. Mixobacterias.....	7
1.1 Introducción.....	7
1.2 Características generales.....	9
1.3 Ciclo de desarrollo.....	18
1.3.1 Introducción.....	18
1.3.2 Métodos para el análisis del desarrollo.....	19
1.3.3 Control del desarrollo.....	24
1.3.4 Un programa de desarrollo para <i>Myxococcus</i> <i>xanthus</i>	34
1.3.5 El significado del ciclo de desarrollo.....	35
1.3.6 Un paso primitivo hacia formas de vida multicelulares.....	37
2. Fisiología y metabolismo del fosfato.....	39
2.1 Introducción.....	39
2.2 Asimilación y transporte del fosfato.....	43
2.3 El fósforo en la célula.....	47
2.4 Respuestas fisiológicas a la limitación de fosfato.....	59
3. El regulón <i>pho</i>	62
4. La ruptura del enlace éster fosfato.....	72
4.1 Introducción.....	72
4.2 Propiedades de las fosfatasas ácida y alcalina....	74
OBJETO DEL TRABAJO.....	81
MATERIAL Y METODOS.....	84
1. Microorganismos.....	85
2. Medios de cultivo.....	85
3. Técnicas de cultivo.....	89
4. Medidas turbidométricas y del número de células.....	90
5. Medidas del peso seco de los cultivos.....	90
6. Medidas espectrofotométricas y de pH.....	90

7. Determinación de proteínas.....	91
8. Determinación de fosfato inorgánico.....	92
9. Estimación de ADN por el método de la difenilamina....	93
10. Estimación del ARN por el método del orcinol.....	94
11. Extracción de pigmentos.....	94
12. Extracción y fraccionamiento de compuestos fosforilados.....	95
13. Microscopía electrónica.....	98
14. Estudios de espectroscopía de RMN.....	99
15. Extracción y medida de los nucleótidos adenilados....	100
16. Permeabilización celular.....	102
17. Determinación de la actividad fosfatasa.....	104
18. Metodos utilizados en el proceso de purificación de las fosfatasas celulares.....	108
18.1 Obtención de extractos sonicados y extractos libres de células.....	108
18.2 Cromatografía en Sephacryl S-200.....	108
18.3 Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de concentración iónica.....	110
18.4 Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH.....	110
18.5 Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida con SDS.....	111
19. Estudios de caracterización de las fosfatasas celulares.....	112
19.1 Aproximación al tamaño molecular.....	112
19.2 Influencia de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación.....	113
19.3 Condiciones óptimas para la actividad enzimática.	113
19.4 Sensibilidad a enzimas y estabilidad frente al calor y pH.....	114
19.5 Efecto de inhibidores enzimáticos.....	116
19.6 Efecto de diferentes iones.....	117

19.7	Especificidad de sustrato.....	118
20.	Estudios de cinética enzimática.....	119
20.1	Características cinéticas.....	119
20.2	Reacción de transfosforilación.....	120
21.	Determinación de otras actividades enzimáticas.....	120
22.	Estudios de localización citoquímica de las actividades fosfatasas celulares.....	121
23.	Estudio de la actividad fosfatasa extracelular.....	122
	RESULTADOS.....	124
1.	Efectos del fosfato sobre la fisiología de <i>Myxococcus coralloides</i> D.....	125
1.1	Efecto del fosfato sobre la producción de proteínas extracelulares.....	125
1.2	Efecto del fosfato sobre la síntesis de pigmentos	128
2.	Compuestos fosforilados en <i>Myxococcus</i> <i>coralloides</i> D.....	139
2.1	Determinación de fosfato libre y fosfato polimerizado.....	139
2.2	Detección de polifosfatos por microscopía electrónica.....	146
2.3	Detección de compuestos fosforilados por RMN.....	148
2.4	Estudio de la carga energética adenilada en los ciclos de vida de <i>Myxococcus coralloides</i> D...	151
3.	Estudio de la actividad hexoquinasa en <i>Myxococcus</i> <i>coralloides</i> D.....	156
4.	Estudios previos sobre producción de fosfatasas.....	158
4.1	Ensayos de actividad fosfatasa <i>in situ</i>	158
4.2	Medios de crecimiento y producción.....	164
4.3	Cinética de producción.....	168
5.	Actividad fosfatasa durante en el ciclo de vida de <i>Myxococcus coralloides</i> D.....	170
5.1	Actividad fosfatasa durante el crecimiento en medio sólido.....	170

5.2	Actividad fosfatasa durante la inducción de mixósporas.....	172
5.3	Actividad fosfatasa durante la germinación de mixósporas.....	174
6.	Estudios de las fosfatasas de <i>Mycoccus coralloides</i> D.	177
6.1	Purificación parcial de los enzimas celulares.....	177
6.1.1	Estudios previos de purificación.....	177
6.1.2	Cromatografía en Sephadryl S-200.....	181
6.1.3	Tratamiento con cloruro magnésico.....	184
6.1.4	Cromatografía de intercambio iónico.....	184
6.1.5	Electroforesis y análisis densitométrico....	192
6.2	Estudios de caracterización de los enzimas celulares	196
6.2.1	Aproximación al tamaño molecular.....	196
6.2.2	Influencia de la concentración proteica y del tiempo de incubación.....	198
6.2.3	Condiciones óptimas para la actividad enzimática.....	201
6.2.4	Sensibilidad a enzimas y estabilidad frente al calor y pH.....	209
6.2.5	Efecto de inhibidores enzimáticos.....	219
6.2.6	Efecto de diferentes iones.....	222
6.2.7	Especificidad de sustrato.....	225
6.3	Estudios de cinética enzimática.....	227
6.3.1	Características cinéticas de las fosfatasas celulares.....	227
6.3.2	Reacción de transfosforilación.....	242
6.4	Localización citoquímica de las actividades fosfatasas celulares.....	245
6.5	Estudio de la actividad fosfatasa extracelular....	249
	DISCUSION.....	254
	CONCLUSIONES.....	291
	BIBLIOGRAFIA.....	295

INTRODUCCION

1. MIXOBACTERIAS

1.1 Introducción

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos típicos que abundan en el suelo y en nichos ecológicos con materia vegetal y animal en descomposición. Todas las especies segregan enzimas que degradan biopolímeros y sobreviven como saprófitos sobre materia vegetal o como depredadores de otros microorganismos. Las mixobacterias se han aislado de suelos de todo el mundo y en un espectro de condiciones climáticas que abarcan del trópico al ártico.

Tres notables características diferencian a las mixobacterias del resto de las bacterias Gram-negativas: su movilidad por deslizamiento, su potencial morfogenético y su carácter de organismos sociales. Estas propiedades no son independientes unas de otras y pueden tener su explicación en la ecología de este grupo de microorganismos (Reichenbach, 1984).

Una de las características apuntada, el comportamiento social, depende de dos propiedades interesantes de la célula individual: la movilidad por deslizamiento y la segregación al medio de una gran variedad de productos. La primera es una forma de movilidad que ofrece a las células la oportunidad de un amplio contacto célula a célula mientras estas se desplazan. Las células deslizantes se mueven en paralelo a su eje longitudinal sobre una superficie sólida, de modo que el número de direcciones que una célula puede tomar está restringido en relación a una bacteria flagelada. Las mixobacterias tienen la capacidad de segregar polisacáridos, antibióticos, bacteriocinas y enzimas que degradan paredes celulares microbianas, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos y proteínas (Rosenberg & Varon, 1984). Dada la baja tasa de movilidad celular ($2\mu\text{m}/\text{min}$) y la abundancia de células vecinas, todos estos productos benefician tanto a las células productoras como a sus vecinas. La importancia

INTRODUCCION

de esta secreción es aumentada por el fenómeno conocido como crecimiento cooperativo (Rosenberg *et al.*, 1977). Este fenómeno ha sido descrito en *Myxococcus xanthus*. Cuando esta mixobacteria crece sobre proteínas no hidrolizadas como única fuente de C, N y energía, su crecimiento en medio líquido requiere una densidad celular mínima de 10^3 células/ml y la tasa de crecimiento aumenta con la densidad celular. Por el contrario, esta tasa es independiente de la densidad celular en un medio con proteínas hidrolizadas.

La octava edición del Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974) engloba en el apartado 2 a las bacterias deslizantes, grupo muy heterogéneo filogenéticamente. A pesar de dicha heterogeneidad, no se incluyen en él otros microorganismos procariotas como las cianobacterias deslizantes. Todo esto, junto al mejor conocimiento los microorganismos deslizantes, llevó a proponer una nueva clasificación (Reichenbach, 1981; Reichenbach & Dworkin, 1981). En ella, los microorganismos deslizantes se dividen en tres grupos diferentes: el primero incluye a las bacterias filamentosas del azufre, el segundo reúne a las cianobacterias deslizantes y el tercero engloba a las bacterias deslizantes unicelulares.

Este último grupo incluye una sola clase denominada *Flexibacteriae*. Esta se divide en dos órdenes: *Cytophagales* y *Myxobacterales*. El primer orden acoge a las bacterias deslizantes unicelulares Gram-negativas, que en muchos casos sufren enquistamiento con cambios de forma celular pero sin la aparición de estructuras semejantes a cuerpos fructificantes. Su contenido en G+C oscila entre 28 y 67 moles por ciento (Mandel y Lewing, 1969). A pesar de encontrarse en suelos de todo el mundo, todas las especies del orden *Myxobacterales* aparecen muy relacionadas en los estudios de su composición de bases del ADN (su contenido de G+C es del 67-71%) y de secuencias nucleotídicas en el ARNr 16S (Ludwing *et al.*, 1983). El estudio de las secuencias del ARNr 16S sugiere una estrecha relación taxonómica entre mixobacterias, *Bdellovibrio* y

sulfato reductoras como *Desulfovibrio* (Oyaizu & Woese, 1985). Así mismo, todas las mixobacterias aparecen relacionadas por su peculiar ciclo de vida.

Recogiendo estas ideas, los avances editados sobre la próxima novena edición del *Bergey's Manual* indican que las mixobacterias quedarán encuadradas en un grupo exclusivo de "Bacterias deslizantes que fructifican". Este grupo incluye el orden *Myxobacterales* con las familias *Myxococcaceae*, *Archangiaceae*, *Cystobacteriaceae* y *Polyangiaceae*.

1.2 Características generales

La estructura de las células vegetativas es similar a la de otras bacterias Gram-negativas. Poseen una capa mucosa (Gnospelius, 1978a) que rodea a las envueltas celulares: membrana externa, peptidoglicano y membrana plasmática.

La membrana externa está compuesta por lipopolisacárido, proteínas y fosfolípidos como en otras bacterias Gram-negativas. Las mayores diferencias entre el lipopolisacárido de mixobacterias y el de otras bacterias entéricas son la ausencia de heptosa, la presencia de ácidos grasos ramificados y de número impar de átomos de carbono y, en algunas especies, la presencia de 3-O-metil-D-xilosa (Rosenfelder et al., 1974). La membrana externa es menos densa que la celular debido a su alto contenido en fosfolípidos, constituyendo la fosfatidiletanolamina la especie mayoritaria con un 64% del total de fosfolípidos (Orndorff & Dworkin, 1980). La localización de las proteínas mayoritarias de la membrana externa no ha sido estudiada en profundidad, aunque es conocido que una proteína asociada a la membrana externa, MBHA, no contiene señal líder liberable, pero sí una región N-terminal muy hidrofóbica (Romeo et al., 1986).

El periplasma de *M.xanthus* contiene varias proteínas, algunas implicadas en su movilidad. El choque osmótico libera 18 proteínas

INTRODUCCION

mayoritarias y provoca una inmovilidad transitoria. Sin embargo no se ha examinado si estas proteínas son verdaderamente periplásmicas o se hallan en tránsito a la membrana externa (Burchard, 1974).

El peptidoglicano de *M.xanthus* se compone de ácido glutámico, ácido diaminopimélico, alanina, glucosamina y ácido murámico en una relación molar de 1: 1: 1.7: 0.75: 0.75; junto con cantidades sustanciales de glicina, serina y glucosa (White et al., 1968). El peptidoglicano no constituye una envuelta continua, como en otras bacterias Gram-negativas, sino una serie de paquetes discontinuos unidos entre si por polímeros de glicina y serina. Este hecho podría contribuir a la flexibilidad celular y a su capacidad para convertirse en mixósporas.

La membrana citoplasmática de *M.xanthus* ha sido aislada y caracterizada en su perfil proteico fosfolipídico. El fosfolípido mayoritario es la fosfatidiletanolamina (60% del total) y su perfil de proteínas es muy diferente al de la membrana externa (Orndorff & Dworkin, 1980).

El genomio de las mixobacterias tiene dos características relevantes: su gran tamaño y su alto contenido en G+C. El tamaño del ADN de *M.xanthus* es de 5690±510 Kb, de modo que cada célula parece contener entre 2 y 4 copias de su genomio según su posición en el ciclo celular. El por qué de este tamaño, uno de los más grandes conocidos en bacterias, no está aún aclarado. El contenido en G+C oscila entre 67-71 moles por ciento. Tan alto contenido se cree ha sido desarrollado por las mixobacterias a lo largo de la evolución para protegerse de la radiación ultravioleta solar a la que están expuestas por vivir generalmente en la superficie del suelo (Yee & Inouye, 1984). El ADN de *M.xanthus* contiene una pequeña cantidad de 5-metilcitosina (Yee & Inouye, 1982). Así mismo, se conoce la existencia en diversas especies de mixobacterias de un ADN accesorio en forma de ADN lineal de cadena simple, conocido como msADN-1 y msADN-2. El msADN-1 contiene ribonucleótidos en su extremo 5' y se presenta en 500 a 700 copias por cromosoma (Dhundale et al., 1985).

INTRODUCCION

Las mixobacterias han desarrollado además otros mecanismos para protegerse de la luz solar, como la producción de pigmentos de naturaleza carotenoide unidos a la membrana citoplasmática, cuya síntesis es fotoinducible en muchos casos (Burchard & Dworkin, 1966; Balsalobre *et al.*, 1987).

Las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua. El mecanismo del deslizamiento no se ha conseguido dilucidar a pesar de los numerosos estudios de los que ha sido objeto; sin embargo no existen datos firmes para explicar en términos mecánicos la movilidad deslizante. La movilidad por deslizamiento se requiere para los dos fascinantes procesos de comportamiento social observados en estos microorganismos: la formación de cuerpos fructificantes y el proceso conocido como ondulación u oleaje (del inglés rippling). El comportamiento deslizante es controlado por dos sistemas multigénicos: el sistema A (aventurero) que controla el deslizamiento de las células individuales y el sistema S (social) que controla el movimiento de grupos coordinados de células conocidos como enjambres. El sistema A contiene al menos 22 loci y el S al menos 10 (Hodgkin & Kaiser, 1979).

Las células A⁺S⁺ se deslizan individualmente y/o en grupos de varios miles de ellas. Las células A⁻S⁺ se mueven en densos enjambres pero nunca individualmente y las A⁺S⁻ tan solo individualmente. Células inmóviles se pueden obtener por dos mutaciones, una en el sistema A y otra en el S, o bien por una simple mutación en el locus *mgI*. Los mutantes A⁻S⁺ no pueden realizar el fenómeno d ondulación aunque la mayoría de ellos si forman cuerpos fructificantes. Aproximadamente dos tercios de los mutantes A⁺S⁻ no fructifican ni ondulan (Shimkets & Kaiser, 1982a). Dos características que parecen estar reguladas por el sistema S y que podrían jugar un cierto papel en él, son la cohesión celular y la presencia de pelos o fimbrias. Todas las células S⁺ poseen pelos y aglutinan en medio líquido, pero no las S⁻. Parece, por tanto, que la

INTRODUCCION

capacidad de las células para adherirse puede tener un profundo efecto sobre el comportamiento celular (Kaiser, 1979).

Por otra parte, se ha observado que las células de *Stigmatella aurantiaca* no aglutinan con células de *M.xanthus*, lo que sugiere algún tipo de especificidad en la cohesión celular (Qualls & White, 1982). El mantenimiento de las células en grumos no requiere energía, pues los venenos energéticos no rompen los grumos preexistentes. La energía puede requerirse para la síntesis y/o secreción de ligandos implicados en la unión de las células (Shinkets, 1986).

Desde hace mucho tiempo es conocido que las mixobacterias degradan y se alimentan de macromoléculas insolubles presentes en el medio ambiente y que pueden lisar a otros microorganismos tales como eubacterias, actinomicetes, cianobacterias, levaduras y otros hongos e incluso nematodos. Esta actividad lítica es debida a la producción de una amplia variedad de antibióticos, bacteriocinas, enzimas líticos de la pared celular, proteasas, polisacaridasas, nucleasas y lipasas (Rosenberg & Varon, 1984).

Los enzimas líticos de la pared celular encontrados en mixobacterias pueden dividirse en cuatro grupos: muramidasa (Harcke et al., 1972), glucosaminidasas (Sudo & Dworkin, 1972; Haska, 1974), amidasa (Katz & Strominger, 1967) y peptidasas (Tsai et al., 1965; Tipper et al., 1967). Los tres primeros grupos rompen enlaces altamente específicos de la pared celular; sin embargo, el último puede actuar también sobre otros polipéptidos.

Los enzimas proteolíticos juegan un papel muy importante en la actividad bacteriolítica de las mixobacterias. Se han detectado enzimas de este tipo en *Myxococcus virescens* (Gnospeilus, 1978b), *Myxobacter* AL1 (Jackson & Wolfe, 1968), *Sorangium* (Whitaker, 1965), *Chondrococcus coralloides* (Harcke et al., 1971) y *M.xanthus* (Rodríguez & Montoya, 1980).

Las mixobacterias son también productoras de endonucleasas de restricción. Mayer y Reichenbach (1978) han encontrado que varias

INTRODUCCION

razas de *Myxococcus fulvus*, *Myxococcus stipitatus*, *M. virescens*, *M. xanthus*, *Archangium serpens* y *Podagium erectum* contenían endonucleasas de restricción en el espacio periplásmico. Debido a la localización de estos enzimas, es difícil atribuirles algún papel en la lisis de otras bacterias, aunque puedan degradar el ADN liberado tras la lisis por otros enzimas. *Myxococcus coralloides* D posee también una intensa actividad desoxirribonucleasa, que ha sido separada en tres fracciones activas diferentes tras cromatografía de extractos libres de células (Martínez-Cañamero, 1986).

También se han descrito en mixobacterias enzimas con actividad lipásica, tanto extracelulares como unidos a células (Sorhang, 1974)

Respecto a la producción de antibióticos, el primero en ser caracterizado fue la mixina, producida por *Sorangium* (Peterson *et al.*, 1966). Con posterioridad se han encontrado sustancias antibióticas en una gran variedad de mixobacterias. En general son sustancias de bajo peso molecular, estructura química compleja, mecanismo de acción variado y un amplio espectro antimicrobiano (Rosenberg & Varon, 1984).

En contraste con la abundancia de antibióticos descritos, existen pocos datos sobre las bacteriocinas producidas por mixobacterias. Así, solo se han descrito en 4 especies: *M. xanthus* (McCurdy & MacRae, 1974), *M. fulvus* (Hirsch, 1977), *M. virescens* (Brown *et al.*, 1976), *M. coralloides* D (Muñoz *et al.*, 1984).

Aunque los antibióticos y bacteriocinas pueden desempeñar algún papel en la lisis de otros microorganismos, son los enzimas epi y extracelulares los más directamente implicados en la actividad depredadora de las mixobacterias. En algunos casos la lisis de los microorganismos atacados puede atribuirse exclusivamente a la producción extracelular de enzimas y antibióticos (bacterias Gram-positivas), en otros casos se requiere además un contacto directo entre la mixobacteria y su presa.

INTRODUCCION

Debido a la producción de este amplio rango de sustancias, las mixobacterias pueden crecer mejor y más rápidamente en medios de cultivo a base de macromoléculas, bacterias o levaduras que en los medios convencionales. La complejidad de estos medios, unida al hecho de que las mixobacterias tienden a crecer agrupadas, ha retrasado y dificultado los estudios sobre el metabolismo de estos microorganismos. La obtención de cultivos dispersos de diversas mixobacterias (Dworkin, 1962; Arias & Montoya, 1978) y la definición de medios mínimos para *M.xanthus* (Bretscher & Kaiser, 1978) han permitido conocer algunos de sus requerimientos nutritivos y su metabolismo intermediario, especialmente en el caso de esta última especie.

Todos los enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos estudiados han sido detectados en *M.xanthus*, así como los dos enzimas propios del ciclo del glioxilato. El ciclo de Krebs es fundamental para la reducción del NAD y como fuente de intermediarios en la biosíntesis de aminoácidos. El ciclo del glioxilato actúa de forma reducida durante el crecimiento en medios ricos pero incrementa su actividad durante la esporulación (Shinkets, 1984).

Es improbable que *M.xanthus* utilice la vía glucolítica para la conversión de glucosa en piruvato. Su crecimiento no es estimulado por los carbohidratos y estos se incorporan pobremente a la célula durante experiencias de marcaje. La hexoquinasa parece ser dependiente de pirofosfato como donador de fosfato y no de ATP. Todos los intentos realizados hasta el momento para detectar actividad piruvato quinasa han sido negativos (Watson & Dworkin, 1968). *M.xanthus* posee todos los enzimas necesarios para la síntesis de precursores azucarados a partir de aminoácidos (Filer *et al.*, 1977). Así, la función primaria de la vía glucolítica es su acción en sentido inverso (gluconeogénesis) de cara a la síntesis de glucosa y otros carbohidratos.

INTRODUCCION

Watson y Dworkin (1968) han puesto de manifiesto la existencia en *M.xanthus* de dos de los enzimas del ciclo del fosfogluconato; puesto que la ribosa no es bien incorporada por este microorganismo, la actividad de esta vía es necesaria para la síntesis de ribosa-5-fosfato que será usada en la biosíntesis de nucleótidos.

M.xanthus mantiene un *pool* de nucleótidos pequeño en comparación con el que posee *Escherichia coli*, siendo el ATP su principal constituyente. Los valores de carga energética medidos en las células vegetativas son de 0.81-0.87 (Hanson & Dworkin, 1974).

A pesar de que *M.xanthus* puede obtener todos sus requerimientos de C, N y energía a partir del metabolismo aminoacídico, se conoce relativamente poco de sus vías metabólicas. La familia del aspártico parece jugar un cierto papel en el control del desarrollo como se comentará más adelante. La metionina requiere para su síntesis una fuente exógena de vitamina B₁₂ como coenzima (Bretscher & Kaiser, 1978). Los aminoácidos ramificados isoleucina, leucina y valina deben también ser aportados de forma exógena (Umbarger, 1978). Los aminoácidos aromáticos fenilalanina, tirosina y triptófano pueden ser sintetizados por la propia célula (Bretscher & Kaiser, 1978). El estudio de las numerosas actividades transaminasa y deshidrogenasa ligadas al metabolismo de los aminoácidos no han pasado, en su mayoría, de su detección en extractos celulares (Shimkets, 1984).

La cadena respiratoria de *M.xanthus*, como otros microorganismos aerobios, está compuesta de citocromos sensibles al cianuro (Dworkin & Niederpruem, 1964).

La mixóspora es un intermediario durmiente entre la célula vegetativa de la que deriva de forma asexual y la célula vegetativa en que se convertirá tras la germinación. Las mixósporas pueden sobrevivir a condiciones ambientales hostiles durante años y son mucho más resistentes que las células vegetativas a la desecación,

INTRODUCCION

ultrasonidos, luz UV y calor (Sudo & Dworkin, 1969). La forma de las mixósporas varia con las especies, desde esféricas a bacilares. Normalmente la formación de mixósporas está acoplada a la morfogénesis multicelular, aunque muchas especies pueden ser inducidas artificialmente en presencia de glicerol sin la formación de cuerpos fructificantes (Dworkin & Gibson, 1964).

Las esporas de glicerol tienen muchas de las propiedades de resistencia de las mixósporas de cuerpos fructificantes, así como una carga energética elevada y similar (Smith & Dworkin, 1980). Sin embargo, existen diferencias bioquímicas entre los dos tipos de esporas. Así, por ejemplo, las formas de glicerol poseen una alta tasa respiratoria frente a la de los cuerpos fructificantes (Bacon *et al.*, 1975). La comparación de la ultraestructura de los dos tipos de esporas sugiere que las mayores diferencias se hallan en la membrana y en la cubierta de la espora. Ambos tipos tienen una membrana interna y otra externa rodeada por una cubierta, pero en las formas de glicerol se observan estructuras lamelares asociadas a la membrana interna que no se aprecian en las mixósporas de cuerpos fructificantes (Inouye *et al.*, 1979). La cubierta de las mixósporas de glicerol es una cubierta fina de 200Å de espesor. La cubierta de las formas de cuerpos fructificantes se divide en tres capas: interna electrodensa de 450Å de espesor, intermedia de 550Å con menor electrodensidad y superficial de 300Å con una baja electrodensidad. Esta cubierta posee una proteína mayoritaria, conocida como proteína S, que se ensambla espontáneamente sobre la superficie de la espora en presencia de Ca^{2+} (Inouye *et al.*, 1983). Esta proteína posee un peso molecular estimado de 18792 y su secuencia aminoacídica es homóloga con las proteínas β y γ del cristalino de vertebrados (Wistow *et al.*, 1985).

Ambos tipos de esporas contienen polisacáridos ricos en glucosa y galactosamina, así como una proteína conocida como proteína U (Komano *et al.*, 1980). Aunque ambos tipos de esporas son diferentes en ultraestructura y composición, hay una serie de etapas

INTRODUCCION

comunes en la secuencia de sucesos que conducen a su formación. Así un 7% de los mutantes incapaces de formar esporas en cuerpos fructificantes tampoco sufren la inducción con glicerol (Burchard & Parish, 1975).

La esporulación en *M.xanthus* es un proceso de enquistamiento en el que el bacilo se acorta, progresando hacia una forma ovoide que finalmente termina en esférica. Lo conocido sobre la formación de la spora se deriva de estudios de inducción con glicerol y puede o no ser similar en la esporulación de los cuerpos fructificantes. El proceso de conversión de la forma celular, probablemente común en ambos tipos de mixósporas, presenta una serie de problemas que relacionan la arquitectura y el remodelamiento de las envueltas celulares. El área superficial del peptidoglicano y el número de enlaces entre las cadenas de péptidos aumentan durante la esporulación (Johnson & White, 1972). También sufre un aumento el potencial autolítico de las células, lo que refleja la debilidad de la pared durante el cambio de forma (Dawson & Jones, 1979). La energía metabólica es dirigida hacia la gluconeogénesis y el ciclo del glioxilato; aparentemente los aminoácidos son catabolizados hasta acetato, el cual nutre al ciclo del glioxilato y luego se deriva hacia la síntesis de los polisacáridos de la cubierta por vía gluconeogénica (Filer *et al.*, 1977; Orlowski *et al.*, 1972). La síntesis del ADN continúa hasta culminar la replicación (Rosenberg *et al.*, 1967). La síntesis neta de ARN cesa, aunque se observa un gran recambio en todas las clases de ARN, así como modificaciones postraduccionales por metilación y fosforilación (Komano *et al.*, 1982).

1.3 Ciclo de desarrollo

1.3.1 Introducción

La característica general más sobresaliente de las mixobacterias es su alto potencial morfogénico, el cual tiene lugar a dos niveles: una morfogénesis cooperativa, que conduce a la formación de cuerpos fructificantes por la acción conjunta de cientos de miles de células (fructificación); y una morfogénesis celular, mediante la cual las células vegetativas sufren una serie de cambios que conducen a la aparición de células de reposo, denominadas mixósporas, que se localizan en el interior de los cuerpos fructificantes (esporulación). El inicio de este ciclo de desarrollo está íntimamente relacionado con los factores nutricionales del medio, disparándose en respuesta a una deficiencia nutricional (Manoil & Kaiser, 1980a). Dado el tamaño de las células (5-10 μm) la formación de un cuerpo fructificante, en ocasiones de varios cientos de micras, constituye una formidable empresa.

Muchas especies de mixobacterias desarrollan otro fascinante comportamiento social en el que ondas oscilantes de células discurren a través de la capas celulares dispuestas sobre una superficie sólida. Este comportamiento se ha denominado ondulamiento u oleaje (rippling) debido a que el movimiento de la onda celular asemeja al movimiento de las olas sobre la superficie del mar. En *M.xanthus* cada onda está compuesta de una cresta de varias capas de células con unas pocas células entre crestas. Este ondulamiento se observa durante el desarrollo de cuerpos fructificantes, aunque la posición de las ondas no está siempre correlacionada con la posición de los cuerpos. Sin embargo, ambos procesos son independientes: los cuerpos fructificantes pueden obtenerse sin observar ondulamiento y este último puede ser inducido bajo condiciones en que no se forman cuerpos. En definitiva, el fenómeno del ondulamiento parece ser la respuesta a la presencia de bacterias muertas que son reconocidas

por los fragmentos de su peptidoglicano (Shimkets & Kaiser, 1982a y 1982b).

Por contra a estos espectaculares comportamientos sociales, las mixobacterias pueden seguir un ciclo de vida vegetativo en el que sólo ocurren divisiones binarias. Este ciclo vegetativo puede tener lugar en medios sólidos y líquidos ricos en nutrientes.

1.3.2. Métodos para el análisis del desarrollo

Durante más de una década, el análisis del desarrollo de las mixobacterias o más bien de *M. xanthus* (donde se centran el 99% de los estudios) ha ido progresando. En cada etapa se han desarrollado técnicas específicas para cuestiones específicas con un sucesivo aumento en nuestra comprensión de la organización y control de los eventos del desarrollo multicelular de estos microorganismos.

A. Aislamiento de mutantes

La primera etapa en el análisis genético de *M. xanthus* fue el aislamiento de mutantes con incapacidad de completar su desarrollo. Dado que el desarrollo es un proceso complejo, se han podido dividir los mutantes en subgrupos basándose en las diferencias de su fenotipo. Dos hechos surgen de estos estudios: primero, la independencia entre los procesos de esporulación y fructificación; segundo, la implicación de moléculas extracelulares en el proceso de formación de cuerpos fructificantes.

La esporulación no es dependiente de la terminación de un cuerpo fructificante, sugiriéndose que la vía de la esporulación se inicia muy pronto en el desarrollo, quizás a la vez que la agregación (Morrison & Zusman, 1979). La evolución de un ciclo de desarrollo en el que la última etapa morfológica (la esporulación) pueda ocurrir antes de completar la primera etapa (la agregación), sugiere algunas ventajas selectivas subyacentes. Quizás esto sea un mecanismo de seguridad que permite que algunas mixósporas estén formadas, incluso en el caso de que un endurecimiento de las

INTRODUCCION

condiciones del medio aborte la formación de los cuerpos fructificantes (Shinkets, 1987).

La implicación de moléculas extracelulares en la fructificación se deduce de los estudios de complementación extracelular de diferentes mutantes. En estos estudios, mezclas de dos tipos diferentes de mutantes pueden formar cuerpos con esporas, aunque cada tipo de mutante por separado no puedan hacerlo (Hagen et al., 1978). Esta complementación no es debida a intercambio genético ni a un intercambio de metabolitos nutricionales necesarios para el crecimiento vegetativo, más bien parece ser reflejo del intercambio de moléculas que únicamente regulan la esporulación (LaRossa et al., 1983).

B. Intercambios genéticos

El desarrollo de técnicas para transferir genes entre razas de *M. xanthus* y entre *E. coli* y *M. xanthus* abrió la puerta para formas de análisis genético más complejas. Los mutantes de desarrollo no tienen generalmente un fenotipo fácilmente seleccionable, con ello surgen dos problemas: disponer de un marcador seleccionable que se transfiera junto al alelo mutado y transferir el alelo a una raza diferente. El primer problema es superable con el uso de elementos transponibles y el segundo con el uso de fagos transductantes generalizados.

El transposón Tn5 ha sido particularmente útil para el análisis genético de *M. xanthus* al integrarse en la mayoría, si no todos, los genes de su cromosoma. El Tn5 es introducido en *M. xanthus* por transducción especializada usando el fago de *E. coli* P1. Este fago inyecta su ADN en *M. xanthus* pero ni se replica ni se lisogeniza, siendo por tanto un perfecto vector suicida ya que las células adquieren la resistencia a la kanamicina solo cuando el Tn5 se ha transpuesto al cromosoma de *M. xanthus* (Kuner & Kaiser, 1981). También se utiliza una versión modificada del Tn5, el llamado Tn5-

132 que porta resistencia a la oxytetraciclina (Avery & Kaiser, 1983a).

La forma más empleada de intercambio genético entre razas de *M. xanthus* es la transducción generalizada. Se han descrito tres grupos de mixofagos transductantes: Mx4, Mx8 y Mx9. Los grupos Mx4 y Mx8 han sido utilizados para la transducción de una amplia variedad de genes. El fago Mx4 puede empaquetar hasta 62Kb y el Mx8 hasta 56Kb de ADN (Martin et al., 1978).

C. Mapeo genético por cotransducción

Los fagos Mx4 y Mx8 solo pueden transferir el 1% del total cromosómico, así no es posible disponer de un mapa genético completo de *M. xanthus*. La transducción es usada para un mapeo fino por cotransducción (Sodergren et al., 1983). La frecuencia de cotransducción de dos marcadores es proporcional a la distancia entre ellos, de modo que aunque la distancia física entre ellos no sea conocida, puede estimarse por la frecuencia cotransduccional según la ecuación de Wu.

D. Fusiones *Lac*

El uso de estas fusiones en *M. xanthus* ha sido simplificado por la inserción de un fragmento sin promotor del operón de la lactosa en el Tn5. Cuando este Tn5 $_{lac}$ se integra en la orientación apropiada próximo a un promotor activo, la β -galactosidasa puede ser detectada (Kross & Kaiser, 1984).

Se han estimado en varios cientos de genes los que aumentan su expresión durante el desarrollo. Menos del 10% de las fusiones con promotores reguladores del desarrollo, provocan un defecto apreciable en el mismo, quizás porque se requieren para la supervivencia a largo plazo o para la germinación. Otros pueden ser componentes del cuerpo fructificante o de la espora y no son esenciales para la terminación del desarrollo bajo las condiciones de laboratorio. Los promotores del desarrollo son activados en

diferentes intervalos y con niveles de expresión muy variados (Kross et al., 1986).

E. Epistasis

La epistasis determina si dos sucesos están en la misma vía y, si es así, el orden de expresión de los mismos en el tiempo. Así, un doble mutante tendrá el fenotipo de la mutación que ocurra antes en la vía alterada. En principio cualquier mutación en la vía de desarrollo puede ser ordenada de este modo. Los estudios con mutantes *SpoA* sugieren que su expresión precede al 85% de los genes reguladores del desarrollo, lo cual coincide con los estudios bioquímicos que predicen que los mutantes *SpoA* están bloqueados en una etapa temprana del desarrollo (Kuspa et al., 1986).

F. Clonación de genes del desarrollo

Se han usado dos estrategias básicas para la clonación de genes del desarrollo. Una requiere conocer previamente la secuencia de aminoácidos de la proteína producto del gen y usa la síntesis de oligonucleótidos sintéticos para identificar el gen por hibridación. De este modo se ha clonado el gen de la proteína S, resultando que el fragmento clonado contenía dos copias similares del gen (Inouye et al., 1983).

Otra estrategia usa una inserción del Tn5 en o cerca del gen a clonar para proporcionar un marcador seleccionable en el aislamiento de plásmidos recombinantes con las secuencias de *M. xanthus*. Trás la inserción del Tn5 se procede a la clonación en un vector apropiado de fragmentos cromosómicos al azar y se transforma con ellos a *E. coli* seleccionando la resistencia a kanamicina. Esta estrategia ha sido usada para la clonación de varias regiones cromosómicas implicadas en el control del desarrollo (O'Connor & Zusman, 1983; Shimkets et al., 1983; Blackhart & Zusman, 1985a).

La transferencia del ADN clonado desde *E. coli* a *M. xanthus* utiliza la transducción generalizada y especializada del colifago P1.

INTRODUCCION

La transducción del plásmido con el gen clonado a *M. xanthus* ocurre con una frecuencia de 10^{-3} - 10^{-7} /ufp (O'Connor & Zusman, 1983).

G. Construcción de merodiploides

La construcción de merodiploides es esencial para los test de complementación genotípica. La construcción de duplicaciones en tandem de regiones definidas del cromosoma de *M. xanthus* es el método usual para obtener diploides parciales de esta mixobacteria. En tales duplicaciones se utiliza la recombinación entre los transposones Tn5 y Tn5-132, que forman un tercer transposón recombinante en el nuevo punto de la región duplicada (Avery & Kaiser, 1983b). Otro método utiliza un plásmido circular incapaz de replicarse en *M. xanthus* y que contiene secuencias de interés de *M. xanthus*. Este plásmido puede integrarse en el cromosoma por sobrecruzamiento con la región de homología, formando una estructura similar a la duplicación en tandem. En este segundo caso se observa una alta frecuencia de conversión génica (Shinkets et al., 1983). Ambas formas de duplicaciones son inestables y segregan con una frecuencia del 0.1% por generación. La segregación y el Southern-blotting proporcionan los medios para el análisis de la estructura y genotipo de los diploides (Shinkets et al., 1983).

1.3.3 Control del desarrollo

Los mutantes del desarrollo obtenidos pueden dividirse en tres grandes grupos: mutantes que no agregan ni esporulan (defectivos en la iniciación del desarrollo), mutantes que no agregan pero si esporulan (defectivos en alguna etapa propia de la agregación) y mutantes que agregan normalmente, pero que no forman esporas (Morrison & Zusman, 1979). Estos resultados sugieren que el desarrollo puede ser dividido en tres etapas: iniciación, agregación y formación del cuerpo fructificante, y esporulación.

A. Iniciación

El desarrollo es una respuesta a una privación nutricional, aunque una inanición gradual es más probable que conduzca a un rápido y sincrónico desarrollo que una privación severa. La privación parcial de los aminoácidos requeridos para el crecimiento vegetativo (valina, leucina e isoleucina) induce el desarrollo. Sin embargo, la falta de otros aminoácidos no esenciales, de una fuente de carbono y energía o de fosfato inorgánico también dispara el proceso de desarrollo. La naturaleza de las señales intracelulares implicadas en la captación de los niveles de aminoácidos y en la iniciación del desarrollo sigue sin ser aclarada. Los intentos de implicar al proceso de respuesta estricta y sus mediadores, los nucleótidos polifosforilados ppGpp y pppGpp, no han sido refrendados por los datos experimentales (Manoil & Kaiser, 1980a, b).

La familia de aminoácidos del aspártico (ácido aspártico, asparagina, treonina, lisina, isoleucina, metionina y ácido mesodiaminopimélico) podría jugar un importante papel en la iniciación del desarrollo. La etapa clave en la biosíntesis de esta familia es la síntesis del β -aspartilfosfato, catalizada por la aspartatoquinasa. *N. xanthus* posee dos formas isoenzimáticas del enzima, la forma I inhibida por la lisina y estimulada por el mesodiaminopimélico y la forma II inhibida por la treonina. El mal balance nutricional de los aminoácidos de esta familia, provoca efectos diversos sobre la iniciación del desarrollo, probablemente en

INTRODUCCION

relación con la regulación alostérica de estos isoenzimas (Shabtai et al., 1975).

Las propiedades de la aspartatoquinasa de *E. coli* y *M. xanthus* son similares y pueden reflejar puntos comunes en la fisiología de formas bacterianas ancestrales que han sido conservadas fuertemente. Sin embargo, la estimulación por mesodiaminopimélico es una nueva propiedad. El mesodiaminopimélico es un componente de la pared celular de esporas y células vegetativas y como tal se requiere una fuente continua del mismo. Puesto que no es un componente de las proteínas de las que se nutre *M. xanthus* y no se encuentra en la pared celular de todas sus presas bacterianas, las células deben sintetizar la mayoría de sus requerimientos. Así la estimulación feedback puede tener el significado de asegurar la síntesis de diaminopimelato cuando la fuente de aminoácidos es muy alta y por tanto su evolución puede reflejar un cambio necesario para adaptarse a la vida de recogedor de proteínas (Shimkets, 1987).

Diversos compuestos con adenina producen la inducción del desarrollo. Estos compuestos provocan un fuerte descenso de fosforibosilpirofosfato (PRPP). Este descenso puede limitar la síntesis de otras sustancias que requieren PRPP como la tiamina, histidina, triptófano y nucleótidos (Bagnara & Finch, 1974). Dentro de este contexto es difícil explicar como ciertos aminoácidos bloquean la inducción del desarrollo por adenina, mientras que la histidina y el triptófano no lo hacen (Campos & Zusman, 1975). El S-adenosilmetionina (SAM) es un compuesto con adenina que no induce el desarrollo. Este compuesto es incorporado eficientemente a la célula a partir de fuentes exógenas, inhibe a la SAM-sintetasa y actúa como donador en la metilación de proteínas; por todo ello podría jugar un importante papel en el desarrollo (Panasencko, 1983).

Durante el inicio del desarrollo se han detectado cambios en los niveles de los nucleótidos AMPc y GMPc y en los de sus enzimas biosintéticos y degradativos (adenilato ciclasa, AMPc fosfodiesterasa, guanil ciclasa y GMPc fosfodiesterasa) (Passador &

McCurdy, 1985). La potencial regulación del desarrollo por estos compuestos es una pregunta que se mantiene a la espera de realizar análisis genéticos de mutantes en las actividades enzimáticas estudiadas.

Cuando la célula entra en el ciclo de desarrollo se aprecian una serie de cambios en el ARN celular. La tasa de acumulación del ARN sufre un incremento transitorio. El nuevo ARN contiene un ARNm con una vida media inusualmente larga, entre estos ARNm estables se hallan los de la proteína S y la MBHA, con una vida media de 38 y 30 minutos respectivamente (Nelson & Zusman, 1983a).

En torno a un 20% de los mutantes resistentes a la rifampicina son incapaces de esporular y tienen muy limitada su capacidad de agregación. La resistencia a la rifampicina y los fenotipos no fructificantes cotransducen en un 99%, lo que sugiere que esto es resultado de una única mutación (Rudd & Zusman, 1979).

B. Agregación

Para la agregación, además de la privación nutricional que dispara la iniciación, son requeridos otros factores: una superficie sólida (para el movimiento), una alta densidad celular y en algunas especies la luz. Ciertos compuestos pueden servir como señales intercelulares de agregación en *M. xanthus* y *S. aurantiaca*.

S. aurantiaca, a baja densidad celular, puede ser estimulada a formar cuerpos fructificantes por la luz, por una feromona de estructura aún no bien conocida o por compuestos que contengan guanina (Stephens et al., 1980; Stephens et al., 1982).

La luz no estimula el desarrollo de *M. xanthus*. En este caso las experiencias sugieren que la adenina es la señal mayoritaria, aunque no la única, para la agregación. Esta señal es específica para la agregación y no actúa sobre la esporulación (Shimkets & Dworkin, 1981).

El hecho de que no aparezcan cuerpos fructificantes en medio líquido se debe a que las mixobacterias no pueden moverse, lo que

impide su agregación en puntos concretos. La incapacidad de fructificar a bajas densidades celulares otorga dos posibles papeles a los compuestos inductores de la agregación: como indicadores intercelulares de las condiciones apropiadas para iniciar el desarrollo, valorando la propia densidad celular o bien como precursores bioquímicos de la propia señal de agregación (Shinkets, 1987). Los intentos de identificar la molécula (o moléculas) implicados en la atracción de las células a sus centros de agregación no han dado resultados positivos hasta el momento.

Se han aislado un gran número de mutantes defectivos en la agregación, dividiéndose por su fenotipo terminal de agregación en "rough", "swirl", "flat mound" y "frizzy" (Morrison & Zusman, 1979). Muchos de estos mutantes poseen una movilidad defectuosa. Estos defectos pueden producirse en las interacciones celulares necesarias para coordinar el movimiento del grupo o en dificultades para controlar la dirección del movimiento celular. Las células salvajes de *M. xanthus* invierten su dirección de deslizamiento cada 6.8 minutos como media, aunque los intervalos de inversión pueden variar en ± 2.5 minutos. El movimiento neto es debido a las grandes variaciones en el intervalo entre las inversiones y a que las células no siguen caminos idénticos en sus movimientos de ida y vuelta (Blackhart & Zusman, 1985b). Para que la agregación tenga éxito, las células en la cercanía de los centros de agregación deben ser capaces de localizar tal centro y deslizarse hacia él, lo que requiere frecuentes alteraciones en la dirección de marcha, movimientos netos considerables y un control adecuado de su movimiento.

Durante la agregación, *M. xanthus* produce una lectina conocida como MBHA, cuya concentración celular está influida por el sistema de movilidad S (Cumsky & Zusman, 1979). La MBHA es una de las proteínas específicas del desarrollo mejor caracterizada. Es un polipéptido simple que se comporta en solución como un monómero de peso molecular estimado entre 27000 y 30000 dalton (Cumsky &

INTRODUCCION

Zusman, 1981a). Sus propiedades de unión multivalente a carbohidratos complejos por un residuo de β -galactosa se deben a que contiene cuatro dominios de 67 aminoácidos altamente conservados (Romeo *et al.*, 1986). Contiene menos del 0.05% de carbohidratos y un alto porcentaje de restos de glicina (19%) (Cumsky & Zusman, 1979). Se localiza en o cerca de la superficie celular en zonas concretas de la célula, en uno o ambos polos (Nelson *et al.*, 1981). Las células vegetativas y en desarrollo contienen receptores para la MBHA, pero estos parecen ser distintos (Cumsky & Zusman, 1981b).

Antes de la aparición de los agregados celulares se han detectado al menos cinco nuevas proteínas de membrana en la célula (Orndorff & Dworkin, 1982). Las experiencias de marcaje sugieren que ocurren cambios dramáticos en la arquitectura de las proteínas de superficie durante el desarrollo (Maeba, 1984). Los anticuerpos monoclonales pueden ser herramientas útiles en el análisis de los componentes de la superficie celular implicados en el desarrollo. Dichos anticuerpos frente a células en desarrollo, podrían agruparse en dos: aquellos que reconocieran antígenos de superficie específicos del desarrollo y aquellos que reconocieran antígenos presentes en células vegetativas y en desarrollo; al menos tres se han descrito pertenecientes al primer grupo (Gill & Dworkin, 1986).

Una vez cumplidos los requisitos previos de la iniciación, las células en agregación empiezan a deslizarse hacia puntos concretos, normalmente formando oleadas. En esos puntos de atracción, se originan unos agregados que van creciendo de tamaño hasta constituir el cuerpo fructificante. La morfología de los cuerpos fructificantes varía según los distintos géneros. Los más simples son los de la familia *Myxococcaceae*, cuyo aspecto es el de montículos esféricos o alargados. En otros géneros, como *Stigmatella* o *Chondromyces* son mucho más complejos, constando de un pedúnculo simple o ramificado del que salen varios esporangiolos o varios racimos de ellos.

C.Esporulación

Las vías de desarrollo que conducen a la esporulación implican la comunicación celular y resultan en la muerte de una parte de las células. El análisis bioquímico de los mutantes defectivos en la esporulación ha dado los mejores resultados en la definición de las etapas que conducen a ella. Los mutantes no esporulantes que pueden ser inducidos a esporular en la presencia de otros mutantes son relativamente comunes (Hagen *et al.*, 1978).

Estos mutantes pueden ser divididos en cuatro grupos en base a la capacidad de esporular en la presencia de otros mutantes, es decir por complementación extracelular. Los cuatro grupos se conocen como SpoA, SpoB, SpoC y SpoD. Los resultados en la eficiencia de esporulación de mezclas de mutantes, sugieren que al menos hay dos señales intercelulares implicadas, una definida por SpoC y otra por SpoA, SpoB y SpoD; queda aún por dilucidar si esta última representa tres señales distintas o tres etapas diferenciables de una misma señal intercelular (LaRossa *et al.*, 1983). En mezclas iguales de células, una raza puede producir la mayoría de las esporas, mientras que las células de la otra raza se lisan. Las experiencias sugieren que ciertos factores genéticos pueden predisponer a las células a asumir un papel específico en el desarrollo. Están por aclarar los mecanismos moleculares que controlan tal determinación.

Se dispone de varios marcadores genéticos y bioquímicos para estimar el punto en el que el desarrollo de un mutante se detiene. En el trabajo con los marcadores genéticos se han estudiado mutantes termosensibles, así como la expresión de promotores reguladores del desarrollo en fusiones *lac*. Los marcadores bioquímicos incluyen la producción de las proteínas específicas del desarrollo S y MBHA. Las características de los cuatro grupos de mutantes para la esporulación en relación a la producción de estas proteínas son las siguientes:

INTRODUCCION

<u>Clase</u>	<u>ProteínaS</u>	<u>ProteínaMBHA</u>
Salvaje	+	+
SpoA	retrasada	-
SpoB	reducida	reducida
SpoD	+	-
SpoC	+	+

Los resultados genéticos y bioquímicos sugieren que la vía de esporulación comienza muy pronto en el desarrollo, quizás tan pronto como la agregación. Los mutantes SpoA, SpoB y SpoD detienen su desarrollo antes que los mutantes SpoC (Shimkets, 1987).

Las aproximaciones bioquímicas para determinar la naturaleza de un bloqueo mutacional implican la complementación del defecto con un componente de un extracto celular. En las mutaciones *spoA*, *spoB*, *spoC* y *spoD* que presumiblemente previenen las señales extracelulares del desarrollo, este estudio es muy complejo por el gran número de etapas intermediarias que pueden existir entre la percepción de una señal y la complementación del desarrollo. Cualquier intento de rescatar un defecto en el desarrollo de los mutantes con extractos o componentes celulares debe estar sujeto a una serie de pruebas para distinguir entre comunicación intercelular y derivación fenotípica. Para que una molécula esté implicada en la comunicación intercelular debe tener las siguientes propiedades: i) debe estar disponible cerca de las células en el momento del desarrollo, ii) debe ser producida a concentraciones que sean suficientes para inducir la respuesta en cuestión, iii) los mutantes defectivos deben carecer de la capacidad para producir o secretar la sustancia, iv) la sustancia deberá imitar los efectos de los ensayos de complementación extracelular y v) la sustancia deberá restaurar el desarrollo en un punto próximo donde fue detenida por la mutación. Estos puntos dan una señal de partida para distinguir entre comunicación celular y derivación fenotípica (Shimkets, 1987).

INTRODUCCION

Los mutantes del grupo SpoA parecen tener dificultades para captar las condiciones de inanición que disparan el desarrollo, de hecho son capaces de seguir creciendo en condiciones donde el crecimiento vegetativo cesa en razas salvajes (LaRossa *et al.*, 1983). Las células salvajes en desarrollo producen una sustancia conocida como factor A que rescata la esporulación de los mutantes SpoA (Kuspa *et al.*, 1986). Aparentemente, una gran variedad de mutaciones pueden generar el fenotipo SpoA ya que sólo unos pocos de los alelos *spoA* están ligados (Kuner, 1980).

Es probable que las mutaciones que generan el fenotipo SpoB se localicen en muchos loci; mientras que dos de los alelos *spoD* están en el mismo locus y otros dos no tienen localización conocida (LaRossa *et al.*, 1983).

Todos los alelos conocidos del grupo SpoC están ligados en una única región del cromosoma. Los mutantes *spoC* son rescatados a la esporulación por la adición de precursores del peptidoglicano, si bien, los resultados son algo enigmáticos pues el fondo genético de las razas usadas afecta a los resultados. Sin embargo, la sensibilidad peculiar de los mutantes *spoC* a los agentes químicos que desvían el bloqueo mutacional puede ser debida al hecho de que tales mutantes han progresado mucho en el ciclo de desarrollo pero no han iniciado la lisis, así las sustancias que inducen la lisis pueden restaurar la vía de la esporulación (Janssen & Dworkin, 1985; Shimkets & Kaiser, 1982b).

El locus *spoC* también se requiere para el fenómeno del ondulamiento. Puesto que numerosos mutantes no esporulantes pueden llevar a cabo este proceso, esporulación y ondulamiento son sucesos del desarrollo probablemente no relacionados (Shimkets, 1987). El papel dual del locus *spoC* en ambos procesos será un punto interesante para futuros trabajos.

La muerte celular durante un proceso de morfogénesis es un fenómeno común del desarrollo en vertebrados (Cowan *et al.*, 1984), invertebrados (Truman, 1984) y bacterias (Wireman & Dworkin, 1977).

INTRODUCCION

Normalmente la muerte celular durante la morfogénesis de *M. xanthus* alcanza a un 70% de la población en desarrollo (cifra que admitimos con las reservas que posteriormente señalamos). Si bien la función de la lisis no es conocida, la evidencia típica sugiere que está implicada en la vía de la esporulación más que en la de agregación. Así, todos los mutantes conocidos en la autólisis del desarrollo tienen un punto en común: son incapaces de esporular. Por contra la lisis no juega un papel aparente en la agregación, los mutantes no esporulantes agregan normalmente en todos los casos.

La mayor parte de la lisis coincide con la aparición de las mixósporas y en razas salvajes es probable que ocurra dentro del cuerpo fructificante ya que es donde se localizan la mayoría de las células en el momento de la esporulación. El mecanismo de inicio de la lisis es poco conocido. Se han aislado cinco sustancias, conocidas como autocidas, que matan preferentemente a las células de *M. xanthus* (Varon et al., 1984). La autocida mayoritaria, AMI, es una mezcla de ácidos grasos que han sido purificados e identificados; los ácidos grasos mono y diinsaturados son los componentes con mayor actividad (Varon et al., 1986).

El papel de la lisis en la esporulación no es conocido y existen dos puntos de vista diferentes. Por un lado la lisis celular puede ser simplemente un fallo en el intento de la esporulación con poco papel en el desarrollo de las células con éxito. Por otro lado, la lisis puede ser una alternativa de desarrollo a la esporulación y cuyos productos estimulan la formación de esporas o su maduración. Los resultados experimentales apoyan la idea de que el número de esporas es determinado por la concentración de los productos de lisis (Wireman & Dworkin, 1977). Al menos, la lisis supliría una gran fuente de nutrientes a las células esporulantes; se puede aproximar que la concentración de aminoácidos liberados por la lisis en el momento de la esporulación estaría en el rango de 2 a 5 mM. Dado que concentraciones similares de ciertos aminoácidos tienen

INTRODUCCION

efectos dramáticos sobre la iniciación del desarrollo, no es ilógico sugerir que también ellos regulasen la esporulación (Shimkets, 1987).

Sin embargo, hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sufriendo morfogénesis, son bastante sensibles al choque osmótico y, por tanto, están expuestas a lisis (Zusman, 1984). Recientemente, O'Connor y Zusman (1987) han informado que las células en diferenciación atraviesan un estado frágil en el que son fácilmente lisadas por la manipulación experimental. Esta fragilidad puede llevar a una sobreestimación de la tasa de lisis durante el desarrollo. Por tanto, aunque se tiende a considerar la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población, esta autólisis sería no activa.

Una serie definida de cambios fisiológicos acompaña la progresión de las células vegetativas en la esporulación. Inicialmente se requiere un periodo de contacto celular y es durante esta primera fase cuando las células intercambian sus señales. Una segunda fase ocurre tras estas señales, pero antes de la autólisis y esporulación. La tercera fase está marcada por el compromiso de las células a su proceso de desarrollo. Finalmente se desarrollan las propiedades de resistencia de las esporas.

El aspecto más estudiado en la maduración de las esporas concierne al ensamblaje de la proteína S sobre su superficie. La proteína S puede llegar a la superficie de la espora bien por su transporte activo a través de la pared o por liberación de células lisadas. Dada la gran cantidad de proteína producida en el desarrollo (hasta el 15% del total de proteínas) y la lisis celular paralela a la esporulación, la segunda hipótesis puede ser más real. La localización de la proteína S antes de la esporulación es eminentemente periplásmica, lo que indicaría su transporte activo fuera del citoplasma, aunque esto no descarta su liberación del periplasma por lisis celular (Nelson & Zusman, 1983).

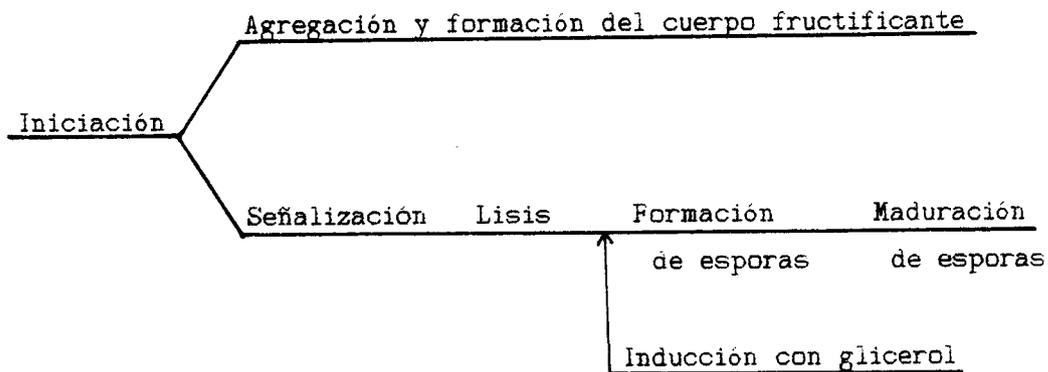
Las diferencias entre células vegetativas y mixósporas fueron anteriormente comentadas, así como algunos de los procesos

observados durante la inducción de mixósporas con glicerol. También se han comentado las diferencias entre ambos tipos de mixósporas; diferencias, que se cree son debidas a que en la esporulación inducida con glicerol, sólo tienen lugar los últimos pasos del proceso de esporulación que se dan durante la formación de los cuerpos fructificantes (Zusman, 1984). Las mixósporas se diferencian de las verdaderas endosporas en que no son células formadas *de novo*, sino células transformadas y en que son mucho menos resistentes que las endosporas. Estas dos razones hacen pensar que las mixósporas son formas de reposo más que de resistencia.

1.3.4 Un programa de desarrollo para *Myxococcus xanthus*

La caracterización de numerosos mutantes del desarrollo, junto con los estudios comentados, han sugerido un modelo para el programa de desarrollo de *M. xanthus*.

Existen dos ramas independientes en la vía del desarrollo, una implica la agregación y construcción del cuerpo fructificante y la otra implica la producción de mixósporas:



Las dos ramas están conectadas durante la fase de iniciación, cuando la disminución de nutrientes induce el programa de desarrollo. Los mecanismos de agregación son bastante desconocidos pero requieren muchos de los genes de la movilidad social. Los

sucesos que llevan a la formación de mixósporas progresan a través de una serie ordenada de sucesos que comienzan incluso antes de que la agregación sea obvia. Su primera etapa es un periodo de señalización intercelular, el cual permanece hasta que se completa la agregación; luego se inicia la autólisis y la esporulación, para finalmente completar la maduración de la esporas y desarrollar sus propiedades de resistencia.

Los estudios en microorganismos han proporcionado grandes avances a la biología como ciencia. Parece razonable suponer que los estudios sobre el desarrollo microbiano contribuirán sustancialmente a nuestra comprensión de la biología del desarrollo. La genética de *M. xanthus* ha avanzado hasta el punto de que el campo está maduro para sofisticados análisis genéticos del comportamiento celular y de su papel en el desarrollo (Shinkets, 1987).

1.3.5 El significado del ciclo de desarrollo

La germinación de las mixósporas formadas al final de un ciclo de desarrollo ocurre cuando son colocadas en un medio rico, por lo que se cree que algunos nutrientes deben actuar como señal que desencadene el proceso. Sin embargo, el mecanismo exacto no es aún conocido. Cualquiera que sea, cuando esto ocurre acontecen una serie de cambios en las esporas. Las mixósporas pierden su refringencia, se rompe la cubierta y emerge una nueva célula vegetativa bacilar (Voelz & Dworkin, 1962). Para que ocurra la germinación parece ser que se requiere una densidad celular alta. Densidades celulares menores son suficientes si la inducción se produce en medios más ricos (Dworkin, 1973). De cualquier manera, no se da la germinación de una célula aislada sino de toda la comunidad. La población de células resultante de la germinación se mantiene unida y se comporta como un nuevo enjambre. En estos, las células siguen el ciclo de vida vegetativo hasta que se agoten los nutrientes. En este momento se iniciará un nuevo ciclo de desarrollo.

INTRODUCCION

Durante mucho tiempo se ha especulado sobre el significado biológico de este ciclo, habiéndose llegado a la conclusión de que su función es asegurar que se inicie un nuevo ciclo a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían colonias en reposo. Ahora bien, ¿por qué se requiere que el ciclo se inicie con una comunidad?. La respuesta podría estar en el modo de vida de estos microorganismos en la naturaleza. Las mixobacterias viven en ambientes de macromoléculas en degradación. Para que una célula aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Allí difundirán y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado, el cual será digerido. Los nutrientes liberados difundirán desde el punto en que se han producido de manera radial, por lo que sólo una pequeña parte llegarán a la célula, siendo insuficientes para mantener su crecimiento. Por el contrario, si en puntos cercanos existen otras células, o sea, se parte de una comunidad, la producción de enzimas será mucho más elevada, con lo cual la degradación de macromoléculas será más rápida y, además, el aprovechamiento de nutrientes más efectivo, ya que cada célula tendrá acceso a los nutrientes obtenidos por toda la comunidad.

El comportamiento vegetativo y de desarrollo de las células cuenta con la movilidad por deslizamiento y la secreción de enzimas hidrolíticos. Durante el crecimiento vegetativo la atención de la colonia está enfocada hacia el movimiento y búsqueda de presas bacterianas para su hidrólisis. La ausencia de tal fuente dispara el ciclo de desarrollo. Durante el desarrollo los miembros de la colonia se deslizan hacia los puntos de agregación, construyen los cuerpos fructificantes y se diferencian hasta la aparición de esporas. Parte de las células de la comunidad inicial se constituyen en esporas que sobrevivirán al germinar, cuando los nutrientes vuelvan a estar disponibles, y otra parte de las células muere en el proceso. La fuente de energía para el gran esfuerzo que supone el

proceso de desarrollo, parece ser suplida por un *turnover* proteico y por la hidrólisis de otros miembros de la comunidad. Si esto último puede considerarse como altruismo o canibalismo, es una interesante cuestión abierta para un debate de sociobiólogos.

1.3.6 Un paso primitivo hacia formas de vida multicelulares

Las primeras formas de vida terrestre se desarrollaron hace 3500 millones de años en condiciones anaerobias (Schopf, 1978). Las células eucariotas con mitocondrias requieren generalmente oxígeno y se cree que se originaron tras la aparición de una atmósfera rica en oxígeno. Los datos geológicos nos indican que una atmósfera rica en oxígeno puede datarse en unos 2000 millones de años. Las primeras evidencias fósiles de células eucariotas son lógicamente posteriores, las formas más primitivas tienen 1500 millones de años (Margulis, 1981). Los fósiles de animales multicelulares más antiguos tienen 700 millones de años (Glaessner, 1976). Así, durante la mayor parte del tiempo, la vida sobre la tierra ha sido unicelular y no eucariótica. Incluso una revisión rápida de los organismos pluricelulares más sencillos indica que el grado de pluricelularidad se alcanzó muchas veces independientemente y probablemente por razones distintas en los distintos grupos.

Dobzhansky *et al*, (1977) sugieren que al menos 17 tipos de organismos pluricelulares han surgido independientemente a partir de formas unicelulares.

Las mixobacterias pueden representar uno de los primeros intentos evolutivos hacia las formas multicelulares. Todas las mixobacterias conocidas viven en agregados multicelulares y como ya hemos indicado aparecen muy relacionadas por su composición de G+C y secuencias de sus ARNr 16S. Todas ellas son aerobias. Reichenbach & Dworkin (1981) distinguen dos subórdenes de mixobacterias (*Soranginae* y *Cystobacterinae*), ambos multicelulares. Por tanto, es probable que su antecesor común lo fuera también. Las bacterias

sulfato reductoras y *Bdellovibrio* son las eubacterias más próximas a las mixobacterias. Estas eubacterias y otras no viven en típicos agregados multicelulares; la multicelularidad surgió después de que las mixobacterias y las eubacterias más próximas a ellas divergieran, pero antes de que los dos subgrupos de mixobacterias se separaran en su evolución. La edad mínima de las mixobacterias puede estimarse en función de los estudios de las secuencias de los ARNr 16S (Ludwing *et al.*, 1983). Se deduce que las mixobacterias pueden haberse separado de las formas bacterianas más primitivas hace unos 2000 millones de años, es decir en el mismo momento en que la atmósfera se transformó en aerobia. Recientes datos fósiles apoyan esta edad para las formas más primitivas de mixobacterias (Lanier, 1987).

Así, probablemente la forma de agregado multicelular de las mixobacterias existió antes que cualquier eucariota multicelular. Este origen tan primitivo es consistente con muchas de las propiedades de las mixobacterias. Estos microorganismos son comunes en todos los suelos del mundo, independientemente del clima de su geografía. Su alimentación cooperativa, puede haber sido una ventaja selectiva en su evolución hacia las formas multicelulares. De hecho, sus presas más comunes, otras bacterias, han existido antes que cualquier forma de célula eucariota.

Las semejanzas entre las mixobacterias y los hongos mixomicetes son un ejemplo de una evolución convergente de propiedades en dos organismos que ocupan el mismo nicho ecológico (Kaiser, 1986). Ambos son haploides con lo que la selección puede actuar más directamente que en los organismos diploides. La evolución convergente de ambos, sugiere que las diferencias estructurales y funcionales entre células procariotas y eucariotas han sido secundarias ante las semejanzas del metabolismo y las limitaciones de la función y estructura proteica para proporcionar la respuesta de estos organismos ante fuerzas de selección semejantes.

2. FISIOLOGIA Y METABOLISMO DEL FOSFATO

2.1 Introducción

El fósforo, en su forma más usual en la célula, el ión fosfato, juega un papel esencial en los sistemas bioquímicos de energía.

El ión ortofosfato libre (PO_4^{-3}) exhibe una estructura tetraédrica estable, con cuatro enlaces σ entre el átomo de fósforo y los cuatro átomos de oxígeno (hibridación sp^3), y un enlace π enlazante deslocalizado entre un orbital d del fósforo y cuatro orbitales p de cada uno de los átomos de oxígeno. A pH fisiológico el ortofosfato muestra protonado el grupo de pKa 12,7 y más o menos protonado el de pKa 7,2, es decir, su fórmula es aproximadamente H_2PO_4^- .

En contraste con el ortofosfato, el metafosfato (PO_3^-) presente en los grupos fosfato de los nucleótidos adenilados, presenta una estructura bipiramidal trigonal muy inestable, con tres enlaces σ entre el átomo de fósforo y los tres átomos de oxígeno (hibridación sp^3d). A pH fisiológico el ión fosfato en la molécula de ATP actúa como un híbrido en resonancia en el que el doble enlace posee un significativo carácter de enlace simple, y el enlace simple formal opuesto posee un considerable carácter de enlace doble. Tales híbridos en resonancia son más estables que lo que indican sus estructuras formales, estabilizándose por una cantidad de energía llamada energía de estabilización por resonancia.

Hemos de considerar por otra parte, la elevada concentración de cargas negativas, situadas muy próximas entre sí, entorno al grupo trifosforilado del ATP. Al hidrolizarse un grupo fosfato terminal, se elimina parte de la tensión eléctrica del grupo fosforilado. La repulsión eléctrica remanente y la mayor estabilidad

INTRODUCCION

del ión ortofosfato formado evita la formación de un nuevo enlace como el anteriormente hidrolizado.

De las propiedades químicas de estas moléculas y enlaces depende, en definitiva, la bioenergética celular, a través de la energía química de la molécula de ATP.

Junto a lo anterior, ha de resaltarse la necesidad de fósforo como nutriente, dado su carácter de bioelemento primordial. El fósforo es parte constituyente de todo ser vivo al entrar a formar parte en la composición química de la molécula base de la vida, el ADN.

Con pocas excepciones, todo el fósforo de los sistemas geológicos y biológicos se presenta en forma oxidada, bien como sales insolubles de calcio, bien como fosfato inorgánico libre o en ésteres fosfato. El ciclo del fósforo es más simple que el del nitrógeno puesto que el fósforo es asimilado solo en estado de valencia +5, la forma natural en que se halla, mientras que el nitrógeno presenta varias formas de oxidación asimilables.

El fósforo ocupa una posición crítica en la biología del suelo, siendo particularmente importantes los procesos de mineralización e inmovilización. El continuo recambio de ambos procesos gobierna el grado de disponibilidad del fósforo en el suelo (Alexander, 1977). El fósforo del suelo se presenta en dos formas: i) inorgánica, en forma de minerales insolubles como fosfatos de hierro y aluminio en condiciones ácidas o como fosfatos de calcio en condiciones alcalinas o de neutralidad; ii) orgánica, originada principalmente por restos vegetales. La fracción orgánica representa 10-80% del total, disminuyendo su proporción con la profundidad. La mayor parte de este fósforo orgánico se encuentra en ácidos nucleicos, fosfolípidos e inositol fosfato (Alexander, 1977).

Los microorganismos del suelo pueden llevar a cabo diversas transformaciones sobre el fósforo de su medio: alteración de la solubilidad de la fracción inorgánica, mineralización de compuestos

INTRODUCCION

orgánicos con liberación de ortofosfato, inmovilización o conversión del fósforo inorgánico en anión intracelular y procesos redox sobre el fósforo inorgánico.

La solubilización por microorganismos de compuestos inorgánicos de fósforo del suelo como el hidroxiapatito, fluoroapatito y fosfato cálcico es un hecho bien establecido. La solubilización llevada a cabo por hongos (Agnihotri, 1970) y bacterias (Craven & Hayasaka, 1982) se realiza por la secreción al medio de ácidos orgánicos derivados del metabolismo de estos microorganismos. Esta solubilización es fuente de fosfato para la microflora y la vegetación del suelo. Se ha propuesto que bacterias como *Escherichia coli* y *Erwinia herbicola* poseen genes que codifican para funciones implicadas en la solubilización de fosfatos minerales (genes *mps*). Estos genes se encontrarían reprimidos en presencia de fuentes alternativas de fosfato inorgánico soluble, bajo el control del metabolismo general del fósforo celular. Las inmediatas especulaciones sobre aplicaciones potenciales en el campo de la agricultura como una forma de fertilización biológica no han tardado en aparecer (Goldstein, 1986; Goldstein & Tiu, 1987).

La tasa de mineralización del fósforo orgánico depende de la temperatura, pH y disponibilidad de sustratos, si bien no se ve inhibida por el fósforo inorgánico. El enlace éster entre el fosfato y las moléculas orgánicas es hidrolizado por enzimas conocidas como fosfatasas. La detección de estos enzimas en el suelo es habitual (Alexander, 1977; Skujins, 1976). La mineralización e inmovilización son procesos relacionados. Puesto que el suelo puede presentar altos contenidos en fósforo orgánico y este puede ser fácilmente liberado como ortofosfato, el reciclaje de éste y su incorporación a la materia viva es inmediata. El fósforo inmovilizado en la materia viva equivale a un 0,3% del peso seco de la materia orgánica usada por los microorganismos.

El fósforo puede existir en varios estados de oxidación, desde -3 como fosfamina a +5 como ortofosfato. Diversos microorganismos

INTRODUCCION

pueden provocar cambios redox sobre el fósforo, en procesos similares a los de desnitrificación, si bien hasta ahora se ha prestado poca atención a estas transformaciones (Alexander, 1977).

En su estado de valencia más usual, +5, el fósforo puede ser asimilado en forma de fosfato y fosfonato. Las tres formas químicas principales del fosfato son el ortofosfato, pirofosfato y metafosfatos, estos últimos presentes en formas polimerizadas. Es admitido que el ortofosfato es la forma inorgánica más usual que los microorganismos pueden asimilar a través de sus sistemas de transporte. La utilización de fosfatos orgánicos también es usual, mediante la ruptura del enlace fosfoéster (R-O-P) a través de las fosfatasas.

Los fosfonatos, compuestos con enlaces C-P, se encuentran en la naturaleza en ciertos protozoos y son sintetizados por el hombre como compuestos organofosforados de difícil degradación. Existen microorganismos capaces de utilizar estos compuestos, liberando Pi que utilizan como fuente de fósforo. Esta capacidad se basa en la existencia de dos enzimas distintos que pueden romper el enlace C-P, una fosfoacetaldehido hidrolasa descrita en *Bacillus cereus* y una C-P liasa descrita en *E. coli*, *Agrobacterium radiobacter* y *Pseudomonas aeruginosa*. En *E. coli* la C-P liasa parece incluida dentro de la regulación general del metabolismo del fosfato (Shinabarger et al., 1984; Wackett et al., 1987a; Wackett et al., 1987b).

2.2 Asimilación y transporte del fosfato

El mantenimiento del fosfato interno es de importancia fundamental para cualquier ser vivo. La síntesis de las macromoléculas con fósforo ADN y ARN tiene una tasa mínima continua, siendo necesario además, mantener un *pool* adecuado de intermediarios fosforilados que permitan la producción de energía para la síntesis de macromoléculas. La puerta al mundo exterior se establece por los mecanismos de transporte que toman Pi o moléculas orgánicas fosforiladas. En el equilibrio del Pi interno son importantes varios factores: i) la regulación del transporte a nivel de expresión, ii) permitir una asimilación mayor cuando las células están forzadas a usar fosfatos orgánicos como fuente de carbono, iii) la regulación de la actividad de los sistemas de transporte de fosfato y iv) el acoplamiento energético necesario para la asimilación de Pi frente al gradiente de concentración.

El análisis cinético de los sistemas de transporte de moléculas fosforiladas revela que la regulación genética no es el único modo de controlar el flujo de fosfato en la célula. El transporte es dependiente de la concentración de fosfato en la célula, del pH interno y del potencial de carga de la superficie celular (Boos, 1987).

La tasa de asimilación del fosfato en cianobacterias es óptima a pH 7,5-8,5, lo que concuerda con la preferencia de estas por condiciones alcalinas. A bajas concentraciones de fosfato, la asimilación es un proceso activo estimulado por la luz, mientras que a altas concentraciones predomina la asimilación pasiva y la luz no ejerce efecto alguno. La asimilación de fosfato de compuestos orgánicos gracias a enzimas con actividad fosfatasa, localizadas en la superficie celular es una propiedad muy extendida entre las cianobacterias (Healey, 1973; Healey, 1982).

INTRODUCCION

La importancia del Pi y de algunos de sus ésteres orgánicos con carbohidratos viene reflejada por el número de sistemas de transporte activo para estos compuestos presentes en *E. coli*. Hay descritos dos sistemas de transporte activo para el Pi, dos para el glicerol-3-fosfato y uno para las hexosas fosfato. Estos cinco sistemas cabe agruparlos en dos tipos: i) sistemas simples con un único componente de membrana, que obtienen su energía a través de un gradiente protónico y cuyos valores de saturación media son elevados; aquí se incluye el sistema de transporte de fosfato inorgánico (Pit) de carácter constitutivo y los sistemas inducibles por sus sustratos GlpT (para el glicerol-3-fosfato) y Uhp (para las hexosas fosfato); ii) sistemas complejos con al menos tres proteínas de membrana y una proteína de unión periplásmica, que obtienen su energía de enlaces fosforilados ricos en ella, son inducidos por la limitación de Pi y sus valores de saturación media son pequeños; se incluyen aquí el sistema específico de transporte de Pi (Pst) y el sistema específico de transporte del glicerol-3-fosfato (Ugp) (Yagil, 1987).

El sistema Pit es de carácter constitutivo, su componente es una proteína de membrana con un peso molecular de 46.200 (Elvin et al., 1987).

El sistema Pst es mucho más complejo, constituyéndose por cinco genes ligados: *phoS*, *pstC*, *pstA*, *pstB* y *phoU* (Surin et al., 1985). *phoS* codifica para la proteína periplásmica de unión al fosfato. Los productos de *pstC*, *pstA* y *pstB* son proteínas de la membrana celular, probablemente implicadas en la formación de un canal de transporte. El gen *phoU*, integrado en el regulón *pho*, está ligado a los cuatro anteriores y se sugiere que está implicado en la formación de una señal intermediaria entre el sistema Pst y otros genes reguladores del regulón *pho*.

La existencia de dos sistemas de transporte para el glicerol-3-fosfato queda justificado por el hecho de que este metabolito es un intermediario clave en muchos procesos anabólicos y catabólicos

INTRODUCCION

de la célula. El sistema GlpT es inducido por la presencia del glicerol-3-fosfato en el medio de cultivo y se halla bajo el control del regulón *glp* (Larson, 1987).

El sistema Ugp forma parte del regulón *pho*. El sistema puede realizar el transporte de glicerol-3-fosfato y de fosfodiésteres como la glicerofosforiletanolamina. Esta última molécula produce glicerol-3-fosfato y un alcohol. El sistema posee dos genes: *ugpB* que codifica para una proteína periplásmica de unión al glicerol-3-fosfato y el *ugpC* probable responsable de la actividad fosfodiesterasa (Brzoska, 1987).

El sistema Uhp es inducible por azúcares fosforilados de 3 a 7 carbonos y aminoazúcares. Su inducción se debe a fuentes exógenas y no a los azúcares fosforilados internos del metabolismo intermediario celular, el sistema de inducción es de carácter vectorial. Se han descrito, al menos, cuatro polipéptidos Uhp (A, B, C y T) (Kadner et al., 1987). Un sistema parecido al Uhp de *E. coli* se ha descrito en *Streptococcus lactis* (Maloney et al., 1984).

Los estudios realizados sobre el mecanismo y la regulación del transporte del fosfato en diversas especies de bacterias como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Streptococcus faecalis*, *Micrococcus lysodeikticus* y *Bacillus cereus* concluyen que la captación de este anión es dependiente de la energía metabólica, observándose una reducción de la tasa de transporte al disminuir la energía celular. El mecanismo exacto no es conocido, si bien, existe una relación inversa entre la tasa de glucólisis y la concentración de fosfato citoplásmico, por lo que las disponibilidades de fosfato constituyen un mecanismo primario para el control de la glucólisis. Una excepción a este mecanismo general parece constituirlo *Streptococcus pyogenes*, donde el transporte de Pi parece inhibirse por la presencia de glucosa (Reizer & Saier, 1987)

La existencia de dos sistemas distintos para el transporte de un mismo metabolito como el Pi, uno de baja afinidad y otro de alta afinidad, no es exclusivo de las bacterias. *Neurospora crassa* y *S.*

INTRODUCCION

cerevisiae poseen también dos sistemas similares. En ambos microorganismos el sistema de transporte de alta afinidad es coregulado por el regulón *pho*, mientras que el sistema de baja afinidad es de carácter constitutivo (Tamai *et al.*, 1985). El sistema de transporte de alta afinidad en *Candida tropicalis* y *S. cerevisiae* presenta un constituyente en la pared celular cerca de la superficie externa. Este componente actúa como una proteína de unión al fosfato (Jeanjean *et al.*, 1984, 1986). También la levadura marina *Rhodotorula rubra* presenta dos sistemas de transporte de Pi con distinta afinidad según los niveles de Pi presentes en el medio (Robertson & Button, 1979).

Junto a la aparición de sistemas específicos de transporte con alta afinidad para el Pi y moléculas fosforiladas, la asimilación del Pi en condiciones de limitación del mismo se ve favorecida por la aparición de nuevas proteínas de membrana externa que facilitan su paso a través de las envueltas celulares de las bacterias donde se han descrito. Estas proteínas de membrana externa, conocidas como porinas, forman canales transmembrana que permiten el paso de pequeños solutos hidrofílicos por difusión (Nikaido & Vaara, 1985).

La aparición de nuevas porinas en condiciones de limitación de Pi ha sido descrita en *E. coli* (proteína PhoE) (Korteland *et al.*, 1982), *Pseudomonas aeruginosa* (proteína P) (Hancock *et al.*, 1982), *Salmonella typhimurium* (Bauer *et al.*, 1985) y otros miembros de las familias *Enterobacteriaceae* y *Pseudomonadaceae* (Poole & Hancock, 1986). La aparición de estas nuevas proteínas de membrana se halla bajo el control del metabolismo general del fósforo.

2.3 El fósforo en la célula

El fósforo representa el 0,5-1% del peso seco del micelio de un hongo (Rosenberg & Cohen, 1983) y el 1-3% del peso seco de una bacteria (Beck & Munns, 1984). El fósforo bacteriano se distribuye entre un 30-50% en el ARN, 2-10% en el ADN, 5-15% en fosfolípidos y el resto en Pi libre o polimerizado y en compuestos solubles del citoplasma (Alexander, 1977). La presencia de Pi polimerizado puede aumentar grandemente la proporción de esta última fracción.

Todo este fósforo se encuentra como fosfato libre o esterificado a través de un grupo hidroxilo a una cadena carbonada (C-O-P) como éster fosfato o bien unido a otro fosfato por un enlace pirofosfato como en los nucleósidos di y trifosfato, pirofosfato y polifosfatos. Los compuestos donde el fosfato se encuentra unido de forma distinta (enlace N-P del carbamifosfato o enlace C-P de los fosfonatos) están presentes en muy pequeñas cantidades.

El enlace éster fosfato asociado a grupos carboxi o enol y especialmente en forma de enlace pirofosfato posee una elevada energía libre de hidrólisis y es bastante estable bajo condiciones biológicas de pH y temperatura. La importancia de estos enlaces éster fosfato y pirofosfato ricos en energía, ya ha sido comentada anteriormente junto a sus características energéticas. Baste con recordar en este momento que estos enlaces se han constituido en el proceso evolutivo como la moneda energética más común y que su presencia, en una forma u otra, es continua a través de todas las vías metabólicas de la célula.

Hay un segundo papel del fósforo, que contrasta con el anterior, basado en la relativa estabilidad del estado diéster (cuando hay dos cadenas carbonadas unidas a dos de los hidroxilos de una molécula de fosfato). En este estado, el fosfato forma un grupo puente que conecta dos unidades y apoya la creación de estructuras macromoleculares. En esta situación, su tercer grupo

INTRODUCCION

hidroxilo permanece libre, ionizable, hidrofílico y moderadamente ácido (pKa 5).

Los compuestos celulares con fósforo pueden incluirse en 5 grupos: ADN, ARN, fosfolípidos, ésteres fosfato simples y fosfato libre (Pi) o polimerizado.

El papel del fósforo en el ADN y ARN es formar un puente estructural entre los desoxiribonucleótidos y ribonucleótidos, aprovechando las propiedades del enlace fosfodiéster. Una excepción es el fosfato terminal de los ARNt, el cual presenta una función de transferencia de energía en el transporte y activación de los aminoácidos.

Los fosfolípidos contienen al fosfato en estado diéster. El elemento alcohol, esterificado al fosfato, define las grandes familias de fosfolípidos: fosfatidilcolina, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol, fosfatidilinositol y fosfatidilserina. El difosfatidilglicerol es un derivado más complejo. Cada uno de ellos genera una serie completa de compuestos muy diversos dependiendo de los ácidos grasos que se le unen. Así mismo, la escisión de los fosfolípidos por acción de las diversas fosfolipasas genera toda una gran variedad de compuestos durante el catabolismo de los fosfolípidos. Los fosfolípidos constituyen la base estructural de las membranas celulares. La presencia en su molécula de una zona hidrófoba (ácidos grasos) y otra hidrofílica (grupo alcohol y fosfato) les permite por sí mismos formar estructuras estables de membrana.

Junto a los fosfolípidos de membrana, las bacterias presentan otros derivados fosforilados en sus paredes celulares: los polímeros de ribitol y glicerol fosfato que constituyen los ácidos teicoicos de la matriz de la pared Gram-positiva, los azúcares fosforilados presentes en el lípido A y la cadena polisacáridica del

INTRODUCCION

lipopolisacárido presente en la pared Gram-negativa. En estos casos, de nuevo el enlace fosfodiéster apoya la construcción de complejas estructuras macromoleculares.

Los ésteres fosfato simples en su conjunto representan gran parte de la maquinaria metabólica celular. Podemos identificar más de 50 ésteres individuales. En un listado, que no pretende ser completo, podemos citar los 4 nucleósidos mono, di y trifosforilados, al menos 8 nucleotidindifosfoazúcares y compuestos relacionados, unas 12 pentosas, hexosas y heptosas mono y difosfato, unos seis poliolfosfatos, 4 triosas fosfato, el fosfoenolpiruvato, el gliceraldehído-3-fosfato, el 6-fosfogluconato, etc. Todos estos compuestos forman las vías metabólicas centrales implicadas en el metabolismo de los carbohidratos y en la transferencia de energía.

El metabolismo de los carbohidratos es esencialmente común considerando diferencias en los enzimas individuales o en vías secundarias del mismo. Igualmente la tasa de carga energética que expresa la relación ATP/ADP/AMP es un parámetro común que puede definir el metabolismo energético celular. El hecho de que los mismos ésteres fosfato se encuentren en células procariotas y eucariotas refleja presumiblemente un temprano desarrollo evolutivo de las funciones de estas sustancias.

El gliceraldehído-3-fosfato (G3P) es un éster fosfato simple de gran importancia como intermediario metabólico de la glucólisis y la gluconeogénesis, por acción de la gliceraldehídefosfato-deshidrogenasa incorpora el fosfato inorgánico a su molécula. El metabolismo de su derivado reducido, el glicerol-3-fosfato del que puede derivar, se halla en *E. coli*, bajo el control del regulón *glp*, con varios operones que son regulados negativamente por un represor común producto del gen *glpR* (Larson, 1987). El inductor es el propio glicerol-3-fosfato que inactiva al represor. El regulón codifica para un transportador de glicerol-3-fosfato (*glpT*), para un facilitador de difusión del glicerol (*glpF*), una gliceroquinasa

INTRODUCCION

citoplasmática (*glpK*), una fosfodiesterasa periplásmica que rinde glicerol-3-fosfato a partir de glicerofosfodiéster (*glpQ*), una glicerol-3-fosfato deshidrogenasa aeróbica (*glpD*) y otra anaeróbica (*glpABC*). En ausencia de glicerol-3-fosfato exógeno, el glicerol-3-fosfato requerido para la síntesis de fosfolípidos se deriva de la dihidroxiacetonafosfato interna por acción de la glicerol-3-fosfato sintetasa (*gpsA*). Los genes del operón *Ugp*, implicados en la asimilación del glicerol-3-fosfato, no responden al control del regulón *glp*, estando bajo control del metabolismo global del fósforo. El glicerol-3-fosfato puede servir como fuente de C y energía para muchos microorganismos, así como de fuente alternativa de fósforo.

El Pi es la fracción más simple y variable en proporción, cantidad y forma de presentación, dada su capacidad de polimerizarse. Destaca que el Pi como tal se requiere para el mantenimiento del metabolismo celular, aunque la variación en su cantidad sugiere que mucho del Pi presente en la célula no es requerido en el metabolismo y actúa como simple reserva. Las formas polimerizadas de fosfato inorgánico requieren un comentario más amplio.

Los polifosfatos se definen como polímeros lineales de ortofosfato unidos por enlaces fosfoanhídricos ricos en energía (el valor de ΔG° es -9 Kcal/mol). El número de residuos de ortofosfato presentes en ellos es muy variable, desde 2 en la forma más simple (pirofosfato) hasta varios cientos o miles en los polifosfatos de alto peso molecular. Su presencia se encuentra descrita en un gran número de microorganismos, siendo su metabolismo y función en la célula objeto de amplias revisiones (Harold, 1966; Dawes & Senior, 1973 y Kulaev & Vagabov, 1983).

Los estudios iniciales del metabolismo de los polifosfatos incidieron sobre el hecho destacado de la gran variación en el contenido de polifosfatos que se podía dar en la célula. Así, se

INTRODUCCION

describieron dos fenómenos típicos de acumulación de polifosfatos: la acumulación en ausencia de crecimiento celular como consecuencia de condiciones desfavorables para este y la acumulación en células en división como proceso normal del metabolismo. La acumulación de polifosfato puede suponer hasta el 20% del peso seco celular. Sin embargo, los polifosfatos se demostraron no esenciales para la vida de los microorganismos que los acumulaban como indicaba la existencia de mutantes no acumuladores. En general, los polifosfatos aparecían en bajo contenido durante las etapas de rápido crecimiento celular e incrementaban su contenido bajo condiciones adversas para el crecimiento (Harold, 1966).

La capacidad de algunos microorganismos para acumular grandes cantidades de fósforo, en condiciones no balanceadas de crecimiento, puede ayudar a resolver el problema de la purificación de aguas residuales e industriales, con altos contenidos en fósforo, a través del desarrollo de la biotecnología adecuada. De hecho, se ha demostrado la eliminación activa de fosfato en fangos activados con ciclos aerobio/anaerobio por acción de poblaciones bacterianas capaces de acumular polifosfatos (Timmerman, 1984; Halvorson et al., 1987).

Posteriormente se inició el estudio de los procesos implicados en la biosíntesis y degradación de los polifosfatos, encontrándose que los enzimas implicados en su dinámica celular pertenecían a los grupos de las transferasas y de las hidrolasas. El primer enzima identificado fue la polifosfato-ADP-fosfattransferasa (polifosfato quinasa) que cataliza el proceso siguiente:



El descubrimiento de este enzima impulsó la hipótesis de que los polifosfatos podían actuar como fosfógenos bacterianos. Los resultados experimentales no apoyan esta hipótesis aunque no se excluye la posibilidad de que los polifosfatos puedan jugar un cierto papel como fuente de ATP en condiciones concretas. La polifosfato quinasa actúa básicamente en el sentido de síntesis de polifosfatos.

INTRODUCCION

Otro enzima implicado en la biosíntesis de polifosfatos es la 1,3-difosfoglicerato-polifosfato-fosfotransferasa. Estas transferasas sintetizadoras de polifosfatos han sido descritas en bacterias y levaduras (Rao *et al.*, 1987; Kulaev *et al.*, 1987).

En la degradación de los polifosfatos puede estar implicadas numerosas actividades fosfotransferasas (quinasas específicas) y polifosfatasas (hidrolasas inespecíficas). Entre las quinasas se han descrito la polifosfato-AMP-fosfotransferasa, la polifosfato-glucoquinasa, la polifosfato-fructoquinasa y la polifosfato-NAD-fosfotransferasa (Kulaev & Vagabov, 1983). Las polifosfatasas son hidrolasas inespecíficas capaces de actuar sobre el fósforo terminal de largas cadenas o produciendo fragmentos menores a partir de éstas.

El metabolismo de los polifosfatos es similar en todas las levaduras y hongos estudiados. Las fracciones más polimerizadas se relacionan con el control de los niveles de ATP, ADP, PPi y Pi, en el control de la glucólisis y el flujo intracelular de iones y con la síntesis de ácidos nucleicos (Kulaev & Vagabov, 1983). Las fracciones menos polimerizadas localizadas en la periferia celular se ligan al transporte de azúcares (Van Steveninck *et al.*, 1987) y en procesos de síntesis de compuestos de la pared celular (Kulaev *et al.*, 1987).

El metabolismo de los polifosfatos en bacterias está ligado al control del nivel de ortofosfato celular y al metabolismo de los ácidos nucleicos a partir de fracciones específicas de polifosfatos y del PPi formado durante la biosíntesis de los mismos.

En el control de la concentración intracelular de Pi los microorganismos poseen dos grandes trampas metabólicas: los polifosfatos que retienen el Pi por enlaces fosfoanhídros y por polímeros complejos de fósforo con cationes divalentes y aminoácidos básicos. Según especies concretas, cada una de estas posibilidades puede ser usada. De igual modo, las cantidades y fracciones de polifosfatos y su importancia en el metabolismo

INTRODUCCION

celular varían según cada especie, dependiendo grandemente de los factores ecológicos (Kulaev & Vagabov, 1983).

En general los polifosfatos actúan como reguladores de las concentraciones intracelulares de importantes metabolitos como los adenín nucleótidos, el P_{Pi} y particularmente el ortofosfato. Además representan un valioso *pool* de fosfato activado, el cual puede ser usado en varios procesos metabólicos como el metabolismo glucídico y de ácidos nucleicos. Las trampas metabólicas que captan el fosfato son imprescindibles en los microorganismos que dependen totalmente de las condiciones del medio para su supervivencia. El contenido en fósforo de los medios naturales suele ser bajo, dada la escasa solubilidad de los fosfatos de calcio, fuente inorgánica más usual. La presencia de polifosfatos permite al microorganismo depender menos de las condiciones externas y poder iniciar en un momento dado su crecimiento y división sin necesidad de un largo periodo *lag*, al encontrar una fuente de carbono y energía favorable y concentraciones intracelulares de fósforo adecuadas para el crecimiento.

Por otra parte, la estructura de los polifosfatos evita problemas osmóticos internos. Todo ello presenta a la acumulación de Pi en polifosfatos, como un primitivo mecanismo de homeostasis celular que permite solventar, bajo ciertas condiciones, las deficiencias de fósforo. Los polifosfatos aparecen, de este modo, como una fase más del ciclo celular de este elemento y no como un mero almacén final (Harold, 1966). Así, una forma cíclica de pirofosfato descrita en metanógenos, el 2,3 ciclopirofosfoglicerato, actúa como intermediario celular implicado en la regulación de su metabolismo. Este compuesto es una de las formas más originales de acumular fosfato dentro del mundo microbiano (Roberts *et al.*, 1987). Esta originalidad no es nueva dentro de las bacterias metanógenas y de las arqueobacterias en general.

La revelación del papel multifuncional de los polifosfatos en el metabolismo del fósforo ha impulsado nuevos estudios. El papel

INTRODUCCION

de los polifosfatos y del pirofosfato en el metabolismo energético celular ha sido estudiado con interés en diversas especies. Está bien establecido el uso de los polifosfatos y del pirofosfato como fuente de energía metabólica en diferentes especies de *Propionibacterium* (Wood & Goss, 1985; Wood *et al.*, 1987), *Clostridium* (Cruden *et al.*, 1983), *Acinetobacter* (Van Groenestijn *et al.*, 1987) y *Entamoeba histolytica* (Reeves, 1987). Por otra parte, se conoce que el PPi se sintetiza acoplado con el transporte fotosintético de electrones en *Rhodospirillum rubrum* (Baltscheffsky & Nyren, 1987).

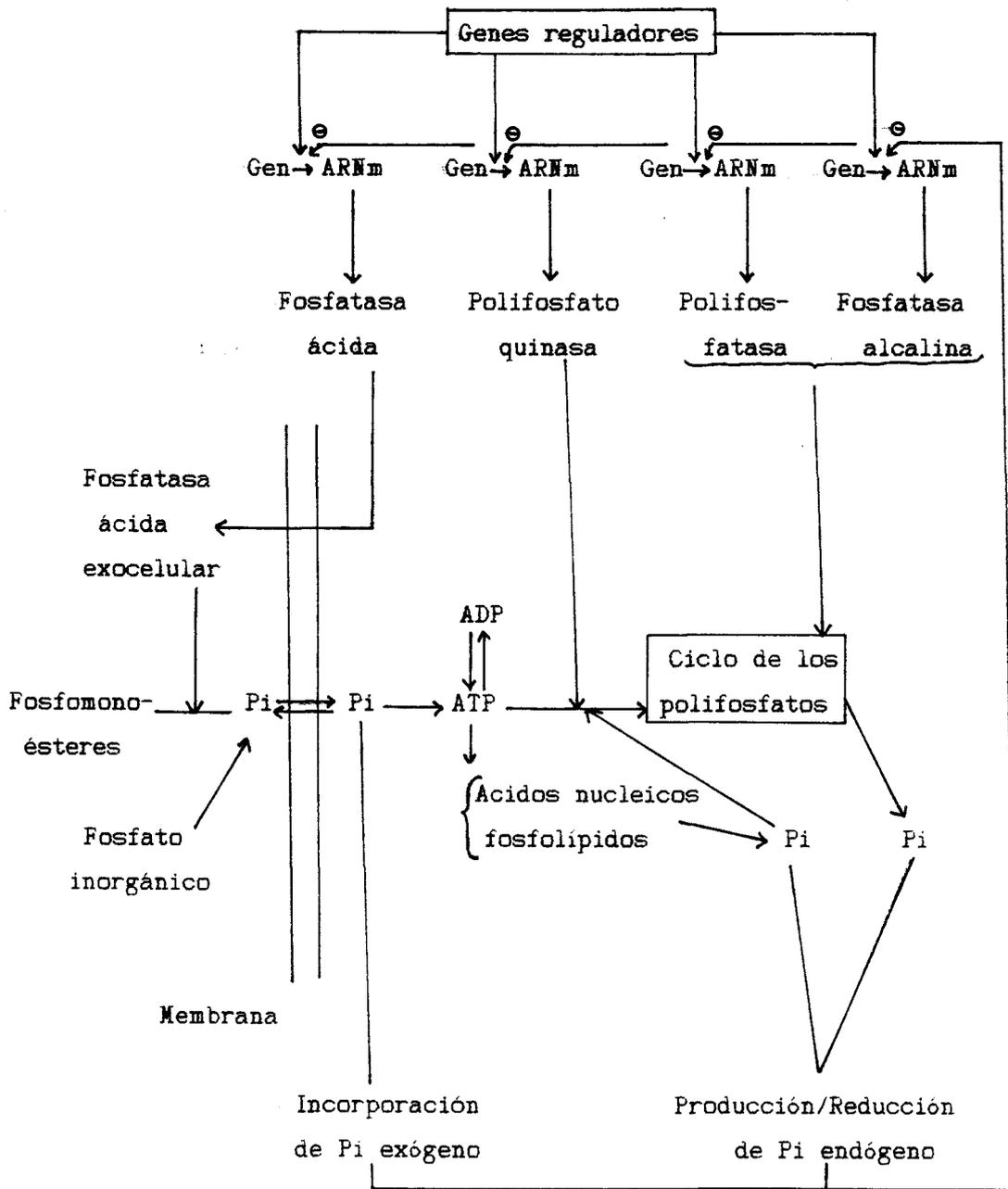
Todos los datos relacionados con la implicación del PPi y los polifosfatos en reacciones donde sustituyen al ATP como fuente de energía, tienen una conexión final con la evolución del metabolismo energético y del fósforo. Se acepta que los polifosfatos sintetizados por procesos inorgánicos en la tierra primitiva, pudieron ser los componentes mayoritarios de los sistemas energéticos de los primeros organismos vivos. Al aumentar la importancia de los procesos energéticos unidos a membrana, el papel bioenergético de estos compuestos dejó paso a nuevas moléculas más complejas que exigen sistemas de regulación más complejos. Así, en organismos superiores los polifosfatos y el pirofosfato son muy escasos o están ausentes junto con los enzimas de su metabolismo. Sin embargo, en el mundo microbiano, estas moléculas mantienen aún un cierto papel en los procesos de fosforilación y han tomado otras funciones en procesos de regulación y homeostasis celular, funciones que fueron asumidas por otros metabolitos más complejos en los organismos superiores.

El estudio de las vías metabólicas de un compuesto particular suele realizarse tras suplir dicho compuesto en forma radiactiva, en experiencias de pulsos de marcaje. De forma muy general, se aprecia que la incorporación del Pi se realiza inicialmente y a tasas mucho mayores en las fracciones más lábiles de fosfoésteres (nucleótidos y

INTRODUCCION

fosfoazúcares). La incorporación posterior se realiza al ARN y fosfolípidos, incorporándose posteriormente al ADN (Bielecki, 1968).

El modelo de esquema 1 representa un intento de esquematizar el metabolismo integral del fósforo y de los enzimas implicados en su movilización celular dentro de *S. cerevisiae*, el microorganismo donde la dinámica del fósforo, quizás, sea mejor conocida. Este metabolismo implica a cinco enzimas principales en su adquisición e integración metabólica: una fosfatasa ácida exocelular, una fosfato permeasa, una polifosfato quinasa, una fosfatasa alcalina y una polifosfatasa vacuolar. Estas enzimas regulan la concentración intracelular de Pi por una vía cíclica de síntesis y degradación de polifosfatos, siendo este ciclo de gran importancia en la homeostasis global de la célula. En condiciones no limitantes de Pi, los enzimas alteran los niveles de polifosfatos según los requerimientos celulares, equilibrando los niveles de Pi, ADP y ATP. En ausencia de fosfato se activan dos fuentes precursoras de Pi: una interna por degradación de las reservas de polifosfatos, gracias a la acción de la fosfatasa alcalina y la polifosfatasa, y otra externa por acción de la fosfatasa ácida exocelular que incorpora fosfato de sustratos externos a la célula (Bostian et al., 1983).



Esquema 1. Modelo del metabolismo del fósforo y de los enzimas implicados en su movilización celular en *Saccharomyces cerevisiae* (según Bostian et al., 1983).

INTRODUCCION

La compartimentación de las cinco fracciones del fósforo celular difiere según consideremos a los microorganismos eucariotas (levaduras y hongos micelares) o procariotas.

En eucariotas el ADN se localiza mayoritariamente en el núcleo, con una fracción menor en sus mitocondrias. El ARN en sus distintas formas se sitúa en los dos compartimentos principales de la célula: núcleo y citoplasma. Los fosfolípidos se distribuyen en todo el conjunto de membranas celulares. La situación citoplasmática de los ésteres fosfato simples es muy diversa según sus diferentes papeles. Esta situación es lógica dada su presencia en muchas vías metabólicas. De hecho una misma especie se presenta en la vía anabólica y catabólica que pueden situarse en puntos distintos de la célula.

El Pi mantiene, en levaduras, dos compartimentos bien diferenciados según su papel en el metabolismo: la fracción requerida para la síntesis de los ésteres fosfato (fracción metabólica, 5-15%) que se sitúa en el citoplasma, mientras que la fracción no metabólica (85-95%) se localiza en forma de polifosfatos de reserva en las vacuolas. El Pi es almacenado en las vacuolas por sistemas de transporte específicos del tonoplasto. Las vacuolas acumulan el Pi como polifosfatos junto a otros iones como Na^+ , K^+ , Mg^{+2} , Mn^{+2} y Ca^{+2} , además de algunos aminoácidos básicos como la arginina, lisina y ornitina (Okorokov et al., 1980). Las vacuolas actúan regulando la concentración en el citoplasma de estos iones. La capacidad de estos iones para cambiar las actividades de numerosos enzimas conlleva que las concentraciones intracelulares de estos pueden servir como eficientes mecanismos de regulación metabólica. Los cambios en el contenido iónico celular ocurren a expensas de la fracción vacuolar no metabólica y no por cambios de la fracción citosólica, lo que permite mantener relativamente estable el ambiente citoplasmático (Lichko et al., 1982). Los polifosfatos pueden localizarse también en la pared celular de las levaduras,

INTRODUCCION

ligados a procesos de transporte y síntesis de componentes de la misma (Kulaev & Vagabov, 1983).

En procariotas el ADN se identifica con el cromosoma bacteriano. El ARN, en sus diversas formas, se puede hallar distribuido por todo el citoplasma, especialmente en los ribosomas. Los fosfolípidos se sitúan en las envueltas celulares: pared y membrana celular. Los ésteres de fosfato simples también los podemos encontrar en todo el citoplasma, con unas características similares a las comentadas para las células eucariotas. El Pi y el P_{PPi} pueden situarse en todos los puntos donde su presencia sea requerida por la maquinaria metabólica. Los polifosfatos pueden presentarse en grandes cantidades agrupados en cuerpos de inclusión próximos al nucleoplasma o en asociaciones más dispersas sobre fibrillas del ADN o en la periferia celular asociados a otras inclusiones citoplasmáticas (Allen, 1984; Harold, 1966).

Globalmente el comportamiento del fósforo en la célula se mueve en una línea que podríamos calificar de conservativa. Este hecho es justificado por la importancia de este elemento en tres procesos básicos de la vida: autorreproducción (ADN), mantenimiento de la propia integridad ante el medio (fosfolípidos) y mantenimiento del propio orden interno frente al omnipresente segundo principio de termodinámica (ésteres fosfato simple).

2.4 Respuestas fisiológicas a la limitación de fosfato

Las condiciones de limitación de fosfato son comunes en los ecosistemas naturales. El fosfato es un factor limitante del crecimiento de muchos microorganismos debido a que sus fuentes naturales de nutrientes lo presentan en forma de sales insolubles.

Si aceptamos que estas condiciones de limitación son importantes en el medio natural, entonces debemos esperar que se haya producido, en el curso evolutivo, una fuerte presión de selección hacia organismos con mecanismos que les permitan acomodarse a estas condiciones. El principal objetivo de estos mecanismos debe dirigirse a conseguir un crecimiento lo más rápido posible en un medio con nutrientes muy limitados. Estos mecanismos pueden incluir tres tipos de respuestas: i) aumentar la tasa de transporte del nutriente, sintetizando más transportadores y/o nuevos transportadores de mayor afinidad, ii) aumentar la tasa metabólica del nutriente intracelular por remoción de sus reservas y extracelular por la aparición de nuevas proteínas con mayor afinidad por él, iii) cambios en la composición química celular por reordenación de los flujos del metabolito limitante, permitiendo un aprovechamiento más estricto del mismo (Harder & Dijkhuizen, 1983).

Dentro de la primera estrategia cabe incluir la aparición de sistemas de transporte específicos del Pi y otras moléculas fosforiladas, comentados anteriormente.

Ejemplos del segundo punto lo constituyen la movilización de las reservas internas de fosfato, la aparición de todo un conjunto de nuevas proteínas que permiten un mejor aprovechamiento de fuentes menores de fosfato y el incremento de la degradación de ciertas proteínas ribosómicas inestables por la falta de Pi (John & Goldberg, 1980). Todo ello revela una profunda reordenación molecular como respuesta a la limitación, incrementando la resistencia celular al medio limitante (Groat *et al.*, 1986).

INTRODUCCION

Los cambios de composición en las envueltas celulares son una respuesta del tercer tipo. Así, el crecimiento en medios limitados de Pi provoca la aparición de ácidos teicurónicos en *Bacillus subtilis* (Lang et al., 1982) y lípidos acídicos en *Pseudomonas fluorescens* (Dorrer & Teuber, 1977). Estos compuestos sustituyen a los ácidos teicoicos y fosfolípidos, respectivamente, reduciendo considerablemente los requerimientos de fósforo.

En realidad no es fácil separar estas respuestas entre sí, dado que la limitación de fosfato provoca muchos cambios en la fisiología celular, cambios que, por acuerdo, han sido denominados respuesta al fosfato. Así, en *E. coli* la limitación de Pi afecta a la síntesis del lipopolisacárido rico en fósforo, este se hace más corto a la vez que contiene menor carga negativa debida al fosfato. De este modo, las fuentes de Pi del medio encuentran menos impedimentos estéricos en su aproximación a la porina PhoE (Korteland & Lugtenberg, 1984).

Junto a las respuestas fisiológicas a la limitación de este nutriente, caben mencionar los efectos de su deficiencia y su acción sobre el metabolismo secundario. Los efectos de su deficiencia han sido ampliamente estudiados en las cianobacterias. El crecimiento de estos microorganismos en medios limitados en fósforo provoca una disminución de los niveles de reservas de fosfato y del contenido celular de ácidos nucleicos, proteínas y clorofila a. En el metabolismo se aprecia un descenso en la tasa de fotosíntesis y un aumento de la tasa de asimilación de Pi. También se producen variaciones morfológicas como la desaparición de las inclusiones de polifosfatos y las vacuolas de gas; los tilacoides sufren un proceso de expansión (Healey, 1982).

El fosfato es un nutriente esencial en la producción de muchos metabolitos secundarios (alcaloides, giberelinas y antibióticos). En general, las altas concentraciones de fosfato inorgánico impiden la síntesis de numerosos antibióticos, probablemente por inhibición de

INTRODUCCION

fosfatasas específicas para la síntesis de la forma activa del mismo o por la estimulación del metabolismo primario que a su vez impide la puesta en marcha de los procesos secundarios del metabolismo (Martin & Demain, 1980).

El fosfato puede afectar a la producción de las fosfatasas. Estas enzimas permiten el uso de fuentes orgánicas de fósforo presentes en el medio que rodea a la célula. Su localización extracelular o en las envoltas celulares les permite actuar sobre sustratos que no tienen fácil entrada a la célula y es acorde con su papel en la estrategia de captación de fuentes alternativas de fósforo.

El control por parte del P_i de la producción de metabolitos secundarios como los antibióticos y de enzimas adaptativos como las fosfatasas, que aseguran fuentes alternativas de un nutriente esencial, son hechos que podrían tener una cierta importancia en la supervivencia microbiana frente a la presión de selección ejercida por los procesos de competencia establecidos entre los microorganismos del suelo.

3. EL REGULON *PHO*

Las propiedades de cualquier célula bacteriana están determinadas en última instancia por las características de su genomio. Este porta toda la información necesaria para que un organismo se constituya en una unidad funcional y estructural y también le proporciona su potencial de respuestas a los cambios del medio. Los microorganismos tienen una capacidad limitada de controlar su medio, por ello, ante cambios de él, responden con cambios propios.

Obviamente, los cambios en la fisiología celular provocados por la escasez de P_i tienen una base genética. Para enfrentarse a la limitación de fosfato, bacterias como *E. coli* han desarrollado un complejo sistema regulador que les permite la asimilación del fósforo con gran eficacia. Este sistema se conoce como regulón *pho*. Nuestras expectativas de encontrar microorganismos adaptados a la limitación de fósforo no quedan defraudadas.

La comprensión del control molecular del sistema de genes regulados por el fosfato depende del análisis de mutantes y de las herramientas genéticas disponibles para su manipulación y estudio. Dentro del mundo bacteriano, es en *E. coli* donde más se ha trabajado sobre la regulación de estos genes. El estudio de las interacciones reguladoras, dentro del sistema de genes del fosfato (regulón *pho*) de *E. coli*, ha puesto de manifiesto que puede ser importante para la célula mantener un balance o equilibrio del fosfato, similar al balance de C, N y energía. Tal balance podría estar relacionado con el metabolismo energético, dado el importante papel biológico de los enlaces fosfato ricos en energía. Este concepto de equilibrio está también apoyado por la forma de regulación de los genes dentro del regulón del fosfato (Wanner, 1987a).

INTRODUCCION

Hasta hace pocos años *E. coli* había acaparado todos los estudios en relación al regulón *pho*. La riqueza y complejidad de los resultados obtenidos en el colibacilo, han animado el inicio de estudios similares en otras bacterias. Este nuevo impulso permitirá conocer los mecanismos de regulación de estas y contemplar en qué medida los resultados obtenidos en el colibacilo son generalizables a otros microorganismos. Sin embargo, hasta el momento es comparativamente escasa la información que se posee sobre otras bacterias Gram positivas y negativas.

Situación similar se presenta dentro de los microorganismos eucarióticos, donde *S. cerevisiae* acapara los estudios, siendo en esta levadura donde mejor está estudiado el metabolismo del fósforo y su regulación (Halvorson & Nakata, 1987).

Escherichia coli

Bajo condiciones de suficiencia de P_i , esta molécula difunde a través de las porinas Omp C y Omp F de su membrana externa, siendo reconocida por el sistema de transporte del fosfato inorgánico (Pit), el cual se encarga de su transporte hasta el citoplasma. En estas condiciones el colibacilo puede incluso almacenar fósforo en forma de gránulos de polifosfato.

En condiciones de limitación de P_i , *E. coli* ha desarrollado un sistema de emergencia. Este sistema se conoce como regulón *pho*, que consta de un gran número de genes. Aparentemente este es el precio que *E. coli* paga por su capacidad de recoger trazas de fuentes útiles de fósforo de su medio circundante.

Los genes del regulón *pho* están dispersos en su cromosoma y sus productos se pueden encontrar en todos los compartimentos celulares. En las condiciones de limitación de P_i , varias proteínas juegan un importante papel en su asimilación.

INTRODUCCION

El Pi y otros solutos fosforilados son reconocidos por la porina Pho E de la membrana externa, que facilita su difusión hacia el periplasma con una eficacia 6-8 veces mayor que las porinas Omp C y Omp F. El Pi es ligado a una proteína de unión periplásmica y transportado a través de la membrana celular por un sistema específico (Pst). La asimilación de bajas concentraciones de glicerol-3-fosfato es mediada por una proteína de unión específica y por un transportador de membrana de alta afinidad para este sustrato (Ugp). La presencia de la porina Pho E facilita el paso de polifosfatos lineales a través de la membrana externa. La fosfatasa alcalina periplásmica despolimeriza esta fuente de fósforo, produciendo Pi que es transportado por el sistema Pst.

La síntesis inducida de fosfatasa alcalina de *E. coli* es un ejemplo clásico de expresión génica regulada fisiológicamente. La tasa de síntesis en condiciones de limitación de fosfato aumenta más de 1000 veces, llegando a suponer hasta el 6% del total de proteína sintetizada por la célula.

El fósforo de moléculas como el 5'-AMP, 3'-AMP y AMPc es hidrolizado por una nucleotidasa y una 2',3'-fosfodiesterasa antes de su transporte por el sistema Pst.

Todos estos sistemas de asimilación inducidos por la falta de Pi tienen en común la necesidad de expresión del gen regulador *phoB* (Gottesman, 1984). El fósforo es un elemento esencial para la célula, este hecho queda reflejado en que el sistema regulador *pho* está compuesto por más de 20 promotores regulados por el Pi, 10 genes reguladores y 2 sistemas de transporte para el Pi. Un modelo de regulación del regulón *pho* se presenta en el esquema 2.

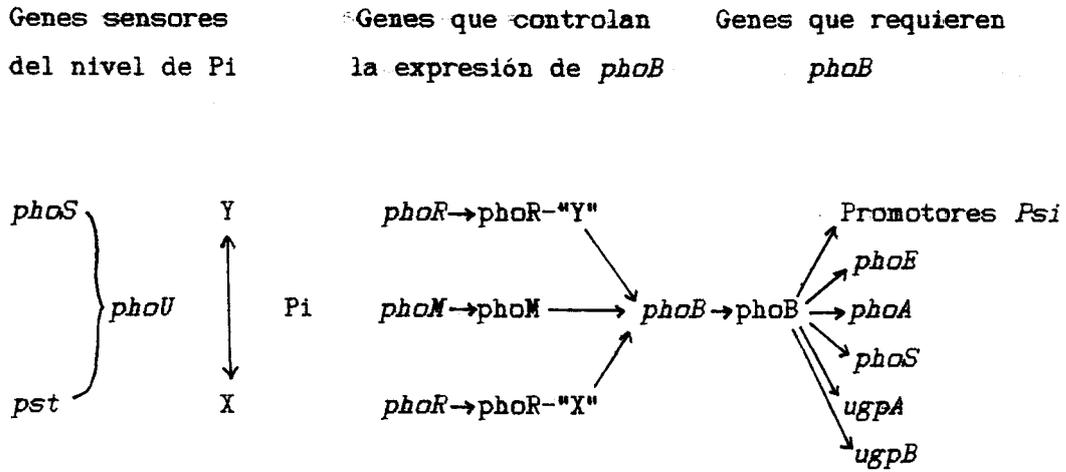
La regulación es extremadamente compleja e implica al menos a 4 genes: *phoB*, *phoR*, *phoU* y *phoM* (Wanner & Chang, 1987; Wanner, 1987b; Wanner *et al.*, 1988; Surin *et al.*, 1986). Los genes del regulón *pho* pueden ser caracterizados por tres hechos: i) la expresión de varios genes *pho* o *psi* es inducible por limitación de Pi, aunque

INTRODUCCION

también son inducidos por otras condiciones fisiológicas desfavorables; ii) algunas proteínas de genes *pho* están implicadas en el transporte de P_i o de compuestos fosforilados (Pst, Pit, UgpA, UgpB, PhoE, PhoA); iii) otros genes tienen papeles reguladores muy diversos según condiciones concretas que afectan a sus promotores (*phoB*, *phoR*, *phoU*, *phoM*, *phoF*, *phoG*, *phoH*, *hima*, *cya*, *crp*, *lon*).

Es importante destacar que existen genes regulados por la concentración de P_i no dependientes de *phoB*. Así, la aminopeptidasa N, tres polifosfatasa de la cara externa de la membrana celular y una fosfatasa ácida de pH óptimo 2,5 son proteínas inducibles por la escasez de P_i que no requieren la expresión de *phoB*. Por otra parte, se reconoce que diversos promotores regulados por el fosfato son también altamente inducibles por otros agentes (promotores *psi*). Estos promotores no son inducidos por la falta de S y su función es aún desconocida; podrían reflejar una respuesta secundaria a la limitación de fósforo (Lugtenberg, 1987).

El regulón *pho* se compone de varios promotores regulados coordinadamente, aunque la regulación individual difiere. Esto sugiere que genes relacionados pueden reunirse en regulones más que en operones, para permitir así un control independiente de su expresión. De este modo, los promotores individuales pueden ser regulados por controles separados y solapados. Estos sistemas de control general pueden afectar simultáneamente a su propio sistema y a otros sistemas, imbricándose varias redes de control general en la regulación del crecimiento y división celular (Wanner, 1987c).



Esquema 2. Esquema de regulación del regulón *pho* en *Escherichia coli* (según Rao et al., 1986).

Salmonella typhimurium

El control del metabolismo del fosfato en esta y otras enterobacterias es aún poco conocido. Los estudios iniciales permitieron conocer que las especies de *Salmonella* no presentan normalmente fosfatasa alcalina, aunque el gen *phoA* de *E. coli* transferido por conjugación es regulado por limitación de Pi en *S. typhimurium*. Si se han detectado dos formas distintas de fosfatasa ácida inespecíficas y tres fosfodiesterasas diferentes, así mismo se conocen y a varios genes reguladores que son afectados de modo diverso por la limitación de Pi. Los resultados iniciales sugieren una gran variedad en los circuitos de control que regulan la respuesta a la limitación de Pi, con diferentes genes respondiendo a esta limitación en momentos diferentes (Foster & Spector, 1986).

Pseudomonas aeruginosa

En *P. aeruginosa* los genes regulados por la limitación de Pi incluyen una porina (proteína P), una fosfatasa alcalina periplásmica, dos hemolisinas y una proteína periplásmica de unión al fosfato, en un proceso de respuesta similar al descrito en *E. coli*. Estos genes estructurales podrían constituir un regulón *pho* similar al descrito en el colibacilo (Pritchard & Vasil, 1986).

Vibrio parahaemolyticus

La limitación de Pi en *V. parahaemolyticus* induce la producción de una proteína de membrana externa, OmpP, que actúa como porina que facilita la entrada de fosfato a la célula. Otras proteínas inducidas son una fosfatasa alcalina, una hemolisina y una fosfolipasa tipo C. Los genes reguladores aislados en esta especie muestran una alta analogía con los de *E. coli*, aunque su organización parece algo diferente (McCarter & Silverman, 1987).

Todos estos genes y sus productos actúan cooperativamente para obtener fuentes alternativas de fosfato en el medio marino donde se desarrolla esta especie. Así, la hemolisina actúa como una

INTRODUCCION

citolisina que provoca la lisis de pequeños organismos marinos. La lisis provoca la liberación del contenido celular. La fosfolipasa C hidroliza los fosfolípidos liberando fosforilcolina, sustrato útil para la fosfatasa. Esta también puede actuar sobre otras moléculas fosforiladas liberadas de las células lisadas.

Bacillus

Tan solo en dos especies del género *Bacillus*, entre las bacterias Gram-positivas, conocemos algo de su regulón *pho*. *B. licheniformis* posee al menos dos genes estructurales distintos para su fosfatasa alcalina: el *APasaI*, dependiente de ARN polimerasa σ^{55} (expresado durante el crecimiento vegetativo) y el *APasaII*, dependiente de ARN polimerasa σ^{37} (expresado durante la esporulación) (Hulett, 1987).

B. subtilis produce, durante su crecimiento vegetativo en condiciones de limitación de Pi, una fosfatasa alcalina y una fosfodiesterasa. Otras dos actividades fosfatasa se producen durante la esporulación. El gen regulador de las actividades inducidas por limitación de Pi, *phoP*, presenta una elevada homología con el gen *phoB* de *E. coli* (Seki et al., 1987).

Saccharomyces cerevisiae

S. cerevisiae posee dos especies de fosfatasa ácida exocelular: una no reprimible por Pi y codificada por *PHO3* y otra si reprimible (rAP) que es codificada por tres genes (*PHO5*, *PHO10*, *PHO11*). También existen dos formas alcalinas: una específica del p-nitrofenilfosfato codificada por *PHO13* y otra inespecífica reprimible por Pi (rALP) codificada por *PHO8*. Así mismo, se han descrito dos sistemas de transporte para el Pi, uno de ellos reprimido por esta misma molécula y codificado por *PHO84* (Lemire et al., 1985).

INTRODUCCION

El esquema propuesto para el regulón *PHO* de *S. cerevisiae* era un modelo de regulación jerárquica que implicaba al menos a 8 genes (Oshima, 1982). La expresión de *PHO3* requiere dos genes adicionales (*PHO6*, *PHO7*). La expresión de la rAP, rALP y del sistema de transporte de Pi implica a seis genes (*PHO2*, *PHO4*, *PHO9*, *PHO80*, *PHO81*, *PHO85*) en respuesta a la señal de limitación de Pi. EL modelo propone que un factor positivo codificado por *PHO4* es indispensable para la transcripción de los genes estructurales. En presencia de Pi, un complejo negativo producto de los genes *PHO80* y *PHO85* impide la acción del factor positivo. En ausencia de Pi, un mediador producto del gen *PHO81* se une al factor negativo y evita su unión al factor positivo. Además, *PHO4* requiere para su acción interaccionar con los productos del gen *PHO2* o de *PHO9*.

Este modelo ha sido modificado al conocerse que *PHO2*, *PHO4* y *PHO80* se transcriben constitutivamente a bajo nivel, y que *PHO85* no codifica para un factor negativo sino para una señal necesaria en la expresión de *PHO80*. La transcripción de *PHO81* está bajo control del Pi a través de *PHO4*, *PHO80* y el propio *PHO81* (Esquema 3). Todo ello indica que el sistema regulador es un circuito cerrado (como el sistema *GAL* de la misma *S. cerevisiae*) y no un sistema jerárquico abierto. En el modelo abierto el Pi interactuaría con el producto de *PHO81*, en el nuevo modelo es posible especular que el Pi inhibe la acción del factor positivo o del mediador o de ambos o incluso estimular al factor negativo (Toshida *et al.*, 1987).

Neurospora crassa

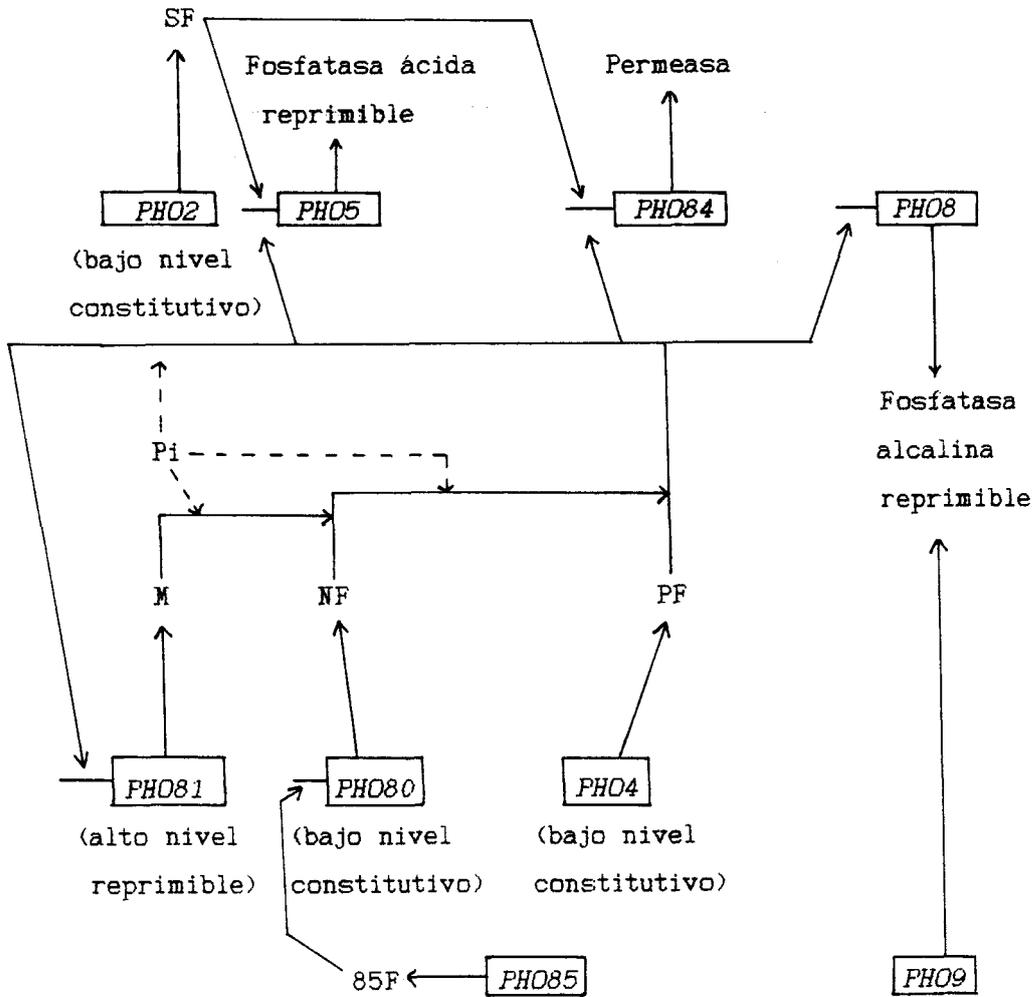
En *N. crassa* la limitación de fósforo provoca la síntesis y secreción al medio de una fosfatasa ácida y otra alcalina, dos nucleasas, una 5'-nucleotidasa, dos ribonucleasas (N_1 y N_2) y tres formas distintas de fosfodiesterasas cíclicas. También se ha descrito un sistema de transporte de alta afinidad para el Pi que es inducible bajo su limitación. Existen además una fosfatasa alcalina

INTRODUCCION

y una fosfodiesterasa constitutivas ligadas a las células (Furukawa et al., 1987). Todo este conjunto de enzimas permite el uso de fuentes orgánicas de fósforo. En concreto, *N.crassa* es capaz de degradar eficientemente el ARN. El ARN puede servir también como fuente alternativa de N. Así, se conoce que la fosfatasa ácida y la ribonucleasa N_4 son desreprimidas tanto por limitación de N como de P, estando bajo el control de ambos sistemas reguladores (Grove & Marzluf, 1980; Lindberg & Drucker, 1984).

Sobre la base de interacciones de epistasia y dominancia de los alelos mutantes de los tres genes implicados en el control del metabolismo del fósforo (*preg⁺*, *nuc-1⁺* y *nuc-2⁺*) se ha propuesto un modelo jerárquico de relación entre ellos. El gen *nuc-1⁺* se requiere para la expresión de los genes estructurales, *preg⁺* antagoniza con la acción de *nuc-1⁺*, *nuc-2⁺* interfiere con la actividad de *preg⁺* y el fosfato o un derivado evita la acción de *nuc-2⁺* (Mann et al., 1988).

INTRODUCCION



Esquema 3. Modelo de regulación del regulon *pho* en *Saccharomyces cerevisiae*. El esquema presenta solo los genes estructurales de las fosfatasas reprimibles (según Toshida *et al.*, 1987).

4. LA RUPTURA DEL ENLACE ESTER FOSFATO

4.1 Introducción

Las fosfatasas se definen como enzimas que catalizan la hidrólisis de ésteres de ácido fosfórico. Las hidrolasas de los anhídridos de ácido fosfórico se conocen como polifosfatasas (E.C. 3.6) y poseen propiedades distintas, si bien, algunas fosfatasas pueden actuar sobre estos anhídridos.

Los fosfomonoésteres y fosfodíesteres son los dos tipos de ésteres fosfóricos presentes en la célula. Estos sustratos son punto de acción de dos tipos distintos de enzimas, las fosfomonoesterasas (E.C. 3.1.3) y las fosfodiesterasas (E.C. 3.1.4). Este criterio de clasificación permite separar en dos grandes grupos a las fosfatasas.

Así mismo, las fosfomonoesterasas pueden dividirse, de acuerdo a su especificidad de sustrato, en fosfomonoesterasas no específicas y fosfomonoesterasas específicas. El primer grupo, a su vez, se divide en fosfomonoesterasas no específicas con pH óptimo alcalino y fosfomonoesterasas no específicas con pH óptimo ácido. Esta última división se realiza de acuerdo con el pH óptimo observado para el enzima, si bien, el comportamiento de estos dos tipos de enzimas es similar en otras propiedades.

Por otra parte, las fosfodiesterasas se agrupan en dos grandes grupos: las que hidrolizan a los ácidos nucleicos y derivados (nucleasas) y las que actúan sobre fosfolípidos y derivados (lipofosfodiesterasas).

La bibliografía usual denomina fosfatasa ácida a la fosfomonoesterasa no específica con pH óptimo ácido (E.C. 3.1.3.1) y fosfatasa alcalina a la fosfomonoesterasa no específica con pH óptimo alcalino (E.C. 3.1.3.2). Estas enzimas son capaces de actuar sobre un amplio número de sustratos, aunque lo hagan con velocidades ampliamente diferenciadas. Esta propiedad contrasta con la elevada

INTRODUCCION

especificidad mostrada por las fosfomonoesterasas específicas (E.C.3.1.3.3, 3.1.3.4, etc.).

La falta de especificidad de las fosfatasa ácida y alcalina sugiere que solo el grupo fosforilado de sus sustratos participa esencialmente en la reacción. Por ello, las consideraciones acerca de los factores que debilitan o rompen el enlace éster fosfórico en sistemas no enzimáticos, han sido de interés en el estudio de los centros activos de estas enzimas.

La hidrólisis no enzimática de los fosfomonoésteres simples y de muchos fosfomonoésteres sustituidos por solvolisis con agua a pH ácido, implica la ruptura del enlace oxígeno-fósforo en la estructura C-O-P. En condiciones de alcalinidad la hidrólisis por agua de esta estructura se realiza a nivel del enlace C-O. La hidrólisis no enzimática puede también verse afectada por sustituyentes de la mitad orgánica y por la ionización del grupo fosforilado, aunque responde siempre a estas dos posibilidades (Schmidt & Laskowski, 1961).

La fosfatasa ácida y alcalina están ampliamente presentes en el mundo de los microorganismos. Su presencia y acción están íntimamente ligadas al metabolismo del fósforo. Como se comentó en su momento, la limitación de fuentes de fósforo origina la aparición de nuevas proteínas que permiten un mejor aprovechamiento de las fuentes de este nutriente. Las necesidades de fósforo pueden ser cubiertas a través de dos estrategias: i) la presencia de sistemas de asimilación y transporte de P_i , ii) la presencia de fosfatasa que permiten el uso de los fosfatos orgánicos como fuente alternativa de este nutriente. Así, y como hemos comentado con anterioridad, estas enzimas se encuentran bajo el control del metabolismo general del fósforo.

Cualquier intento de revisión de las propiedades y características de las fosfatasa presentes en microorganismos,

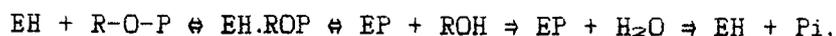
rebasaría los objetivos de esta introducción y las posibilidades reales disponibles para ello. Por tanto, nos limitaremos a comentar las propiedades generales comunes de las fosfatasas, así como algunas propiedades específicas de la forma ácida y alcalina. El estudio de las propiedades y características concretas será aplazado hasta el capítulo de discusión, donde se comentarán a modo de comparación con los resultados obtenidos en esta memoria. La simple enumeración de referencias bibliográficas sobre especies, donde se han descrito estas actividades enzimáticas, además de necesariamente incompleta, no tiene objetivo alguno en sí mismo, sobre todo, considerando que los datos y comentarios aportados en la posterior discusión pueden por sí solos dar una idea del gran número de trabajos y referencias existentes sobre el tema en la bibliografía consultada.

4.2 Propiedades de las fosfatasas ácida y alcalina

La acción de todas las fosfomonoesterasas estudiadas implica la ruptura del enlace P-O en forma similar a la solvolisis no enzimática en medio ácido, como se ha comprobado en estudios con O^{18} .

La reacción sería: $R-O-P + H_2O^{18} \rightleftharpoons R-O-H + P-O^{18}-H$.

El esquema del proceso enzimático es:



EH representa al enzima y EH.ROP al complejo de Michaelis. Se han aislado formas del enzima unidas covalentemente al centro activo del enzima (EP), si bien, el complejo de Michaelis es más estable y la etapa de hidrólisis del complejo EP es muy rápida, por lo que resulta difícil de aislar esta forma. La unión del fosfato (P) al enzima se realiza por un resto de serina o tirosina. La reacción final resultante es: $ROP + H_2O \rightleftharpoons Pi + ROH$.

INTRODUCCION

Las fosfatasas poseen, junto a su actividad hidrolasa, una actividad fosfotransferasa que exhibe una mayor especificidad que la actividad hidrolasa. Este proceso ocurre en presencia de altas concentraciones de alcoholes que actúan como aceptores alternativos del grupo fosfato, así: $R-O-P + R'-OH \rightleftharpoons R'-O-P + R-OH$.

El Tris y otros alcoholes dihidroxilo o aminados son los mejores aceptores para la reacción de transfosforilación, comportándose como aceptores del Pi con una eficacia 100 veces mayor que el agua. Esta reacción es bastante independiente del pH y puede llegar a ser hasta un 90% de la propia reacción de hidrólisis, si bien, los valores usuales se sitúan en un 8-50%. La presencia de estos alcoholes puede también aumentar la tasa de hidrólisis de los sustratos (Hollander, 1971). La discriminación del agua como aceptor del Pi frente a otros alcoholes presentes a mucha menor concentración, parece indicar la naturaleza poco hidrofílica del centro activo de estas enzimas (Fernley, 1971).

Las diferencias básicas entre los dos tipos de enzimas trasciende a la mera consideración del pH óptimo. Así, las fosfatasas ácidas no hidrolizan monoésteres-S-sustituidos pero sí monoésteres-O-sustituidos, mientras que, las fosfatasas alcalinas actúan sobre ambos. Esto sugiere que la forma ácida requiere una unión específica al O, que no puede ser sustituido por el S; unión que no es requerida por las formas alcalinas (Hollander, 1971).

Ambos tipos de fosfatasas actúan sobre una amplia gama de fosfomonoésteres de alcoholes alifáticos primarios y secundarios, alcoholes cíclicos, de azúcares, fenoles y aminas. También pueden actuar en casos concretos sobre fosfomono, di y trinucleótidos, polifosfatos, fosfopéptidos y fosfoproteínas (Schmidt, 1961; Stadtman, 1961). Aunque la especificidad respecto al radical orgánico de la molécula es muy baja, sí existe alta especificidad en relación a la porción inorgánica. Los ésteres de sulfato no son hidrolizados, ni tampoco los fosfodiésteres. Dada la gran variabilidad de sustratos que son aceptados, es difícil de imaginar un centro activo

INTRODUCCION

rígido, pareciendo que el modo de interacción de cada sustrato sería dependiente de la naturaleza particular del radical orgánico unido al fosfato (Fernley, 1971).

Los agentes alquilantes no afectan a la actividad, lo que indica que esta no depende de grupos -SH libres, como es propio de enzimas inespecíficos (Stadtman, 1961).

El pH óptimo de acción de cada enzima depende de la naturaleza del sustrato, de su concentración, de la concentración de enzima, de la presencia de cofactores metálicos y del tipo de tampón usado. Así, al aumentar el pK del sustrato los pHs óptimos son más neutros, la velocidad es menor y la Km aumenta. Al incrementar la concentración de sustrato el pH óptimo es mayor, y el incremento de la fuerza iónica produce un aumento en la velocidad y una disminución en la Km para el sustrato. El aumento del pH incrementa la Km y disminuye la velocidad máxima de reacción. Particularmente importantes son las relaciones actividad-pH-concentración de sustrato. Por ello, en los estudios cinéticos deben definirse explícitamente las condiciones de ensayo, siendo los parámetros estudiados válidos sólo para cada condición particular de estudio, especialmente en formas no puras de los enzimas (Fernley, 1971).

Las fosfatasas ácida y alcalina se han descrito como metaloenzimas que requieren la presencia de cofactores metálicos. El requerimiento de Zn^{+2} para la fosfatasa alcalina de *E. coli* es el caso mejor estudiado (Reid & Wilson, 1971). Sin embargo, en muchos casos la cinética de activación por Zn^{+2} es compleja y poco repetitiva. La activación por Mg^{+2} resulta menor pero más reproducible. Los iones Mn^{+2} y Co^{+2} se han descrito en ocasiones como activadores leves. Otros muchos cationes se describen como inhibidores en mayor o menor medida, por ejemplo el Fe^{+3} , Cu^{+3} , Ca^{+2} , Be^{+2} , Ni^{+2} , Cd^{+2} , etc. Algunos aminoácidos pueden actuar como activadores débiles al quelar algunos iones tóxicos del medio, si bien, a altas concentraciones son inhibidores. Los agentes quelantes más efectivos, como el EDTA, son inhibidores al retirar a los

INTRODUCCION

Aunque las fosfatasas alcalinas presenten un resto de serina en su centro activo, el diisopropilfluorofosfato tiene un efecto inhibitor menor que en otras hidrolasas y esterases con la misma característica. Un inhibidor no competitivo bien caracterizado de estas enzimas es la L-fenilalanina, que evita la ruptura del complejo Enzima-Pi (Stadtman, 1961).

La energía de activación de la ruptura enzimática de algunos sustratos se sitúa en las 10.000 calorías/mol, frente a valores tres veces superiores en la hidrólisis no enzimática. La velocidad de reacción es del orden de 10^{22} - 10^{12} veces superior a la hidrólisis no enzimática (Fernley, 1971).

Las fosfatasas ácidas presentan un pH óptimo entre 4 y 6, aunque existen descritos valores más ácidos y también más próximos a la neutralidad.

Se han descrito dos inhibidores característicos de esta actividad, el fluoruro y el ácido D(+)-tartárico. El fluoruro actúa como un inhibidor competitivo de la reacción hidrolítica y como un inhibidor no competitivo de la transfosforilación. El ácido D(+)-tartárico y otros ácidos α -hidroxicarboxílicos actúan como potentes inhibidores en algunos casos. Los derivados inhibidores deben cumplir algunos requisitos, como presentar un grupo α -hidroxilo en posición D y que el carbono β sea un grupo carboxilo o esté unido a él o a otro grupo hidroxilo. La estereoespecificidad de esta inhibición no ha sido aclarada (Hollander, 1971).

Significado biológico y localización

Como indicamos anteriormente, las fosfatasas inespecíficas permiten el uso de los fosfatos orgánicos como fuente alternativa de fósforo. Este fin parece obvio, en relación a su actividad hidrolasa.

Aunque estas enzimas son reprimidas en su síntesis por Pi y se encuentran bajo la regulación del metabolismo del fósforo, en todos los grupos de microorganismos podemos encontrar fosfatasas

INTRODUCCION

constitutivas (Kudo & Blumenthal, 1961; Healey, 1982; Lemire *et al.*, 1985). Por ello, y en relación con su actividad fosfotransferasa, cabría la posibilidad de que estas enzimas asumieran naturalmente otras funciones como la del transporte de Pi, aprovechando su unión covalente al fósforo para cederlo posteriormente a un alcohol ligado a otros componentes celulares. De este modo, las fosfatasas aprovecharían fuentes orgánicas de fósforo y colaborarían en su transporte y concentración intracelular desde un medio con bajas concentraciones de este nutriente (Reid & Wilson, 1971).

La mayoría de las actividades fosfatasas presentan una localización acorde con estos posibles papeles biológicos, es decir, se presentan asociadas con las envueltas celulares. Esta situación les permite actuar sobre sustratos fosforilados que no tienen facilitada su entrada a la célula. Así, en bacterias, su localización característica es el espacio periplásmico, la superficie exterior de la membrana celular y la superficie exterior de la membrana externa. En levaduras se localizan en la superficie de la pared celular o en las membranas vacuolares en su acción sobre los polifosfatos que estas contienen.

Junto a esta situación periplásmica o superficial, muchos microorganismos presentan actividades fosfatasas extracelulares que actúan sobre los fosfatos orgánicos presentes en el medio externo. Las fosfatasas pueden ser segregadas activamente al medio (Ramaley, 1979). El papel adaptativo de estas actividades ya ha sido comentado a lo largo de esta introducción.

Por último y recordando la actividad hidrolasa de las fosfatasas inespecíficas sobre fosfoproteínas, hemos de indicar que en los últimos años se han descrito numerosos casos de fosforilación de proteínas en bacterias. Esta actividad quinasa se creía sólo presente en células eucariotas. Sin embargo, ya se han establecido varios papeles reguladores a estos procesos de fosforilación (Cozzone, 1984). y se han aislado proteínas con doble actividad quinasa/fosfatasa, así como, se han clonado los genes que

INTRODUCCION

codifican para ellas (Cortay et al., 1988). Estudios anteriores indicaban el posible papel potencial de la fosfatasa alcalina de *E. coli* como proteínofosfatasa (Li, 1982). La fosforilación de proteínas bacterianas y el aislamiento de proteínas con actividad fosfatasa/quinasa puede relanzar los estudios sobre este posible papel de las fosfatasas inespecíficas. Sin embargo, la localización de estos enzimas, más allá de la membrana celular evita, la acción de las fosfatasas inespecíficas sobre las proteínas fosforiladas citoplasmáticas, quedando estas bajo el control de formas específicas de fosfoproteínofosfatasas.

OBJETO DEL TRABAJO

OBJETO DEL TRABAJO

En relación con ello, se ha intentado conocer aspectos del metabolismo glucídico, del contenido en reservas de fósforo en forma de polifosfatos y se han estudiado los niveles de nucleótidos adenilados en las diferentes fases fisiológicas.

Un segundo objetivo ha consistido en el aislamiento, purificación y caracterización bioquímica de las actividades fosfatasas celulares, así como, el estudio de estas enzimas en los ciclos de vida de *M. coralloides* D.

OBJETO DEL TRABAJO

En los últimos años se ha producido un gran avance en el conocimiento de la biología de las mixobacterias, dado que estas bacterias presentan interés por sus implicaciones ecológicas, económicas y servir de modelo, por su comportamiento social, para estudios de diferenciación celular.

Dos hechos han contribuido decisivamente a este proceso. De una parte, el desarrollo de la genética de *Myxococcus xanthus*, y de otra parte, la extensiva utilización de otras mixobacterias fundamentalmente para la producción de antibióticos.

Hace unos años se inició, en nuestro Departamento, un trabajo de Tesina de Licenciatura sobre las fosfatasas de *Myxococcus coralloides* D encontrándose que esta mixobacteria presenta dos actividades fosfatasas: una ácida y otra alcalina. Además, se comprobó la influencia del fosfato sobre algunos aspectos de la biología de *M. coralloides* D : autólisis, diferenciación celular y producción de antibióticos, entre otros.

No obstante, los datos existentes sobre la influencia del fosfato en los ciclos celulares de las mixobacterias en general, son escasos y, a menudo, contradictorios. Así, el fosfato se ha descrito unas veces como activador de procesos del desarrollo y, en otros casos, como inhibidor de ellos.

De otra parte, los datos sobre fosfatasas en estas bacterias, se limitan a una descripción fragmentaria en *M. xanthus*.

Dado el papel del fosfato en la glucólisis de *M. xanthus*, donde la fosforilación de la glucosa ocurre sin intervención del ATP, usándose el pirofosfato como donador del grupo fosfórico, uno de los objetivos de este trabajo de Tesis Doctoral sería el estudio de diversos aspectos de la dinámica del fosfato que nos permitiera un mejor conocimiento de la biología de la mixobacteria con la que se viene investigando, usualmente, en nuestro laboratorio: *Myxococcus coralloides* D.

MATERIAL Y METODOS

1. MICROORGANISMOS

Myxococcus coralloides D fue obtenido por Arias y Montoya (1978) sometiendo a una raza salvaje de *M. coralloides*, aislada por ellos, a sucesivos pases por medios líquidos apropiados.

2. MEDIOS DE CULTIVO

Agar levadura

Este medio ha sido utilizado para la conservación de *M. coralloides* D, ya que en él se produce el proceso de fructificación. Por ello también ha sido usado en todos los estudios realizados durante este proceso. La composición de este medio es la siguiente:

Levadura prensada de panaderia	10,0 g.
Agar	20,0 g.
Agua destilada	1,0 l.
pH	7.2

La levadura se añade disuelta en el agua, ajustando el pH con una solución de NaOH al 10%. Se esteriliza en autoclave a 117°C, 20 min.

Medio ALP

Responde a la misma composición del medio anterior, pero adicionado de tampón $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$ a una concentración final de 20 mM. Esta adición de fosfato provoca la inhibición del proceso de fructificación que ocurre sobre el medio de Agar levadura, produciéndose solo un crecimiento vegetativo similar al que se observa sobre medio CTA (González, 1985).

Medio CTA

Se utilizó en todos aquellos casos en que se quiso obtener crecimiento vegetativo en medio sólido. Su composición es:

Bacto-Casitone (Difco)	10,0 g.
Agar (Difco)	18,0 g.
SO ₄ Mg.7H ₂ O	1,0 g.
Tampon PO ₄ H ₂ K-PO ₄ HK ₂ 10 mM	1,0 l.
pH	7.2

Se esteriliza en autoclave a 117°C, 20 min.

Medios de producción

En los estudios de producción de fosfatasas en medio líquido se utilizaron diversos sustratos como base para el crecimiento de *M. coralloides* D. Todos los medios usados presentaron la siguiente composición base:

Hidrolizado de proteínas	10 g
SO ₄ Mg.7H ₂ O	1 g
Tampón PO ₄ H ₂ K-PO ₄ HK ₂ 10 mM	1 l
pH	6,5

Los medios se esterilizaron en autoclave a 117°C, 20 minutos.

Los hidrolizados de proteínas utilizados fueron los siguientes:

- Casaminoácidos (Difco)
- Bacto-Casitone (Difco)
- Peptona de carne (ADSA)
- Polipeptona (BBL)
- Phytona (BBL)
- Tripticasa (BBL)
- Biopeptona H (Hoechst)
- Bioproteína L (Hoechst)
- Extracto de levadura (BBL)

MATERIAL Y METODOS

En estudios posteriores se utilizó la Tripticasa (BBL) a concentraciones comprendidas entre el 0,1% y el 2%. En otros casos el tampón fosfato utilizado presentó un pH de 7,2..

El medio más usado con Tripticasa al 0,75% se modificó en algunas ocasiones por variación en la concentración del tampón fosfato usado o por el empleo de otros tampones. El tampón $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$ se empleó a concentraciones de 10, 20 y 30 mM. Otros tampones empleados en los medios de cultivo fueron el Tris-ClH, Hepes y Mops, todos a concentraciones de 10 y 30 mM. En otros casos no se empleó tampón alguno en el medio de cultivo, ajustando el pH inicial con una solución al 10% de NaOH.

El medio con Tripticasa al 0,75% fue adicionado en ocasiones con β -glicerol-fosfato (Merck). Este sustrato fue esterilizado previamente por filtración y adicionado a una concentración final de 20 mM.

Medio minimo

Se preparó a partir de las siguientes soluciones madre de aminoácidos (en %):

Aspártico (Sigma)	3,7
Treonina (Sigma)	2,5
Serina (Merck)	3,2
Prolina (Sigma)	4,0
Glutámico (Sigma)	14,2
Glicina (Fluka)	1,0
Alanina (Sigma)	2,0
Valina (Sigma)	4,1
Metionina (Sigma)	1,7
Isoleucina (Sigma)	2,7
Leucina (Sigma)	3,5
Tirosina (Merck)	3,1
Fenilalanina (Sigma)	0,7
Lisina (Sigma)	3,7

MATERIAL Y METODOS

Histidina (Sigma)	0,7
Arginina (Sigma)	1,4
Cisteina (Sigma)	0,3
Triptófano (Sigma)	1,0
Asparagina (Merck)	0,5
Glutamina (Sigma)	0,5

Todos los aminoácidos se disolvieron en pequeños volúmenes de agua destilada, calentándose suavemente aquellos que se mostraron insolubles, o como en el caso de la cisteina se añadió un pequeño volumen de ClH al 3,5%. Tras su disolución se completó hasta un volumen final de 10 ml para alcanzar las concentraciones madre indicadas.

Se añadieron 0,5 ml de cada solución y se completó hasta 50 ml con una solución que contenía:

SO ₄ Mg.7H ₂ O	(0,2)
Cl ₂ Ca.2H ₂ O	(0,05%)
(NH ₄) ₂ SO ₄	(0,06%)
Almidón	(0,1%)
Tris-ClH 15 mM pH 7,6	
Tampón fosfato 0,05-1 mM	
Solución vitaminas 1ml/l	

Se esteriliza a 115°C, 20 minutos.

La solución de vitaminas contenía:

Acido Djenkólico (Sigma)	17mg/ml
Acido pantoténico (Sigma)	33mg/ml
Espermidina (Sigma)	33mg/ml
Nicotinamida (Merck)	3mg/ml
Biotina (Sigma)	3mg/ml

La solución de vitaminas y la glutamina fueron adicionadas tras ser esterilizadas por filtración.

3. TECNICAS DE CULTIVO

Mantenimiento y conservación

El mantenimiento del crecimiento vegetativo se realizó por transferencias diarias en medio líquido apropiado. Para asegurar la conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio fresco adicionado de glicerol 0,5 M, el cual induce la formación de mixósporas. Estas pueden ser mantenidas congeladas durante tiempo indefinido.

La inducción de mixósporas con glicerol 0,5 M se realizó tanto en pequeños volúmenes (tubos de 4,5 ml) como para la obtención de grandes cantidades de mixósporas (matraces de 250 y 500 ml).

Condiciones de cultivo

Las condiciones de cultivo para mantener el crecimiento disperso de las células vegetativas fueron: agitación a 200 rpm en un agitador orbital y temperatura de 28°C o 33°C. El crecimiento en medio sólido se realizó siempre a 28°C.

En los casos en que se deseó obtener grandes masas celulares, se empleó un fermentador de laboratorio Braun Biostat E. Los parámetros de uso fueron los siguientes:

Medio: Triptona 0,75% + SO_4Mg_2 0,1% + Tampón $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}-\text{PO}_4\text{HK}_2$ 10 mM

Cantidad: 7 litros

$p\text{O}_2$: 45 mm Hg

Temperatura: 30°C

rpm: 150

Inóculo: 500 ml

Tiempo de cultivo: 30 horas

D. O. recogida de células: 0,85

4. MEDIDAS TURBIDOMETRICAS Y DEL NUMERO DE CELULAS

Las medidas turbidométricas del crecimiento bacteriano se llevaron a cabo a intervalos regulares de tiempo, determinando valores de absorción a 650nm en un Spectronic 20D.

Las medidas de densidad óptica fueron relacionadas con el número de células de acuerdo con Benhamú (1978).

5. MEDIDAS DE PESO SECO DE LOS CULTIVOS

Una vez recogidas las células de los distintos cultivos líquidos u obtenidas las soluciones correspondientes a partir de medios sólidos, se tomaron porciones de 1 ml que se colocaron en crisoles de porcelana previamente desecados, enfriados y tarados en una balanza de precisión. Posteriormente se llevaron al horno de secado a 105°C durante 24 horas, transcurridas las cuales se volvieron a enfriar y se pesaron de nuevo. La diferencia entre ambas pesadas es el peso seco en mg/ml.

6. MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS Y DE pH

Todas las medidas espectrofotométricas realizadas durante la elaboración de esta memoria se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Hitachi 100-80A.

Las medidas de pH de los caldos de cultivo y de los tampones utilizados se realizaron en un pHmetro PHM84-Research.

7. DETERMINACION DE PROTEINAS

Método de Bradford

Fundamento: La determinación cuantitativa de proteínas se llevó a cabo por el método de Bradford (1976). Este método de determinación implica la unión del colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 a las proteínas. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento en el máximo de absorción del colorante desde 465nm a 595nm. Este incremento en la absorción a 595nm sirve para determinar la concentración de proteínas.

Preparación del reactivo: 100 mg de colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 son disueltos en 50 ml de etanol 95%. A esta solución se añaden 100 ml de ácido fosfórico 85% (p/v). La disolución resultante se lleva a un volumen final de 1 litro, se mantiene en agitación por 2 horas y se filtra antes de su uso. Este reactivo es estable durante al menos un mes a temperatura ambiente.

Ensayo: La solución problema conteniendo entre 10 y 50 µg de proteína se completa hasta un volumen de 0,1 ml con tampón apropiado, añadiendo posteriormente 5 ml de reactivo, se agita vigorosamente y se mide la absorción a 595nm tras 2 minutos y antes de 1 hora frente a un blanco con 0,1 ml del tampón correspondiente y 5 ml del reactivo.

Microensayo: La solución problema conteniendo entre 1 y 10 µg de proteína se completa hasta un volumen de 0,1 ml con tampón, añadiendo 1 ml de reactivo, procediéndose posteriormente como en el ensayo anterior.

La concentración de proteína presente en las muestras ensayadas es deducida frente a una curva estándar obtenida en ensayos por triplicado con albumina de suero bovino. La curva estándar para el ensayo (100-500 µg/ml) y el microensayo (10-100 µg/ml) se obtuvo para cada litro de reactivo preparado.

Absorción en el U.V. a 280nm

Se empleó este procedimiento como criterio cuantitativo relativo determinando la absorción a 280nm de cada una de las fracciones eluidas de las columnas utilizadas en el proceso de purificación frente a un blanco constituido por el tampón de elución.

Extracción de proteínas celulares

Todas las medidas de proteínas realizadas sobre células completas se llevaron a cabo tras el tratamiento de estas con NaOH 1N durante 5 minutos a 100°C. Un ml de cultivo fue centrifugado en microfuga y resuspendido en 1 ml de NaOH 1N, realizándose posteriormente el tratamiento indicado. La suspensión tratada fue centrifugada de nuevo para recoger el sobrenadante con las proteínas extraídas. Este tratamiento provoca la extracción de la mayoría de las proteínas microbianas (Herber *et al.*, 1971).

8. DETERMINACION DE FOSFATO INORGANICO

Todas las determinaciones de fosfato inorgánico realizadas en esta memoria han sido llevadas a cabo según la técnica descrita por Ames (1966).

Principio: La técnica se basa en la estimación espectrofotométrica de la reducción del complejo de fosfomolibdato por el ácido ascórbico. El complejo reducido y su coloración azul es estable por varias horas. Las lecturas de absorbancia a 820 nm son proporcionales a la concentración de fosfato.

Reactivos: (a) Acido ascórbico al 10%, conservado en frío por un máximo de un mes. (b) Molibdato amónico tetrahidratado al 0,42% en ácido sulfúrico 1N. Esta solución es estable a temperatura ambiente.

MATERIAL Y METODOS

Se mezcla una parte de (a) y seis partes de (b). Esta solución se mantiene en hielo para su uso en el día.

Procedimiento: Se añaden 0,7 ml de la mezcla anterior a 0,3 ml de la solución problema en un tubo de hemólisis y se incuba una hora a 37°C. La lectura de absorbancia a 820 nm se realizó frente al blanco correspondiente tratado de igual forma.

Comentarios: En todas las determinaciones se realizó una recta patrón de fosfato utilizando la misma mezcla de reactivo que en las posteriores determinaciones. El contenido en fosfato inorgánico se dedujo a partir de la misma, considerando los factores de dilución introducidos. Las medidas estándar de fosfato fueron proporcionales entre 0,005 y 0,05 μ moles de fosfato inorgánico. Todas las medidas se realizaron por triplicado.

Todo el material de vidrio y las cubetas de medida fueron lavadas con ácido antes de su primer uso. Los tubos de hemólisis, las cubetas de medida y tubos de ensayo utilizados en sucesivas determinaciones fueron reutilizados tras su lavado con detergente libre de fosfatos (Extran 2000, Merck) y aclarados en agua destilada.

9. ESTIMACION DE ADN POR EL METODO DE LA DIFENILAMINA

El método se basa en la reacción de la difenilamina con la 2-desoxiribosa.

1 ml de extracto de ADN es mezclado con 2 ml de reactivo de la difenilamina y calentado en agua hirviendo durante 10 minutos. La intensidad de color azul se mide a 600 nm.

El reactivo de la difenilamina se prepara disolviendo 1 g de difenilamina en 100 ml de ácido acético glacial. Inmediatamente antes de su uso se debe mezclar con 2,75 ml de ácido sulfúrico concentrado.

MATERIAL Y METODOS

La correspondencia entre intensidad de color y concentración de ADN fue calculada mediante una recta patrón de 0-400 μg ADN/ml que había sido realizada utilizando ADN de salmón (Sigma) como referencia.

10. ESTIMACION DE ARN POR EL METODO DEL ORCINOL

La estimación se basa en la reacción del orcinol en ClH con las pentosas presentes en el medio. La reacción es catalizada por sales férricas.

0,2 ml del extracto de ARN es diluido hasta 1,5 ml y calentado con 1,5 ml de reactivo de orcinol en agua hirviendo durante 20 minutos. La intensidad del color verde es medida a 660 nm.

El reactivo de orcinol contiene 1 g de orcinol purificado en 100 ml de ClH concentrado con 0,5 g de Cl_3Fe .

La correspondencia entre color y concentración de ARN fue calculada a partir de una recta patrón de 0-200 μg ARN/ml que había sido realizada utilizando ARN de levadura (Sigma) como referencia.

11. EXTRACCION DE PIGMENTOS

Los pigmentos presentes en las células de *M. coralloides* D fueron extraídos con metanol a partir de células de cultivos en fase final de crecimiento exponencial o en fase estacionaria.

Un ml de cultivo era recogido por centrifugación en microfuga y tras eliminar el sobrenadante, las células fueron resuspendidas en un ml de metanol. La resuspensión se consiguió con agitación vigorosa de los tubos Ependorf utilizados. La suspensión celular se agitó ocasionalmente durante un par de minutos y se volvió a centrifugar en microfuga para retirar las células. El sobrenadante

se recogió y completó con metanol hasta 1 ml de volumen final. Este sobrenadante se consideró como el extracto crudo de metanol.

Posteriormente se procedió a realizar una medida de absorbancia entre 600 y 325 nm de estos extractos crudos frente a un blanco con metanol. Las medidas, realizadas cada 5 nm, se presentan como un barrido entre 600 y 325 nm.

El precipitado celular obtenido tras la extracción de los pigmentos era sometido a una nueva extracción con NaOH para determinar su contenido en proteínas.

12. EXTRACCION Y FRACCIONAMIENTO DE COMPUESTOS FOSFORILADOS

Recogida y preparación de las muestras

Los cultivos en medio líquido fueron recogidos por centrifugación a 6.000 x g durante 20 min a 4°C. El precipitado obtenido fue resuspendido y lavado una vez en una solución de Cl_2Mg 5 mM a 1/50 de su volumen inicial.

Las muestras obtenidas de medio sólido fueron recogidas de placa y resuspendidas en un volumen similar y lavadas una vez con la misma solución.

Después del lavado las muestras fueron llevadas a -70°C para su posterior procesamiento en común.

Proceso de extracción y fraccionamiento

La extracción de los compuestos fosforilados presentes en las células de *M. coralloides* D se ha realizado de acuerdo con el procesamiento que se describe a continuación.

Extracción de compuestos fosforilados ácido solubles

Muestras celulares, con un peso aproximado de 200 mg, fueron extraídas 2 veces con ClO_4H 0,5 N a 0°C durante 10 minutos. La extracción en frío fue seguida de centrifugación a 6.000 x g durante 20 min a 4°C para la recogida del precipitado y los sobrenadantes

MATERIAL Y METODOS

obtenidos. Los sobrenadantes fueron reunidos y neutralizados con NaOH 0,5 N hasta pH 6.

El sobrenadante neutralizado fue mezclado con carbono activado (Merck, p.a) en proporción de 100 mg carbono/10 ml sobrenadante. El carbono activado fue lavado anteriormente con ClLi 0,5 M (100 mg carbono/20 ml ClLi 0,5 M). En estas condiciones se produce la adsorción sobre el carbono de los nucleótidos presentes en el sobrenadante, mientras que los polifosfatos no sufren adsorción (Muller-Felter & Ebel, 1962). Tras este tratamiento por una hora, se separó el carbono por centrifugación en las mismas condiciones que anteriormente. El sobrenadante final constituye la fracción de fósforo ácido soluble.

Esta fracción fue analizada directamente en su contenido en fosfato inorgánico. El valor obtenido se da como ortofosfato celular. Alicuotas de la fracción ácido soluble fueron quemadas en ácido sulfúrico 0,5 M (7 min a 100°C) y en una mezcla 1 SO₄H₂ : 2 NO₃H (30 min a 100°C) para determinar el contenido en fósforo lábil y en fósforo total, respectivamente.

El valor de fósforo lábil se calculó tras sustraer al valor obtenido en sulfúrico 0,5 M, el valor anterior de ortofosfato celular. El fósforo lábil corresponde a polifosfatos de cadena corta (entre 2 y 25 restos de Pi). El valor del fosfato total obtenido de las muestras menos los dos anteriores valores muestran la presencia de otros compuestos fosforilados no adsorbidos sobre el carbono activado, este valor correspondería a la fracción ácido soluble-ácido estable.

Extracción de compuestos ácido insolubles

El precipitado obtenido tras la extracción en perclórico frío fue posteriormente tratado por dos veces con ClO₄H 0,5 N a 70°C durante 15 minutos. Tras centrifugar en iguales condiciones que con anterioridad, los sobrenadantes fueron reunidos y neutralizados con NaOH 0,5 N hasta pH 6.

MATERIAL Y METODOS

Alicuotas del neutralizado fueron separadas para determinar su contenido en ADN y ARN.

El sobrenadante a pH 6 fue tratado con carbono activo lavado en ClLi 0,5 M en iguales condiciones que anteriormente, con el fin de producir la adsorción de los ácidos nucleicos. Tras la separación del carbono activado, el sobrenadante obtenido constituye la fracción de fósforo ácido insoluble.

Esta fracción fue analizada en su contenido de fosfato inorgánico tras quemar alícuotas de ella en SO_4H_2 0,5 M y la mezcla de sulfúrico-nítrico anteriormente dada, en las mismas condiciones anteriores. El primer valor se da como el contenido en fosfato de los polifosfatos de cadena larga. El valor del fosfato total menos el valor anterior da idea de la desfosforilación sufrida por los ácidos nucleicos durante el tratamiento en ácido caliente.

Extracción de lípidos

Muestras, conteniendo unos 200 mg de células, fueron extraídas con 7,5 ml de cloroformo-metanol (1:2) durante 3 horas a temperatura ambiente. Posteriormente se añadieron 2,5 ml de cloroformo y 2,5 ml de agua destilada, la mezcla fue agitada y dejada reposar 30 min.

El extracto fue filtrado por papel Whatman nº1, añadiéndose al residuo 9 ml de cloroformo. El filtrado fue reunido, eliminándose la capa de metanol-agua.

El peso del lípido crudo total fue calculado en crisoles de porcelana tarada tras evaporar el cloroformo en baño de vapor a 40°C.

13. MICROSCOPIA ELECTRONICA

La preparación de las células para su observación a microscopía electrónica se realizó siguiendo técnicas generales, modificadas según se estimó conveniente. De particular interés fue la etapa de fijación inicial, siendo necesario asegurar una buena fijación para los posteriores tratamientos (Isabel Guerra, comunicación personal). El orden de preparación de las muestras se presenta a continuación.

Los cultivos líquidos en Tripticasa 0,75% o Tripticasa 0,25% (100 ml) fueron resuspendidos en 1/10 de su volumen inicial y lavados dos veces en tampón Tris-maleico 20 mM pH 8,0.

Las células lavadas fueron resuspendidas en el mismo tampón con glutaraldehído (Merck) a una concentración final del 2%, incubándose durante 30 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se lavó dos veces en tampón y se resuspendieron las células en varias alícuotas de 1 ml de volumen final con el tampón inicial y glutaraldehído al 2%. Esta segunda etapa de fijación se prolongó por dos horas a temperatura ambiente. Trás este tiempo se realizó un lavado en el momento con el tampón y dos lavados de una hora de duración cada uno de ellos.

Trás el último lavado se realizó la tinción con OsO_4 en agua destilada al 0,5%, en baño de hielo y campana de gases por una hora. A continuación se realizó un lavado en el momento con el tampón inicial y dos lavados posteriores de una hora a temperatura ambiente. Por último se mantuvieron las muestras una noche en tampón a 4°C, realizándose un último lavado a la mañana siguiente.

Después del último lavado y centrifugación se realizó una deshidratación en serie de acetona (30, 50, 70, 90, 95 y 100%) con una duración de 30 minutos cada paso. Posteriormente se realizó la inclusión en resina Spurr. Trás la inclusión las muestras se conservaron para su posterior corte y tinción de contraste con acetato de uranilo al 5% y citrato de plomo.

Los procesos de deshidratación, inclusión, corte y tinción de contraste se realizaron en el Laboratorio de Procesado de Muestras de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

Las muestras fueron observadas en un microscopio electrónico EM-10C Zeiss, en la sección de Microscopía Electrónica de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

14. ESTUDIOS DE ESPECTROSCOPIA DE RMN

Preparación de las muestras

Las células de *M. coralloides* D se recogían en frío a partir de un cultivo de 500 ml en Tripticasa 0,75%, con una densidad óptica de 0,9-1,0. Las células fueron lavadas en tampón Hepes 200 mM pH 7,5 con EDTA 15 mM y concentradas hasta un volumen de 5-10 ml. Las medidas de RMN se realizaron sobre estas suspensiones celulares o bien con los extractos libres de células obtenidos como se indica posteriormente, a partir de las suspensiones anteriores. Las muestras eran mantenidas a 4°C o congeladas a -20°C hasta su posterior uso.

Medidas de RMN

Los espectros de P^{31} -RMN eran realizados a 121,49 MHz en un espectrómetro Bruker AM300, operando en el modo de transformación de Fourier. Los parámetros de uso fueron: SW 4.237 Hz, PW 12 μ s con un ángulo de flip de 30° y un tiempo de adquisición de 0,48 s. Los espectros se acumularon durante 1040 scans.

Se usaron suspensiones celulares con 10^{10} - 10^{11} células/ml o extractos sonicados de las mismas, en tubos capilares de 10 mm, con un capilar concéntrico de 5 mm que contenía ácido fosfórico 0,1% en ClH concentrado, operando a una temperatura de 293 K. El desplazamiento químico fue medido en ppm de ácido fosfórico 85% que

fue considerado como estándar interno a $\delta = 0$ ppm. Las señales fueron identificadas según las asignaciones de Cholli *et al.*, 1985.

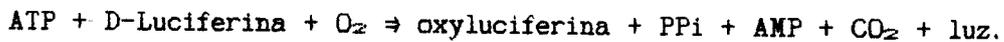
Los espectros fueron realizados en la sección de Resonancia Magnética Nuclear de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

15. EXTRACCION Y MEDIDA DE LOS NUCLEOTIDOS ADENILADOS

El dimetilsulfóxido (DMSO) fue utilizado en la extracción de los nucleótidos adenilados ATP, ADP y AMP.

Muestras de 5 μ l de suspensión celular fueron añadidas a tubos de reacción con 50 μ l de DMSO. Tras su incubación a temperatura ambiente durante 5 minutos, las muestras fueron conservadas a -20°C hasta el momento de su medida. Las muestras de cultivos líquidos fueron tomadas directamente del medio. Las muestras de cultivos sólidos fueron recogidas de las placas y resuspendidas en 2 ml de agua destilada.

El ATP fue determinado por el ensayo de la luciferina/luciferasa, usando un Luminiscence Biometer (Turner Designs). El principio del ensayo es:



El proceso requiere la presencia de luciferasa e iones Mg^{+2} . El rendimiento cuantico de esta reacción, definido como la relación entre el número de fotones emitidos y el número de moléculas de ATP consumidas es practicamente del 100%. La luz emitida presenta un máximo de absorbancia a 562 nm.

MATERIAL Y METODOS

La luciferina/luciferasa (Sigma) fue resuspendida en tampón Hepes 100 mM pH 7,75 con Cl_2Mg 15 mM y utilizada en el momento, añadiendo 100 μl en el vial de medida conteniendo la muestra.

El análisis de ATP fue realizado directamente por la adición de 100 μl de la solución anterior en el vial de reacción con la muestra y el DMSO.

El ADP y AMP fueron convertidos enzimáticamente en ATP. Tras el proceso enzimático se procedió a la medida de su contenido en ATP por el mismo método

La conversión del ADP a ATP fue realizada según el siguiente proceso:

0,535 mg de fosfoenolpiruvato (Sigma) y 2 mg de piruvato quinasa (Boehringer Mannheim) fueron disueltos en 5 ml de tampón Hepes 100 mM pH 7,75 con Cl_2Mg 15 mM. La muestra fue adicionada con 100 μl de esta mezcla e incubada por 30 minutos a 28°C. La reacción fue detenida por introducción de los viales en hielo. En el momento de realizar la medida se adicionaron 100 μl de luciferina/luciferasa al vial y se realizó la medida en el bioluminómetro. El valor del ADP se obtuvo sustrayendo, al valor obtenido en este caso, el valor de ATP obtenido anteriormente.

La conversión del AMP a ATP se realizó del siguiente modo: 0,535 mg de fosfoenolpiruvato, 2 mg de piruvato quinasa y 2,5 mg de mioquinasa (Boehringer Mannheim) fueron disueltos en 5 ml de tampón Hepes 100 mM pH 7,75 con Cl_2Mg 15 mM. La muestra fue adicionada con 100 μl de esta mezcla e incubada por 30 minutos a 28°C. La reacción fue detenida por introducción de los viales en hielo. En el momento de realizar la medida se adicionaron 100 μl de luciferina/luciferasa y se realizó la medida. El valor del AMP se obtuvo tras sustraer al valor obtenido en este caso los anteriores valores correspondientes a las medidas de ADP y ATP.

MATERIAL Y METODOS

La piruvato quinasa y la mioquinasa utilizadas fueron dializadas 1 hora frente al tampón de la mezcla antes de su uso en las reacciones de conversión enzimática del ADP y AMP.

La correspondencia entre el número de fotones y la cantidad de ATP se obtuvo frente a una curva estándar de ATP. Los valores de ATP, ADP y AMP se dan como $\mu\text{g} \times 10^{-9}$ células. El valor de la carga energética adenilada se define como:

$$(\text{ATP}) + \frac{1}{2}(\text{ADP}) / (\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP}).$$

16. PERMEABILIZACION CELULAR

En los estudios de ensayo *in situ* se utilizaron células vegetativas, mixósporas de ambos tipos o formas intermedias entre ellas. Estas formas fueron resuspendidas en tampón Tris-ClH 10 mM pH 7,0 Cl₂Mg 10 mM. La suspensión (3 ml) fue tratada con el agente permeabilizante, a las concentraciones indicadas más abajo, durante 5, 15 o 30 minutos en agitación en cámara de 28°C. Trás un lavado en el tampón de incubación del ensayo enzimático, la suspensión permeabilizada fue usada inmediatamente en la prueba o conservdas en el mismo tampón a 4°C (durante no más de 24 h). El volumen se mantuvo constante en 3 ml.

0,1 ml de suspensión permeabilizada (conteniendo entre 200 y 300 μg proteína/ml) se utilizó en el ensayo enzimático. Tras el ensayo, las células o mixósporas fueron eliminadas por centrifugación y se midió la absorción a 410nm.

La actividad fue ensayada en extractos libres de células obtenidos por sonicación y centrifugación a partir de células vegetativas permeabilizadas o no. Estas últimas sirvieron como control de la actividad enzimática.

Los agentes permeabilizantes usados y sus concentraciones finales en % (v/v) fueron:

MATERIAL Y METODOS

SDS (Sigma)	2%
Triton X-100 (Sigma)	2%
Eter etilico (Quimon)	50%
Dimetilsulfóxido(DMSO) (Prolabo)	15%
Tolueno (Merck)	10%
Metanol (Merck)	10%
Tolueno-etanol (5:4)	17%
Tolueno-etanol-Triton X-100,TET(5:4:1)	17%
Tolueno-etanol-Triton X-100,TET(3:4:1)	17%
Tolueno-etanol-Triton X-100,TET(2:4:1)	17%
Tolueno-etanol-Triton X-100,TET(2:4:0,2)	17%
Etanol (Panreac)	10%
Cloroformo (Probus)	10%
2-propanol (Normasolv)	10%
Alcohol isoamilico (Quimon)	10%

17. DETERMINACION DE LA ACTIVIDAD FOSFATASA

En la determinación de la actividad fosfatasa se emplearon dos procedimientos, según el tipo de sustrato utilizado en la medida de actividad.

A. Método basado en la medida de p-nitrofenol liberado

La determinación está basada en medir espectrofotométricamente a 410nm la cantidad de p-nitrofenol liberado a partir del sustrato artificial p-nitrofenilfosfato (pNPP). El p-nitrofenol en medio alcalino posee un coeficiente de extinción molar conocido ($1,62 \times 10^4 \text{ cm}^2/\text{mol}$).

Las medidas se realizaron en tubos de dialisis según el siguiente protocolo general:

	Volumen (ml)	Concentración en ensayo (mM)
Tampón	0,8	50
pNPP	0,1	3
Muestra	0,1	--

Los valores dados fueron los habituales en los estudios de actividad en células permeabilizadas, sobrenadantes de cultivo y valoración de fracciones de purificación. En la valoración de actividad durante los estudios de caracterización y cinética enzimática los volúmenes del tampón y muestra variaron según las necesidades de cada estudio particular. En general el volumen de tampón fue ajustado para completar el volumen final a 1 ml. La concentración de tampón y de pNPP fueron modificadas en casos particulares. De forma general se usaron dos tipos de tampones: Tris-ClH (pH alcalino) para la valoración de la fosfatasa alcalina y Acético-acetato (pH ácido) para la fosfatasa ácida. La reacción se iniciaba con la adición de la muestra de enzima, llevándose a cabo a

28°C o 37°C durante 30 minutos (si no se indica otro particular). Transcurrido este tiempo se adicionaba 1 ml de NaOH 1 N que proporciona el medio alcalino necesario para la lectura espectrofotométrica del p-nitrofenol a 410nm y que a su vez detiene la reacción. La actividad era medida frente a un blanco sin muestra y tratado de igual forma.

B. Método basado en la medida del fosfato inorgánico liberado

El método utilizado es el de Ames (1966). Este método de ensayo de fosfato inorgánico descrito anteriormente puede ser usado para las fosfatasas que hidrolizan ésteres de fosfato como glucosa-6-fosfato, AMP, ribosa-5-fosfato, etc. No requiere desproteínización dada su sensibilidad y la incubación enzimática se detiene con la solución de ascórbico-molibdato que utiliza en su metodología.

El protocolo general describe la adición de 0,7 ml de reactivo de ascórbico-molibdato a 0,3 ml de mezcla con tampón, enzima y sustrato. Este conjunto se incubaba en las condiciones descritas anteriormente.

El blanco usual contenía enzima y tampón pero no sustrato. Un blanco con el sustrato se medía independientemente para determinar el fosfato inorgánico libre que pudiera contener. Este valor era sustraído de la medida de actividad. Este método ha sido utilizado durante los estudios de caracterización y cinética enzimática.

C. Calculos de actividad

Dado que la concentración real de los enzimas no se conoce en la mayoría de los casos, la cantidad de enzima presente puede expresarse sólo en términos de su actividad.

La actividad específica se expresó en unidades enzimáticas por miligramo de proteína (U/mg) y la concentración de enzima en unidades enzimáticas por mililitro de solución (U/ml).

La actividad enzimática en los estudios previos de producción y purificación se determina del modo siguiente:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta D_{0.410}/\text{min} \times Fd}{c \times d \times v}$$

La actividad específica se expresa como incremento de densidad óptica por minuto y miligramo de proteína.

En los estudios posteriores la actividad específica se determinó como sigue:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\Delta D_{0.410}/\text{min} \times V}{F_c \times \epsilon \times d \times v \times c}$$

La actividad específica se expresa como micromoles por minuto y miligramo de proteína. Definiéndose una unidad de actividad fosfatasa como la cantidad de enzima que cataliza la formación de un micromol de p-nitrofenol por minuto en las condiciones indicadas. Cuando se utilizaron ésteres de fosfato como sustrato en la reacción enzimática, la unidad de actividad se define como la cantidad de enzima que libera un micromol de fosfato inorgánico por minuto en las condiciones indicadas. La cantidad de fosfato inorgánico

MATERIAL Y METODOS

liberado se calculó según la alícuota tomada para la determinación de fosfato inorgánico según el método de Ames (1966).

Las abreviaturas tienen los siguientes significados:

$\Delta D_{0.410}/\text{min}$ = incremento de densidad óptica por minuto

V = volumen de ensayo (ml)

Fd = factor de dilución de la muestra

c = mg de proteína/ml

d = espesor de la cubeta o paso de luz del espectrofotómetro (1cm)

ϵ = coeficiente de extinción molar del p-nitrofenol ($1,62 \times 10^4 \text{cm}^2/\text{mol}$).

v = volumen de muestra

Fc = factor de conversión a micromoles (10^{-6}).

18. METODOS UTILIZADOS EN EL PROCESO DE PURIFICACION DE LAS FOSFATASAS CELULARES

18.1 Obtención de extractos sonicados y extractos libres de células

Para la obtención de extractos sonicados se recogieron por centrifugación las células de cultivos líquidos de *M. coralloides* D y se resuspendieron en tampón Tris-ClH 10 mM con Cl_2Mg , concentrando 100 veces. La suspensión celular se colocaba en un sonicador Branson Sonic B-12, a una potencia de 50 w, durante 15 minutos en baño de agua helada. A continuación se centrifugó durante 20 minutos a $40.000 \times g$ a $4^{\circ}C$ en una ultracentrifuga Beckman L5-50, con rotor T-50. El sobrenadante se consideró como el extracto libre de células, punto de partida del proceso de purificación.

18.2 Cromatografía en Sephacryl S-200

Preparación del gel: El Sephacryl S-200 se suministra ya hinchado en una suspensión de agua destilada con mertiolato al 0,01%. Para eliminar las burbujas de aire que pudieran existir en el gel y que podrían dar lugar a un empaquetamiento y flujo desiguales, se conectó una bomba de vacío al matraz que contenía el gel y se mantuvo así hasta que dejaron de salir burbujas de aire.

Montaje y preparación de la columna: Se ha empleado una columna de Pharmacia Fine Chemicals de 40 cm x 2,5 cm, con un tubo de teflón en cada extremo los cuales canalizan la entrada y salida del eluyente. La preparación de la columna, así como el proceso cromatográfico completo se llevaron a cabo en cámara fría a $4^{\circ}C$;

Una vez fijada la placa porosa inferior de la columna, se dispuso ésta verticalmente y se conectó su salida a una bomba peristáltica (Peristaltic Pump P-1 Pharmacia Fine Chemicals) para

mantener constante el flujo. Se adicionó por el extremo superior agua destilada hasta llenar la tercera parte de su volumen, procurando no dejar atrapadas burbujas de aire en la placa porosa. Se añadió entonces la suspensión de gel con sumo cuidado para evitar la penetración o formación de burbujas en el interior de la columna, así como, para procurar un empaquetamiento totalmente homogéneo. Una vez llenada la columna, se dejó reposar 10 minutos. Tras este tiempo se dispuso sobre la columna un reservorio de gel (Pharmacia Fine Chemicals), este fue llenado con sumo cuidado con el volumen de gel necesario para alcanzar el nivel de empaquetamiento deseado y completado hasta el tope con agua destilada. Tras el llenado, el reservorio de gel se conectó a un reservorio del tampón utilizado como eluyente. Prosiguiendo el montaje, se hicieron pasar 2 volúmenes de tampón eluyente a un flujo de 0,25 ml/min. Una vez empaquetado el gel a la altura deseada, se cerró la salida inferior, se desmontó el reservorio de gel y se introdujo el émbolo superior hasta que su placa porosa contactó con la superficie del gel. Tras esta operación, se pasó en flujo inverso 2 volúmenes del tampón eluyente al mismo flujo anterior, quedando la columna estabilizada y lista para recibir las muestras. El tubo de teflón superior se conectó a una válvula de cuatro vías.

Aplicación y elución de la muestra: La muestra (extracto libre de células), con exceso de volumen, fue colocada en un pequeño reservorio de muestras (Pharmacia Fine Chemicals) y mediante la válvula de cuatro vías y la bomba peristáltica, se introdujo en la columna un volumen aproximado al 5% del volumen de la columna. Tras girar la válvula a su posición adecuada, se comenzó la elución con tampón Tris-ClH 10 mM pH 8,0 con Cl_2Mg 10 mM, recogiendo fracciones de 4 ml.

Las fracciones fueron recogidas en un colector de fracciones Fraction Collector FRAC-100 (Pharmacia Fine Chemicals). Este colector de fracciones y la bomba anteriormente citada fueron utilizados en las restantes cromatografías.

18.3 Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de concentración iónica

Se utilizó Carboximetil Sephadex C-25 (Pharmacia Fine Chemicals), una resina débil de intercambio catiónico. El gel fue preparado en un exceso de tampón Cítrico-citrato 10 mM pH 6,0, calentando en baño a 90°C durante 1 hora. En estas condiciones, 1 g de gel proporciona de 4 a 6 ml de volumen.

El gel se empaquetó en una columna de vidrio de 50 cm x 1,2 cm y lavado con un volumen del mismo tampón. Tras la adición directa de la muestra (8 ml), la elución se realizó a un flujo de 30 ml/h aplicando un gradiente lineal de 0 a 0,15 o 0,3 M de cloruro sódico, a partir de las siguientes soluciones:

- (a) tampón cítrico-citrato 10 mM pH 6,0 (200 ml)
- (b) tampón cítrico-citrato 10 mM pH 6,0 + ClNa 0,15 o 0,3 M (200ml).

El gradiente de fuerza iónica se consiguió con un mezclador de gradientes (Pharmacia Gradient Mixer GM-1). La cámara de mezcla del gradiente fue llenada con la solución (a) y la otra cámara con la solución (b). La mezcla de (a) y (b) fue realizada con agitación por el propio aparato. Se recogieron fracciones de 3 ml.

La regeneración del gel se realizó por lavado con un volumen de la solución (a) + ClNa 2M, con ello se procedía a remover cualquier sustancia unida por fuerza iónica. Posteriormente el gel era reequilibrado por lavado con varios volúmenes de la solución (a).

18.4 Cromatografía de intercambio iónico en gradiente de pH

Se utilizó una columna 40 cm x 1cm (Pharmacia Fine Chemicals) llena con DEAE-Sephadex A-25. El gel fue hinchado en exceso de agua destilada y se mantuvo en baño a 90°C durante 1 hora, proporcionando así unos 5 ml de volumen de lecho por gramo.

MATERIAL Y METODOS

El montaje de la columna se realizó siguiendo las recomendaciones generales de la casa suministradora. La elución se realizó, tras preparar la columna, con tampón Tris-ClH 10 mM pH 9,0 con Cl_2Mg 10 mM. Una vez pasada la muestra (12 ml), se realizó una elución isocrática con este tampón de las proteínas no adsorbidas al gel. Las proteínas adsorbidas fueron eluidas con tampón Tris-ClH 25 mM pH 7,0 con Cl_2Mg 10 mM. Las fracciones recogidas contenían 5 ml. el flujo de elución fue de 30 ml/h.

18.5 Electroforesis analítica en gel de poliacrilamida con SDS

A fin de comprobar la homogeneidad de cada una de las fracciones obtenidas en cada etapa del proceso de purificación, se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida con SDS.

Se utilizaron geles con la siguiente composición: acrilamida 5,6%, bisacrilamida 0,2%, SDS 0,1%, Dimetilaminopropionitrilo 0,0025%, persulfato amónico 0,02% y $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 0,1 M pH 7,0. Antes de adicionar el SDS y el dimetilaminopropionitrilo, la mezcla fue filtrada y posteriormente, desgasificada a vacío durante 10 minutos. La gelificación se realizó con una solución de persulfato amónico reciente e inmediatamente el gel fue vertido en tubos de Pyrex de 10 x 0,6 cm y cubierto con unas gotas del tampón en que fue preparado para evitar la formación del menisco y el contacto del aire. El gel fue dejado en reposo durante una noche. El tampón de los electrodos fue el mismo en que fue preparado el gel, adicionado con SDS al 0,1%.

Las muestras, con una concentración aproximada de 0,3 mg proteína/ml, se calentaron a 100°C durante 5 minutos en la siguiente solución: SDS 1%, β -mercaptoetanol 1%, $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na}-\text{PO}_4\text{HNa}_2$ 0,01 M pH 7,0. Tras este tratamiento, se adicionó a cada muestra de 50 μl de azul de bromofenol al 0,02% en glicerol 10%. El azul de bromofenol

fue utilizado como indicador del frente de la electroforesis. El volumen de muestra aplicado a cada gel fue de 60 μ l.

Los geles fueron sometidos a una preelectroforesis durante 30 minutos aplicando una corriente constante de 3mA/gel. Para el desarrollo de la electroforesis se aplicó una corriente constante de 7mA/gel durante 3-5 horas, hasta que el indicador del frente alcanzó el extremo terminal del gel. La fijación y tinción se realizaron de forma simultánea por inmersión en metanol:acético:agua (5:1:5) con Azul Coomassie G-250 (0,025%) durante 12 horas. La decoloración se llevó a cabo mediante sucesivos lavados con metanol:acético:agua (5:7,5:87,5).

El análisis por densitometría de los geles y las imágenes de los mismos fueron realizadas en un Procesador de Imágenes IBAS 2000 Krontron con toma de imagen por cámara de vídeo e impresión por Video HardCopy. El análisis densitométrico se basa en un barrido de 500 puntos de la imagen tomada por vídeo. Este procesado fue llevado a cabo en el Servicio de Análisis de Imágenes de los Servicios Técnicos de la Universidad de Granada.

19. ESTUDIOS DE CARACTERIZACION DE LAS FOSFATASAS CELULARES

19.1 Aproximación al tamaño molecular

Se utilizó la columna de Sephacryl S-200 en las condiciones anteriormente indicadas. La calibración de la columna fue realizada calculando el volumen vacío (V_0), el volumen total (V_t) y el volumen de elución de cada muestra (V_e). K_{av} representa la fracción del volumen estacionario del gel que es disponible para la difusión de una especie molecular dada, correspondiendo su valor a la relación $V_e - V_0 / V_t - V_0$.

Los patrones de peso molecular utilizados fueron: albúmina de suero bovino (66 Kd), anhidrasa carbónica de eritrocito de carnero (29 Kd) y citocromo c de corazón de caballo (12,4 Kd). Estos

patrones se aplicaron a la columna a una concentración de 0,4 mg/ml.

19.2 Influencia de la concentración de proteínas y del tiempo de incubación

Con objeto de estudiar el margen de concentración protéica para la cual se obtenía una hidrólisis del pNPP proporcional a la cantidad de proteína ensayada, se llevaron a cabo ensayos de actividad con diferentes cantidades de proteína (5-20 μg para la fosfatasa alcalina y 5-50 μg para la fosfatasa ácida).

Posteriormente se analizó la influencia que sobre el ritmo de hidrólisis del pNPP ejercen los distintos tiempos de incubación. Los tiempos ensayados fueron de 1, 3, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 y 60 minutos.

19.3 Condiciones óptimas para la actividad enzimática

pH

Se ensayaron valores de pH comprendidos entre 3 y 8,5 para la actividad fosfatasa ácida y entre 6 y 10,5 para la alcalina. Se utilizaron a una concentración inicial de 50 mM los siguientes tampones:

Cítrico-citrato	(pH 3,0; 3,5; 4,0; 4,5; 5,0; 5,5; 6,0)
Acético-acetato	(pH 4,0; 4,5; 5,0; 5,5)
MES	(pH 5,5; 6,0; 6,5)
Tris-ClH	(pH 7,1; 7,6; 8,1; 8,5; 8,9)
HEPES	(pH 7,5; 8,0)
Glicina-NaOH	(pH 8,6; 9,0; 9,5; 10,0; 10,5).

Las determinaciones de actividad se realizaron a 37°C.

Temperatura

Se hicieron ensayos a las siguientes temperaturas: 20°C, 28°C, 32°C, 37°C, 43°C, 49°C y 58°C. Antes de la reacción se equilibraron los reactivos a la temperatura correspondiente. Las determinaciones se efectuaron en los tampones donde se detectó mayor actividad según la prueba anterior.

Molaridad del tampón

Se han realizado ensayos frente a los tampones Tris-ClH pH 7.6 y 8.1 a concentraciones cada uno de 5, 10, 25, 50 y 75 mM. Igualmente para el tampón Acético-acetato pH 4 y 4.5.

19.4 Sensibilidad a enzimas y estabilidad frente al calor y pH

Estabilidad térmica

La estabilidad frente a la temperatura de los preparados parcialmente purificados de la fosfatasa ácida y alcalina se ensayó sometiendo las disoluciones de los mismos a temperaturas de -20°C, 4°C, 37°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C. Las determinaciones correspondientes a -20°C se llevaron a cabo a los 3 días, 7 días, 1 mes y 2 meses. Los tiempos correspondientes a 37°C, 50°C, 60°C, 70°C y 80°C fueron de 15, 30 y 60 minutos. Finalmente, los tiempos para la temperatura de 4°C fueron de 12, 24, 48 y 72 horas.

Las muestras que se iban a someter a -20°C se dispusieron en tubos independientes con objeto de evitar pérdida de actividad por congelaciones y descongelaciones sucesivas. La metódica consistió en disponer volúmenes de 0,5 ml de las muestras a ensayar en distintos tubos de hemólisis que se llevaron a las temperaturas señaladas. De ellos se fueron tomando alícuotas de 50 µl para las determinaciones en tiempos sucesivos.

Estabilidad frente al pH

Se ensayó el efecto de la preincubación a 4°C o 20°C y a distintos pH (3-10) sobre la actividad enzimática de preparados parcialmente purificados de ambas fosfatasas. Las soluciones tampón empleadas para los distintos pH, a una concentración de 50 mM, fueron las siguientes:

Cítrico-citrato (pH 3,0; 4,0; 5,0; 6,0)
Tris-ClH (pH 7,1; 8,1)
Glicina-NaOH (pH 9,0; 10,0)

Se tomaron alícuotas de las soluciones enzimáticas y se dispusieron en tubos de hemólisis a los que se añadieron los tampones indicados a una concentración final de 50 mM. Estas disoluciones se incubaron a 4°C o 20°C durante 0 (control) y 2 horas. Transcurrido este tiempo se determinó la actividad presente en las soluciones según el método habitual.

Sensibilidad a tratamientos enzimáticos

Alícuotas de soluciones parcialmente purificadas, fueron incubadas en presencia de los siguientes enzimas:

β-Glucosidasa (Sigma)
Lipasa Tipo I (Sigma)
Lisozima (Sigma)
Pronasa Grado B (Calbiochem)
Proteasa de *Streptomyces griseus* Tipo V (Sigma)
Proteasa de *Tritirachium album* Tipo XI (Sigma)
Tripsina (Merck)

La concentración de enzima empleada fue de 2 mg/ml a pH 7,5 durante 30 minutos a 37°C. Tras la incubación las muestras fueron ensayadas para determinar la actividad enzimática residual.

19.5 Efecto de inhibidores enzimáticos

Se ensayó la acción de distintos inhibidores enzimáticos sobre la actividad fosfatasa ácida y alcalina parcialmente purificada. Las concentraciones finales de los distintos inhibidores fueron de 5, 2 y 0,5 mM, excepto para el PMSF que se usó a 1, 0,4 y 0,1 mM. Partiendo de soluciones madre 50 mM, excepto para el PMSF que lo fue 10 mM. Los inhibidores utilizados fueron los siguientes:

Acido aspártico (Sigma)
Acido aurintricarboxílico (ATA) (Merck)
Acido cítrico (Merck)
Acido málico (Merck)
Acido tartárico (Probus)
EDTA, sal disódica (Merck)
Fenilmetilsulfonilfluoruro (PMSF) (Merck)
FNa (Merck)
Hidroxiquinoleína (Merck)
N-etilmaleimida (NEM) (Fluka)

Los inhibidores eran preparados en agua destilada e incorporados directamente a las mezclas de reacción enzimática. En todos los casos se efectuó la reacción control en ausencia del inhibidor, iniciándose la reacción por adición de la muestra de enzima.

En el caso del uso de NEM, se realizaron estudios paralelos con cisteína a una concentración final de 5 mM (solución madre 50 mM).

19.6 Efecto de diferentes iones

Se ensayaron 19 especies iónicas, en forma de cloruros en su mayoría y a concentraciones de 0,1 , 1 y 10 mM. Todos ellos se prepararon a una concentración inicial de 200 mM en agua destilada. Las sales utilizadas en su preparación fueron las siguientes:

$\text{Cl}_3\text{Al}.6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	p.m. 241,45
$\text{Cl}(\text{NH}_4)$ (Panreac)	p.m. 53,50
Cl_2Cd (Riser)	p.m. 183,32
Cl_2Ca (Merck)	p.m. 110,99
Cl_2Cs (Sigma)	p.m. 168,40
$\text{Cl}_2\text{Co}.6\text{H}_2\text{O}$ (Probus)	p.m. 237,95
Cl_2Fe (Probus)	p.m. 126,75
$\text{Cl}_3\text{Fe}.6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	p.m. 270,30
ClLi (Panreac)	p.m. 42,40
$\text{Cl}_2\text{Mg}.6\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	p.m. 203,30
$\text{Cl}_2\text{Mn}.4\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	p.m. 197,91
Cl_2Hg (Panreac)	p.m. 271,50
$\text{Cl}_2\text{Ni}.6\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba)	p.m. 237,30
ClK (Panreac)	p.m. 72,00
Cl_2Zn (Carlo Erba)	p.m. 136,28
$\text{Na}_2\text{AsO}_4\text{H}.7\text{H}_2\text{O}$ (Merck)	p.m. 312,01
$\text{Na}_2\text{PO}_4\text{H}$ (Panreac)	p.m. 141,96
$\text{Na}_2\text{MoO}_4.2\text{H}_2\text{O}$ (Panreac)	p.m. 241,98
$\text{CuSO}_4.5\text{H}_2\text{O}$ (Probus)	p.m. 249,69

Con objeto de precisar la acción de algunos cationes, se realizaron estudios en presencia de EDTA con una relación EDTA/ión de 1, usando concentraciones de 5 mM para ambos.

Las soluciones enzimáticas utilizadas fueron previamente dializadas antes de su uso, para evitar la interferencia de los iones presentes en los tampones de elución utilizados durante el proceso de purificación. Para ello, se dispusieron las preparaciones enzimáticas en tubos de diálisis Wisking 8/32 o 20/32 previamente

humedecidos, y se sumergieron en vaso de precipitado que contenía 2 litros de tampón Tris-ClH 10 mM pH 8,0 o acético-acetato 10 mM pH 4,0. El proceso duró 12 horas y se desarrolló a 4°C con agitación.

19.7 Especificidad de sustrato

Se ensayaron como sustratos 19 ésteres fosfóricos a una concentración final de 3 mM. Todos ellos se prepararon a una concentración inicial de 25 mM en agua destilada. La concentración para las formas de polifosfatos se refiere a concentraciones de fosfato inorgánico. Los ésteres utilizados fueron los siguientes:

Glucosa-6-fosfato, sal disódica (Boehringer Mannheim) p.m. 304,20

Glucosa-1-fosfato, sal disódica (Boeh. Mannh.) p.m. 376,20

Fructosa-6-fosfato, sal disódica (Boeh. Mannh.) p.m. 304,10

Fructosa-1,6-difosfato, sal trisódica (Boeh. Mannh.) p.m. 550,20

Ribosa-5-fosfato, sal monobárica (Boeh. Mannh.) p.m. 473,50

Acido fosfoenolpirúvico, sal monosódica (Boeh. Mannh.) p.m. 208,00

β-glicerolfosfato, (Merck) p.m. 306,12

4-p-nitrofenilfosfato, sal disódica (pNPP) (Boeh. Mannh.) p.m. 371,10

Fenolftaleínadifosfato, sal disódica (Sigma) p.m. 566,20

α-naftolfosfato (Serva) p.m. 407,40

Piridoxal-5-fosfato (Sigma) p.m. 247,20

AMPc (Sigma) p.m. 329,20

Adenosín-5-trifosfato, sal trisódica (Boeh. Mannh.) p.m. 605,20

Adenosín-5-difosfato, sal monopotásica (Boeh. Mannh.) p.m. 501,30

Adenosín-5-monofosfato, sal disódica (Boeh. Mannh.) p.m. 499,20

Pirofosfato (Sigma) p.m. 265,90

Tripolifosfato, sal pentasódica (Sigma) p.m. 476,00

Polifosfato sódico Tipo 25 (longitud media de cadena = 28) (Sigma)

Polifosfato sódico Tipo 75+ (longitud media de cadena = 82) (Sigma)

La actividad enzimática sobre los sustratos se expresa como μ moles de fosfato inorgánico liberados por minuto.

20. ESTUDIOS DE CINETICA ENZIMATIZA

20.1 Características cinéticas

En la determinación de los valores de la constante de Michaelis-Menten se midieron actividades enzimáticas con concentraciones diferentes de sustrato. Para el p-nitrofenilfosfato se utilizaron concentraciones de 0,7, 1, 1,25, 2,5, 5 y 10 mM. Para la glucosa-6-fosfato las concentraciones fueron de 1, 1,5, 2, 4 y 8 mM. En el caso del β -glicerolfosfato se usaron concentraciones de 1, 2,5, 5, 7,5 y 10 mM. Estas concentraciones de sustrato mantienen entre si relaciones relativas que proporcionan incrementos inversos iguales, facilitando las representaciones gráficas posteriores.

Las actividades enzimáticas fueron también ensayadas en presencia de diferentes concentraciones de inhibidores. En los estudios con pNPP se utilizaron como inhibidores el fosfato y el arseniato (8, 16 y 33 mM para ambos). En el caso de la glucosa-6-fosfato se utilizó la glucosa como inhibidor (0,45, 0,75 y 1,25 M) y para el β -glicerolfosfato se usó el glicerol (0,5 y 1,9 M).

Las medidas con pNPP se basaron en la detección del p-nitrofenol formado y con los otros dos sustratos se estudió en función del Pi liberado.

La representación inversa de Lineweaver-Burk ($1/v - 1/s$) permitió deducir los valores de la K_m . La representación de las pendientes de cada recta obtenida frente a la concentración de inhibidor utilizada o de la inversa de la velocidad frente a la concentración de inhibidor (representación de Dixon) permitió deducir los valores de K_i . Estas representaciones nos indicaron el carácter lineal o no de las inhibiciones observadas.

20.2 Reacción de transfosforilación

La capacidad de transfosforilación de los enzimas fue determinada por ensayo simultáneo del p-nitrofenol y del fosfato inorgánico liberado a partir del p-nitrofenilfosfato. La cantidad de fosfato perdido por diferencia entre ambos se considera la cantidad de fosfato inorgánico transfosforilado.

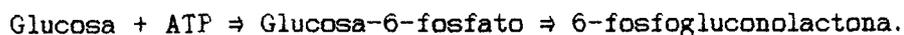
La capacidad transfosforilante de la enzima alcalina fue determinada sin ninguna variación en la mezcla de incubación, dado que el tampón Tris proporciona los grupo hidroxilo del alcohol para la reacción. Para la actividad ácida, determinada en tampón acetato, la mezcla de incubación fue adicionada con n-propanol 50 mM.

La determinación estandar de fosfato fue realizada bajo las mismas condiciones para eliminar la posibilidad de interferencia por n-propanol.

21. DETERMINACION DE OTRAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS

Actividad hexoquinasa

La determinación de la actividad hexoquinasa fue basada en el proceso acoplado con la acción de la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa.



La primera etapa es catalizada por la hexoquinasa y la segunda por la deshidrogenasa, con uso de una molécula de NADP⁺ que es reducida hasta NADPH. La aparición de éste era seguida espectrofotométricamente a 340 nm. El ATP puede ser sustituido por otro tipo de molécula con enlaces ricos en energía, según la especificidad de la hexoquinasa para este sustrato.

La mezcla de reacción utilizada contenía 6,5 µmoles de ATP o 6,5 µmoles de PPi o 6 µmoles de polifosfatos (Sigma Tipo 75+), 200

MATERIAL Y METODOS

µmoles de tampón Tris-ClH pH 7,8, Cl₂Mg 10 µmoles, glucosa 10 µmoles y 0,3 unidades de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Boehringer Mannheim), extracto celular (con un contenido aproximado de 0,1 mg de proteína) y agua destilada hasta 1 ml. La reacción se iniciaba al añadir 0,5 µmoles de NADP⁺ (Boehringer Mannheim).

La actividad específica se expresa como nanomoles de NADPH producido por minuto y mg de proteína. El coeficiente de extinción molar utilizado fue de $6,22 \times 10^5$ cm²/mol.

Actividad malato deshidrogenasa

La L-malato-NAD-oxidoreductasa fue ensayada por medida de la oxidación del NADH a 340 nm en presencia de oxalacetato. La mezcla de reacción contenía Tris-ClH pH 7,5 75 µmoles, oxalacetato 1 µmol, NADH (Boehringer Mannheim) 0,3 µmoles, 0,25 ml de sobrenadante de cultivo y agua destilada hasta 1 ml.

Actividad desoxirribonucleasa

El ensayo de la actividad DNAasa se realizó siguiendo el procedimiento descrito por MacDonald (1955).

Actividad proteolítica

La actividad proteolítica fue ensayada de acuerdo con Haska y Noren (1967).

22. ESTUDIOS DE LOCALIZACION CITOQUIMICA DE LAS ACTIVIDADES

FOSFATASAS CELULARES

En los estudios de localización citoquímica se partió de cultivos líquidos (100 ml) en Tripticasa 0,75%. Las células fueron recogidas a mitad de la fase exponencial de crecimiento (D.O. 0,5-0,6) y fueron lavadas dos veces en el tampón posterior de incubación, concentrándose diez veces el volumen.

MATERIAL Y METODOS

Tras el lavado, las células fueron incubadas durante 30 minutos en una solución que contenía tampón Tris-maleico 10 mM (pH 5,0 para el estudio de la actividad fosfatasa ácida y pH 8,0 para la fosfatasa alcalina), sacarosa 5%, p-nitrofenilfosfato 3 mM y β -glicerolfosfato 3 mM. La incubación se realizó en tubos de plástico, con agitación y a 28°C. Tras este tiempo, se retiró por centrifugación esta solución y se resuspendieron las células en una solución con el mismo tampón conteniendo citrato de plomo 3 mM. Se incubaron las células por 15 minutos y posteriormente se lavaron en el tampón sin la sal de plomo.

Después de este tratamiento, las células fueron procesadas para su observación a microscopía electrónica como se comentó anteriormente.

Así mismo se realizaron controles no incubados con sustratos ni citrato de plomo. La actividad fosfatasa se detecta a microscopía electrónica como precipitados densos a los electrones producidos por la presencia de sales insolubles de plomo. Estas sales son fosfatos de plomo, producidos por la combinación del fosfato, liberado por las actividades fosfatasas, y el plomo soluble del medio.

23. ESTUDIO DE LAS ACTIVIDADES FOSFATASAS EXTRACELULARES

En el estudio de las actividades extracelulares se partió de 2.500 ml de sobrenadante de cultivo, obtenido a partir de un cultivo con una densidad óptica de 0,3, tras eliminar las células por centrifugación en frío.

Para su concentración se utilizó acetona a -20°C, añadiéndose esta lentamente y con agitación en baño de hielo hasta una concentración final del 20% (v/v). El conjunto se mantuvo en agitación por 30 minutos en hielo y se centrifugó a 6.000 x g durante 10 minutos a -5°C, obteniéndose un fino precipitado que se resuspendió en tampón Tris-ClH 10 mM pH 8,0 con Cl₂Mg 10 mM. Esta

MATERIAL Y METODOS

suspensión fue llevada a un frasco Bücher y la acetona eliminada por calentamiento a 30°C bajo presión reducida en rotavapor. La solución final fue utilizada en estudios posteriores.

Los ensayos de estabilidad frente al pH y enzimas se realizaron basicamente en las mismas condiciones que las ya indicadas para los enzimas celulares, sustituyendo en cada caso los enzimas celulares por los extractos concentrados de las actividades extracelulares. Igualmente, los estudios de inhibición con cloruro amónico y fosfato potásico se realizaron en las mismas condiciones que para los enzimas celulares.

La ultracentrifugación de los sobrenadantes se realizó durante 60 minutos a 108.000 x g a 4°C en una ultracentrifuga Beckman L5-50, con rotor T-30. El sobrenadante y el precipitado obtenido, resuspendido en tampón Tris-ClH 10 mM con Cl₂Mg, fueron analizados en su actividad fosfatasa.

RESULTADOS

1. EFECTOS DEL FOSFATO SOBRE LA FISILOGIA DE *Myxococcus coralloides* D

El ión fosfato ejerce una marcada influencia sobre el comportamiento autolítico de *M. coralloides* D (Fernandez-Vivas et al., 1983). Así mismo, otros estudios realizados en nuestro laboratorio pusieron de manifiesto que el proceso de fructificación de esta mixobacteria era inhibido por dicho ión (González, 1985). Por otro lado, y como se comenta en la Introducción de este trabajo, el fosfato puede afectar a diversas características del metabolismo y fisiología de los microorganismos. Todo ello nos llevo a estudiar la posible acción del ión fosfato sobre algunos aspectos de la fisiología de *M. coralloides* D. Así, se estimó conveniente investigar el efecto del fosfato sobre la producción de proteínas extracelulares y sobre la síntesis de pigmentos.

1.1 Efecto del fosfato sobre la producción de proteínas extracelulares

Como se indicó en la Introducción, una de las propiedades que caracterizan a las mixobacterias, es la capacidad de secreción de una amplia variedad de biopolímeros. Por ello se consideró interesante el estudio de la influencia del fosfato sobre el proceso de secreción de proteínas a los medios de cultivo.

Para la detección de proteínas extracelulares fue necesario determinar la cantidad de proteína presente en los sobrenadantes de cultivo endistintos momentos del crecimiento en medio líquido de *M. coralloides* D (Tripticasa 0,75%). Muestras de cultivo en diferentes fases eran centrifugadas a 8.000 x g durante 30 min a 4°C, a fin de eliminar las células. La cuantificación de las proteínas se realizó

RESULTADOS

por el método de Bradford, en el que no interfieren los aminoácidos y péptidos presentes en el medio. El método de Lowry se comprobó que no era el más adecuado, dada la interferencia que estas sustancias presentan con la detección de proteínas.

Los resultados obtenidos, mostrados en la Figura 1, indican que la cantidad total de proteína detectada aumenta paralelamente al crecimiento celular. Así, tras la fase estacionaria, coincidiendo con la etapa de autólisis, se detectaron cantidades muy superiores de proteína (no representado en la Figura 1). Obviamente, la presencia de estas proteínas es debido al proceso de autólisis y no a un proceso de secreción.

La cantidad de proteína detectada no aumentó durante la fase estacionaria; el incremento se inició con la fase de lisis. Durante el crecimiento no se detectó actividad malato deshidrogenasa, un enzima citoplasmático, pero sí al inicio de la autólisis.

La presencia de distintas cantidades de fosfato en el medio inicial de cultivo (0, 10, 20 y 30 mM) no influyeron sobre la cantidad de proteína extracelular detectada; no obstante, concentraciones de fosfato entre 20 y 30 mM provocaron un retraso en la aparición de la fase de autólisis, como ya era conocido (Fernandez-Vivas *et al.*, 1983).

En la Figura 1 también se puede observar como la producción de proteína extracelular por célula fue constante a lo largo del crecimiento exponencial. Igualmente en la fase de autólisis, este valor aumentó (no representado) como consecuencia de la lisis celular.

La cantidad de proteína extracelular detectada durante la fase crecimiento osciló entre 10 y 25 $\mu\text{g/ml}$. La proteína extracelular producida por célula se sitúa en torno a 6-7 $\mu\text{g}/10^9$ células. Ambos valores no se vieron afectados por la concentración de fosfato del medio de cultivo. Los resultados mostrados en la Figura 1 corresponden a la producción de proteína extracelular a una concentración de 20 mM de fosfato.

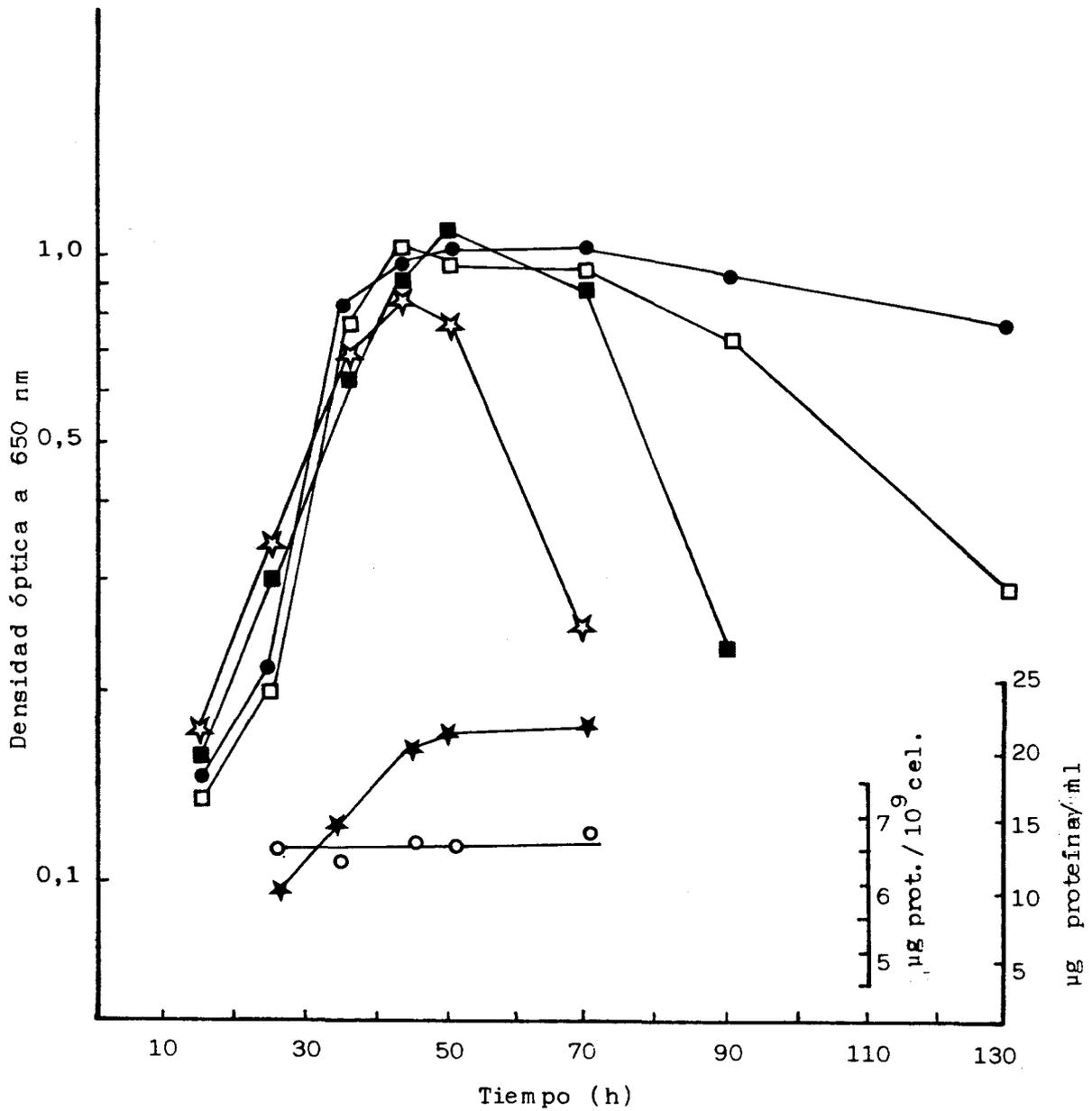


Figura 1. Curvas de crecimiento de *M. coralloides* D a diferentes concentraciones de tampón fosfato: 30 mM (●), 20 mM (□), 10 mM (■) y sin tampón (☆). Producción de proteínas extracelulares durante el crecimiento en un medio con 20 mM de tampón fosfato: µg proteína/ml (☆) y µg proteína/10⁹ células (○).

1.2 Efecto del fosfato sobre la síntesis de pigmentos

La observación directa de los cultivos de *M. coralloides* D en medio líquido (Trypticasa 0,75%), adicionado con diferentes concentraciones de tampón fosfato, reveló una coloración decreciente de los mismos a medida que aumentaba la molaridad del tampón fosfato presente en el caldo.

Es conocido que el color de las células de las mixobacterias es debido a una mezcla de pigmentos carotenoides y no carotenoides, localizados en la membrana citoplasmática (Reichenbach & Kleining, 1984). Los pigmentos de naturaleza carotenoide presentan sus máximos de absorción entre 430 y 520 nm y los pigmentos amarillos, de naturaleza no carotenoide, entre 360 y 400 nm.

Los espectros de absorción de extractos crudos en metanol de cultivos líquidos en fase estacionaria, mostraron una disminución en los valores de absorbancia al aumentar la molaridad del tampón fosfato (Figura 2). Sin embargo, este fenómeno no solo era producido por el tampón fosfato, y así la presencia de concentraciones crecientes de tampones orgánicos (Tris, Hepes, Mops) en el medio, producía un fenómeno similar (Figuras 3-5).

Aún cuando este efecto era bastante manifiesto, una aproximación más real del efecto observado en las determinaciones de los espectros podía ser obtenido mediante la relación entre el incremento de absorbancia a los máximos observados y el contenido en proteína de las células extraídas con metanol. Estos valores se muestran en la Tabla 1. El aumento en la molaridad de los tampones fosfato y Tris-ClH afectó a este cociente; especialmente en los pigmentos carotenoides (para ambos tampones) y con mayor efecto para los no carotenoides al usar el tampón Tris-ClH. En el caso de los tampones Hepes y Mops el incremento por 3 veces de su molaridad no llevó a un mayor descenso en la relación $\Delta D.O./mg$ proteína

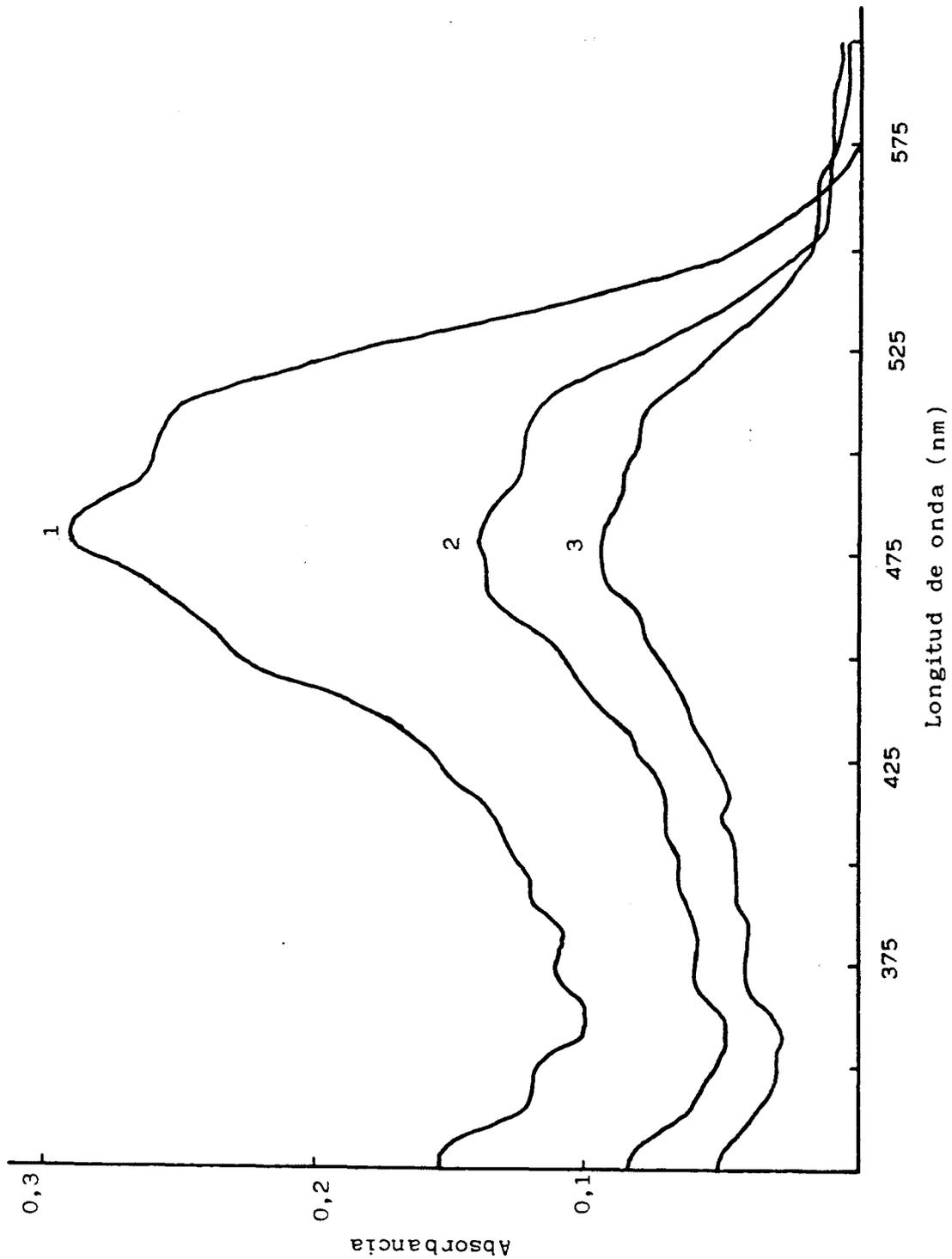


Figura 2. Espectro de absorción de los extractos crudos en metanol de células crecidas en medio sin tampón (1), con tampón fosfato 10 mM (2) y 30 mM (3). Las medidas corresponden a un barrido de longitud de onda entre 325 y 600 nm.

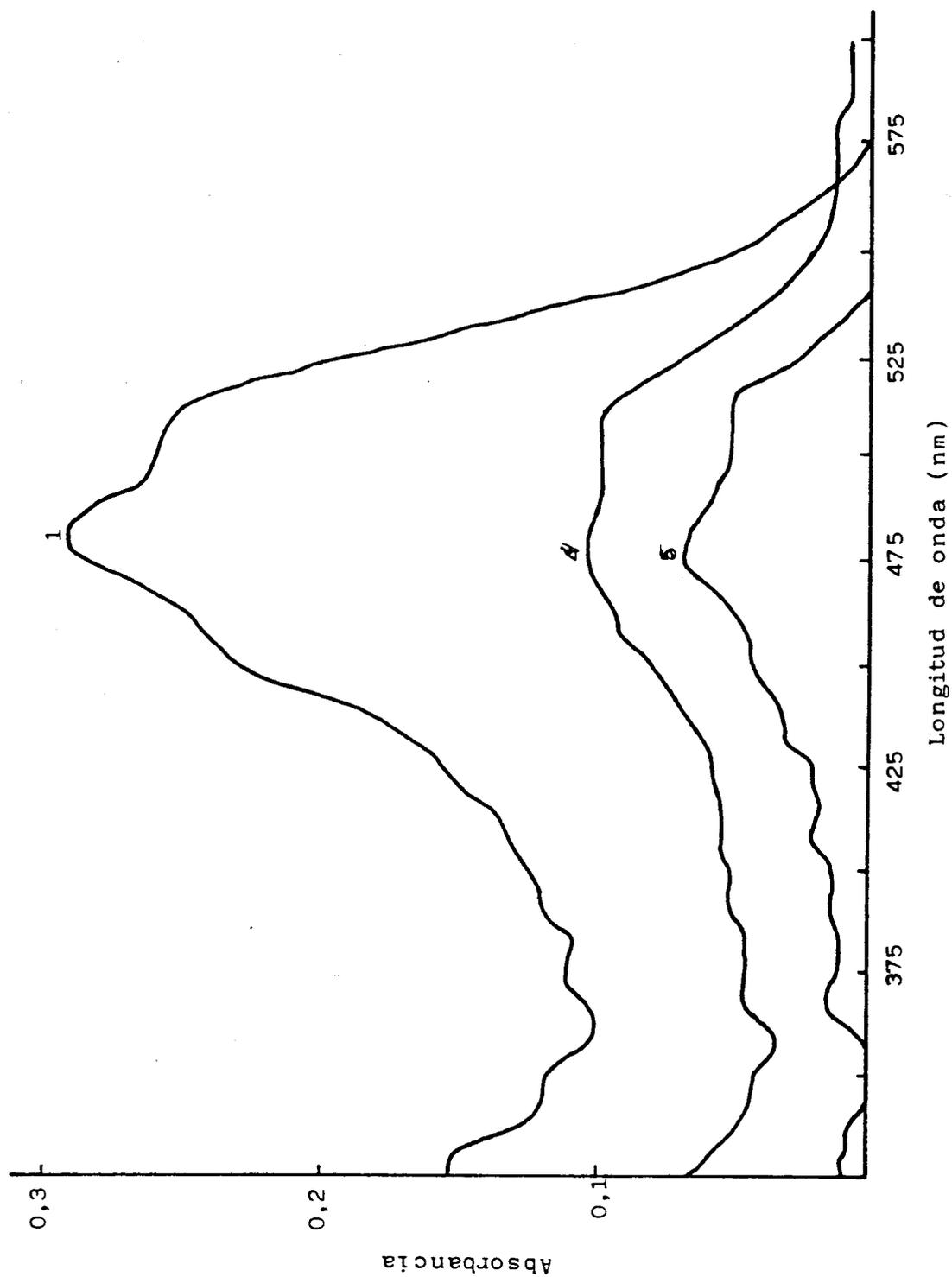


Figura 3. Espectro de absorción de los extractos crudos en metanol de células crecidas en medio sin tampón (1), con tampón Tris-ClH 10 mM (4) y 30 mM (5). Las medidas corresponden a un barrido de longitud de onda entre 325 y 600 nm.

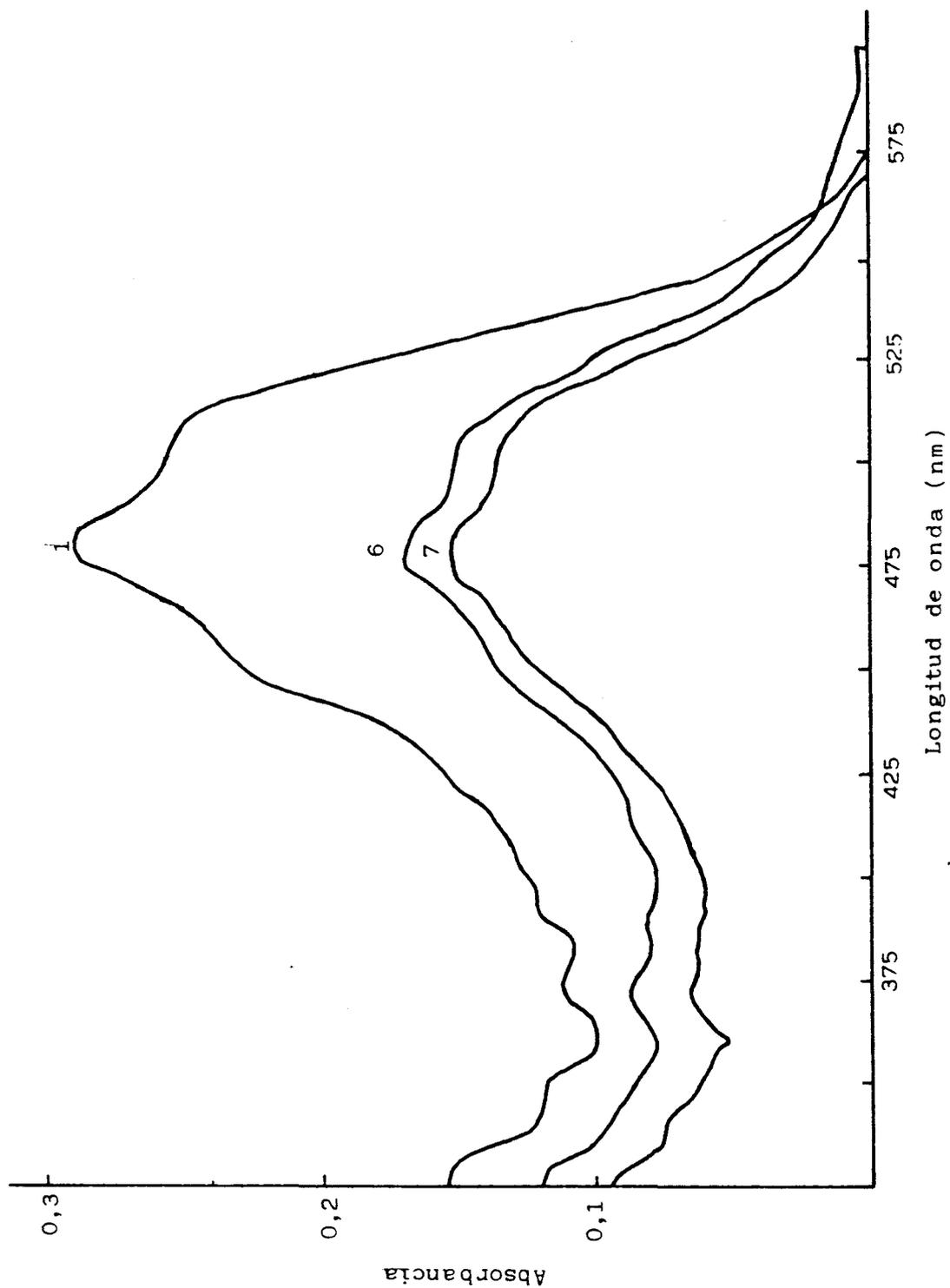


Figura 4. Espectro de absorcion de los extractos crudos en metanol de células crecidas en medio sin tampón (1), con tampón HEPES 10 mM (6) y 30 mM (7). Las medidas corresponden a un barrido de longitud de onda entre 325 y 600 nm

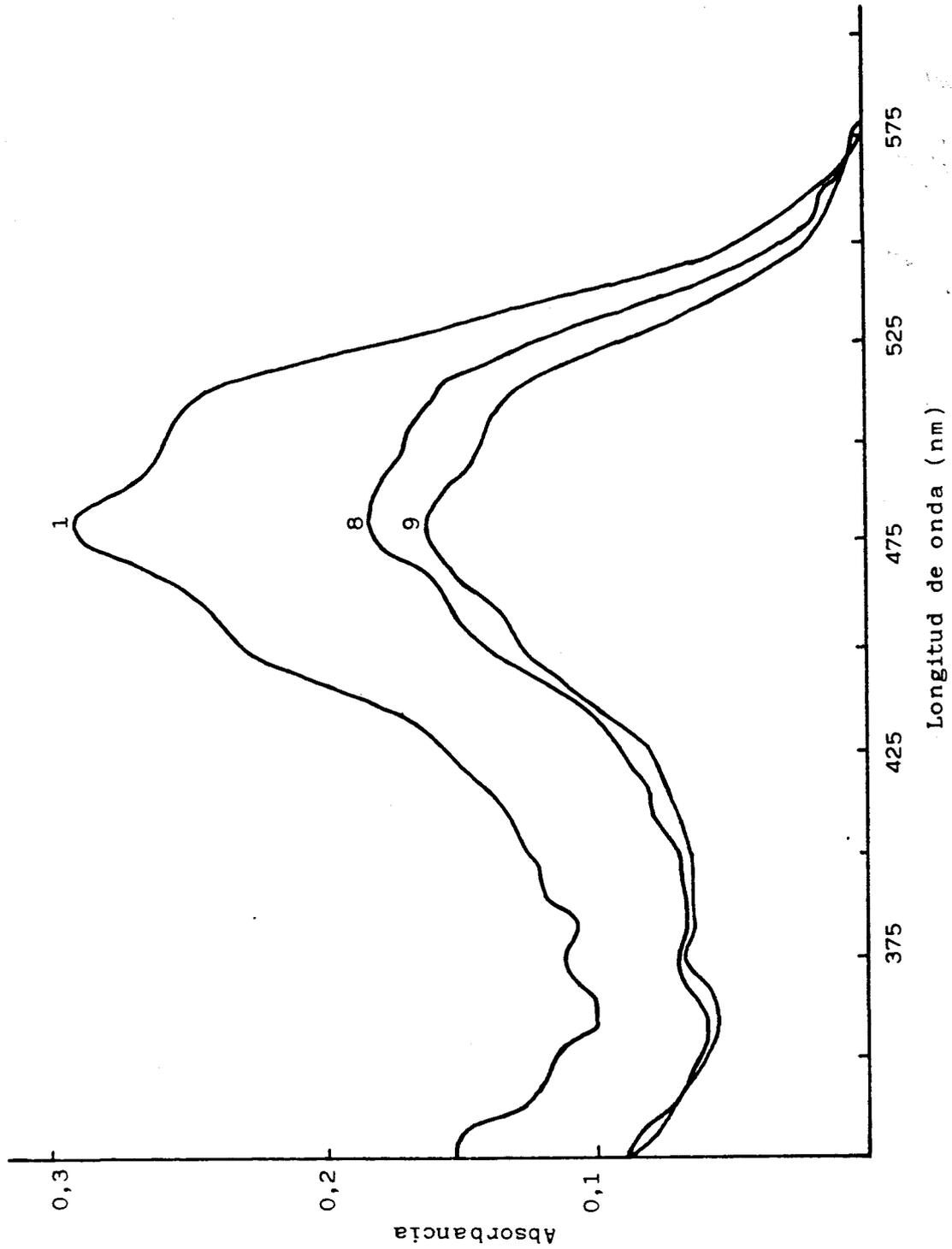


Figura 5. Espectro de absorción de los extractos crudos en metanol de células crecidas en medio sin tampón (1), con tampón Mops 10 mM (8) y 30 mM (9). Las medidas corresponden a un barrido de longitud de onda entre 325 y 600 nm.

RESULTADOS

De estos estudios, y colateralmente, se comprobó que los tampones Hepes y Mops también podían retrasar la fase de autólisis de los cultivos líquidos, si bien el tampón fosfato resultaba ser el más eficaz en la prevención de la lisis. El efecto de estos tampones orgánicos es apreciable a concentraciones de 10 mM. El tampón Tris-ClH tiene una menor influencia en la prevención de la lisis. En las Figuras 6 a 9 se presenta la evolución de los cultivos en las condiciones estudiadas.

Paralelamente al seguimiento de la densidad óptica de los cultivos, se procedió a la medida del pH de los caldos, apreciándose un incremento de su valor a lo largo del crecimiento. Este incremento varió entre 1,34 y 2,58 unidades de pH, siendo más lento, y con valores finales menores, en los tampones con mayor molaridad. El aumento de pH observado puede deberse a la liberación de compuestos nitrogenados, como el ión amonio u otros compuestos aminados, por las células en crecimiento. La mayor molaridad del tampón presente en el medio de cultivo ofrece una mayor capacidad de tamponamiento frente a esta acción.

RESULTADOS

TABLA 1. Relación entre los valores de absorbancia de los extractos crudos en metanol de cultivos líquidos en fase estacionaria y su contenido en proteínas. Los valores entre paréntesis corresponden a la relación entre el medio control, no tamponado, y el medio tamponado correspondiente.

<u>Tampón usado</u>	<u>Δ D.O. 475-480 nm</u>	<u>Δ D.O. 380 nm</u>
Ninguno	0,546	0,206
Fosfato (10mM)	0,300 (1,82)	0,122 (1,68)
Fosfato (30mM)	0,202 (2,70)	0,092 (2,23)
Tris-ClH (10mM)	0,197 (2,77)	0,084 (2,45)
Tris-ClH (30mM)	0,115 (4,74)	0,016 (12,8)
Hepes (10mM)	0,360 (1,51)	0,171 (1,20)
Hepes (30mM)	0,329 (1,66)	0,137 (1,50)
Mops (10mM)	0,394 (1,38)	0,144 (1,43)
Mops (30mM)	0,347 (1,57)	0,140 (1,47)

RESULTADOS

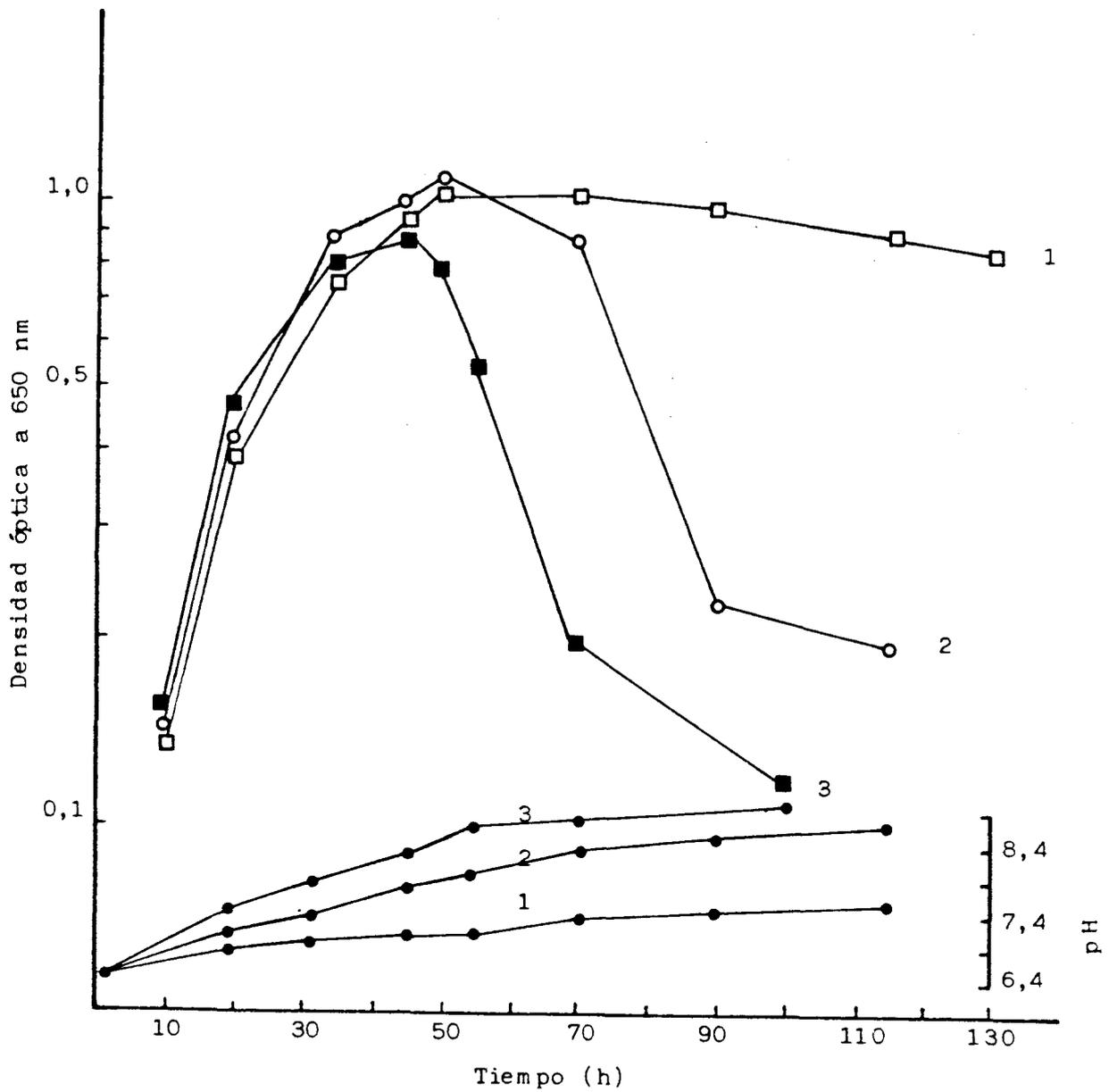


Figura 6. Curvas de crecimiento de *M. coralloides* D en diferentes medios tamponados. Medio con tampón fosfato 30 mM (□,1), 10 mM (○,2) y medio sin tampon (■,3). Las rectas inferiores (1,2,3) representan las variaciones de pH (●) encontradas en los sobrenadantes respectivos.

RESULTADOS

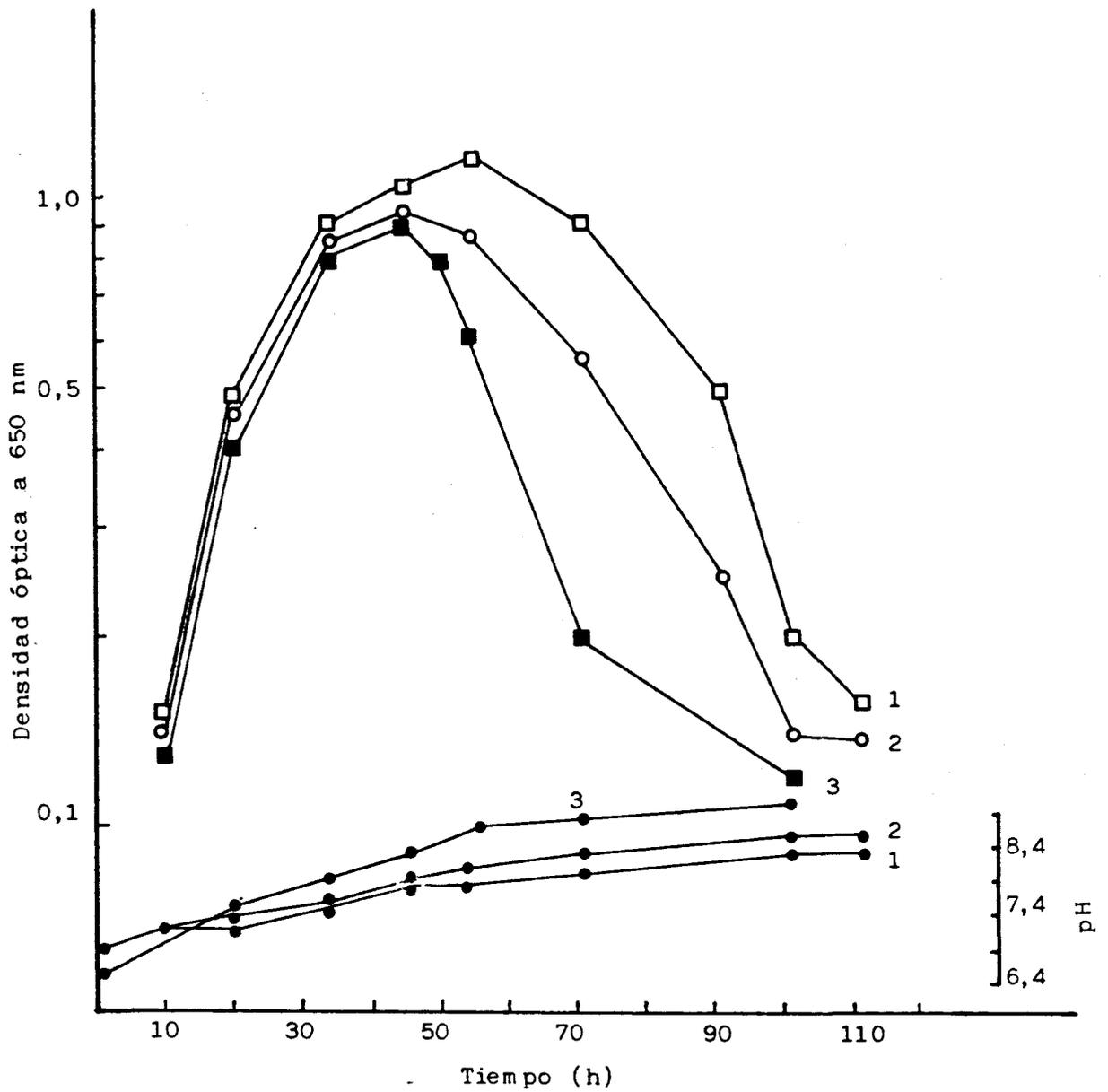


Figura 7. Curvas de crecimiento de *M. coralloides* D en diferentes medios tamponados. Medio con tampón Tris 30 mM (\square ,1), 10 mM (\circ ,2) y sin tampón (\blacksquare ,3). Las rectas inferiores (1,2,3) representan las variaciones de pH (\bullet) encontradas en los sobrenadantes respectivos.

RESULTADOS

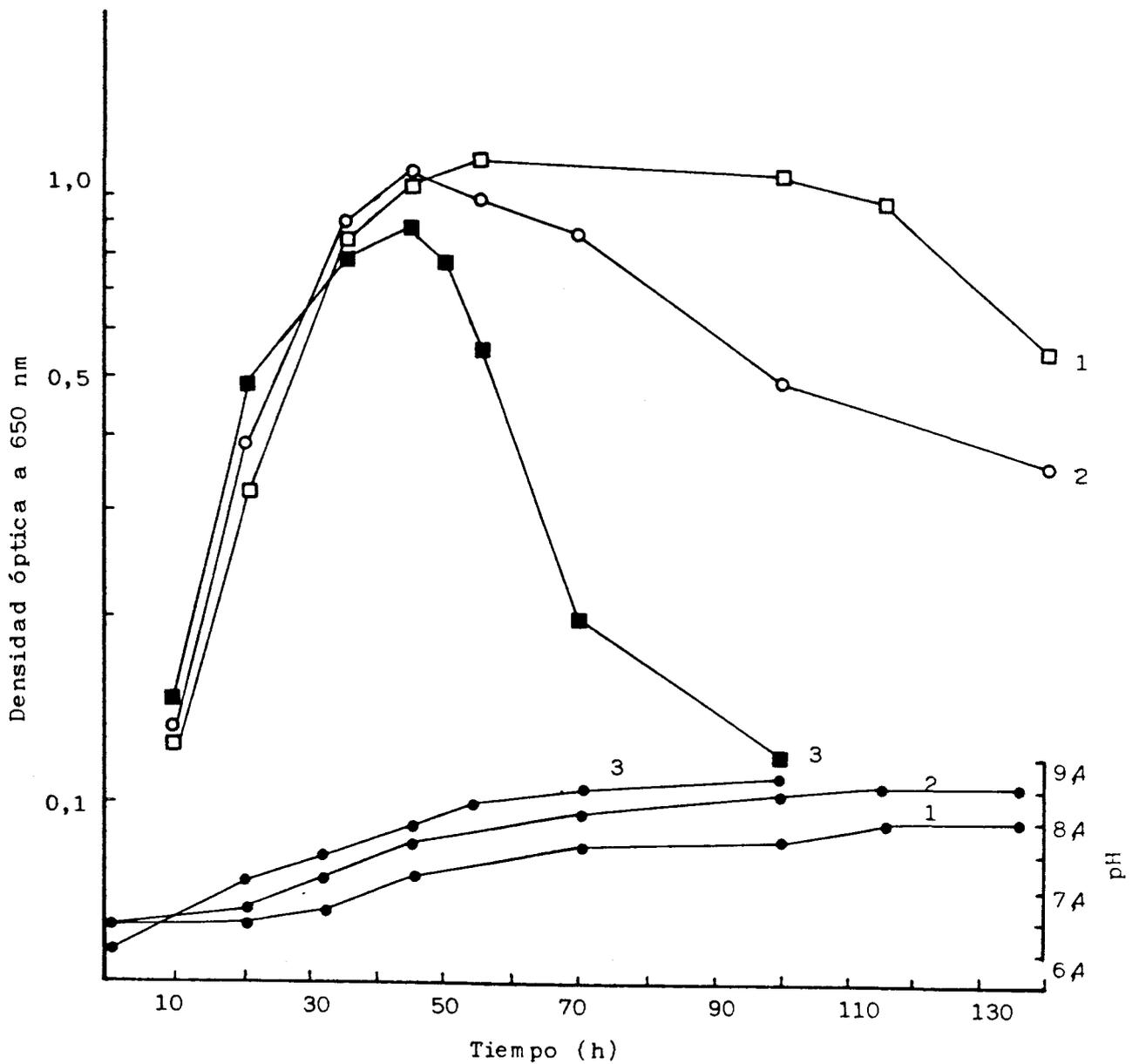


Figura 8. Curvas de crecimiento de *M. coralloides* D en diferentes medios tamponados. Medio con tampón Hepes 30 mM (□,1), 10 mM (○,2), y medio sin tampón (■,3). Las rectas inferiores (1,2,3) representan las variaciones de pH (●) encontradas en los sobrenadantes respectivos.

RESULTADOS

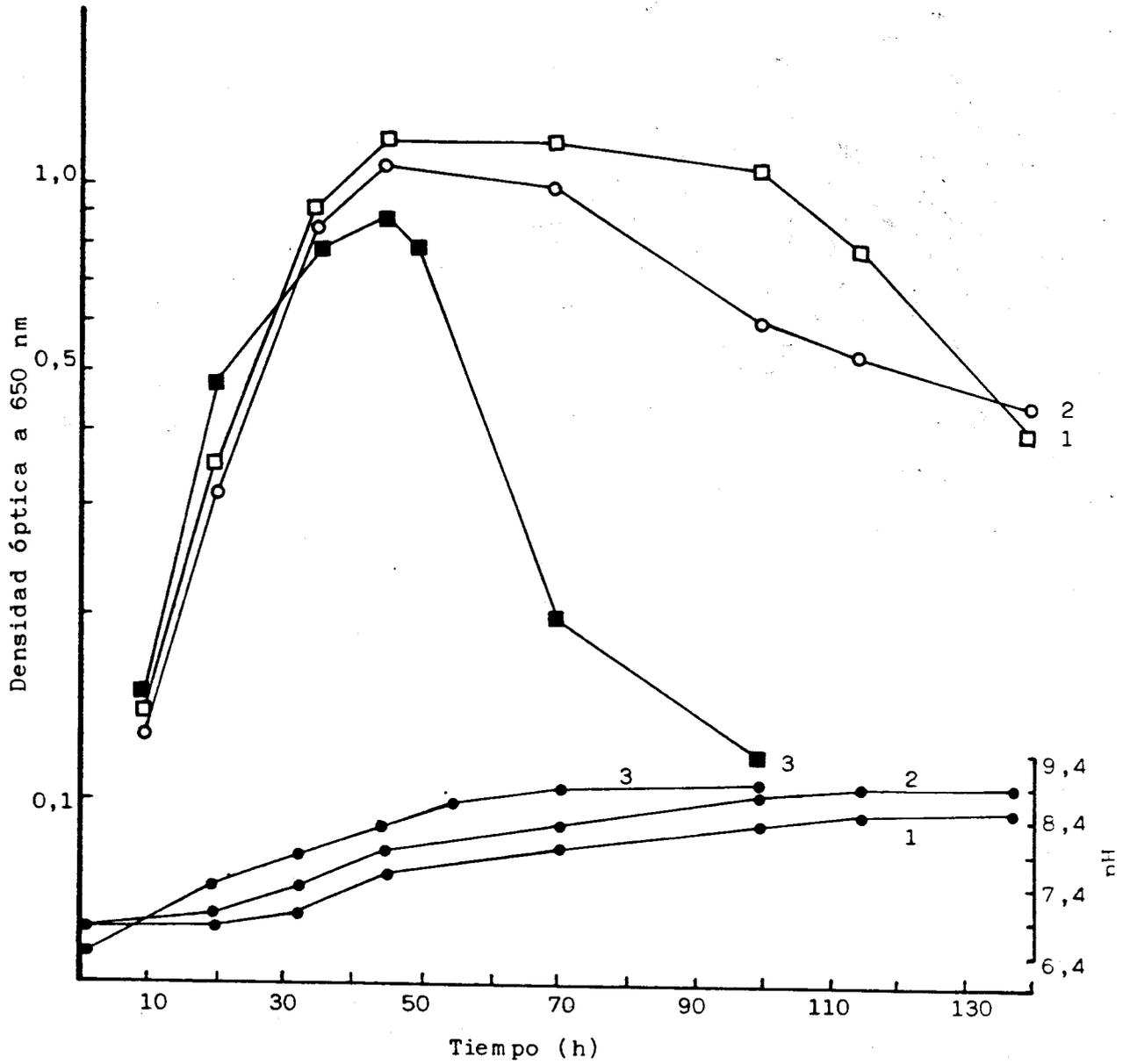


Figura 9. Curvas de crecimiento de *M. coralloides* D en diferentes medios tamponados. Medio con tampón Mops 30 mM (□,1), 10 mM (○,2) y sin tampón (■,3). Las rectas inferiores (1,2,3) representan las variaciones de pH (●) encontradas en los sobrenadantes respectivos.

2. COMPUESTOS FOSFORILADOS EN *Myxococcus caralloides* D

2.1 Determinación de fosfato libre y fosfato polimerizado

La extracción y fraccionamiento de compuestos fosforilados se basa en una metodología convencional que ha sido aplicada a numerosos microorganismos (Sutherland & Wilkinson, 1971). El proceso permite separar en dos grandes fracciones los compuestos fosforilados. Así, se habla de una fracción ácido soluble y otra ácido insoluble.

La primera de ellas se obtiene tras un tratamiento con ácido en frío. Esta fracción contiene nucleótidos, nucleósidos, azúcares, coenzimas, aminoácidos y otros metabolitos de bajo peso molecular junto a una parte del total de fosfato libre o polimerizado de la célula. En concreto, el tratamiento con ácido en frío extrae el fosfato inorgánico libre y los polifosfatos con menos de 25 restos de Pi.

El tratamiento posterior con ácido en caliente permite la extracción de las fracciones mayores de los ácidos nucleicos y de los polifosfatos de mayor tamaño (fracción ácido insoluble).

El proceso de extracción completo requiere partir de una cierta masa celular, en torno a 200 mg, para ello se sembraron matraces de 500 ml, en los casos de cultivos líquidos (Trypticase 0,75% y 0,25%) y lotes de unas 25 placas de medio sólido (Agar Levadura y CTA), para cada uno de las muestras en que se realizaron los procesos de extracción y medida.

A fin de conseguir la mayor homogeneidad posible de las muestras todos los lotes de placas y cultivos líquidos recogidos en cada momento, para cada experiencia, se inocularon a partir de un inóculo líquido común. La siembra en medio sólido se realizó aplicando gotas de 50 μ l sobre las placas de medio (6 gotas por placa). En los estudios de germinación de mixósporas se partió de

RESULTADOS

formas de resistencia inducidas con glicerol. La inducción se llevó a cabo en matraces de 500 ml con el fin de obtener la masa necesaria de mixósporas.

Las muestras obtenidas fueron congeladas a -70°C y reunidas para su tratamiento posterior conjunto. Los resultados corresponden a la media de dos procesos completos e independientes de obtención, extracción, fraccionamiento y medida.

Las determinaciones de fósforo permitieron diferenciar tres fracciones: ortofosfato, fosfato lábil y polifosfatos de cadena larga. El contenido de estas fracciones se expresa, en todos los casos, como $\mu\text{moles Pi/g}$ peso seco de células. El fosfato lábil representa el contenido en fósforo presente, como pirofosfato y en polifosfatos de menor longitud. Las medidas de fósforo total, tras la extracción con ácido frío, permitió comprobar que la fracción ácido soluble-ácido estable era muy pequeña, menor de $2 \mu\text{mol Pi/g}$ peso seco. Esta fracción correspondería a nucleótidos no adsorbidos sobre el carbono activo y por los azúcares fosforilados. El fósforo total detectado, tras la extracción en caliente, indica que la desfosforilación sufrida por los ácidos nucleicos tras este tratamiento, aporta no más de un 5% del valor del fosfato atribuido a los polifosfatos de cadena larga.

La Figura 10 muestra la evolución de las fracciones indicadas durante el crecimiento en medio líquido. En medio con Tripticasa al 0,75% (un medio que permite alcanzar altas densidades celulares), la fracción de polifosfatos de cadena larga, aumentó su contenido durante el crecimiento, especialmente al finalizar la fase exponencial de crecimiento y comienzo de la fase estacionaria. La fracción fosfato lábil mostró un comportamiento más irregular, mientras que el ortofosfato se mantuvo con valores próximos a los $12 \mu\text{mol Pi/g}$ peso seco.

RESULTADOS

En medio con Tripticasa al 0,25%, que permite un crecimiento más pobre, resalta el contenido e incremento mayor de la fracción de polifosfatos durante la fase exponencial, con una posterior disminución en la etapa estacionaria. La fracción fosfato lábil oscila de forma parecida a la anterior, mientras que el ortofosfato fluctua entre 6 y 10 $\mu\text{mol Pi/g}$ peso seco.

El contenido total de estas fracciones da unos valores de 53 a 80 $\mu\text{mol Pi/g}$ peso seco para el primer medio y de 39 a 85 $\mu\text{mol Pi/g}$ para el segundo.

La Figura 11 muestra el contenido de estas mismas fracciones durante el crecimiento de *M. coralloides* D en medio sólido. Los perfiles sobre CTA y Agar Levadura presentan algunas diferencias.

Sobre CTA, donde esta mixobacteria crece vegetativamente, la fracción de ortofosfato sufre un incremento que le lleva a doblar su valor, mientras los polifosfatos disminuyen durante el crecimiento. La fracción fosfato lábil se muestra como la más estable. Sobre Agar-Levadura, donde *M. coralloides* D lleva a cabo un proceso de fructificación, también el ortofosfato sufre un incremento sucesivo en su contenido. Las otras dos fracciones disminuyeron inicialmente para presentar un incremento final que corresponde en el tiempo con el proceso de maduración de los cuerpos fructificantes. El contenido total de las fracciones varía entre 65 y 75 $\mu\text{mol Pi/g}$ peso seco en Agar Levadura y 63 y 75 $\mu\text{mol Pi/g}$ peso seco en CTA.

Los cambios sufridos durante la inducción de mixósporas con glicerol y la germinación de las mismas se muestran en la Figura 12. En la inducción se aprecia una disminución de la fracción de polifosfatos de mayor longitud y un aumento sucesivo en el contenido de las otras dos fracciones. El contenido total muestra ligeras variaciones en torno a 65 $\mu\text{mol Pi/g}$ peso seco. En la germinación, los polifosfatos no sufren variación alguna, mientras se observa un descenso en el contenido de las otras dos fracciones, así como en el total, durante las primeras 8 horas. La fracción fosfato lábil, inicia una recuperación transcurrido este tiempo.

RESULTADOS

En conjunto, y sin entrar en una discusión que se aplaza para un apartado posterior, podemos destacar que el contenido de las tres fracciones analizadas es diferente según que el crecimiento de *M. coralloides* D se realice en medio líquido o sólido. También se observan diferencias para cada medio líquido o sólido en función de su composición. Las variaciones en el contenido de las fracciones durante los procesos de inducción y germinación de mixósporas son cuantitativamente menores.

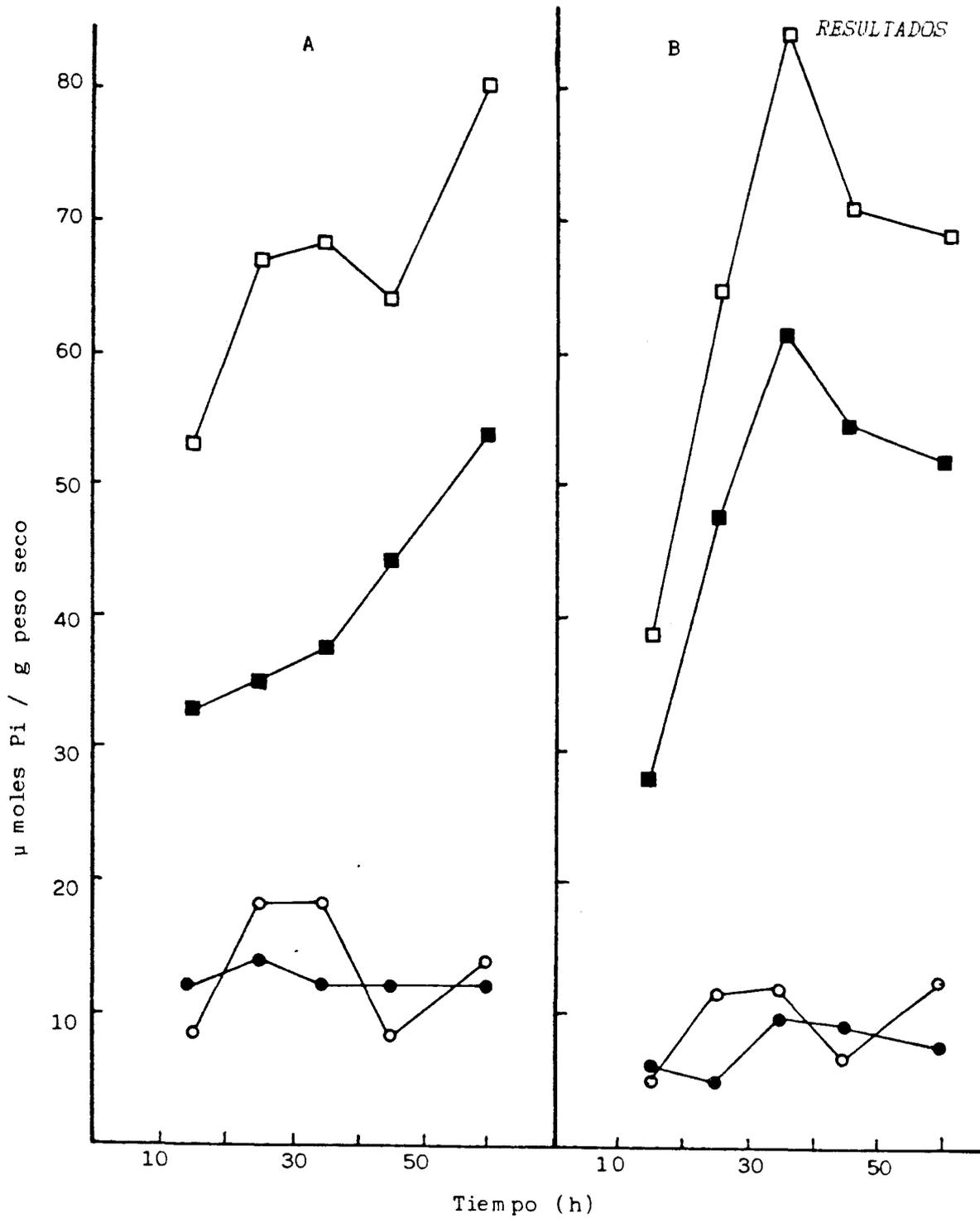


Figura 10. Contenido en compuestos fosforilados de *M. coralloides* D durante su crecimiento en medio líquido Trypticasa 0,75% (A) y Trypticasa 0,25% (B). Los valores se expresan como $\mu\text{moles Pi/g}$ peso seco de células en ortofosfato (●), fosfato lábil (○), polifosfatos ácido insolubles (■) y total de las fracciones anteriores (□).

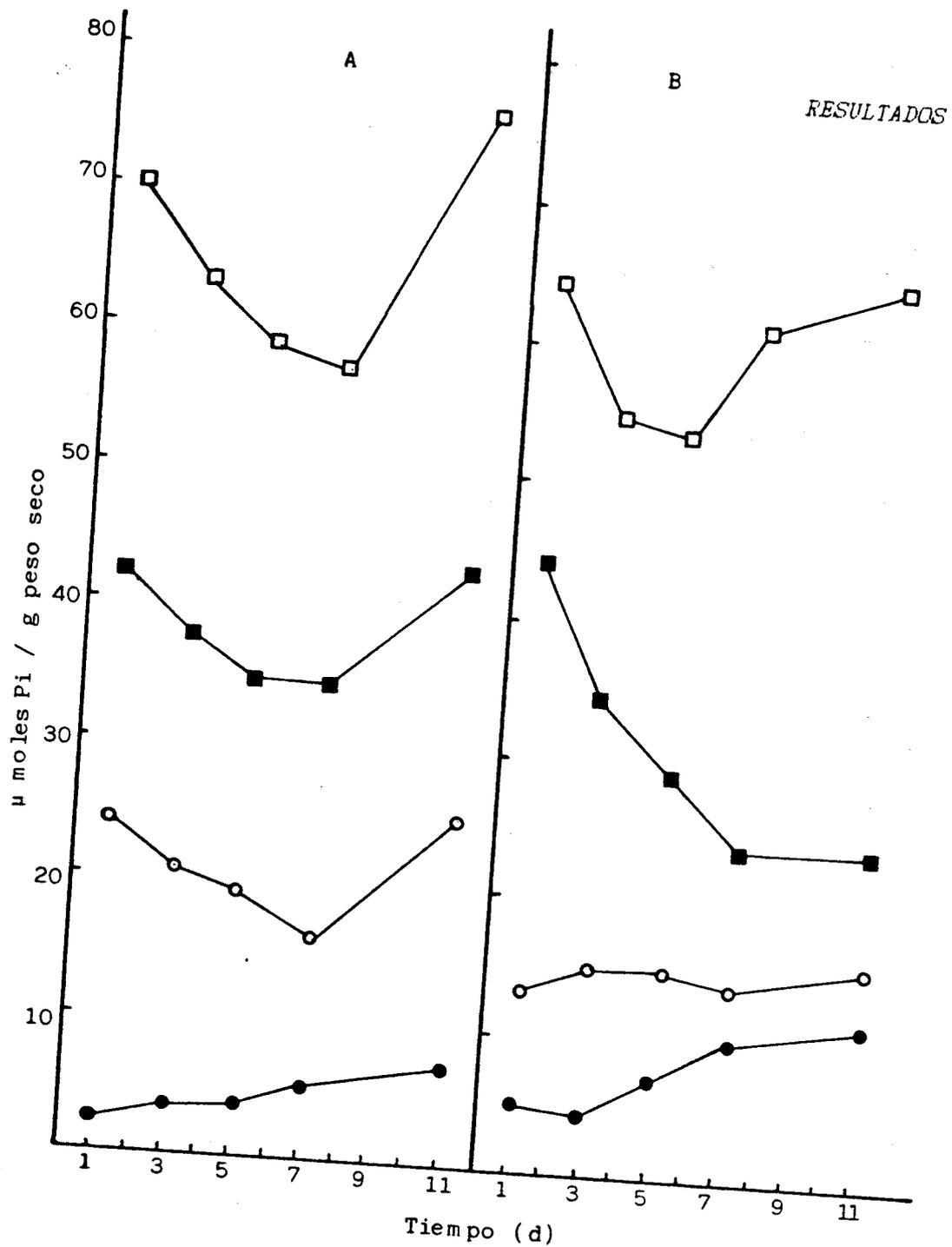


Figura 11. Contenido en compuestos fosforilados de *M. coralloides* D durante su crecimiento en medio sólido Agar levadura (A) y medio CTA (B). Los valores se expresan como μ moles de Pi/g peso seco de células en ortofosfato (●), fosfato lábil (○), polifosfatos ácido insolubles (■) y total de las fracciones anteriores (□).

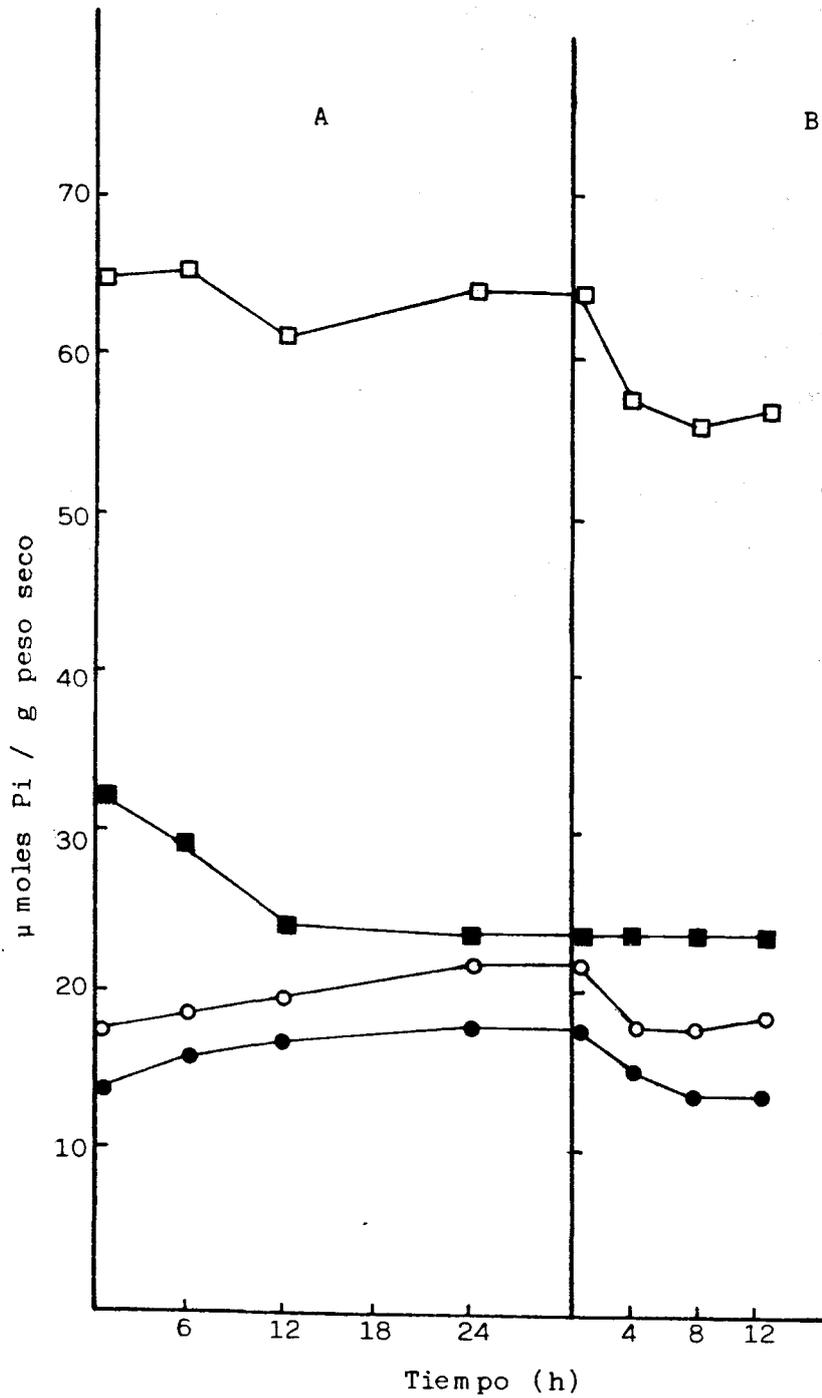


Figura 12. Contenido en compuestos fosforilados de *M. coralloides* D durante la inducción de mixósporas con glicerol (A) y germinación de las mismas (B). Los valores se expresan como $\mu\text{moles Pi/g peso seco}$ de células en ortofosfato (●), fosfato lábil (○), polifosfatos ácido insolubles (■) y total de las fracciones anteriores (□).

2.2 Detección de polifosfatos por microscopía electrónica

La observación al microscopio electrónico de células de *M. coralloides* D crecidas en Tripticasa 0,75% o Tripticasa 0,25% reveló la presencia en ellas de cuerpos densos a los electrones. Los cultivos eran recogidos en fase estacionaria para el primer medio y al final del crecimiento exponencial en el segundo caso.

Los cuerpos de inclusión densos a los electrones se describen como cuerpos de polifosfatos (Harold, 1966; Kulaev & Vagabov, 1983). Estos cuerpos de inclusión se localizaron principalmente en el nucleoplasma de las células de *M. coralloides* D.

El número de gránulos varió entre 1 y 4. Este último número solo se encontró en células crecidas sobre Tripticasa 0,25%. El número más común encontrado en ambos tipos de cultivos fue de uno o dos gránulos por célula.

La Figura 13 muestra una célula crecida sobre Tripticasa 0,25% que presenta cuatro gránulos de polifosfatos y la Figura 14 muestra una célula cultivada en el mismo medio con dos gránulos de polifosfatos de gran tamaño.

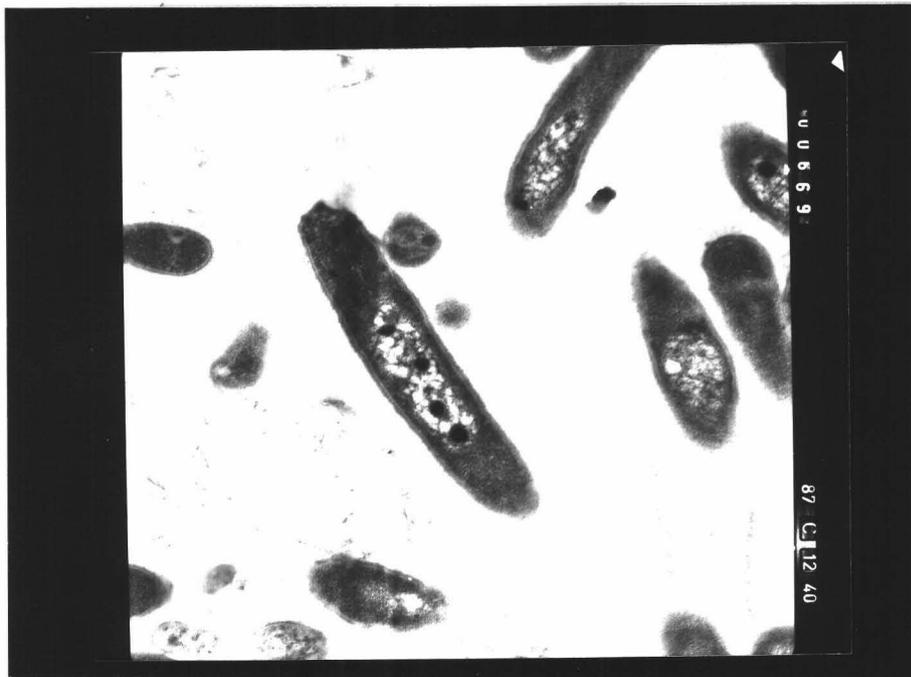


Figura 13. Observación a microscopio electrónico de células de *M. coralloides* D presentando inclusiones de polifosfatos. 31.500x.

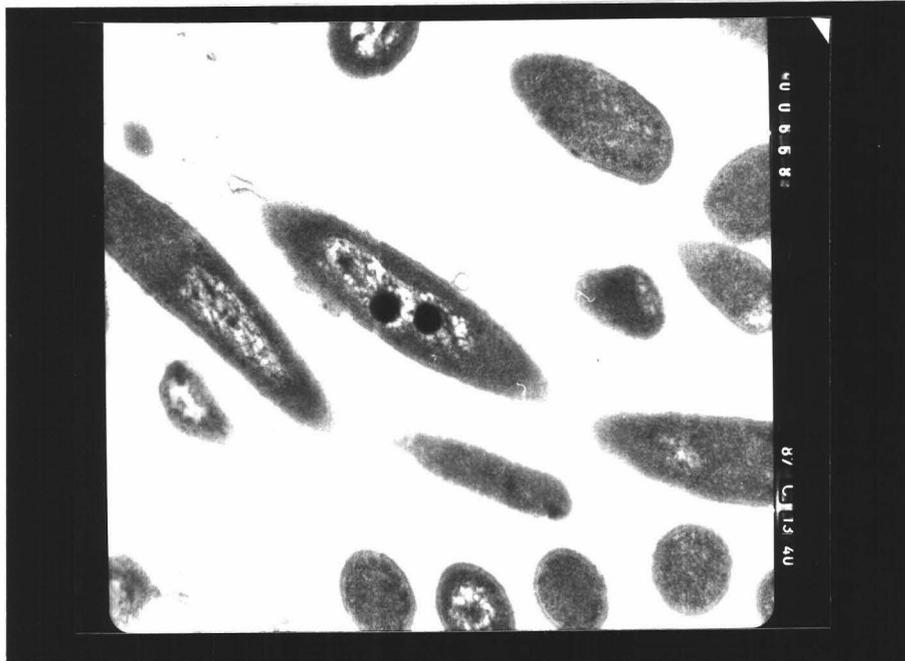


Figura 14. Observación a microscopio electrónico de células de *M. coralloides* D presentando inclusiones de polifosfatos. 40.000x

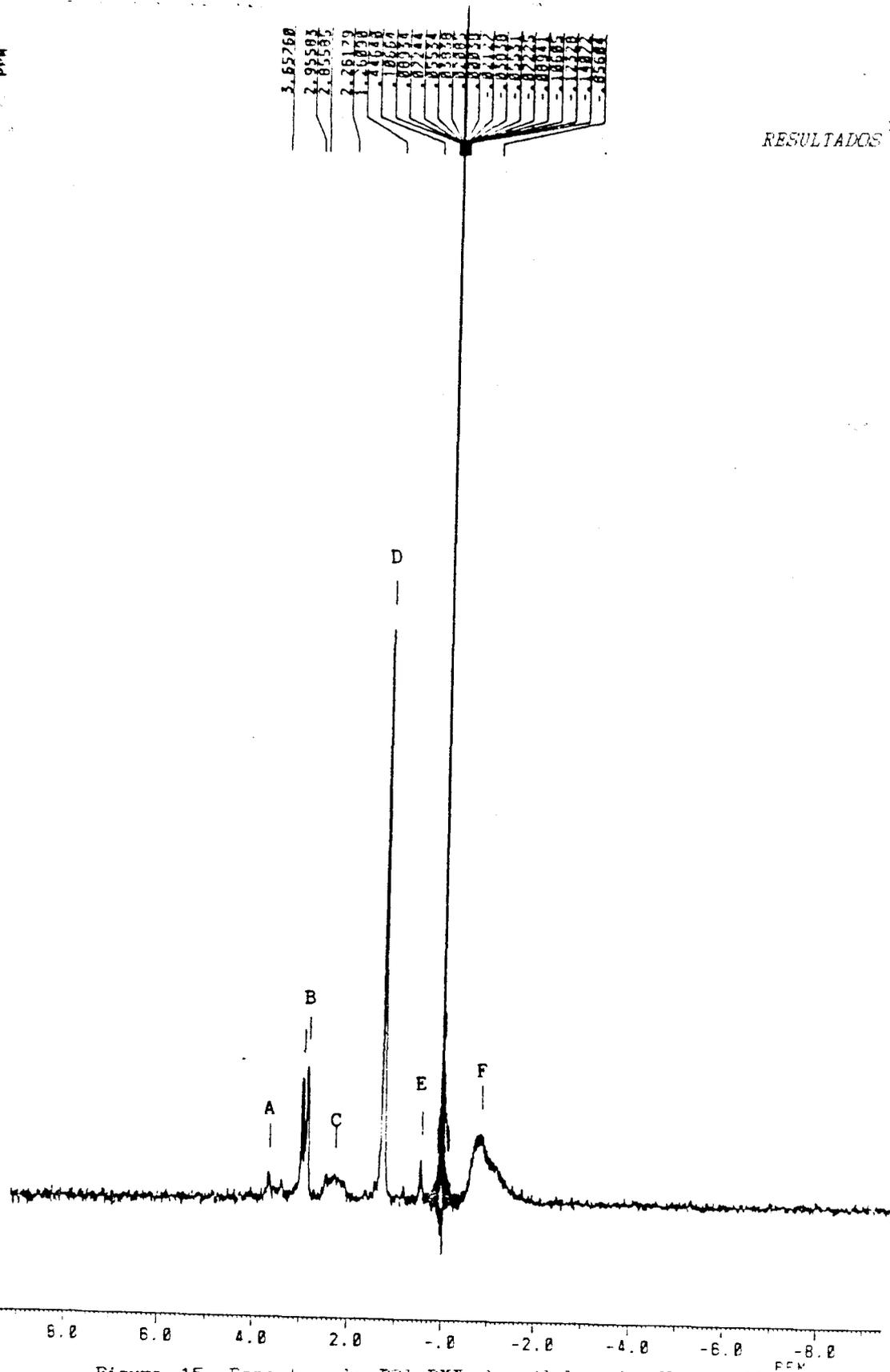
2.3 Detección de compuestos fosforilados por RMN

La Figura 15 muestra el espectro de P^{31} -RMN de suspensiones celulares de *M. coralloides* D recogidas al final del crecimiento exponencial en medio Tripticasa 0,75%. Las señales reconocidas se asignan como azúcares fosforilados (3,65 ppm, 2,95 ppm y 2,85 ppm), probablemente fructosa-1,6-difosfato y fructosa-6-fosfato; la señal a 2,26 ppm se describe como AMP o 3-fosfoglicerato, el pico a 1,26 ppm corresponde a fosfato inorgánico y la señal a 0,44 ppm corresponde a glicerol-3-fosforiletanolamina y glicerol-3-fosforilserina. La señal detectada a -0,85 ppm se asigna a fosfatidilcolina y fosfoenolpiruvato.

La Figura 16 muestra el espectro de P^{31} -RMN de un extracto celular obtenido por sonicación y posterior centrifugación de células de *M. coralloides* D crecidas en iguales condiciones que anteriormente. La señal a 3,13 ppm es probablemente fructosa-1,6-difosfato, el fosfato inorgánico se asigna a 1,59 ppm y las señales a 0,43 ppm y -0,89 ppm se corresponden como en el caso anterior a glicerol-3-fosforiletanolamina y glicerol-3-fosforilserina para la primera señal y fosfatidilcolina y fosfoenolpiruvato para la segunda. En este caso se detecta una señal a -7,77 que se describe en la bibliografía como debida al grupo β -fosfato del ADP y al γ -fosfato del ATP.

En conjunto los espectros permiten detectar la presencia del fósforo celular en sus diferentes formas, libre como ortofosfato o ligado en fosfomonoésteres y fosfodiésteres. Resalta que la detección de nucleótidos solo se realiza en extractos celulares pero no en células enteras. La detección del fósforo en forma no soluble, como en los polifosfatos, ADN y ARN que forman grandes moléculas, no es posible con el uso de la espectroscopia de RMN en las condiciones de trabajo empleadas.

PPM



RESULTADOS

Figura 15. Espectro de ^{31}P -RMN de células de *M. coralloides* D al final de su crecimiento exponencial. Las señales corresponden con: A, B y C, azúcares fosforilados; D, fosfato inorgánico; E, glicerol-3-fosforiletanolamina y glicerol-3-fosforilserina; F, fosfatidilcolina y fosfoenolpiruvato.

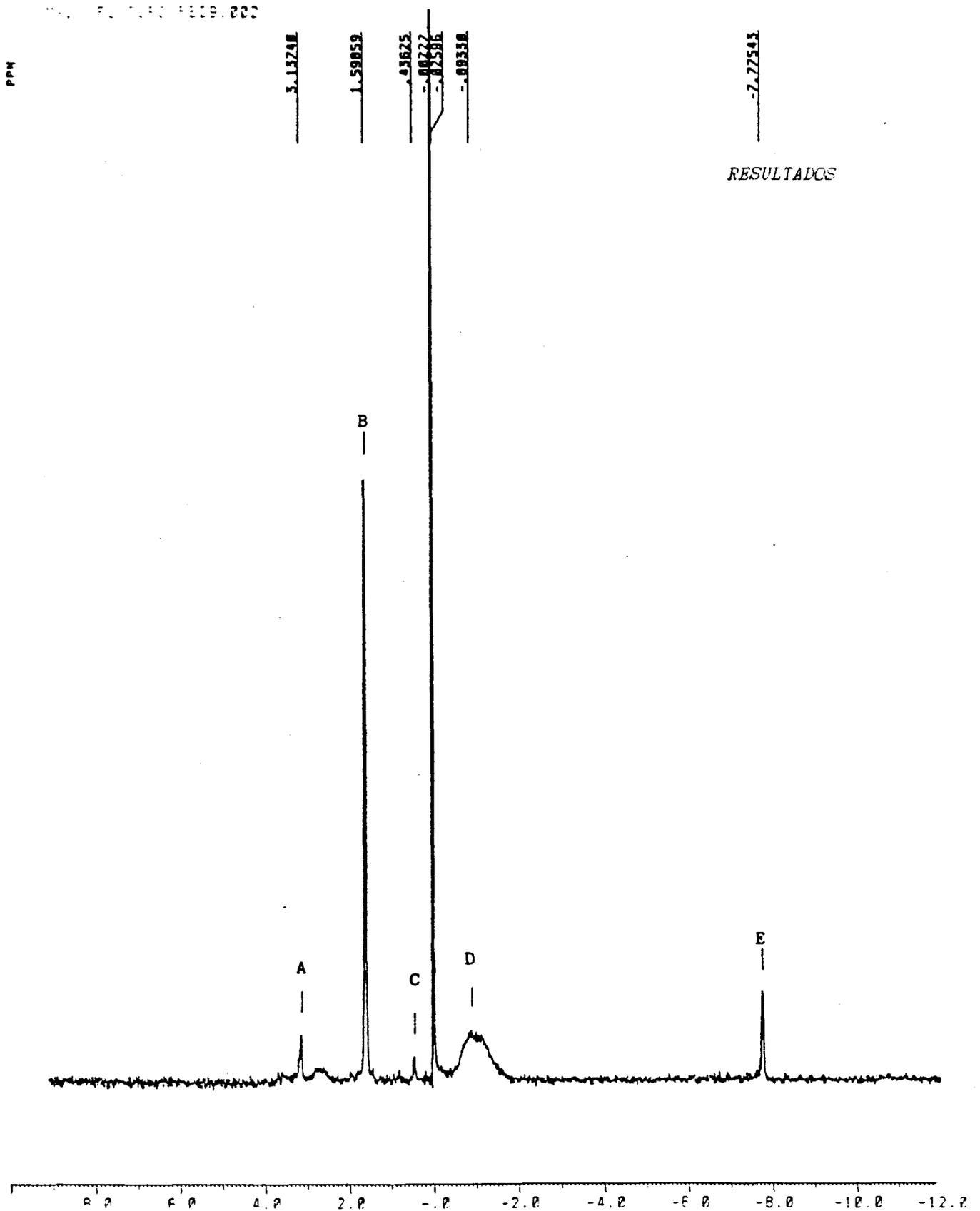


Figura 16. Espectro de P^{31} -RMN de extractos celulares de *M. coralloides* D al final de su crecimiento exponencial. Las señales corresponden con: A, azúcares fosforilados; B, fosfato inorgánico; C, glicerol-3-fosforiletanolamina y glicerol-3-fosforilserina; D, fosfatidilcolina y fosfoenolpiruvato; E, ADP y ATP.

2.4 Estudio de la carga adenilada en los ciclos de vida de *Nyxococcus coralloides* D

Los nucleótidos adenilados constituyen una fracción de los ésteres fosfato simple de gran importancia en la célula. Dado que el ATP, ADP y AMP constituyen el sistema energético celular, el estudio de sus niveles y de la carga energética adenilada, definida como la relación $(ATP) + \frac{1}{2}(ADP)/(ATP) + (ADP) + (AMP)$, puede ser útil para el conocimiento del estado metabólico de las células de esta mixobacteria durante las diferentes etapas de su ciclo de vida.

Los resultados derivados de los procesos de extracción de nucleótidos adenilados y medida de ATP por ensayo de bioluminiscencia, según se detalló en el capítulo de Material y Metodos, se muestran en las Tablas 3, 4 y 5. El contenido en ATP, ADP y AMP se expresa como $\mu\text{g}/10^8$ células. La carga energética adenilada se expresa como el cociente definido anteriormente.

La Tabla 2 presenta los resultados obtenidos durante el crecimiento vegetativo en un medio líquido rico (Trypticasa 0,75%) y en otro con una menor concentración de nutrientes (Trypticasa 0,25%). En el primer caso la carga energética adenilada oscila entre 0,82 y 0,84, mientras que en el segundo medio obtenemos valores de 0,60 a 0,63. El crecimiento en este medio es más pobre y provoca, también, un contenido menor en ATP y mayores niveles de ADP y AMP.

En los estudios de carga energética adenilada en medio sólido y a pesar de los diferentes formas de crecimiento que se dan en los tres medios sólidos utilizados, la carga energética hallada fue en todos los casos muy similar, oscilando entre 0,72 y 0,82 (Tabla 3). Tan solo a los siete días de crecimiento sobre medio Agar levadura se detectó una disminución en los valores de la carga energética, paralelamente a la aparición de los cuerpos fructificantes. La posterior maduración de estos (días 8-11 y sucesivos) provocó una ligera bajada en el valor de carga energética, que se estabilizó en

RESULTADOS

0,65. El contenido en ATP, ADP y AMP detectado sobre los medios con Agar Levadura fue algo superior al presente en el medio CTA.

La inducción de mixósporas con glicerol 0,5 M, provoca un proceso de diferenciación celular que imita en algunas etapas al proceso ocurrido durante la vía normal de desarrollo de las mixobacterias. Las formas de resistencia obtenidas tras este proceso de inducción y las formadas naturalmente, en el interior de los cuerpos fructificantes, pueden restaurar el crecimiento vegetativo tras el proceso de germinación. Los valores mostrados en la tabla 4 indican que no hay cambios significativos en la carga energética en el transcurso de estos procesos de inducción y germinación.

El valor de la carga energética de las mixósporas de glicerol es solo 1,2 veces superior al encontrado en las mixósporas de cuerpos fructificantes. Los valores de carga energética no sufrieron modificaciones tras el envejecimiento de estas formas de resistencia durante tres semanas. Por otro lado el valor de 0,65 presente en las mixósporas de cuerpos fructificantes aumentó rápidamente hasta 0,82 durante las primeras etapas de la germinación.

En conjunto, se aprecia que los niveles de carga energética adenilada permanecen constantes, con muy escasas variaciones, durante todo el ciclo de vida de *M. coralloides* D.

RESULTADOS

TABLA 2. Contenido en nucleótidos adenilados y carga energética adenilada de células de *M. coralloides* D durante su crecimiento en medio líquido.

Medio con Tripticasa al 0,75%

Tiempo cultivo (h)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E ^b
10	13,71	3,88	1,00	18,59	3,53	0,84
24	14,31	3,93	1,58	19,82	3,64	0,82
34	16,72	3,72	1,52	21,96	4,75	0,84
48	16,80	3,20	1,91	21,91	5,25	0,83
55	16,60	3,72	1,74	22,06	4,46	0,83
80	4,85	6,44	2,68	13,97	0,75	0,57

Medio con Tripticasa al 0,25%

Tiempo cultivo (h)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E ^b
10	9,25	7,12	4,00	20,37	1,29	0,63
24	9,20	7,16	4,90	21,26	1,28	0,60
34	10,14	7,31	4,52	21,97	1,38	0,63
48	9,27	7,32	4,90	21,49	1,26	0,60
55	9,83	7,60	4,70	22,13	1,29	0,61
80	4,42	9,25	6,41	16,08	0,47	0,56

^a Expresado como $\mu\text{g}/10^8$ células

^b Carga energética dada como $(\text{ATP}) + \frac{1}{2}(\text{ADP}) / (\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})$

RESULTADOS

TABLA 3. Contenido en nucleótidos adenilados y carga energética adenilada de células de *M. coralloides* D durante su crecimiento en medio sólido.

Medio CTA

Tiempo cultivo (d)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E ^b
1	12,25	4,15	1,85	18,25	2,95	0,78
3	14,10	4,27	1,92	20,29	3,30	0,80
5	11,15	5,01	1,87	18,03	2,22	0,75
7	10,15	4,85	1,95	16,95	2,09	0,74
11	9,17	4,66	1,93	15,76	1,96	0,72

Medio ALP

Tiempo cultivo (d)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E ^b
1	18,67	5,41	2,01	26,09	3,27	0,82
3	19,49	5,75	2,11	27,35	3,38	0,82
5	19,51	6,00	2,23	27,74	3,25	0,81
7	17,49	5,71	2,40	25,60	3,06	0,79
11	17,45	5,72	2,14	25,31	3,05	0,80

Medio Agar Levadura

Tiempo cultivo (d)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E ^b
1	18,76	5,11	1,93	25,80	3,67	0,82
3	21,73	6,77	2,15	30,65	3,20	0,82
5	20,74	7,74	3,05	31,53	2,67	0,78
7	15,71	10,76	4,00	30,47	1,79	0,69
11	12,65	12,12	3,91	28,68	1,38	0,65

^a Expresado como µg/10⁸ células

^b Carga energética dada como (ATP) + ½(ADP)/(ATP)+(ADP)+(AMP)

RESULTADOS

TABLA 4. Contenido en nucleótidos adenilados y carga energética adenilada durante los procesos de inducción y germinación de mixósporas de *M. coralloides* D.

Inducción de mixósporas con glicerol

Tiempo (h)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E. ^b
0	16,72	3,72	1,52	21,96	4,75	0,84
4	15,85	3,75	1,57	21,17	4,22	0,84
8	15,73	3,64	1,55	20,92	4,32	0,84
12	14,31	3,65	1,49	19,45	3,92	0,83
24	14,12	3,38	1,45	19,45	4,17	0,81

Germinación de mixósporas de glicerol

Tiempo (h)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E. ^b
0 ^c	13,77	3,43	1,41	18,61	4,01	0,83
4	12,10	3,11	1,20	16,41	3,89	0,83
8	13,20	3,10	1,21	17,51	4,25	0,84
12	13,89	3,99	1,60	19,48	3,48	0,81

Germinación de mixósporas de cuerpos fructificantes

Tiempo (h)	ATP ^a	ADP ^a	AMP ^a	Total	ATP/ADP	C.E. ^b
0 ^c	10,98	12,05	3,01	26,04	0,91	0,65
4	13,01	4,12	1,12	18,25	3,15	0,82
8	13,42	3,87	1,12	18,66	3,46	0,82
12	13,25	3,90	1,11	18,26	3,39	0,83

^a Expresado como $\mu\text{g}/10^8$ células

^b Carga energética dada como $(\text{ATP}) + \frac{1}{2}(\text{ADP}) / (\text{ATP}) + (\text{ADP}) + (\text{AMP})$

^{c-c'} Valores presentes en mixósporas de glicerol y de cuerpos fructificantes, respectivamente, desecadas durante tres semanas

3. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD HEXOQUINASA EN *Nyxococcus coralloides* D

Recordemos dos aspectos citados en la introducción. Por una parte, comentábamos que era improbable que *M. xanthus* utilizara la vía glucolítica para la conversión de la glucosa en piruvato. En *M. xanthus* se ha descrito una hexoquinasa dependiente de PPi, pero no se ha encontrado actividad hexoquinasa dependiente de ATP. De otra parte, y al considerar el papel de los polímeros de fosfato inorgánico en la célula, indicábamos que estas formas polimerizadas juegan un cierto papel en el metabolismo energético celular.

Así, la actividad hexoquinasa dependiente de PPi encontrada en *M. xanthus* no es un caso aislado, sino uno más de las descripciones de enzimas que utilizan formas alternativas al ATP como fuente de energía en los procesos del metabolismo celular. Sin embargo, la actividad hexoquinasa ATP dependiente ha sido descrita en otras mixobacterias como *Polyangium cellulorum* (Sarao et al., 1985), *Stigmatella brunnea* (McCurdy & Khouw, 1969) y *Corallocooccus* (*Myxococcus*) *coralloides* Cc c127 (Irschik & Reichenbach, 1985).

Por todo ello, nos pareció de interés el estudio de la actividad hexoquinasa en *M. coralloides* D.

La tabla 5 muestra los valores de actividad hexoquinasa ATP, PPi y polifosfato dependiente encontrados en extractos libres de células de *M. coralloides* D.

Como podemos observar, se detectó la presencia de actividad hexoquinasa ATP y polifosfato dependiente, pero no se encontró actividad PPi dependiente. La actividad ATP-dependiente detectada es 5 veces mayor que la actividad polifosfato-dependiente. Estos resultados confirman la actividad hexoquinasa ATP dependiente encontrada en otras razas de *M. coralloides* (Irschik & Reichenbach, 1985). Sin embargo, la actividad PPi dependiente, descrita en *M. xanthus*, no fue detectada en este caso, aunque si se detectó una actividad dependiente de polifosfato.

RESULTADOS

TABLA 5. Actividad hexoquinasa en extractos libres de células de *M. coralloides* D.

<u>Enzima</u>	<u>Actividad^a</u>
ATP-hexosa-6-fosfotransferasa	44
PPi-hexosa-6-fosfotransferasa	0
Polifosfato-hexosa-6-fosfotransferasa	8,5

^a Expresada como nmoles de NADPH producidos por minuto y mg de proteína

4. ESTUDIOS PREVIOS SOBRE PRODUCCION DE FOSFATASAS

4.1 Ensayos de actividad fosfatasa *in situ*

Las células permeabilizadas proporcionan un sistema adecuado para un ensayo rápido de los enzimas celulares. La porosidad de las envueltas celulares puede verse aumentada por el tratamiento con diversos agentes, detergentes y alcoholes o mezclas de ambos. El incremento en la porosidad celular permite la entrada a la célula de sustratos a los que usualmente no es permeable.

Diversos agentes han sido utilizados para permeabilizar células vegetativas, mixósporas de glicerol y de cuerpos fructificantes de *M. coralloides* D. El efecto de cada agente sobre la actividad en células vegetativas fue comparado con la actividad detectada en extractos libres de células no permeabilizadas y en extractos libres de células previamente tratados. Las concentraciones en % (v/v) se indicaron en el correspondiente apartado del capítulo de Material y Métodos.

De todos los agentes utilizados, el tolueno fue el más efectivo para permeabilizar las células vegetativas de *M. coralloides* D. Estos resultados se muestran en las Tablas 6 y 7. El tratamiento con este agente permitió detectar el 60% de la actividad fosfatasa ácida y el 66% de la actividad alcalina presente en los extractos control. Su empleo disminuyó en solo un 5-12% la actividad enzimática como mostraron los extractos control permeabilizados. Los resultados muestran las actividades detectadas tras 5 minutos de exposición al agente permeabilizante.

En las tablas 8 y 9 se muestra que el dimetilsulfóxido (DMSO) y el tolueno son los agentes más efectivos para permeabilizar las mixósporas de glicerol y de cuerpos fructificantes. En este caso el tratamiento se prolongó por 15 minutos. El tratamiento durante 5

RESULTADOS

minutos permitió detectar una actividad algo menor, en torno al 60% de la obtenida tras una exposición de 15 min. La prolongación por más de 20-25 min produjo algunos problemas en la recogida de las mixósporas tratadas, provocando dificultades en la reproducción de los resultados tras varios ensayos. En el estudio de las mixósporas no se llevaron controles con extractos celulares dada la dificultad encontrada para poder romper estas formas de resistencia; así la elección del agente permeabilizante se realizó en base a la relación entre las actividades detectadas tras el tratamiento con cada uno de ellos.

Dado que el tolueno permitía obtener buenos resultados con las tres formas celulares y su toxicidad es menor que la del DMSO, se eligió a esta sustancia para la permeabilización celular en los ensayos de actividad fosfatasa *in situ*.

RESULTADOS

Tabla 6. Actividad fosfatasa ácida en células vegetativas de *M. coralloides* D tratadas con diferentes agentes permeabilizantes.

Agente	Fosfatasa ácida ^a		%Control no permeabilizado	
	<i>in situ</i>	control permeab.	<i>in situ</i>	c.permeab.
SDS	0,044	0,063	8	12
TritonX-100	0,068	0,087	12	16
Eter etílico	0,248	0,583	46	71
DMSO	0,296	0,388	55	72
Tolueno	0,327	0,388	60	72
Metanol	0,259	0,350	50	65
Tol-Met.	0,251	0,353	46	65
TET ^b 5:4:1	0,064	0,082	12	15
TET 3:4:1	0,047	0,087	9	16
TET 1:4:0,2	0,055	0,120	10	22
Etanol	0,246	0,392	45	72
Cloroformo	0,265	0,403	49	75
2-propanol	0,261	0,330	48	61
Isoamílico	0,270	0,396	50	73

^a Actividad específica dada como $\Delta D.O.410nm/min.mg$ proteína

^b Tolueno-Etanol-Tritón X-100

RESULTADOS

Tabla 7. Actividad fosfatasa alcalina en células vegetativas de *M. coralloides* tratadas con diferentes agentes permeabilizantes.

Agente	Fosfatasa alcalina ^a		%Control no permeabilizado	
	<i>in situ</i>	control permeab.	<i>in situ</i>	c.permeab.
SDS	0,017	0,018	6	6
TritonX-100	0,036	0,037	12	13
Eter etílico	0,106	0,121	37	42
DMSO	0,124	0,151	43	53
Tolueno	0,188	0,203	66	71
Metanol	0,186	0,215	65	75
Tol-Met.	0,181	0,224	63	78
TET ^b 5:4:1	0,036	0,041	12	14
TET 3:4:1	0,032	0,038	11	13
TET 1:4:0,2	0,021	0,028	7	10
Etanol	0,087	0,201	30	70
Cloroformo	0,082	0,174	29	61
2-propanol	0,128	0,186	45	65
Isoamílico	0,086	0,178	30	62

^a Actividad específica dada como $\Delta D_{0.410nm}/\text{min.mg}$ proteína

^b Tolueno-Etanol-Triton X-100

RESULTADOS

Tabla 8. Actividad fosfatasa ácida y alcalina en mixósporas de glicerol de *M. caralloides* D tratadas con diferentes agentes permeabilizantes.

Agente	Fosfatasa ácida*		Fosfatasa alcalina*	
	<i>in situ</i>	% máxima	<i>in situ</i>	% máxima
SDS	0,022	18	0,013	21
TritonX-100	0,036	29	0,019	31
Eter etílico	0,106	85	0,051	84
DMSO	0,125	100	0,061	100
Tolueno	0,125	100	0,060	98
Metanol	0,117	94	0,057	93
Tol-Met.	0,106	85	0,057	93
TET ^b 5:4:1	0,036	29	0,022	36
TET 3:4:1	0,023	18	0,013	21
TET 2:4:1	0,022	18	0,015	25
TET 1:4:0,2	0,018	14	0,010	16
Etanol	0,100	80	0,055	90
Cloroformo	0,082	66	0,050	82
2-propanol	0,092	74	0,049	80
Isoamilico	0,098	78	0,055	90

* Actividad específica dada como $\Delta D.O.410nm/min.mg$ proteína

^b Tolueno-Etanol-Triton X-100

RESULTADOS

Tabla 9. Actividad fosfatasa ácida y alcalina en mixósporas de cuerpos fructificantes de *M. coralloides* D tratadas con diferentes agentes permeabilizantes.

Agente	Fosfatasa ácida*		Fosfatasa alcalina*	
	<i>in situ</i>	% máxima	<i>in situ</i>	% máxima
SDS	0,013	21	0,005	19
Triton	0,016	26	0,010	38
Eter etílico	0,055	90	0,024	92
DMSO	0,060	98	0,026	100
Tolueno	0,061	100	0,025	96
Metanol	0,057	93	0,024	92
Tol-Met.	0,059	97	0,025	96
TET ^b 5:4:1	0,009	15	0,005	19
TET 3:4:1	0,010	16	0,005	19
TET 2:4:1	0,010	16	0,004	15
TET 1:4:0,2	0,012	20	0,004	15
Etanol	0,049	80	0,022	85
Cloroformo	0,047	77	0,021	80
2-propanol	0,050	82	0,021	80
Isoamilico	0,052	85	0,020	77

* Actividad específica dada como $\Delta D.0.410\text{nm}/\text{min. mg proteína}$

^b Tolueno-Etanol-Triton X-100

4.4.2 Medios de crecimiento y producción

Los medios líquidos habituales para el crecimiento disperso de las mixobacterias están constituidos por hidrolizados de proteínas. De forma similar los medios definidos descritos para algunas especies se componen básicamente de aminoácidos, con un aporte adicional de vitaminas y sales.

Se ensayaron diversos medios líquidos de crecimiento constituidos por hidrolizados de proteínas (peptonas), extracto de levadura y proteínas microbianas. *M. coralloides* D creció deficientemente en hidrolizados ácidos de caseína (Casaminoácidos, Difco) y extracto de levadura (BBL). El crecimiento fue muy superior sobre diversos hidrolizados enzimáticos de proteínas: peptona de carne (ADSA), peptona de soja (Phytona, BBL), peptonas de caseína (BactoCasitone, Difco y Trypticasa, BBL) y peptona de carne y caseína (Polipeptona, BBL). Los hidrolizados enzimáticos de proteínas microbianas también permitieron un adecuado crecimiento de esta mixobacteria (Biopeptona H y Bioproteína L, Hoechst).

Todos los medios fueron utilizados al 1%, usándose tampón fosfato 10 mM pH 6,5 y SO_4Mg al 0,1%. El crecimiento celular fue paralelo a un aumento del pH del medio de cultivo, como había sido observado anteriormente, alcanzándose valores de pH finales superiores a 8 en los casos de mayor crecimiento. En la Tabla 10 se muestra el máximo crecimiento observado en los diferentes medios ensayados y el pH final de los caldos de cultivo. La actividad fosfatasa detectada en ensayos *in situ* de células procedentes de cultivos de densidad óptica media (0,4-0,5), no reveló grandes diferencias en la actividad específica entre los diferentes medios.

Dada la mayor homogeneidad de los lotes comerciales de Trypticasa (BBL), la mejor disponibilidad de este sustrato, el mayor y más rápido crecimiento de *M. coralloides* D sobre esta peptona y su menor coste, fue elegida para el medio líquido de crecimiento de esta mixobacteria.

RESULTADOS

Tabla 10. Crecimiento y actividad fosfatasa de *M. coralloides* D sobre diversos medios de cultivo

Medio	D.O ₅₅₀ máxima	pH final	Fosfatasa			
			celular ^a		sobrenadante ^b	
			AC	AL	AC	AL
Peptona (ADSA)	0,86	7,76	0,67	0,34	0,30	0,10
Polipetona	0,93	8,12	0,68	0,36	0,28	0,14
Biopeptona H	0,90	8,46	0,64	0,28	0,35	0,18
Phytone	1,07	8,37	0,57	0,26	0,40	0,22
Extracto lev.	0,52	7,20	nd	nd	nd	nd
Casaminoácidos	0,26	6,61	nd	nd	nd	nd
Bioproteína L	0,95	8,11	0,58	0,25	0,37	0,26
Bactocasitone	0,82	8,43	0,65	0,34	0,24	0,14
Tripticasa	1,17	8,63	0,68	0,30	0,30	0,20

^a Actividad expresada como $\Delta D_{0.410nm}/min. mg$ proteína

^b Actividad expresada como U/ml

nd (no determinada)

RESULTADOS

Siendo necesario obtener grandes masas celulares en el proceso de purificación posterior, se buscó optimizar otros parámetros del crecimiento de esta mixobacteria. La Tabla 11 muestra como el crecimiento fue mayor a una concentración del 0,75% de Tripticasa (BBL), pH inicial de 6,5 y 33°C. Las actividades específicas encontradas en cultivos de densidad óptica media fueron similares en todos los casos. El crecimiento a 33°C permite obtener una mayor densidad celular pero requiere una agitación mayor para mantener el cultivo disperso, por ello se mantuvieron las condiciones de 28°C y pH 6,5. Los cultivos se realizaron en matraces de un litro con 500 ml de medio.

Posteriormente se obtuvieron hasta 7 litros de cultivo, gracias al empleo de un fermentador de laboratorio Braun Biostat E, en las condiciones de uso indicadas en la sección de Material y Métodos.

RESULTADOS

Tabla 11. Crecimiento y actividad fosfatasa de *M. coralloides* D sobre Trypticase en diferentes condiciones de cultivo.

Condiciones de cultivo	D.O ₅₅₀ máxima	pH final	Fosfatasa			
			celular ^a		sobrenadantes ^b	
			AC	Al	AC	AL
Tryptic. 0,1%	0,26	7,23	nd	nd	nd	nd
Tryptic. 0,25%	0,63	8,17	0,62	0,30	0,32	0,18
Tryptic. 0,5%	0,89	8,69	0,68	0,31	0,29	0,19
Tryptic. 0,75%	1,25	8,53	0,68	0,30	0,30	0,19
Tryptic. 1%	1,17	8,63	0,68	0,30	0,30	0,20
Tryptic. 2%	0,77	8,67	0,65	0,29	0,28	0,20
Tryptic. 0,75%						
pH 6,5, 28°C	1,25	8,53	0,68	0,30	0,30	0,19
Tryptic. 0,75%						
pH 6,5, 33°C	1,60	8,85	0,67	0,30	0,31	0,19
Tryptic. 0,75%						
pH 7,2, 28°C	1,19	8,87	0,86	0,30	0,32	0,18
Tryptic. 0,75%						
pH 7,2 33°C	1,23	8,77	0,65	0,31	0,30	0,18

^a Actividad expresada como $\Delta D_{0.410nm}/min. mg$ proteína

^b Actividad expresada como U/ml

nd (no determinado)

4.3 Cinética de producción

En la Figura 17 se muestra la curva de crecimiento de *M. caralloides* D en las condiciones de cultivo elegidas para la producción de fosfatasa. Simultáneamente se representa la cinética de producción de estas enzimas. La actividad total y específica ligada a células aumentó paralelamente a la densidad del cultivo, para disminuir durante la fase de lisis. La actividad fosfatasa encontrada en los sobrenadantes (U/ml) siguió un curso distinto, encontrándose una mayor actividad al inicio del crecimiento vegetativo, apreciándose un posterior descenso. El aumento siguiente en la actividad de los sobrenadantes coincidió con la lisis celular.

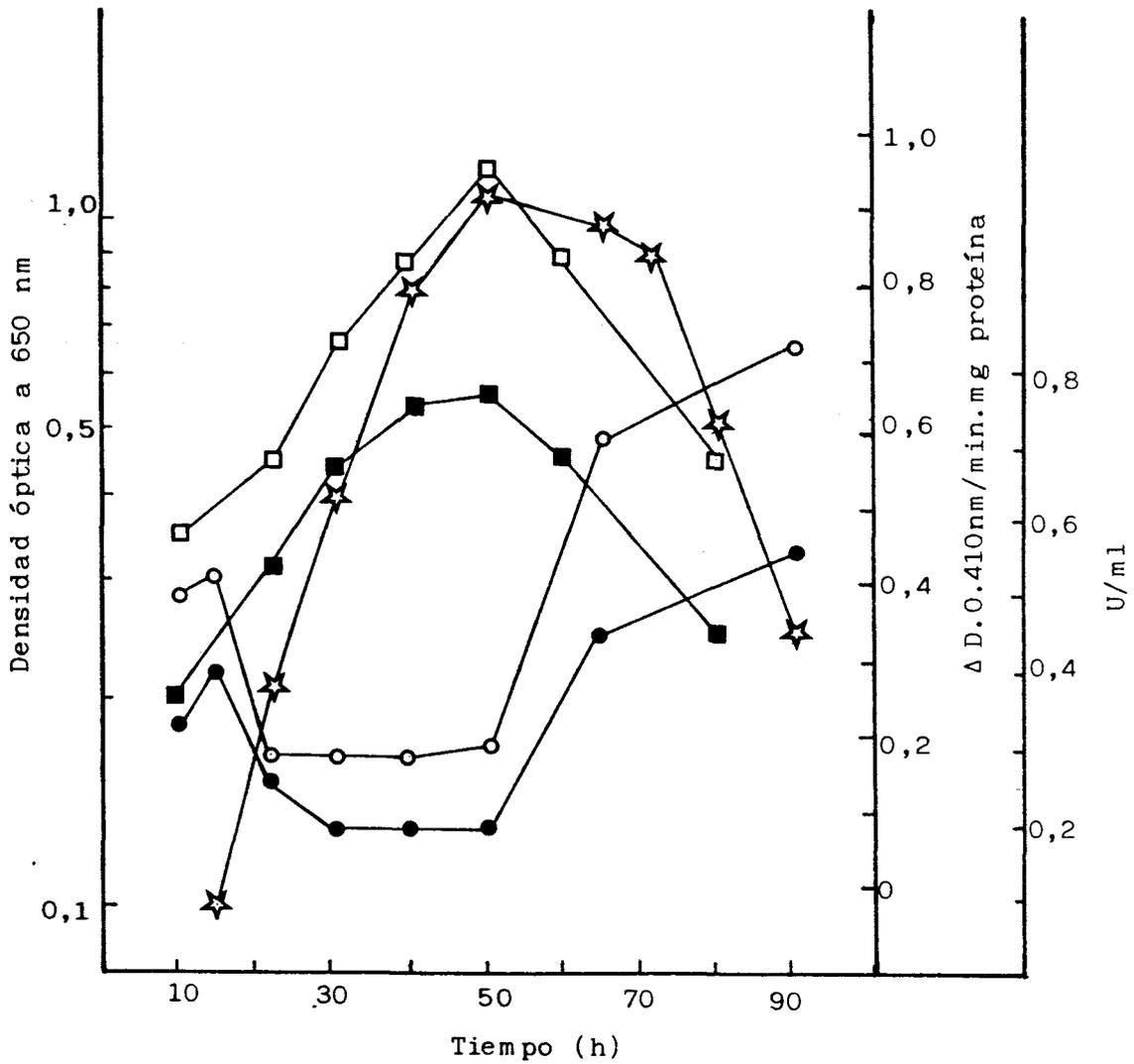


Figura 17. Curvas de crecimiento y producción de fosfatasa por *M. coralloides* D en medio con Tripticasa 0,75%. Crecimiento referido como densidad óptica a 650 nm (★). Actividad específica ácida (□) y alcalina (■) ligada a células, expresada como $\Delta D.O.410 nm/min.mg$ proteína. Actividad ácida (○) y alcalina (●) en sobrenadantes, expresada como U/ml.

5. ACTIVIDAD FOSFATASA DURANTE EL CICLO DE VIDA DE *M. coralloides* D

M. coralloides D puede seguir un ciclo de vida vegetativo con sucesivas divisiones binarias, tanto en medio sólido como líquido. Frente a este simple ciclo de vida vegetativo y como es característico en las mixobacterias, *M. coralloides* D puede llevar a cabo un ciclo de desarrollo que finaliza con la aparición de cuerpos fructificantes y la diferenciación de sus bacilos vegetativos en formas de resistencia, conocidas como mixósporas. Las características de este proceso de desarrollo fueron ampliamente comentadas en la introducción de esta memoria.

Estudiada la actividad fosfatasa en *M. coralloides* D durante su crecimiento vegetativo en medio líquido, se consideró interesante el estudio de estas actividades durante los procesos de desarrollo.

5.1 Actividad fosfatasa durante el crecimiento en medio sólido

Los medios sólidos nos permitieron estudiar y comparar estas actividades durante el crecimiento vegetativo y el proceso de fructificación. *M. coralloides* D crece vegetativamente sobre medio CTA (Casitone Agar) y fructifica en medio Agar Levadura.

La Figura 18 muestra la actividad fosfatasa ácida y alcalina en ambos medios. El perfil de actividad durante el crecimiento vegetativo muestra un máximo durante el desarrollo de la colonia para disminuir en paralelo a su envejecimiento. La actividad apreciada durante el crecimiento y desarrollo de cuerpos fructificantes sobre Agar Levadura mostró dos picos de máxima actividad, siendo sus valores mayores que los detectados durante el crecimiento vegetativo.

El proceso de fructificación sobre Agar Levadura es inhibido por la adición a este medio de fosfato inorgánico 20 mM (González, 1985). La determinación de la actividad fosfatasa durante el crecimiento en este medio mostró un perfil más similar al encontrado durante el crecimiento vegetativo sobre Casitone Agar.

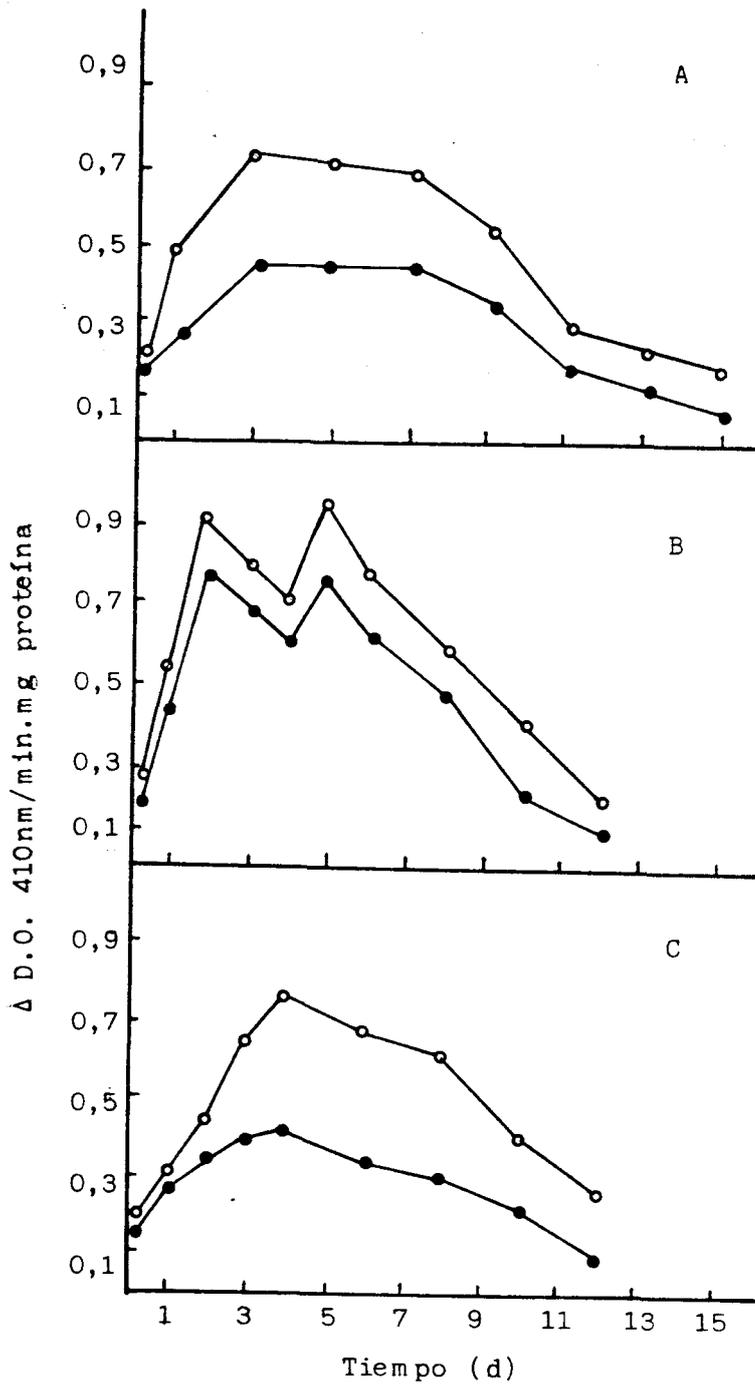


Figura 18. Actividad fosfatasa en células de *M. coralloides* D durante su crecimiento en medio sólido. Medio CTA (A), Agar levadura (B) y medio ALP (C). Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●).

5.2 Actividad fosfatasa durante la inducción de mixósporas

La Figura 19 muestra que las actividades específicas de ambas fosfatasas aumentaron durante las primeras horas del proceso de inducción de mixósporas con glicerol 0,5 M. En las mixósporas de glicerol maduras (24 h) las actividades ligadas a células fueron un 40-60% menores que las presentes en las células vegetativas. La actividad presente en los sobrenadantes también sufrió un incremento en el proceso de inducción para desaparecer posteriormente toda actividad. Tampoco se detectó actividad alguna tras resuspender por varias horas a las mixósporas maduras en solución salina. Los cambios morfológicos observados durante la inducción se comentan en la Figura 19.

Ensayos de actividad proteolítica durante el proceso de inducción de mixósporas pusieron de manifiesto la presencia de esta actividad en los caldos de cultivo. La actividad proteasa podría ser responsable de la desaparición de la actividad fosfatasa previa presente en los sobrenadantes.

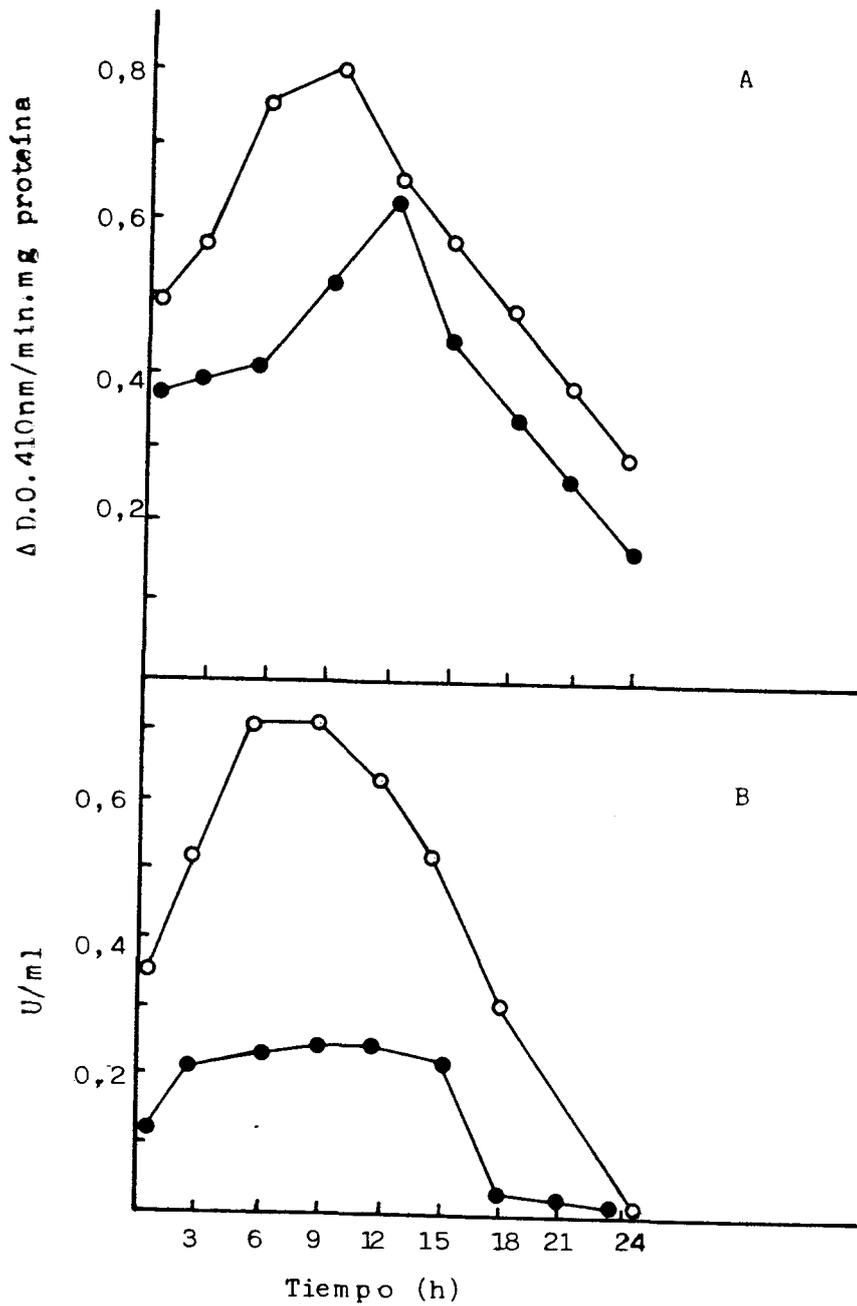


Figura 19. Actividad fosfatasa durante la inducción de mixósporas con glicerol 0,5 M. Actividad celular (A) y en sobrenadantes (B). Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●). La actividad en los diferentes momentos corresponde a las siguientes morfologías celulares: 0 h (células vegetativas), 3 h (bacilos acortados), 6 h (esferas no refráctiles), 12-18 h (esferas refráctiles) y 24 h (mixosporas maduras).

5.3 Actividad fosfatasa durante la germinación de mixósporas

En la germinación de mixósporas de glicerol (Figura 20) apreciamos un aumento lineal de la actividad específica celular hasta alcanzar los valores propios de las células vegetativas, al finalizar el proceso de germinación. Sin embargo, en la germinación de mixósporas de cuerpos fructificantes la actividad específica celular alcanzó un máximo durante la germinación para descender posteriormente hasta los valores de las células vegetativas. El modelo de actividad fue similar para ambas fosfatasas (Fig. 20).

Por el contrario, el perfil de actividad encontrado en los sobrenadantes fue similar para los dos tipos de mixósporas. Así mismo, para ambos no se detectó actividad extracelular antes del inicio de la germinación en medio fresco (Fig. 21). Los cambios de morfología durante la germinación se describen en la figura 20.

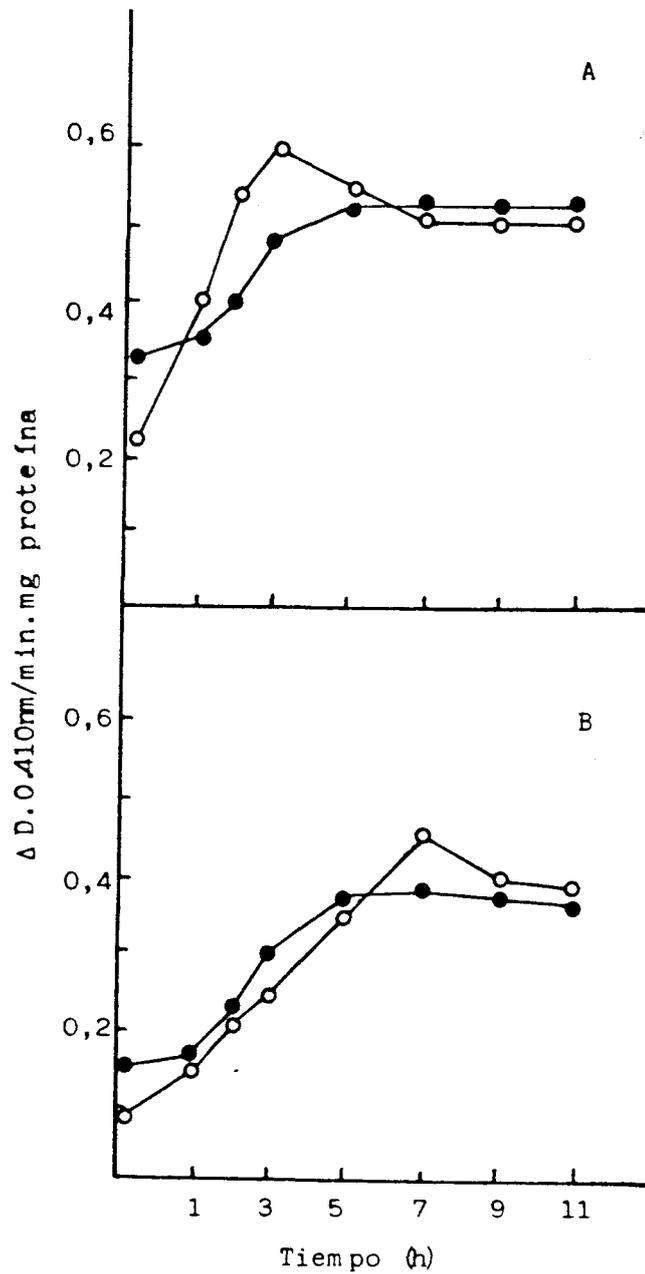


Figura 20. Actividad fosfatasa celular durante la germinación de mixosporas de glicerol (○) y de cuerpos fructificantes (●). Actividad fosfatasa acida (A) y alcalina (B). La actividad a los diferentes tiempos corresponde a los siguientes cambios morfológicos: 0 h (mixosporas), 3 h (esferas no refráctiles), 5-9 h (células iniciando la elongación) y 11 h (bacilos).

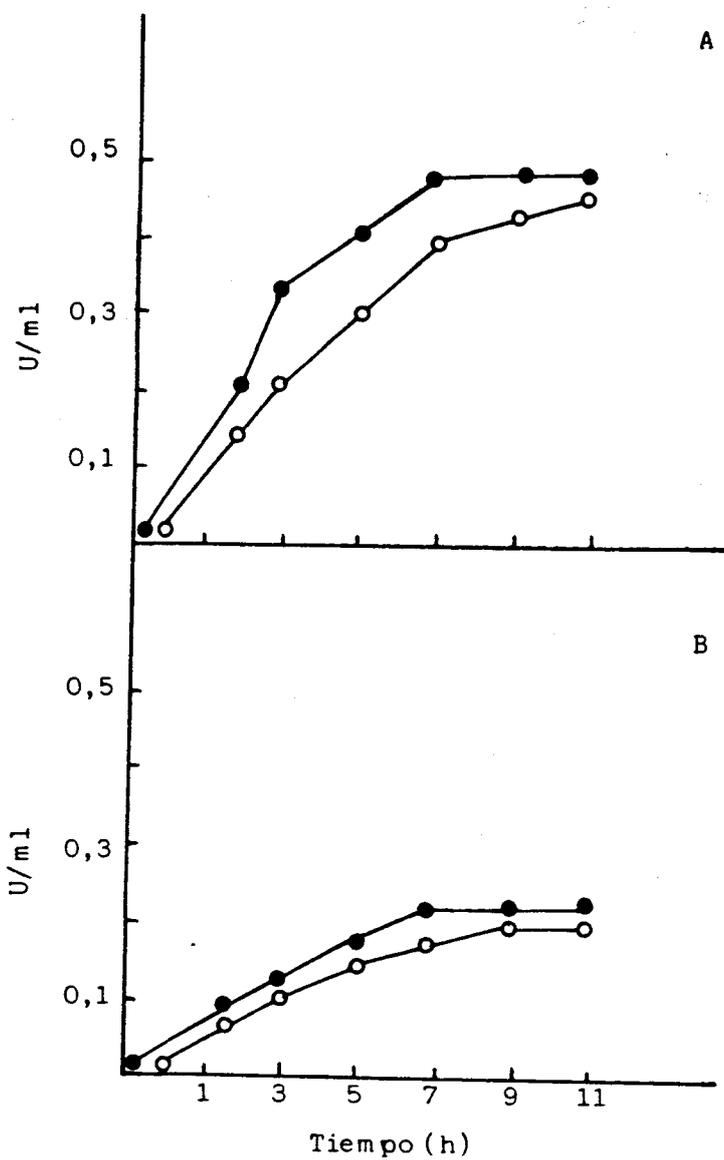


Figura 21. Actividad fosfatasa detectada en sobrenadantes durante la germinación de mixósporas de glicerol (O) y de cuerpos fructificantes (●). Actividad fosfatasa ácida (A) y alcalina (B). Los cambios morfológicos de las células son los mismos que los descritos en la figura anterior.

6. ESTUDIO DE LAS FOSFATASAS DE *Nyctococcus coralloides* D

6.1 Purificación parcial de los enzimas celulares

6.1.1 Estudios previos a la purificación

Los estudios previos llevados a cabo tuvieron un doble objetivo; por un lado establecer el estado fisiológico óptimo del cultivo para obtener el material de partida en el proceso de purificación y, por otra parte, estudiar el efecto de las fuentes de fósforo presentes en el medio de cultivo, sobre las actividades fosfatasas celulares.

En relación al primer punto, y partiendo del extracto libre de células obtenido tras centrifugar el sonificado celular, se ensayó la actividad fosfatasa a pH 4,5 y 8,5 con pNPP como sustrato común. De acuerdo con los resultados anteriores de ensayo *in situ* se detectó actividad para ambos pHs. Este ensayo se realizó sobre sonificados procedentes de 500 ml de cultivo en las condiciones fijadas anteriormente. La actividad fosfatasa se valoró en cultivos al inicio, mitad y final de la fase exponencial de crecimiento (D.O.₅₅₀ de 0,2, 0,6 y 0,8, respectivamente). Los resultados mostraron una mayor actividad total y específica en los cultivos al final del crecimiento exponencial, por lo que se partió de cultivos con una densidad óptica de entre 0,75 y 0,9. En todos los casos se detectó actividad a pH ácido y alcalino, con un incremento de actividad con la densidad del cultivo, como se muestra en la Tabla 12.

Por otra parte, y como se comentó en la Introducción, las fosfatasas pueden ser reprimidas por la presencia de fosfato inorgánico en el medio de crecimiento. Si bien la detección de niveles considerables de actividad fosfatasa en el medio de Tripticasa con tampón fosfato 10 mM parecía indicar que en este caso no se producía una represión por este metabolito, se realizaron estudios suprimiendo el tampón del medio y elevando su

RESULTADOS

concentración hasta 30 mM. Los datos obtenidos no mostraron diferencias con los iniciales.

Las fosfatasas reprimibles por fosfato inorgánico se caracterizan por un elevado incremento de sus niveles cuando las condiciones del medio son limitantes en Pi. El medio Trypticasa al 0,75% fue analizado en su contenido en Pi, resultando contener unos niveles de 1 mM de fosfato inorgánico, proporcionado por la preparación comercial de peptona. Esta concentración no suele ser considerada como limitante para el crecimiento y de hecho *M. coralloides* D alcanza elevadas densidades en este medio sin ninguna adición externa de fosfato. En la búsqueda de un medio con más baja concentración de fosfato, se ensayó el crecimiento en un medio mínimo adicionado con 0,05 mM y 1 mM de fosfato potásico. Anteriormente a la siembra en este medio se procedió al cultivo sucesivo de la mixobacteria en concentraciones decrecientes de Trypticasa, desde el 0,75% al 0,1%, con el fin de habituar su crecimiento a un medio limitado en nutrientes, si bien el tampón fosfato se mantuvo a concentraciones de 10 mM. El crecimiento en el medio mínimo alcanzó una densidad óptica máxima de 0,3 después de 130 horas de cultivo, para entrar luego en una fase de lisis. El inóculo se realizó con 3 ml de un cultivo en Trypticasa al 0,1% lavado, tres veces en el nuevo medio mínimo. El crecimiento fue similar tanto a la concentración de 0,05 mM de fosfato como a la de 1 mM. La densidad óptica máxima de 0,3 es la alcanzada también por los cultivos en Trypticasa al 0,1%.

Los cultivos en medio mínimo (40 ml) fueron recogidos y sonicados, midiendo la actividad fosfatasa presente en los extractos libres de células. La actividad total fue pequeña, dada la poca masa celular recogida, pero la actividad específica es comparable con la presente en los cultivos de Trypticasa de igual densidad óptica (Tabla 12). Los niveles de actividad total y específica fueron semejantes con ambas concentraciones de fosfato. No se apreció, por

tanto, ninguna variación en los niveles de actividad como respuesta a una limitación de Pi.

Anteriores ensayos *in situ* de la actividad fosfatasa de células cultivadas en presencia de β -glicerol-fosfato habian indicado la presencia de mayores niveles de actividad fosfatasa (González, 1985). Sin embargo, estos resultados *in situ* no han podido ser comprobados en extractos libres de células, donde la actividad total y específica detectada no es significativamente mayor a la presente en células crecidas en medio no adicionado con este sustrato (Tabla 12).

Por otra parte la posible inducción de la actividad fosfatasa por fosfato ligado al sustrato orgánico de crecimiento (Trypticasa) queda descartada con el uso del medio mínimo y con los niveles de actividad detectados en él.

De acuerdo con estos resultados, se estimó conveniente, para posteriores estudios de purificación, partir de extractos libres de células, obtenidos como se detalla en el capítulo de Material y Métodos. Los extractos procedieron inicialmente de un litro de cultivo. Para disponer de mayor cantidad de masa celular se utilizó un fermentador Braun Biostat E que permitía obtener hasta 7 litros de cultivo.

RESULTADOS

Tabla 12. Efecto de las fuentes de fósforo presentes en el medio de cultivo sobre la actividad fosfatasa ácida y alcalina ligada a células de *M. coralloides* D.

Medio	D.O _{650nm}	Actividad fosfatasa ^a	
		ácida	alcalina
Trip. + 10 mM Pi	0,2	0,50	0,24
Trip. + 10 mM Pi	0,6	0,66	0,30
Trip. + 10 mM Pi	0,8	0,95	0,54
Trip. + 30 mM Pi	0,2	0,51	0,24
Trip. + 30 mM Pi	0,6	0,69	0,37
Trip. + 30 mM Pi	0,8	1,02	0,56
Trip. + 20 mM βGB ^b	0,2	0,56	0,26
Trip. + 20 mM βGP	0,6	0,70	0,38
Trip. + 20 mM βGP	0,8	1,05	0,56
Medio mínimo + 0,05mM Pi	0,25	0,54	0,22
Medio mínimo + 1 mM Pi	0,25	0,50	0,22

^a Actividad dada como ΔD.O 410 nm/min.mg proteína

^b β-glicerolfosfato

6.1.2 Cromatografía en Sephacryl S-200

El extracto libre de células se filtró a través de una columna de Sephacryl S-200, recogándose fracciones de 4 ml a las que se les determinó su absorbancia a 280 nm y la actividad fosfatasa a pH 4,5 y 8,5, con un tiempo de incubación de 30 minutos a una temperatura de 28°C.

Como se observa en la Figura 22, tras la cromatografía aparecen dos fracciones con actividad fosfatasa bien diferenciadas por su volumen de elución. La actividad del frente presentaba una elevada actividad a pH 4,5 y una actividad mucho menor a pH 8,5. La actividad que aparece distanciada del frente de elución presentaba actividad a pH 8,5 pero no a 4,5. Dado que la fracción del frente podría contener grandes agregados de proteínas, sería posible que el frente de elución arrastrara con él una parte minoritaria de la fracción activa a pH 8,5. También sería posible la presencia en la fracción inicial de dos enzimas de elevado peso molecular con actividad a distinto pH o una proteína con actividad para ambos.

Las fracciones activas fueron congeladas a -20°C para su posterior utilización o bien fueron usadas inmediatamente en etapas posteriores.

Tras este paso de purificación se obtuvo una recuperación de la fosfatasa alcalina del 71%, con un aumento de actividad específica que supone un factor de purificación de 14,85 veces con respecto al extracto inicial. La recuperación de la fosfatasa ácida se aproximó al 80% con un factor de purificación de solo 2,35.

El perfil de elución de la Figura 22 fue obtenido a partir de un extracto libre de células procedente de un cultivo realizado en las condiciones ya indicadas. Un perfil similar se obtuvo cuando el extracto crudo original procedía de cultivos sin tampón fosfato o con tampón a una concentración de 30 mM. Así mismo, la elución de

RESULTADOS

extractos celulares procedentes de cultivos adicionados con β -glicerol-fosfato no mostraron diferencia alguna con el perfil presentado. Este perfil de elución resultó ser idéntico, independientemente de la fase de crecimiento y del medio de cultivo empleado.

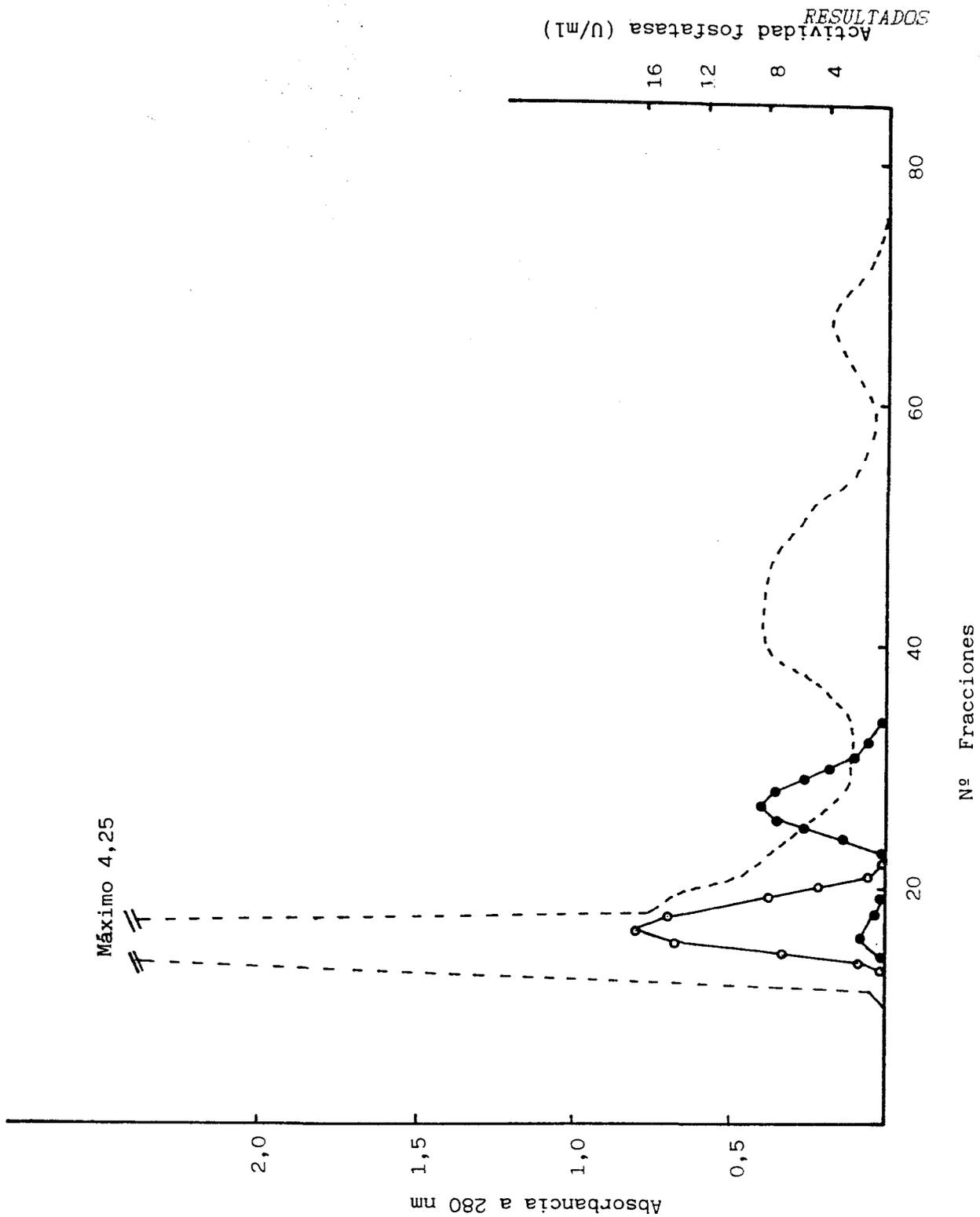


Figura 22. Cromatografía en columna de Sephacryl S-200.
 (○—○) Actividad fosfatasa ácida, (●—●) Actividad fosfatasa
 alcalina, (---) Absorbancia a 280 nm.

6.1.3 Tratamiento con cloruro magnésico

Las fracciones de mayor actividad a pH ácido obtenidas de la columna S-200 (12 ml) fueron adicionadas, en frío y con agitación constante de una solución a pH 8 de Cl_2Mg 1 M, hasta que la sal alcanzó una concentración final de 0,2 M.

Tras agitación por 30 minutos, las fracciones tratadas fueron centrifugadas a 48.000 x g durante 45 minutos a 4°C. La actividad ácida se determinó en el sobrenadante y en el sedimento obtenido para observar su distribución. En el sobrenadante se localizó más del 70% de la actividad total inicial, con una mayor actividad específica y un factor de purificación de 5.

La actividad a pH 4,5 detectada en el sobrenadante tras este tratamiento supuso el 90% de la actividad anterior; mientras que sólo se recuperó en este sobrenadante un 65% de la actividad alcalina presente en el frente de elución.

6.1.4 Cromatografía de intercambio iónico

A. Cromatografía sobre CM-Sephadex de las fracciones activas a pH alcalino

Las fracciones de mayor actividad a pH alcalino obtenidas de la columna S-200 (12 ml) fueron cromatografiadas en columna de CarboximetilSephadex C-25 equilibrada con tampón cítrico-citrato 10 mM pH6,0.

Previamente se comprobó la adsorción sobre DEAE-Sephadex A-25 y CM-Sephadex C-25. El análisis del eluido de la adsorción sobre ambos geles indicó que la actividad fosfatasa quedaba fijada por el cambiador CM-Sephadex C-25 tras realizar el lavado con el tampón empleado en su equilibrado.

RESULTADOS

Para la elución de la actividad enzimática se aplicó un gradiente continuo de ClNa entre 0 y 0,15 M, recogiendo fracciones de 3 ml que fueron ensayadas en su actividad fosfatasa a pH 8,5. La elución con ClNa conseguía el desplazamiento de la actividad a una concentración próxima a 0,05 M. Este paso obtuvo un rendimiento del 27% y un factor de purificación, con respecto al extracto inicial, de 127,75.

En la Figura 23 se representa el proceso cromatográfico de elución en columna de CM-Sephadex C-25.

Dado el rendimiento obtenido y el factor de purificación conseguido, dichas fracciones se estimaron útiles para los estudios posteriores de caracterización y cinética enzimática.

RESULTADOS

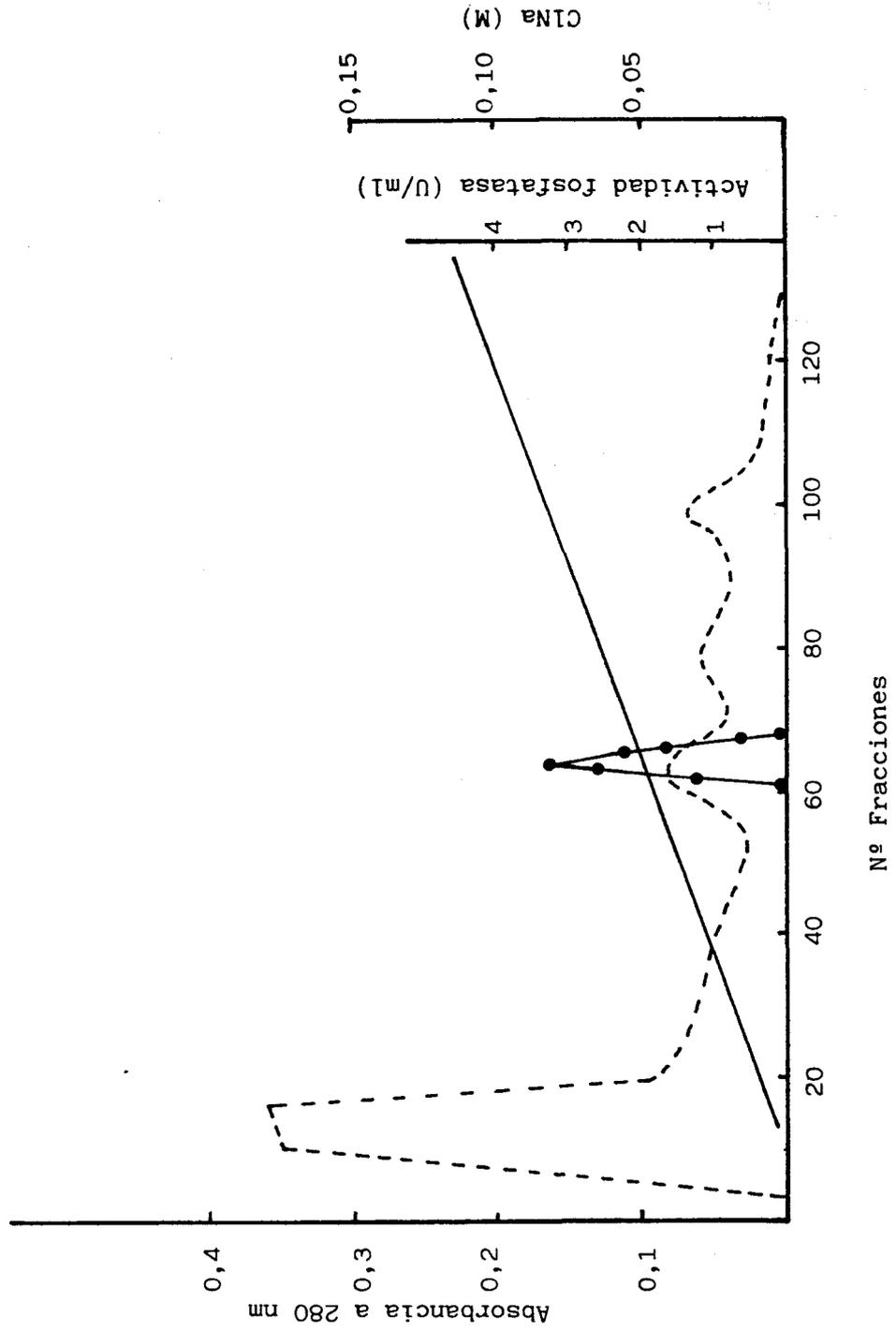


Figura 23. Cromatografía en columna de CM-Sephadex C-25.

(●—●) Actividad fosfatasa alcalina, (---) Absorbancia a 280 nm,
 (—) Gradiente de ClNa.

B. Cromatografía sobre CM-Sephadex de las fracciones activas a pH ácido

El sobrenadante obtenido tras el tratamiento con Cl_2Mg fue cromatografiado en columna de CarboximetilSephadex C-25 equilibrado con tampón cítrico-citrato 10 mM pH 6,0. De igual modo que anteriormente se comprobó la adsorción sobre este gel y sobre DEAE-Sephadex A-25. Los resultados mostraron que la actividad fosfatasa quedaba fijada sobre el cambiador C-25, sin afectar la presencia del cloruro magnésico presente en las muestras utilizadas.

La elución de la actividad fosfatasa se realizó a través de un gradiente continuo de ClNa entre 0 y 0.3 M, recogándose fracciones de 3 ml que fueron ensayadas en su actividad fosfatasa a pH 4.5. La elución con ClNa conseguía el desplazamiento de la actividad a una concentración de 0,1 M. El rendimiento obtenido fue del 48%, con un factor de purificación de 45,77.

En la Figura 24 se muestra el proceso cromatográfico de elución de la actividad ácida.

De igual modo y con iguales consideraciones que en el apartado anterior, las fracciones obtenidas tras esta etapa, se estimaron útiles para los estudios posteriores de caracterización y cinética enzimática.

Las fracciones activas a pH ácido obtenidas tras la elución sobre CM-Sephadex fueron ensayadas a pH 8,5, no encontrándose actividad. Así, cabe descartar la posibilidad de un enzima con un amplio rango de pH. La actividad a pH 8,5 se detectó a muy bajos niveles en las fracciones de elución correspondientes a una concentración de 0,04-0,05 M de ClNa , valor similar al obtenido en la anterior cromatografía de las fracciones activas a pH alcalino.

RESULTADOS

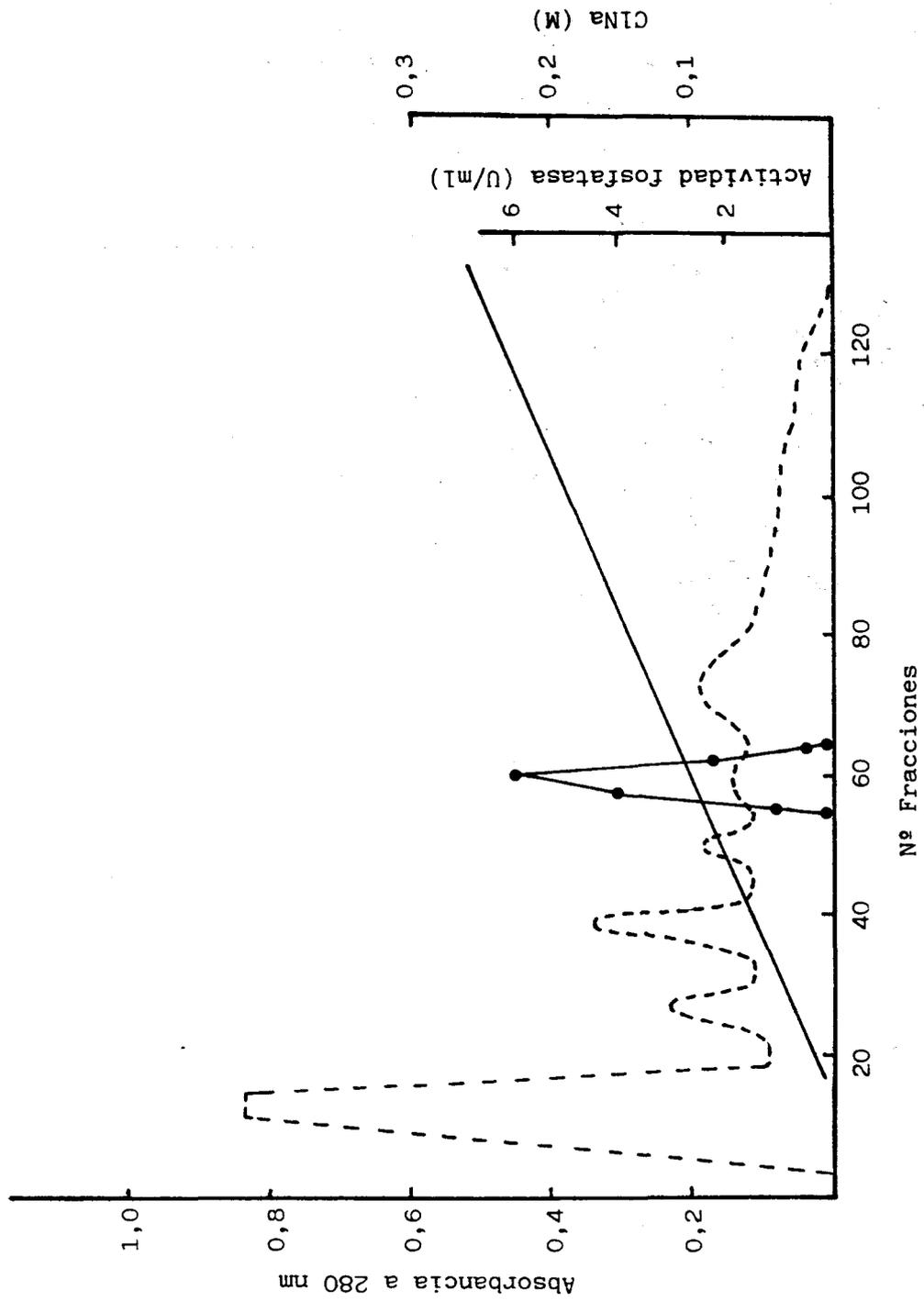


Figura 24. Cromatografía en columna de CM-Sephadex C-25.

(●—●) Actividad fosfatasa ácida, (---) Absorbancia a 280 nm,
 (—) Gradiente de ClNa.

C. Cromatografía sobre DEAE-Sephadex

Los estudios realizados sobre actividad desoxirribonucleasa en *M. coralloides* D mostraron la presencia de una actividad ADNasa que eluía junto a la actividad fosfatasa alcalina tras la filtración por Sephacryl S-200 (Martínez-Cañamero, 1985). La actividad nucleasa mostraba un pH óptimo de 8,0, muy próximo al pH de 8,5 utilizado para la detección de la actividad fosfatasa alcalina.

Todo ello hizo pensar en la posible presencia de un enzima con doble actividad fosfatasa-nucleasa, como la presente en la exonucleasa III de *E. coli*.

Sin embargo, la actividad fosfatasa alcalina y la actividad nucleasa fueron separadas mediante cromatografía de intercambio iónico sobre DEAE-Sephadex A-25. En este tipo de cromatografía la fosfatasa alcalina no se une al gel, mientras que la nucleasa sí es adsorbida, eluyendo posteriormente. La elución se realizó en gradiente de pH (Figura 25). Por tanto, podemos descartar la posibilidad de una enzima con doble actividad fosfatasa-nucleasa.

Así mismo, *M. coralloides* D presenta una actividad nucleasa que eluye en las mismas fracciones que la actividad fosfatasa ácida tras la cromatografía en S-200. La DNasa presenta una actividad máxima a pH 8 pero no es activa a pH 4,5 (Martínez-Cañamero, 1985), por lo que no se considera la posibilidad de un enzima con doble actividad.

En la tabla 13 se recoge a modo de resumen, la evolución del proceso de purificación.

RESULTADOS

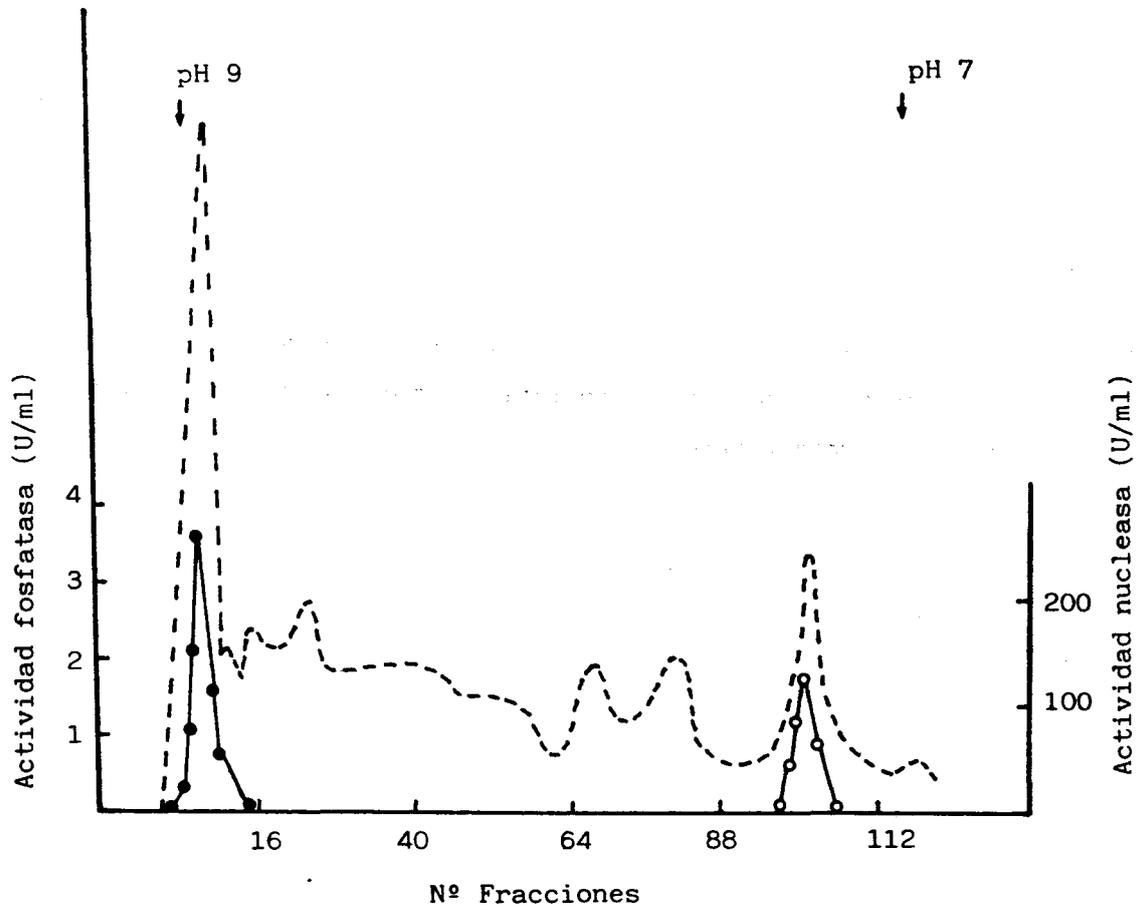


Figura 25. Cromatografía en columna de DEAE-Sephadex A-25.

(●—●) Actividad fosfatasa alcalina, (○—○) Actividad nucleasa,
 (---) Absorbancia relativa a 280 nm.

Tabla 13. Purificación parcial de las fosfatasas ácida y alcalina ligadas a células de *Mycococcus coralloides* D.

Etapa	Vol. (ml)	Prot. (mg/ml)	Act. (U/ml)	Act.	Actividad	Rend. (%)	F.P. ^a
				total (U)	especifica (U/mg prot.)		
Forma ácida							
Extracto							
crudo	10	5,840	17,49	174,90	2,994	100	1,00
S-200 ^b	12	1,640	11,52	138,24	7,024	79	2,35
Cl ₂ Mg ^c	15	0,537	8,23	123,45	15,325	70	5,11
CM-25 ^d	12	0,051	6,99	83,88	137,058	48	45,77
Forma alcalina							
Extracto							
crudo	10	5,840	8,95	89,50	1,532	100	1,00
S-200 ^b	12	0,235	5,35	64,20	22,765	71	14,85
CM-25 ^d	6	0,021	4,11	24,66	195,714	27	127,75

^a Factor de purificación

^b Cromatografía en Sephacryl S-200

^c Tratamiento con Cl₂Mg 0,2 M

^d Cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sephadex C25

6.1.5 Electroforesis y análisis densitométrico

En la Figura 26 se muestra una fotografía de las electroforesis en geles de poliacrilamida. Las Figuras 27 y 28 presentan los densitogramas obtenidos por el análisis de imágenes de los geles.

El gel A y el densitograma 1 de la Figura 27 corresponden a los extractos libres de células, origen del proceso de purificación. El gel B, cuyo densitograma es el número 2 de la Figura 27, presenta el análisis de las muestras recogidas en frente de elución de la columna de Sephacryl S-200. A su vez, el gel C y el densitograma 3 de la Figura 27, muestran los resultados obtenidos a partir de las fracciones de purificación por intercambio iónico de la fosfatasa ácida. Tras el proceso de intercambio iónico, en la electroforesis apareció una sola banda de proteína localizada en el extremo inicial del gel. El análisis por densitometría mostró un pico en el que queda reflejada la composición del gel anterior.

Así mismo, los geles D y E muestran el resultado obtenido al someter a electroforesis las fracciones activas a pH alcalino tras las etapas de purificación por Sephacryl S-200 e intercambio iónico, respectivamente. Los densitogramas 1 y 2 de la Figura 28 corresponden al análisis de estos geles. Se observó que tras la cromatografía en Sephacryl aparecen 5-6 picos y después de la cromatografía de intercambio iónico aparecen dos picos que se corresponden con las bandas del gel. Estas están localizadas hacia el extremo terminal del gel.

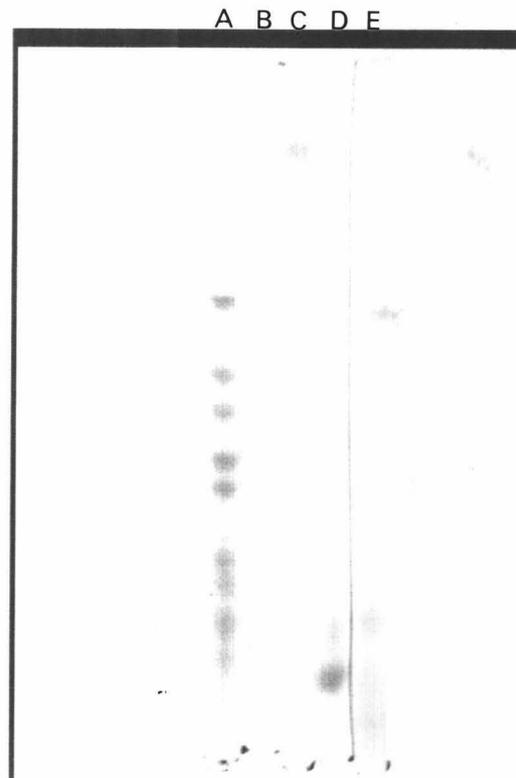
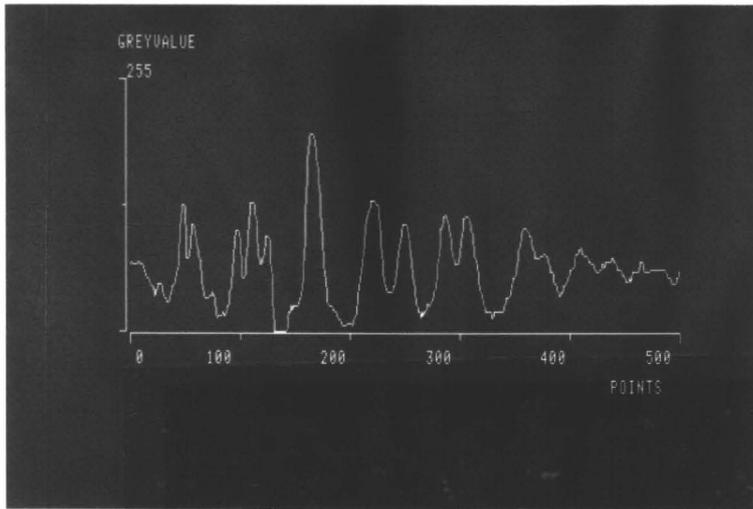
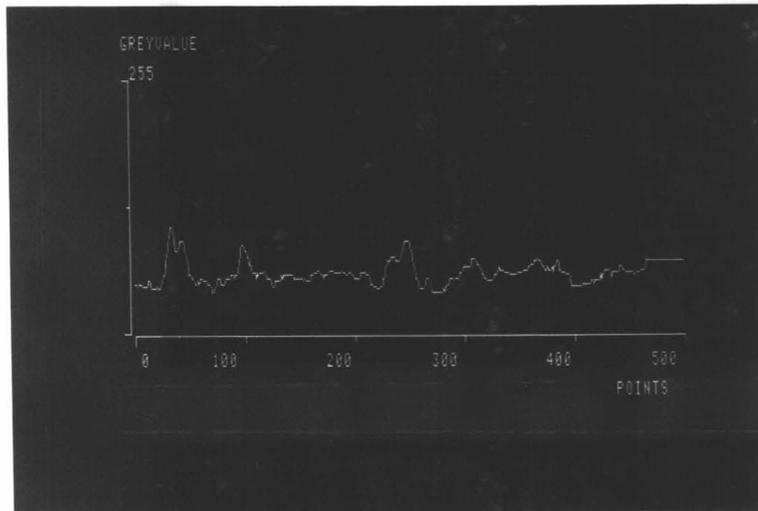


Figura 26. Electroforesis en geles de poliacrilamida. (A) Extracto celular libre de células, (B) Fracciones con actividad fosfatasa ácida tras la cromatografía en Sephacryl S-200, (C) Fracciones con actividad fosfatasa ácida tras la cromatografía de intercambio iónico, (D) Fracciones con actividad fosfatasa alcalina tras cromatografía en Sephacryl S-200, (E) Fracciones con actividad fosfatasa alcalina tras cromatografía de intercambio iónico.

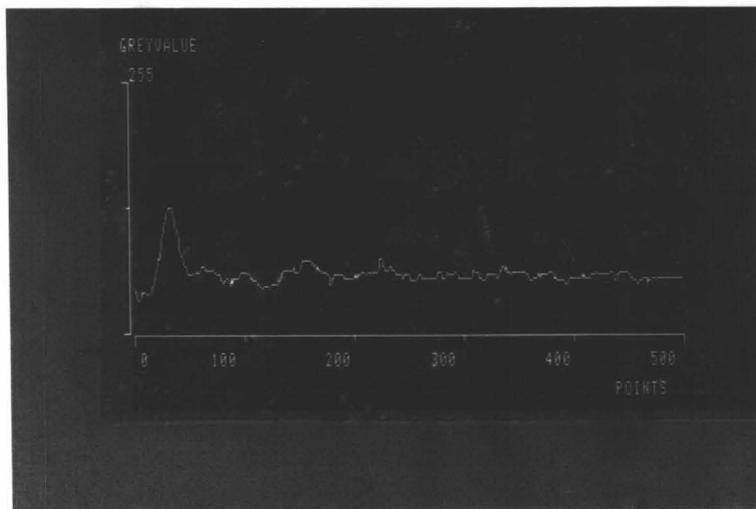
RESULTADOS



1

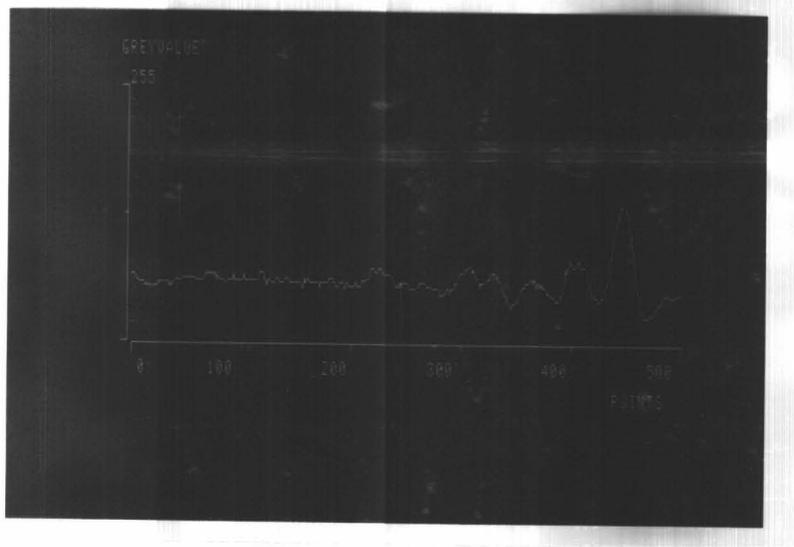


2

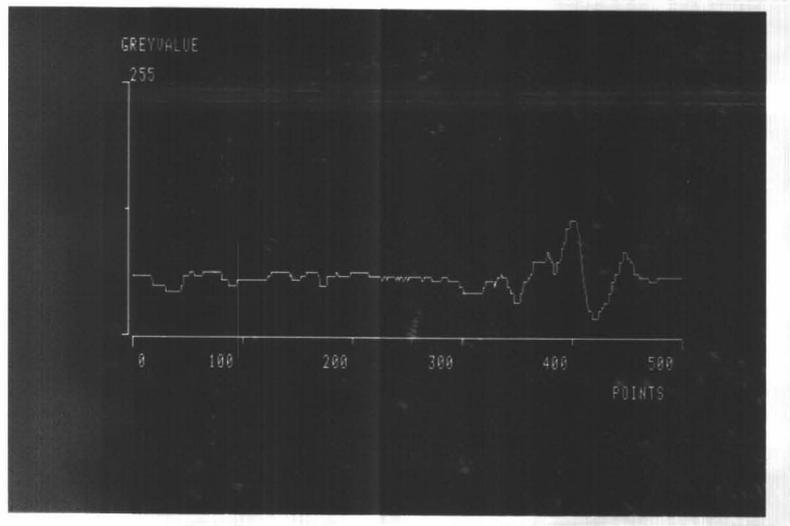


3

Figura 27. Densitogramas obtenidos por análisis de imágenes de 500 puntos de los geles anteriores, correspondiendo los densitogramas 1, 2 y 3 a los geles A, B y C, respectivamente.



1



2

Figura 28. Densitogramas obtenidos por análisis de imágenes de 500 puntos de los geles anteriores, correspondiendo los densitogramas 1 y 2 a los geles D y E, respectivamente.

6.2 Estudios de caracterización de los enzimas celulares

6.2.1 Aproximación al tamaño molecular

La Figura 29 muestra la representación gráfica de los datos obtenidos a partir de los procesos de elución que se efectuaron en columna de SEphacryl S-200 con la serie de patrones y la solución de fosfatasa alcalina. Se representan los valores de K_{av} frente al peso molecular en escala logarítmica. Por interpolación en la recta patrón resultante se obtuvo un peso molecular de 31.000 dalton para la fosfatasa alcalina de *M. coralloides* D.

La fosfatasa ácida eluía en el volumen vacío de la columna. Dado que el Sephacryl S-200 fracciona proteínas en un rango de 5.000 a 250.000, tan solo podemos indicar que la fosfatasa ácida parece presentar un tamaño molecular superior a 250.000 dalton.

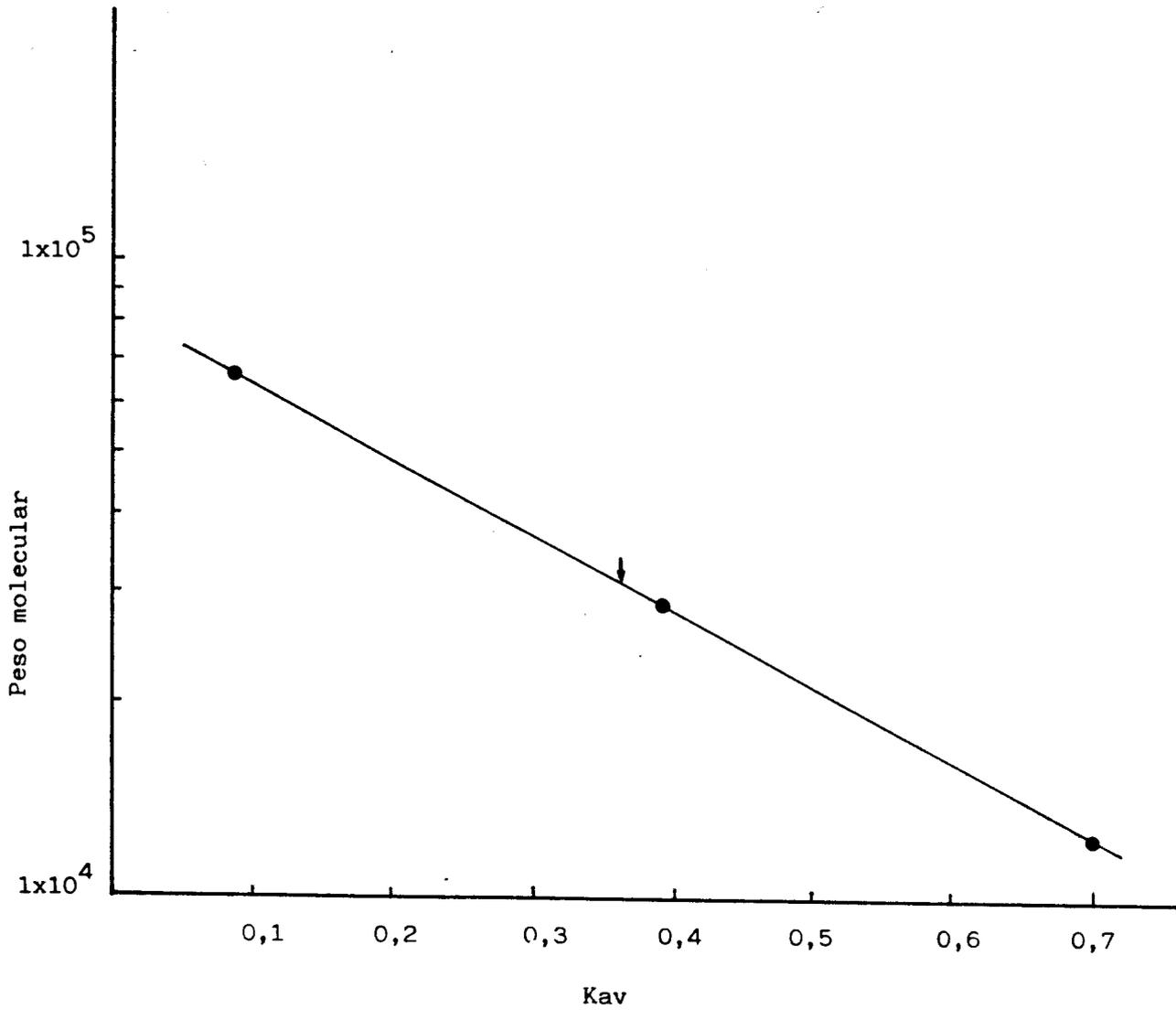


Figura 29. Determinación del tamaño molecular de la fosfatasa alcalina de *M. coralloides* D mediante filtración en Sephacryl S-200. Los patrones utilizados fueron: albúmina bovina sérica (66 Kd), anhidrasa carbónica de eritrocito de carnero (29 Kd) y citocromo c de corazón de caballo (12,4 Kd). La flecha indica la posición de la fosfatasa alcalina.

6.2.2 Influencia de la concentración proteica y del tiempo de incubación

Inicialmente, y con vista a los posteriores estudios de caracterización y cinética, se comprobó el margen de concentración proteica para la cual se obtenía p-nitrofenol proporcionalmente a la cantidad de proteína ensayada. Las pruebas se realizaron en unos márgenes de 5 a 50 μg de proteína purificada para la actividad ácida y de 5 a 20 μg para la alcalina. En la Figura 30 se muestran los resultados de estas experiencias, observándose una respuesta proporcional hasta 25 μg de proteína para la fosfatasa ácida y de 20 μg para la alcalina. Estos márgenes se mantuvieron en todos los estudios posteriores.

Para determinar el tiempo óptimo de la reacción se realizaron experiencias a diferentes tiempos en un intervalo de 0 a 60 minutos. La formación de p-nitrofenol fue lineal durante al menos 40 minutos para ambas actividades (Figura 31). El tiempo elegido inicialmente fue de 30 minutos, intervalo que entra dentro del tiempo de linealidad observado y que se mantuvo posteriormente.

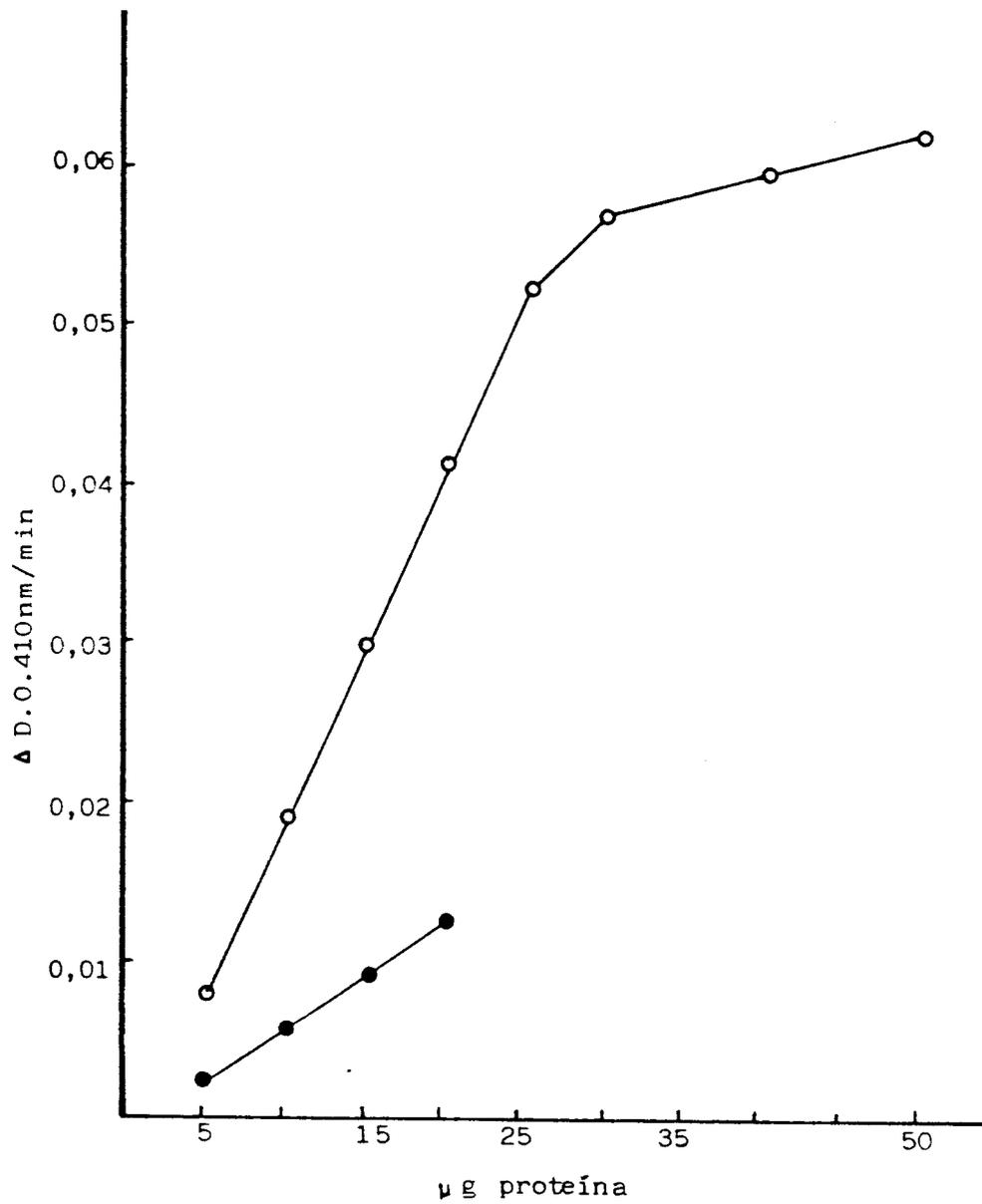


Figura 30. Influencia de la concentración de proteína sobre la formación de p-nitrofenol por acción de la fosfatasa ácida (○) y la fosfatasa alcalina (●) parcialmente purificadas de *M. coralloides* D.

RESULTADOS

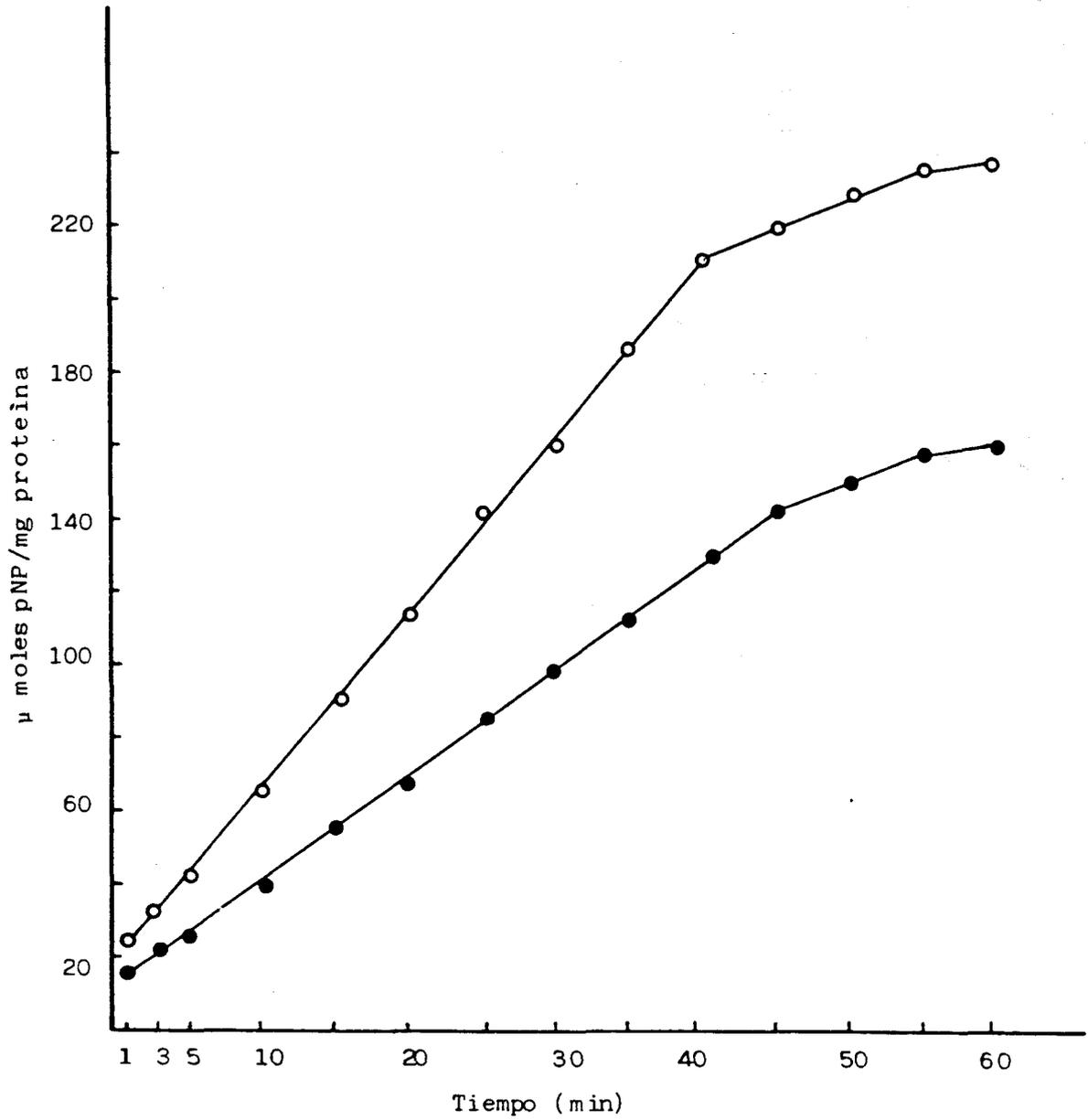


Figura 31. Influencia del tiempo de incubación sobre la formación de p-nitrofenol por acción de la fosfatasa ácida (○) y la fosfatasa alcalina (●) parcialmente purificadas de *M. coralloides* D.

6.2.3 Condiciones óptimas para la actividad enzimática

pH

La Figura 32 muestra el efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad fosfatasa ácida. Los valores máximos se alcanzaron a pHs en torno a 4,5, siendo mayores los valores obtenidos en tampón acético-acetato. La disminución hacia la zona alcalina, tras una meseta entre 5 y 5,5, presenta una pendiente similar a la presentada hacia la zona ácida.

En la Figura 33 se muestra el efecto del pH sobre la actividad fosfatasa alcalina. El máximo se observa a pH 8,1, tanto en tampón Hepes como en Tris-ClH. La disminución hacia ambas zonas del pH presenta una pendiente similar.

De acuerdo con estos resultados obtenidos se eligió el tampón acético-acetato pH 4,5 y el tampón Tris-ClH pH 8,1 para posteriores estudios.

RESULTADOS

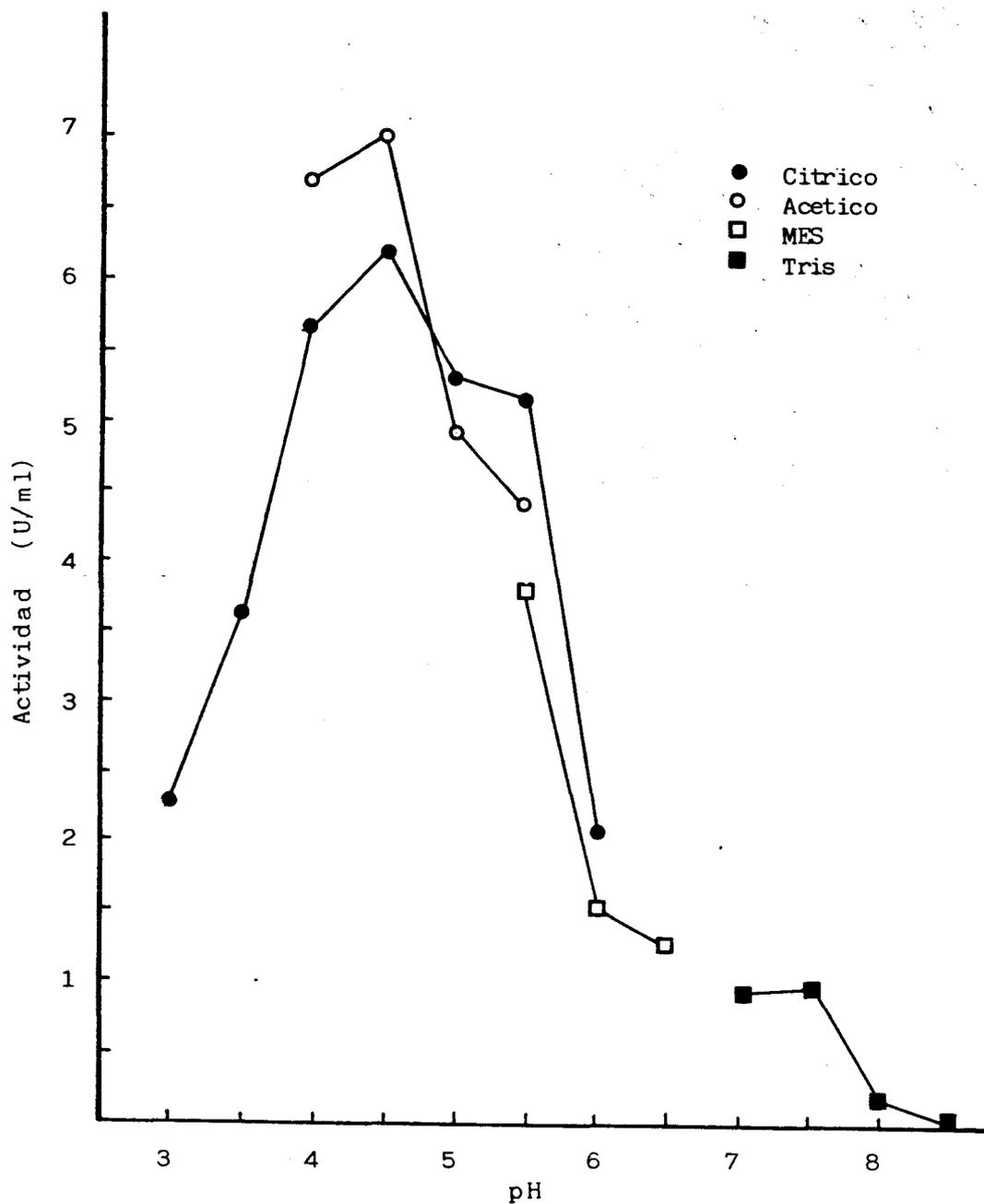


Figura 32. Efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad fosfatasa ácida parcialmente purificada de *M. coralloides* D.

RESULTADOS

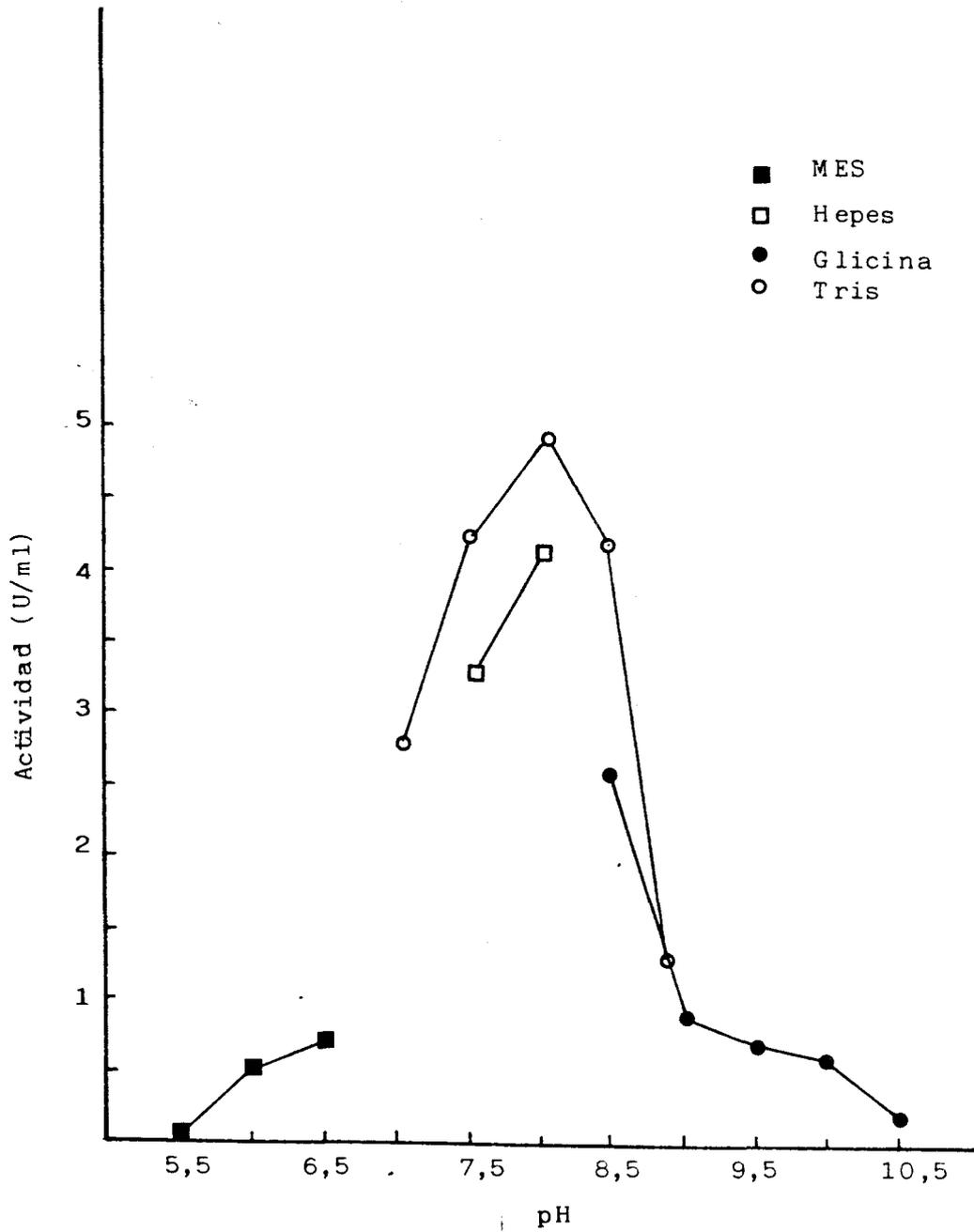


Figura 33. Efecto del pH del medio de reacción sobre la actividad fosfatasa alcalina de células de *M. coralloides* D.

Temperatura

Las Figuras 34 y 35 recogen los resultados obtenidos al estudiar la influencia de la temperatura sobre las actividades fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente.

El máximo de actividad ácida se presenta a 43°C, iniciándose después una marcada disminución, presumiblemente por inactivación de la enzima por efecto de la temperatura. El máximo de actividad alcalina se presenta a 37°C, con una inactivación hacia temperaturas mayores con menor pendiente que en el caso de la actividad fosfatasa ácida.

Dado que la actividad ácida detectable a 37°C fue también apreciable, se escogió esta temperatura para el ensayo de ambas actividades en estudios posteriores.

Molaridad

Como se recoge en las Tablas 14 y 15, ambas actividades presentaron una máxima actividad en tampones con una molaridad de 50 mM. Se ensayaron dos valores de pH para ambas enzimas con resultados similares.

Las condiciones de ensayo escogidas tras estos resultados fueron: tampón acético-acetato pH 4,5 50 mM y tampón Tris-ClH pH 8,1 50 mM, a una temperatura de 37°C.

RESULTADOS

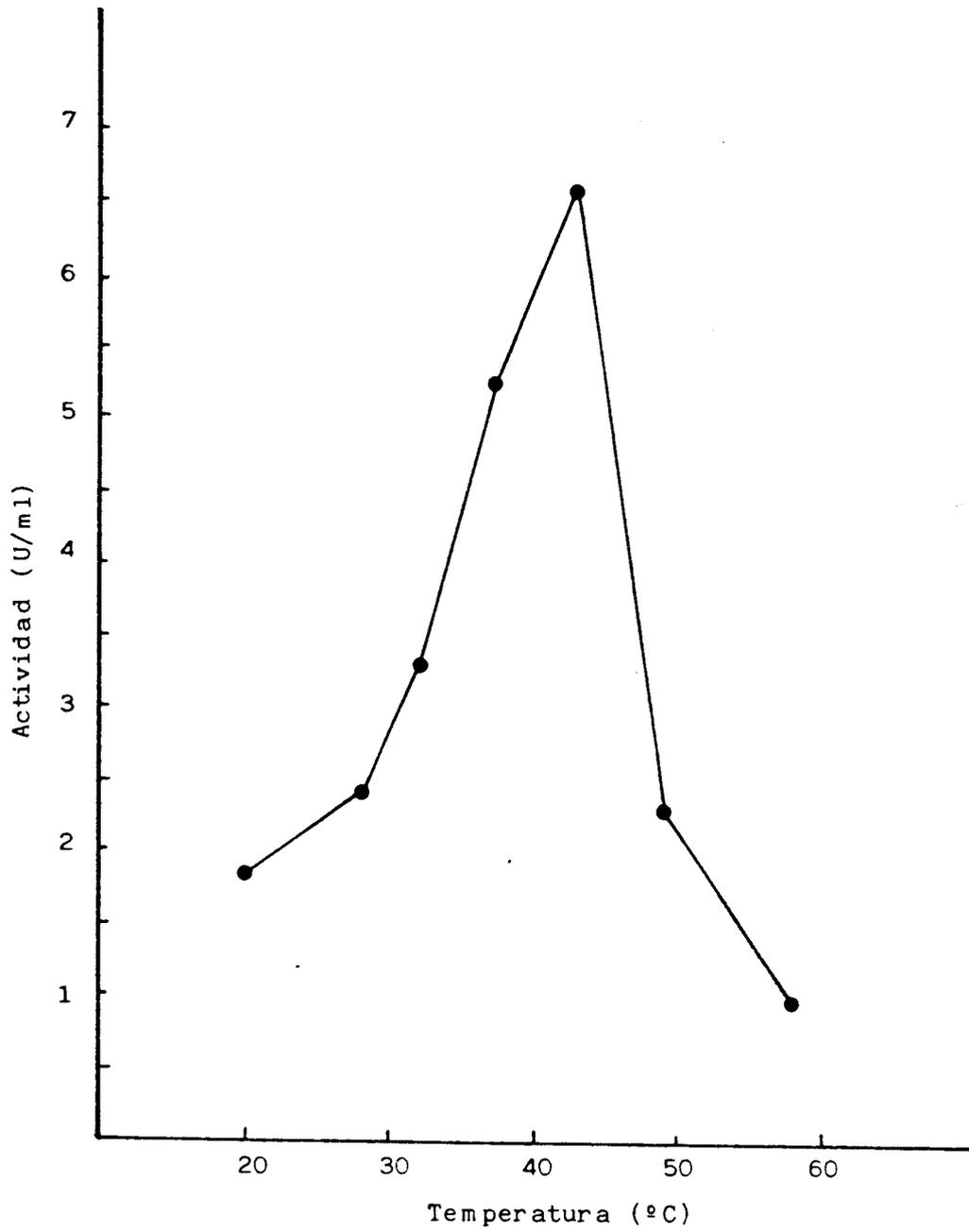


Figura 54. Influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad fosfatasa acida de células de *M. coralloides* D.

RESULTADOS

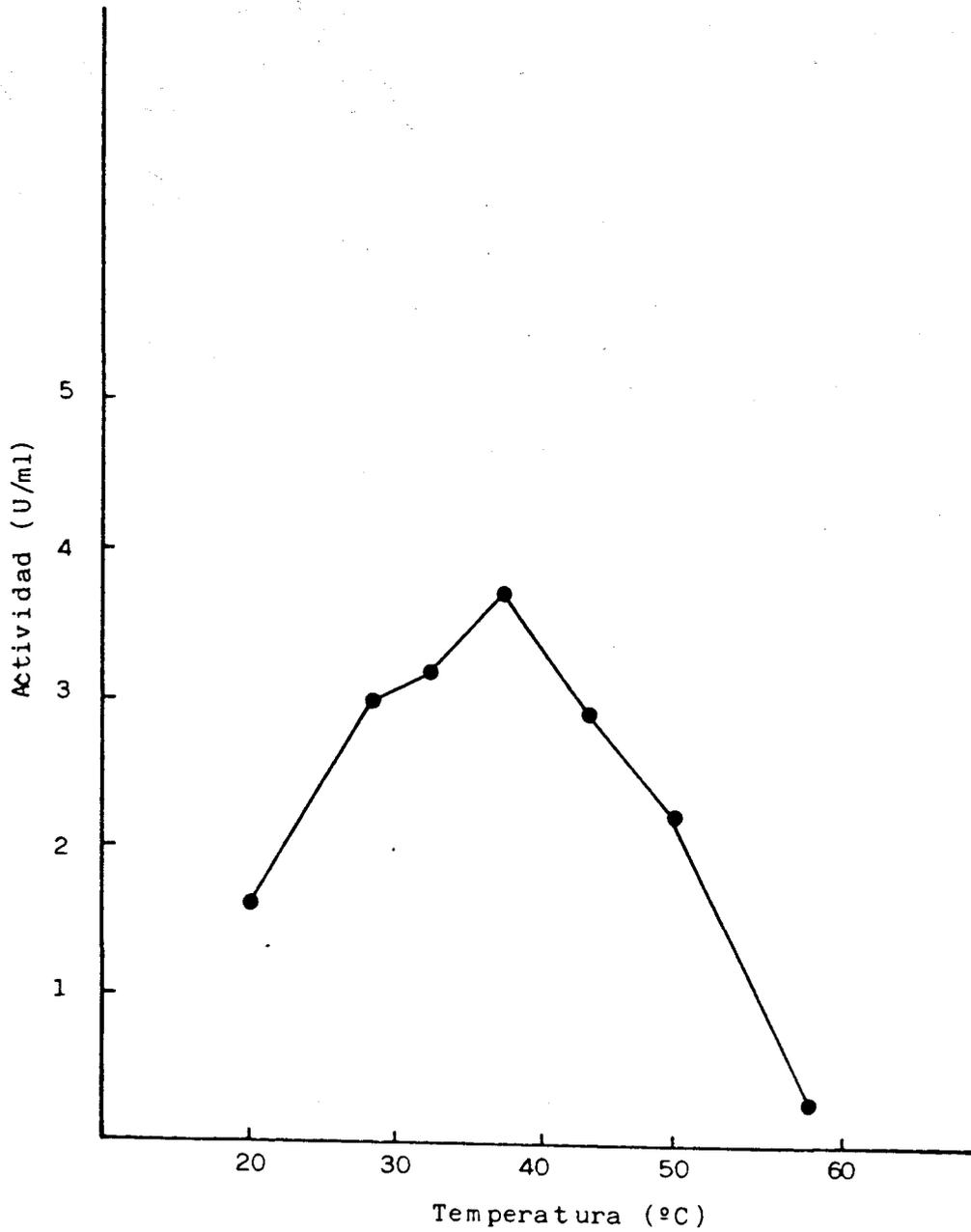


Figura 35. Influencia de la temperatura de reacción sobre la actividad fosfatasa alcalina de células de *M. coralloides* D.

RESULTADOS

Tabla 14. Influencia de la molaridad del tampón acético-acetato sobre la actividad fosfatasa ácida.

pH	Concentración (mM)	Actividad (% máximo)
4,0	5	77
4,0	10	95
4,0	25	98
4,0	50	100
4,0	75	84
4,5	5	70
4,5	10	90
4,5	25	97
4,5	50	100
4,5	75	77

RESULTADOS

Tabla 15. Influencia de la molaridad del tampón Tris-ClH sobre la actividad fosfatasa alcalina.

pH	Concentración (mM)	Actividad (% máximo)
7,6	5	58
7,6	10	93
7,6	25	100
7,6	50	96
7,6	75	41
8,1	5	80
8,1	10	69
8,1	25	86
8,1	50	100
8,1	75	58

6.2.4 Sensibilidad a enzimas y estabilidad frente al calor y pH

Sensibilidad a enzimas

Se determinó el efecto de diversos enzimas sobre las actividades fosfatasas. Ambas actividades no sufrieron modificaciones tras el tratamiento con enzimas que atacan a componentes glucídicos (β -glucosidasa y lisozima) o lipídicos (lipasa).

Por el contrario, y como era esperado, ambas actividades resultaron ser sensibles a los enzimas proteolíticos (Tabla 16). Sin embargo, es destacable la resistencia total al tratamiento con la proteasa Tipo V (Sigma), producida por *Streptomyces griseus*, por parte de la actividad alcalina. La forma ácida también resultó menos afectada por esta proteasa en comparación con las otras utilizadas (Pronasa, Tripsina y Proteasa Tipo XI).

Tabla 16. Sensibilidad a diferentes enzimas de la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

Enzima	Actividad residual (%)	
	ácida	alcalina
β -glucosidasa	100	100
Lipasa	100	100
Lisozima	100	100
Pronasa	28	22
Proteasa Tipo V	58	100
Proteasa Tipo XI	21	0
Tripsina	26	0

Estabilidad térmica

En las Tablas 17, 18 y 19, así como en las Figuras 36, 37, 38 y 39 se expone la evolución de la actividad fosfatasa ácida y alcalina en función de las distintas temperaturas y tiempos de ensayo.

La estabilidad de los enzimas a -20°C y 4°C se presenta en las Tablas 17 y 18, respectivamente. La actividad ácida resulta ser más estable a bajas temperaturas, conservándose el 71% de actividad al cabo de 2 meses a -20°C . La forma alcalina solo conserva el 51%. A 4°C , la fosfatasa alcalina presentaba solo el 41% de actividad residual tras 72 horas. La forma ácida mantiene un 74% de su actividad inicial.

A 37°C , y tras 60 minutos, ambas actividades permanecen casi inalteradas (Tabla 19).

El curso de inactivación a 50°C es diferente para las dos actividades. La fosfatasa alcalina presenta una meseta entre los 15 y 60 minutos, siendo bastante estable a esta temperatura. La forma ácida solo mantiene un 35% de actividad residual tras 60 minutos.

La inactivación a 60°C , 70°C y 80°C es exponencial para ambos enzimas, si bien la forma ácida es algo más resistente que la alcalina. La pérdida de actividad ácida es casi completa después de 60 minutos a 80°C y total la alcalina después de 60 minutos a 70°C .

RESULTADOS

Tabla 17. Estabilidad de la actividad fosfatasa ácida y alcalina a -20°C.

Tiempo	Actividad ácida (U/ml)	Actividad residual (%)	Actividad alcalina (U/ml)	Actividad residual (%)
0	7,02	100	4,37	100
3 días	6,01	85	3,04	69
7 días	5,19	74	2,57	59
1 mes	5,00	71	2,47	56
2 meses	5,01	71	2,24	51

Tabla 18. Estabilidad de la actividad fosfatasa ácida y alcalina a 4°C.

Tiempo	Actividad ácida (U/ml)	Actividad residual (%)	Actividad alcalina (U/ml)	Actividad residual (%)
0	5,72	100	4,37	100
12 horas	4,75	82	3,27	75
24 horas	4,50	78	2,14	49
48 horas	4,33	75	1,95	44
72 horas	4,27	74	1,79	41

RESULTADOS

Tabla 19. Estabilidad de la actividad fosfatasa ácida y alcalina a 37°C

Tiempo	Actividad ácida (U/ml)	Actividad residual (%)	Actividad alcalina (U/ml)	Actividad residual (%)
0	5,72	100	4,37	100
15 min	5,04	88	4,02	92
30 min	5,37	94	4,10	94
60 min	5,30	92	4,02	92

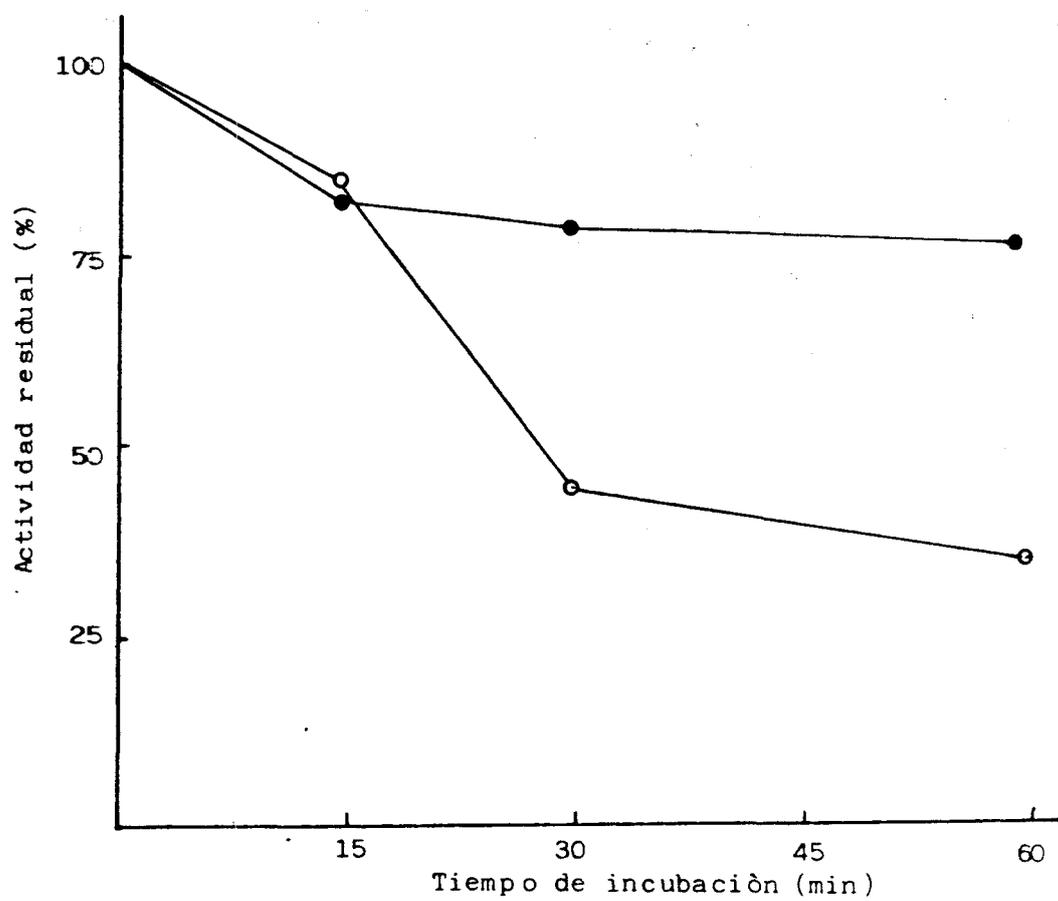


Figura 36. Estabilidad enzimática a 50°C. Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●).

RESULTADOS

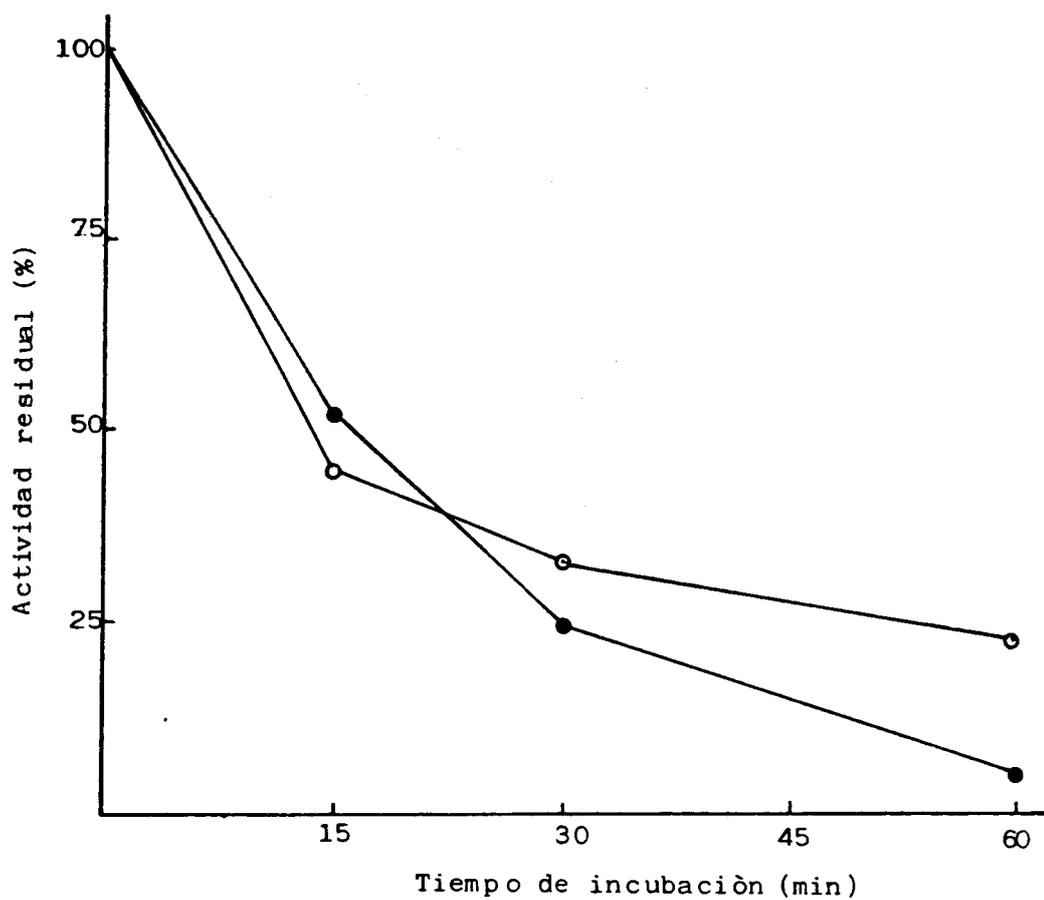


Figura 37. Estabilidad enzimática a 60°C. Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●).

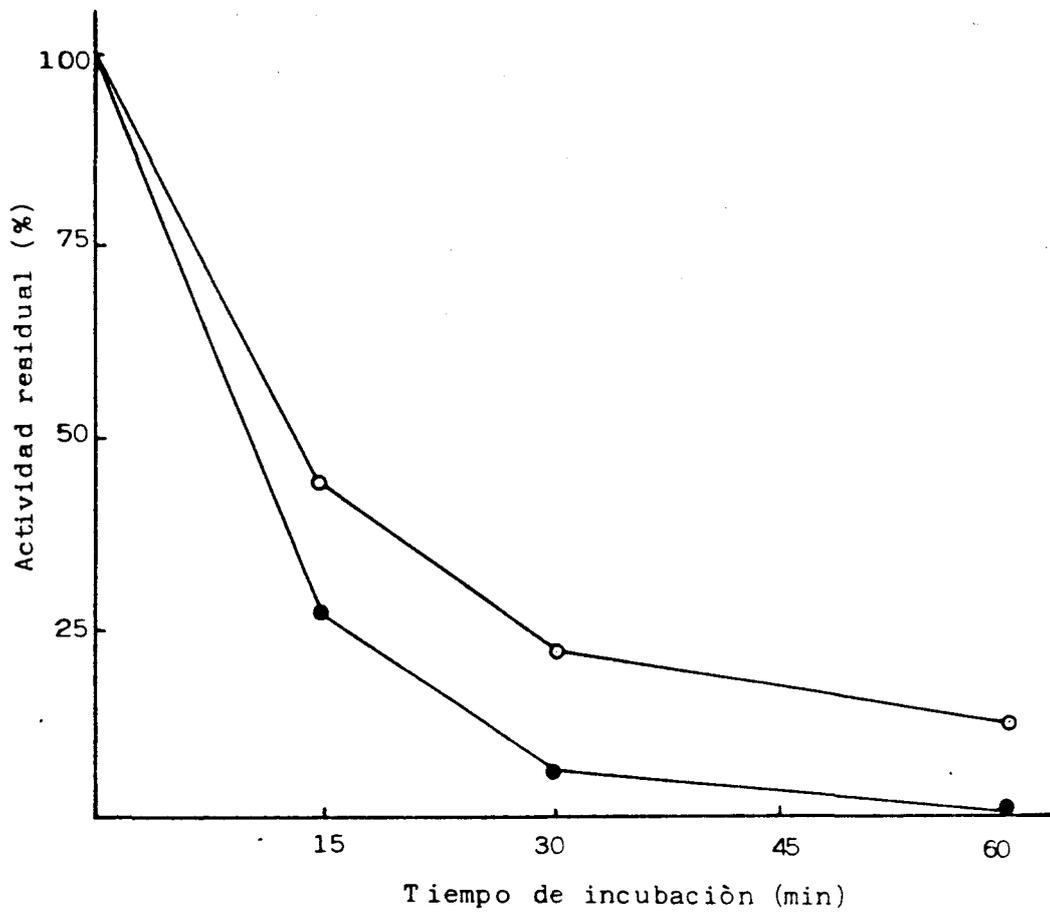


Figura 38. Estabilidad enzimática a 70°C. Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●).

RESULTADOS

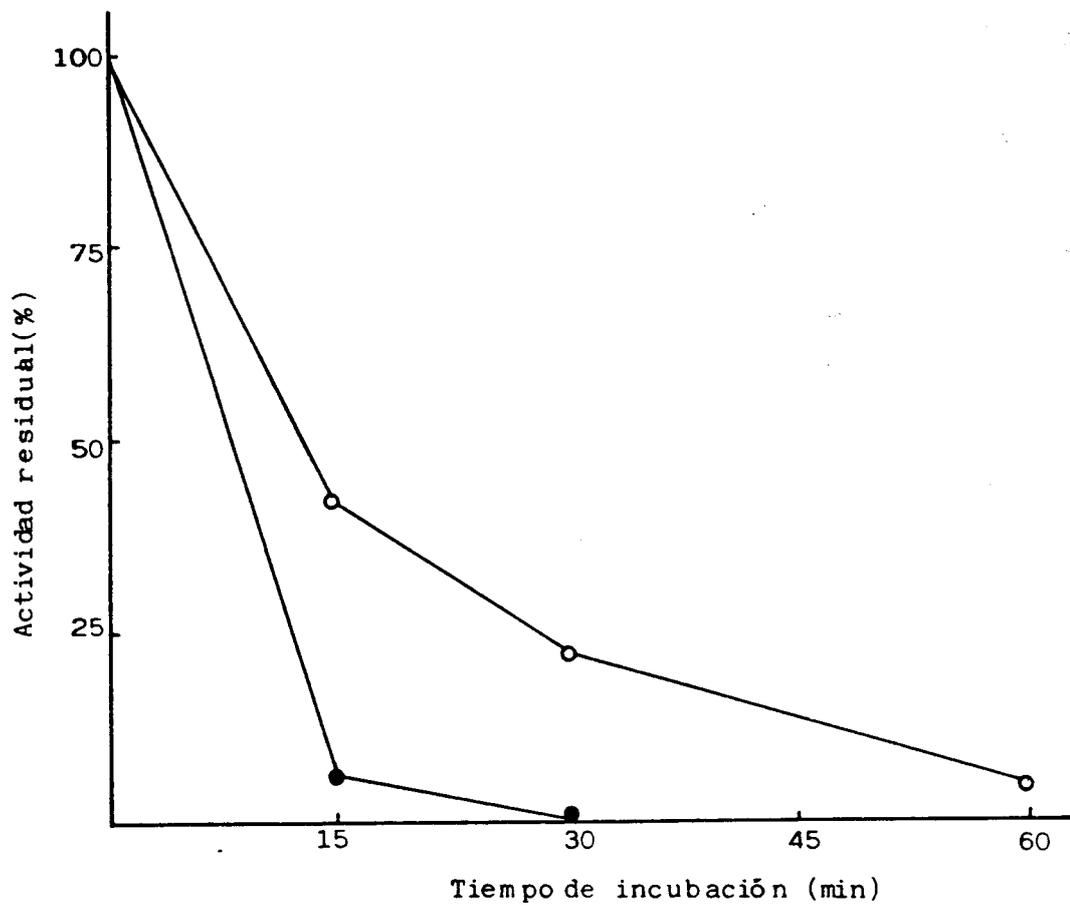


Figura 39. Estabilidad enzimática a 80°C. Actividad fosfatasa ácida (○) y alcalina (●).

Estabilidad frente al pH

En las Tablas 20 y 21 se presenta la evolución de las actividades fosfatasas tras la preincubación a 4°C y 20°C en tres tampones distintos de idéntica molaridad (50 mM) que cubrían un rango de pH de 3,0 a 10,0.

Las actividades enzimáticas determinadas tras dos horas de preincubación fueron poco alteradas para valores de pH comprendidos entre 3,0 y 9,0 para la actividad ácida y entre 6,0 y 9,0 para la alcalina, observándose una pérdida menor de actividad tras la preincubación a 4°C en comparación con la preincubación a 20°C.

Tabla 20. Estabilidad frente al pH a 4°C de la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

Tampón (50 mM)	pH	Actividad fosfatasa residual tras 2 horas (%)	
		ácida	alcalina
Citrato	3,0	94	0
Citrato	4,0	89	20
Citrato	5,0	89	33
Citrato	6,0	88	88
Tris	7,1	88	80
Tris	8,1	86	100
Glicina	9,0	81	80
Glicina	10,0	54	50

RESULTADOS

Tabla 21. Estabilidad frente al pH a 20°C de la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

Tampón (50 mM)	pH	Actividad fosfatasa residual tras 2 horas (%)	
		ácida	alcalina
Citrato	3,0	86	0
Citrato	4,0	86	26
Citrato	5,0	82	53
Citrato	6,0	82	80
Tris	7,1	88	73
Tris	8,1	82	73
Glicina	9,0	75	66
Glicina	10,0	46	36

6.2.5 Efecto de inhibidores enzimáticos

1. α -hidroxiácidos y compuestos relacionados

El ácido tartárico y otros α -hidroxiácidos han sido descritos como inhibidores de fosfatasa, especialmente en tejidos animales. Se ha estudiado el efecto del ácido tartárico, málico, cítrico y aspártico sobre ambas actividades, no encontrándose ningún grado de inhibición a concentraciones de 0,5 mM. Concentraciones de 2 y 5 mM provocaron una inhibición máxima del 8% (ácido málico y aspártico) en la fosfatasa ácida y del 10% para la alcalina (ácido málico y tartárico). En los otros casos no se encontró ningún grado de inhibición con estas concentraciones.

2. Agentes protectores e inhibidores de grupos -SH

Se ensayó la influencia de la N-etilmaleimida, un inhibidor de grupos -SH, sobre la actividad fosfomonoesterasa de ambas enzimas, no encontrándose efecto relevante. Las concentraciones estudiadas fueron de 0,5, 2 y 5 mM. De igual modo la presencia de cisteína, un protector de grupos -SH, a las mismas concentraciones, y de mezclas NEM/cisteína equimolares no produjeron variaciones apreciables sobre las actividades enzimáticas.

3. Agentes quelantes

La adición de EDTA o hidroxiquinoleína a concentraciones 0,5, 2 y 5 mM inhibió ligeramente la actividad fosfatasa ácida y de forma más acentuada la actividad alcalina.

La inhibición por EDTA e hidroxiquinoleína, ambas 5 mM, no superó el 9% de la actividad ácida. En la Tabla 22 se muestra el efecto inhibitor de ambos agentes sobre la actividad alcalina. El EDTA 5 mM se mostró más efectivo en la inhibición estudiada, con hasta un 60% en la reducción de actividad.

Tabla 22. Influencia del EDTA y la hidroxiquinoleina sobre la actividad fosfatasa alcalina

Agente	Concentración (mM)	Actividad residual (%)
EDTA	0	100
EDTA	0,5	95
EDTA	2	73
EDTA	5	40
Hidroxiquinoleina	0	100
Hidroxiquinoleina	0,5	90
Hidroxiquinoleina	2	82
Hidroxiquinoleina	5	69

4. ATA y FNa

El ácido aurintricarboxílico (ATA) es un potente inhibidor de nucleasas. Aunque la posibilidad de una actividad fosfatasa-nucleasa en un mismo enzima había sido descartada anteriormente, se estimó conveniente el estudio el efecto de este inhibidor sobre la actividad fosfatasa ácida y alcalina de *M. coralloides* D. Para ambas actividades se detectó una inhibición no superior al 6% para una concentración 5 mM de ATA.

El FNa se ha descrito como un potente inhibidor de la actividad fosfatasa. En nuestro caso, el fluoruro se muestra como un inhibidor potente de la actividad ácida, mientras que actúa de forma mucho menos acentuada sobre la actividad alcalina (Tabla 23). Las concentraciones utilizadas fueron 0,5, 2 y 5 mM. La actividad ácida es inhibida en un 73% a una concentración de FNa de 0,5 mM. La actividad alcalina solo es inhibida en un 42% a una concentración diez veces mayor.

Tabla 23. Efecto del FNa sobre la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

Concentración de FNa (mM)	Actividad residual (%)	
	ácida	alcalina
0	100	100
0,5	27	97
2	6	72
5	0,18	58

6.2.6 Efecto de diferentes iones

Los diferentes iones ensayados pueden agruparse por sus características químicas en varios grupos:

i) cationes alcalinos monovalentes: Li^+ , K^+ y Cs^+ . En este grupo incluimos en razón de su carga al ión amonio, NH_4^+ , aunque no comparte afinidades químicas con los anteriores.

ii) cationes alcalinoterreos divalentes: Mg^{+2} y Ca^{+2} .

iii) cationes metálicos divalentes del grupo del zinc: Zn^{+2} , Cd^{+2} y Hg^{+2} .

iv) cationes metálicos di o trivalentes del grupo de hierro: Fe^{+2} , Fe^{+3} , Co^{+2} y Ni^{+2} . En este grupo incluimos arbitrariamente al Al^{+3} , Cu^{+2} y Mn^{+2} . El Cu^{+2} se sitúa entre el grupo del hierro y del zinc. El Al^{+3} y el Mn^{+2} poseen una cierta proporción de carácter no metálico.

v) Aniones descritos como inhibidores de la actividad fosfatasa: PO_4^{-3} , AsO_4^{-3} y MoO_4^{-2} .

Los estudios con los iones presentados se realizaron a tres concentraciones diferentes, 0,1, 1 y 10 mM. Esta última concentración produjo en algunos casos precipitaciones en el tampón de incubación con interferencias en las medidas de actividad, especialmente tras detener la reacción con NaOH. Los iones Cd^{+2} , Fe^{+2} y Co^{+2} produjeron interferencias en la coloración por lo que sus medidas no fueron consideradas.

La concentración 1 mM produjo los efectos más claros sobre la actividad fosfatasa sin provocar problemas de interferencia en las medidas. Por ello en la Tabla 24 se muestran los resultados obtenidos con esta concentración.

Se observa que a excepción del Mg^{+2} y Mn^{+2} , el resto ejerce un efecto inhibitor en mayor o menor grado. Los iones K^+ , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Ni^{+2} , Al^{+3} , MoO_4^{-2} y Cu^{+2} fueron los más efectivos en la

RESULTADOS

inhibición de la actividad ácida, superando el 50% de inhibición. Este grado fue superado para la actividad alcalina en el caso de los iones Li^+ , Cs^+ , Zn^{+2} , Hg^{+2} , Fe^{+3} , Cu^{+2} y MoO_4^{-2} .

El resto de los iones provoca un grado de inhibición comprendido entre el 50% y el 8%. El Mn^{+2} posee un efecto inhibitor muy reducido (2-3%) y el Mg^{+2} actúa como activador (102-120%).

Los aniones fosfato y arseniato a una concentración de 1 mM provocaban un ligero efecto inhibitor. Por su interés en posteriores estudios de cinética se estudió el efecto inhibitor a mayores concentraciones, encontrándose una inhibición del 50% para ambas actividades a concentraciones de fosfato y arseniato de 16 mM.

RESULTADOS

Tabla 24. Efecto de diferentes iones (concentración 1 mM), sobre la actividad fosfatasa ácida y alcalina.

Ión	Actividad residual (%)	
	ácida	alcalina
NH_4^+	84	68
Li^+	82	28
K^+	45	50
Cs^+	63	35
Mg^{+2}	102	120
Ca^{+2}	84	67
Zn^{+2}	66	36
Hg^{+2}	46	8
Fe^{+3}	10	29
Ni^{+2}	27	60
Al^{+3}	23	57
Mn^{+2}	98	97
Cu^{+2}	41	17
PO_4^{-3}	92	90
As_4^{-3}	92	90
MoO_4^{-2}	26	22

6.2.7 Especificidad de sustrato

La Tabla 25 muestra la especificidad de sustrato de ambas actividades fosfatasa. Como es característico de las fosfomonoesterasas, ambas presentan actividad sobre una amplia variedad de sustratos.

Las dos enzimas son capaces de actuar sobre el enlace fosfoéster de azúcares fosforilados, nucleótidos, sustratos artificiales y otras sustancias fosforiladas que se pueden encontrar en la célula.

La actividad sobre azúcares fosforilados presenta un cierto grado de complementariedad en ambas enzimas. El ATP es hidrolizado, especialmente por la actividad alcalina, mientras que ambas actividades actúan con eficacia sobre el ADP y AMP. Los cuatro sustratos artificiales ensayados son también degradados. Tan solo la forma alcalina actuó significativamente sobre el pirofosfato. Las otras formas de polifosfatos ensayadas fueron hidrolizadas a muy bajo nivel o no fueron degradadas en absoluto. No se detectó actividad fosfodiesterasa sobre el AMPc.

TABLA 25. Actividad de la fosfatasa ácida y alcalina sobre diversos sustratos

Sustrato	Actividad (% máxima)	
	ácida	alcalina
Fructosa-6-fosfato	27	42
Fructosa-1,6-difosfato	6	100
Glucosa-6-fosfato	35	33
Glucosa-1-fosfato	65	9
Ribosa-5-fosfato	12	34
ATP	1	31
ADP	50	66
AMP	96	84
AMPc	0	0
p-NPP	57	28
fenoltaleinadifosfato	100	56
α -naftolfosfato	54	53
β -glicerolfosfato	23	34
PPi	4	37
PP ₃	1	0
PP ₂₅ ^a	0	0
PP ₇₅ ^b	0	0
Fosfoenolpiruvato	40	38
Piridoxal-5-fosfato	31	28

^a Polifosfatos con una longitud media de 25 unidades de fosfato

^b Polifosfatos con una longitud media de 75 unidades de fosfato

6.3 ESTUDIOS DE CINÉTICA ENZIMÁTICA

6.3.1 Características cinéticas de las fosfatasas celulares

Los datos cinéticos obtenidos según se detalla en el apartado de Material y Métodos, fueron representados en forma lineal para facilitar la determinación de las constantes cinéticas. Estos estudios comprenden la determinación de la constante de Michaelis-Menten para los sustratos p-nitrofenilfosfato (pNPP), glucosa-6-fosfato (G6P) y β -glicerolfosfato (β GP). Así mismo, se estudió la inhibición de la hidrólisis del p-NPP por fosfato y arseniato, la inhibición de la hidrólisis de la G6P por la glucosa y de la hidrólisis del β GP por el glicerol.

1. Estudios con pNPP

Las Figuras 40 y 41 muestran la representación según Lineweaver-Burk obtenidas con cuatro concentraciones distintas de fosfato (0, 8, 16 y 33 mM), para la fosfatasa ácida y alcalina, respectivamente. Los resultados muestran que la inhibición por fosfato es de tipo competitiva.

La K_m encontrada para el p-NPP fue de $1,56 \times 10^{-3}M$ en el caso de la fosfatasa ácida y de $5 \times 10^{-3}M$ para la alcalina.

La representación de la pendiente de cada representación inversa frente a la correspondiente concentración de inhibidor (Figura 42) muestra que la inhibición es lineal. Los valores de K_i encontrados fueron de $6,2 \times 10^{-3}M$ en el caso de la fosfatasa ácida y de $8 \times 10^{-3}M$ para la alcalina.

En los estudios de inhibición con arseniato (Figuras 43,44 y 45) se encontraron unos valores de K_i de $8,4 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa ácida y de $16,2 \times 10^{-3}M$ para la alcalina. Los datos muestran también una inhibición lineal competitiva.

RESULTADOS

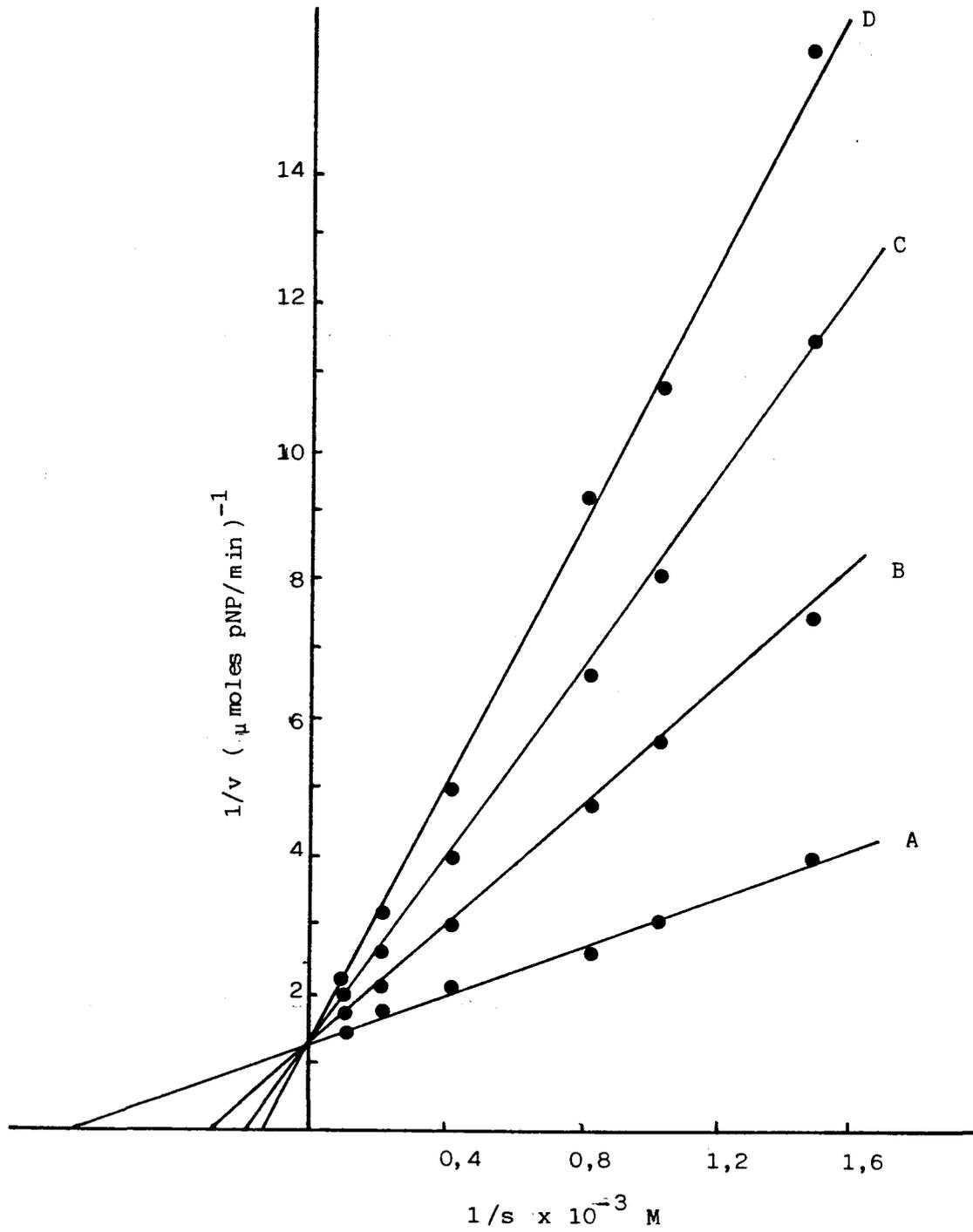


Figura 40. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el pNPP de la fosfatasa ácida a diferentes concentraciones de Pi. (A) 0 mM de Pi, (B) 8 mM de Pi, (C) 16 mM de Pi y (D) 33 mM Pi.

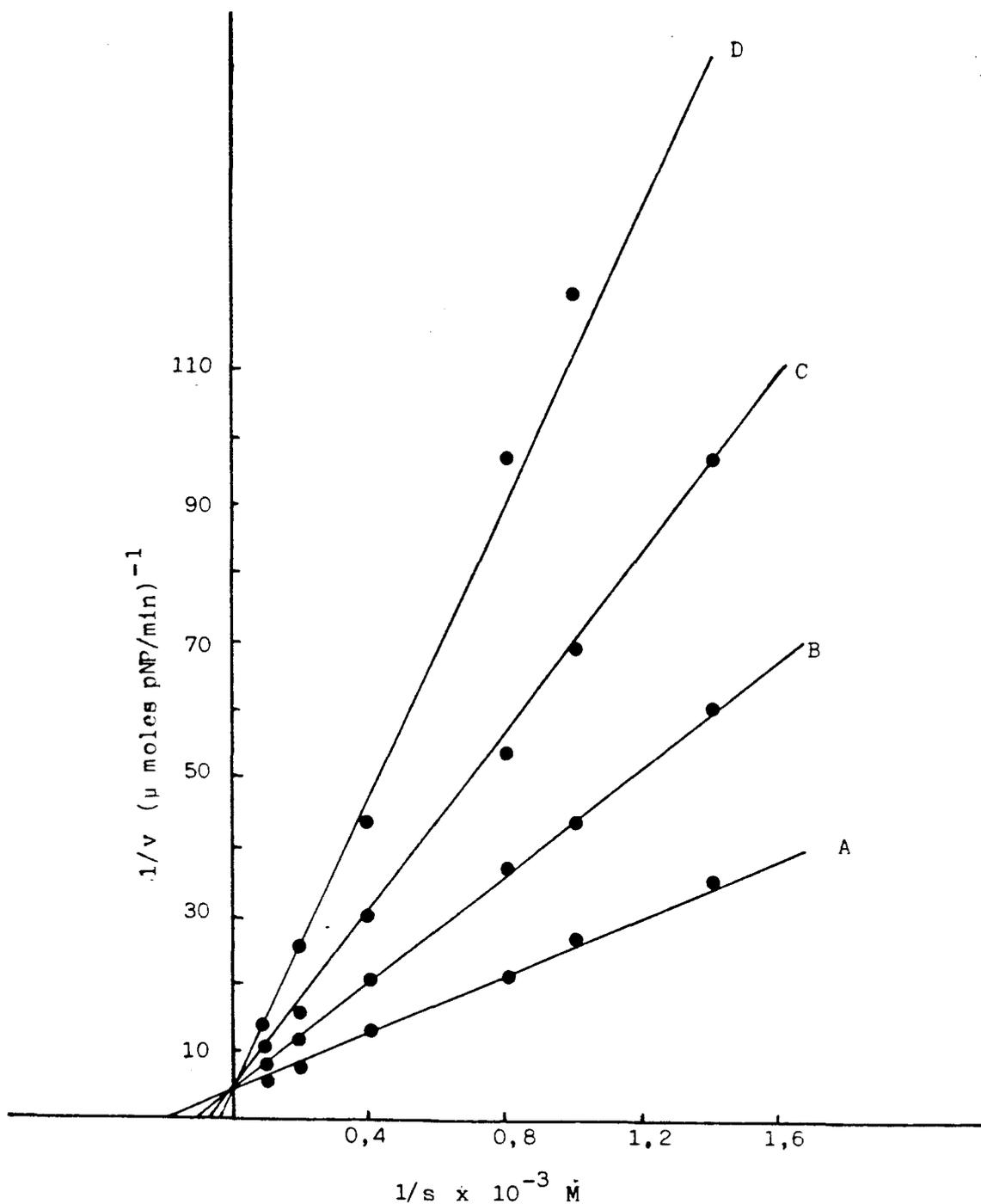


Figura 41. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el pNPP de la fosfatasa alcalina a diferentes concentraciones de Pi. (A) 0 mM Pi, (B) 8 mM Pi, (C) 16 mM Pi y (D) 33 mM Pi.

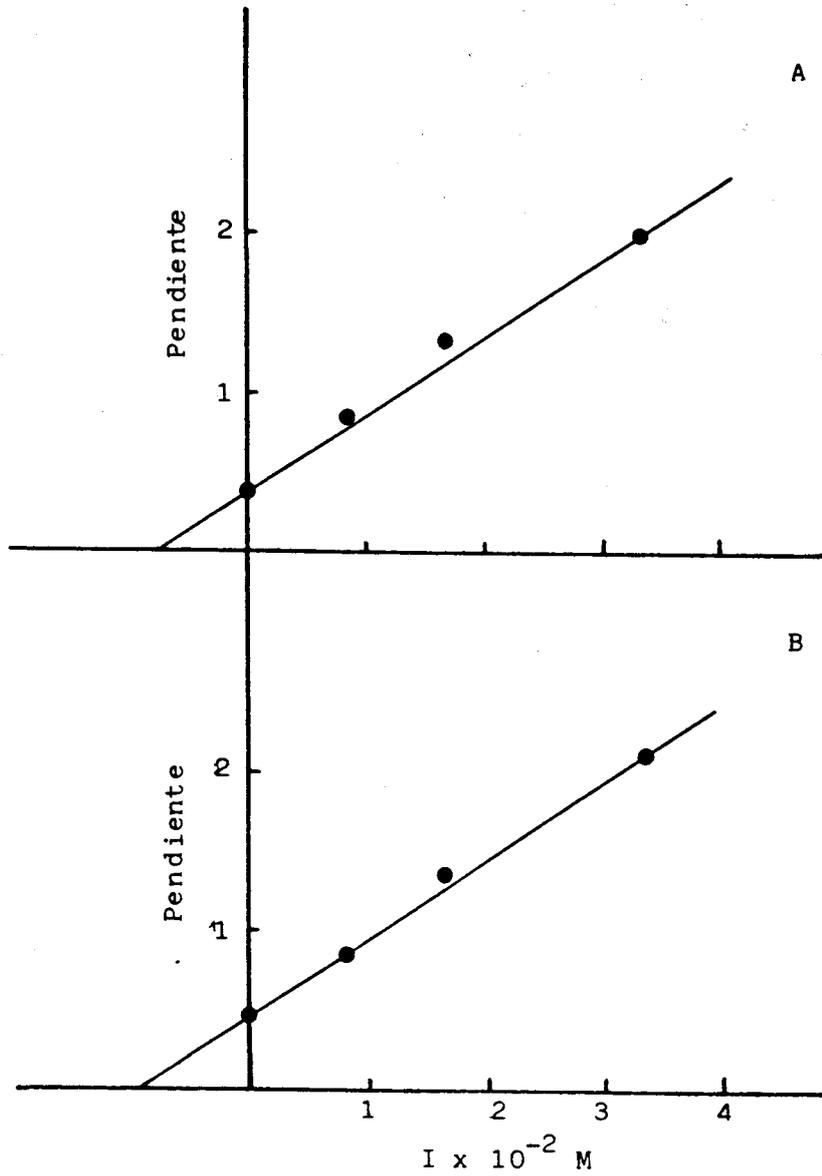


Figura 42. Pendientes de las representaciones inversas de las figuras 36 (A) 37 (B) en función de la concentración de fosfato.

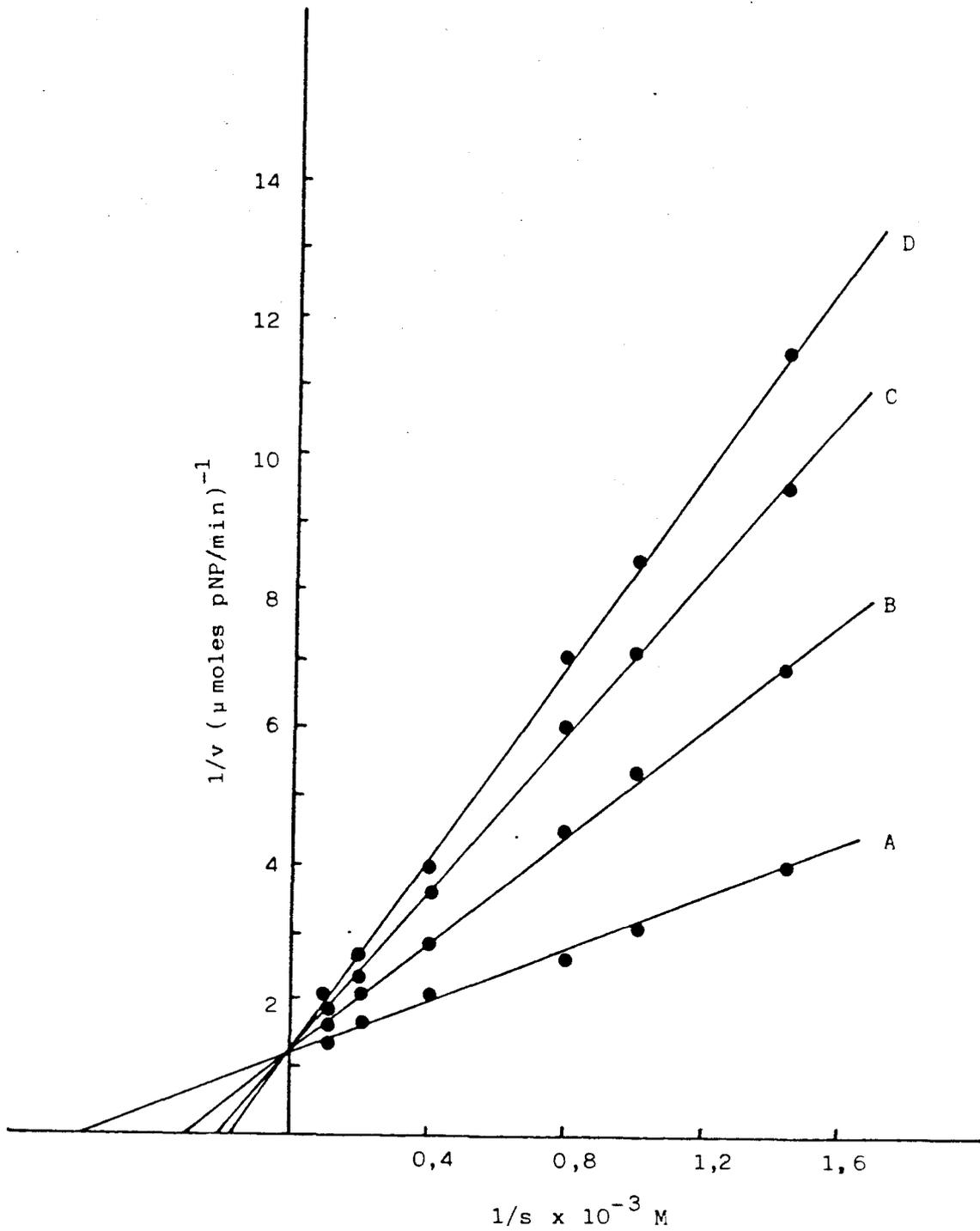


Figura 43. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el pNPP de la fosfatasa ácida a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} . (A) 0 mM AsO_4^{3-} , (B) AsO_4^{3-} , (C) 16 mM AsO_4^{3-} y (D) 33 mM AsO_4^{3-} .

RESULTADOS

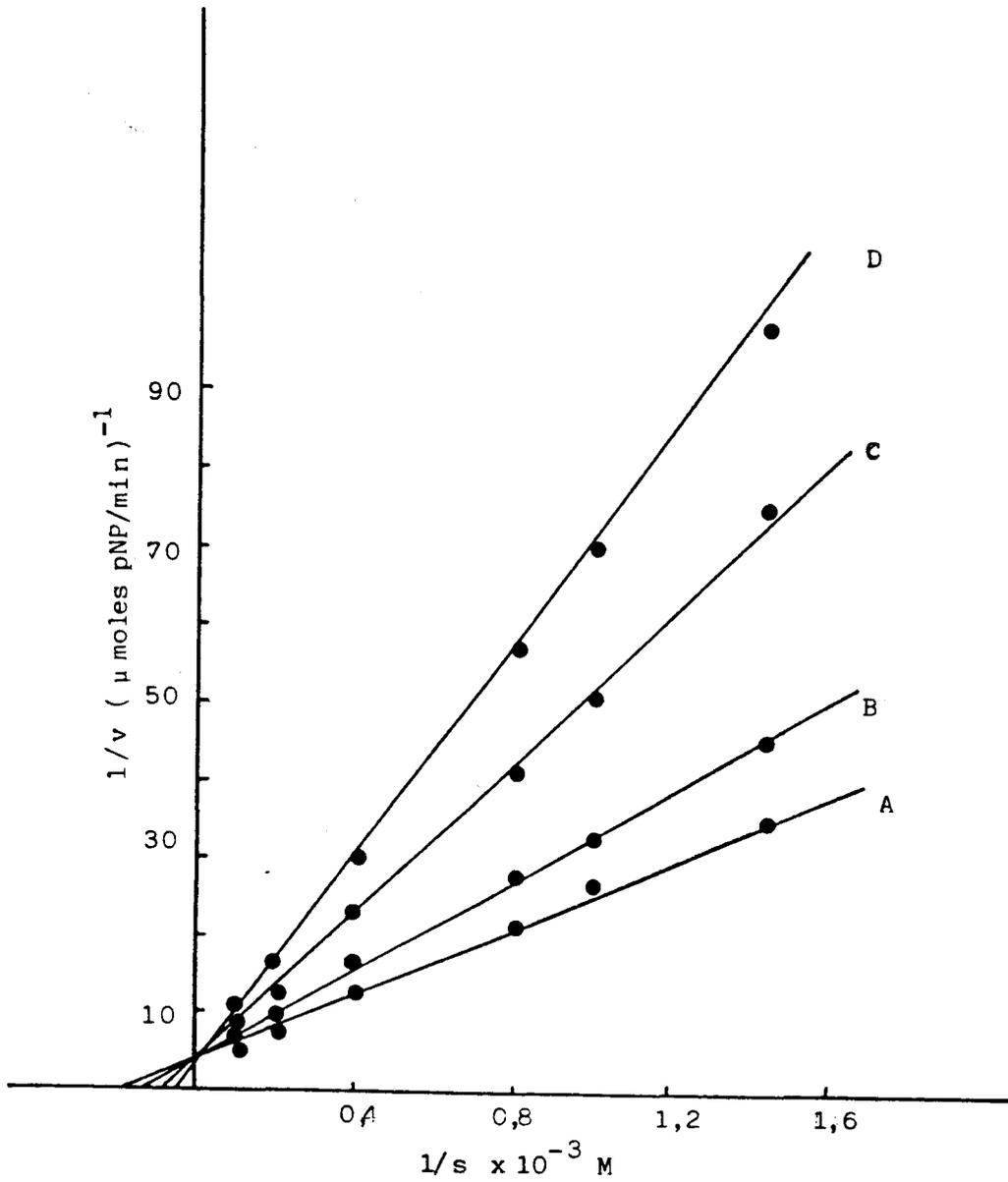


Figura 44. Representacion de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el pNPP de la fosfatasa alcalina a diferentes concentraciones de AsO_4^{3-} . (A) 0 mM AsO_4^{3-} , (B) AsO_4^{3-} , (C) 16 mM AsO_4^{3-} y (D) 33 mM AsO_4^{3-} .

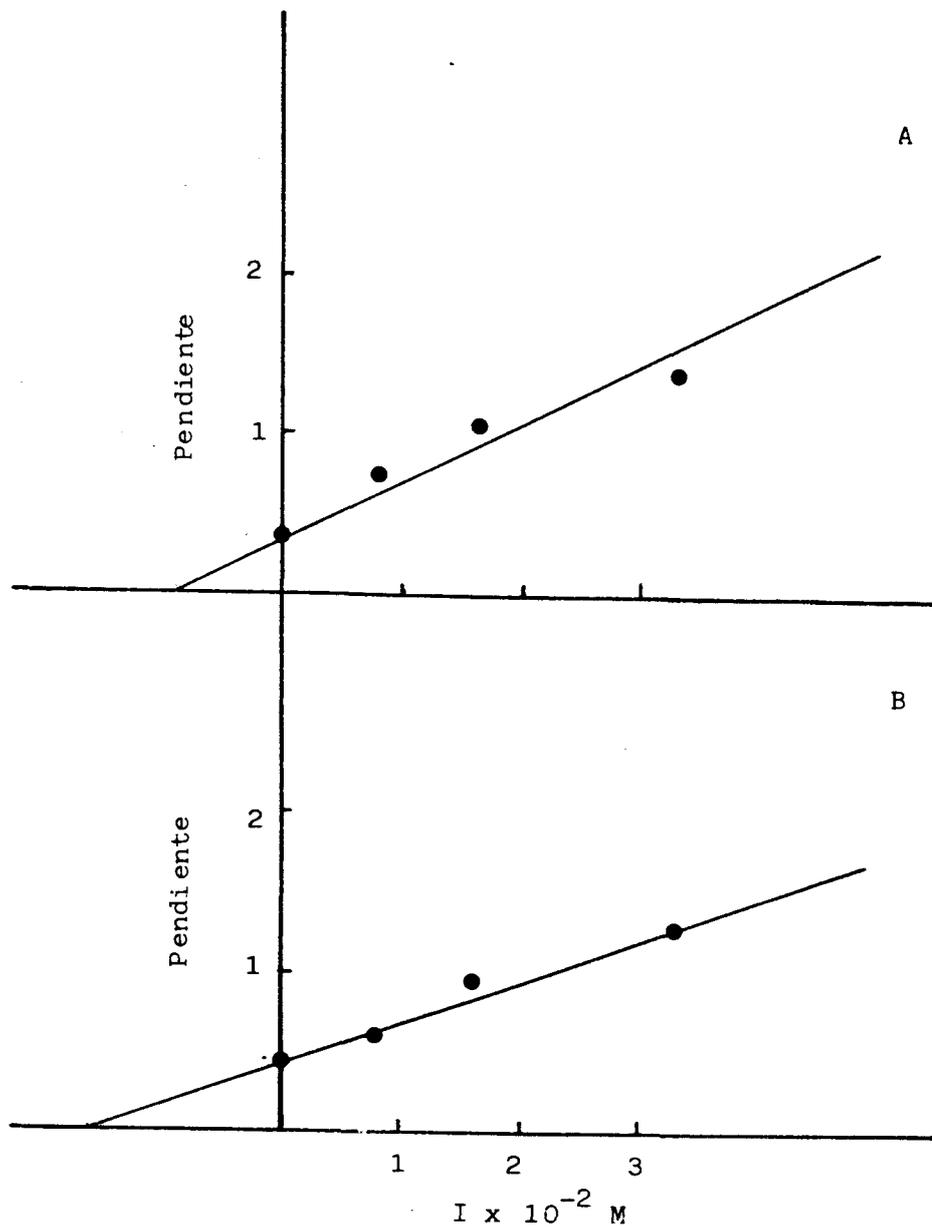


Figura 45. Pendientes de las representaciones inversas de las figuras 39 (A) y 40 (B) en función de la concentración de arseniato.

2. Estudios con glucosa-6-fosfato

La producción de fosfato a partir de glucosa-6-fosfato fue medida en presencia de cuatro concentraciones diferentes de glucosa (0, 0,45, 0,75 y 1,25 M). Los resultados se presentan en las Figuras 46 y 47, según Lineweaver-Burk.

Se obtuvieron unos valores de K_m para la glucosa de $2,22 \times 10^{-3}M$ en el caso de la fosfatasa ácida y de $2,85 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa alcalina.

El tipo de inhibición mostrado fue no competitiva (lineal tipo mixto). La representación de la pendiente de cada una de las representaciones inversas frente a la concentración de inhibidor (Figura 48) permitió calcular la K_i de la glucosa. Los valores encontrados fueron de 1,35 M para la fosfatasa ácida y 1,075 M para la fosfatasa alcalina.

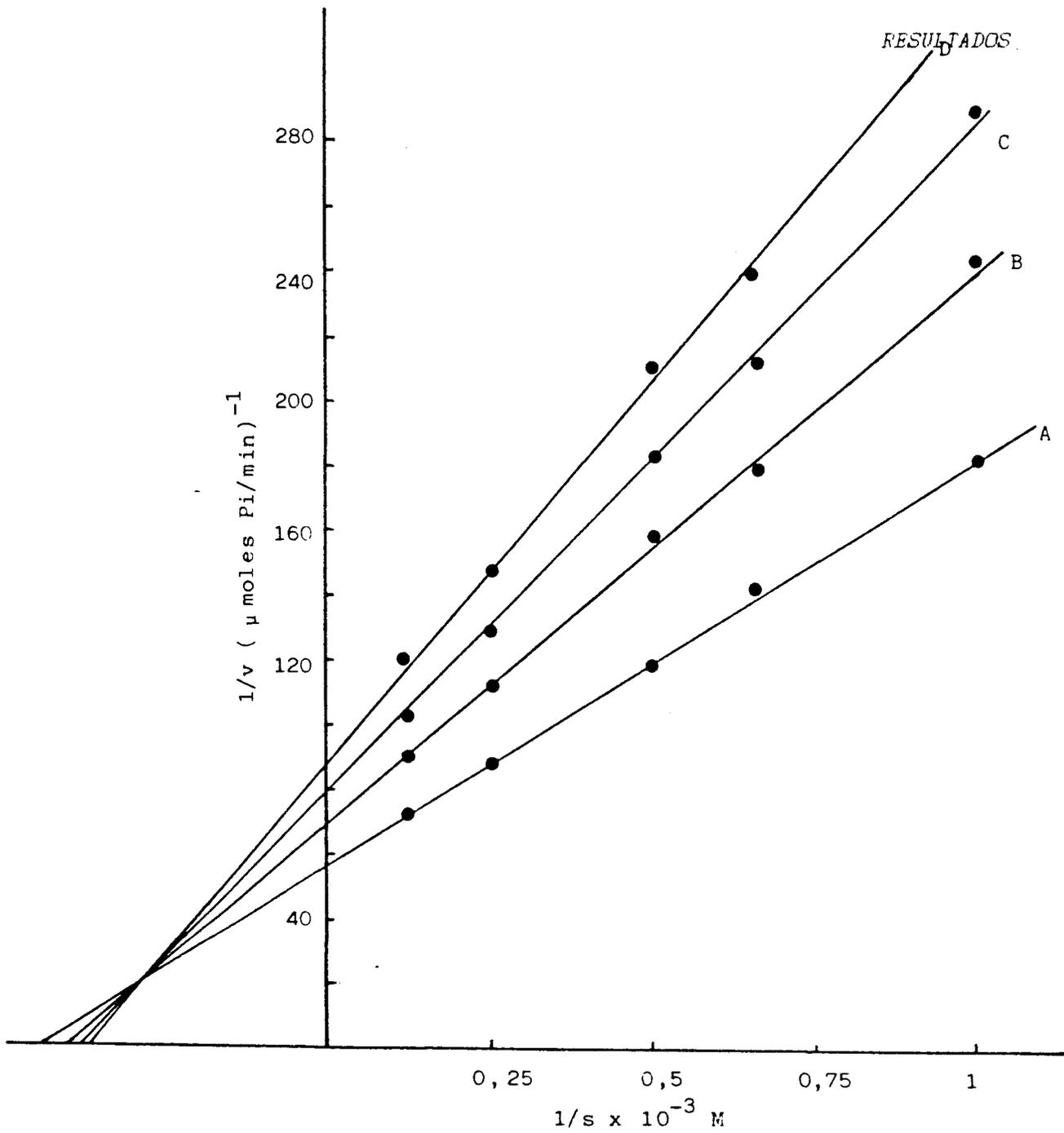


Figura 46. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para la glucosa-6-fosfato de la fosfatasa ácida a diferentes concentraciones de glucosa. (A) 0 M glucosa, (B) 0,45 M glucosa, (C) 0,75 M glucosa y (D) 1,25 M glucosa.

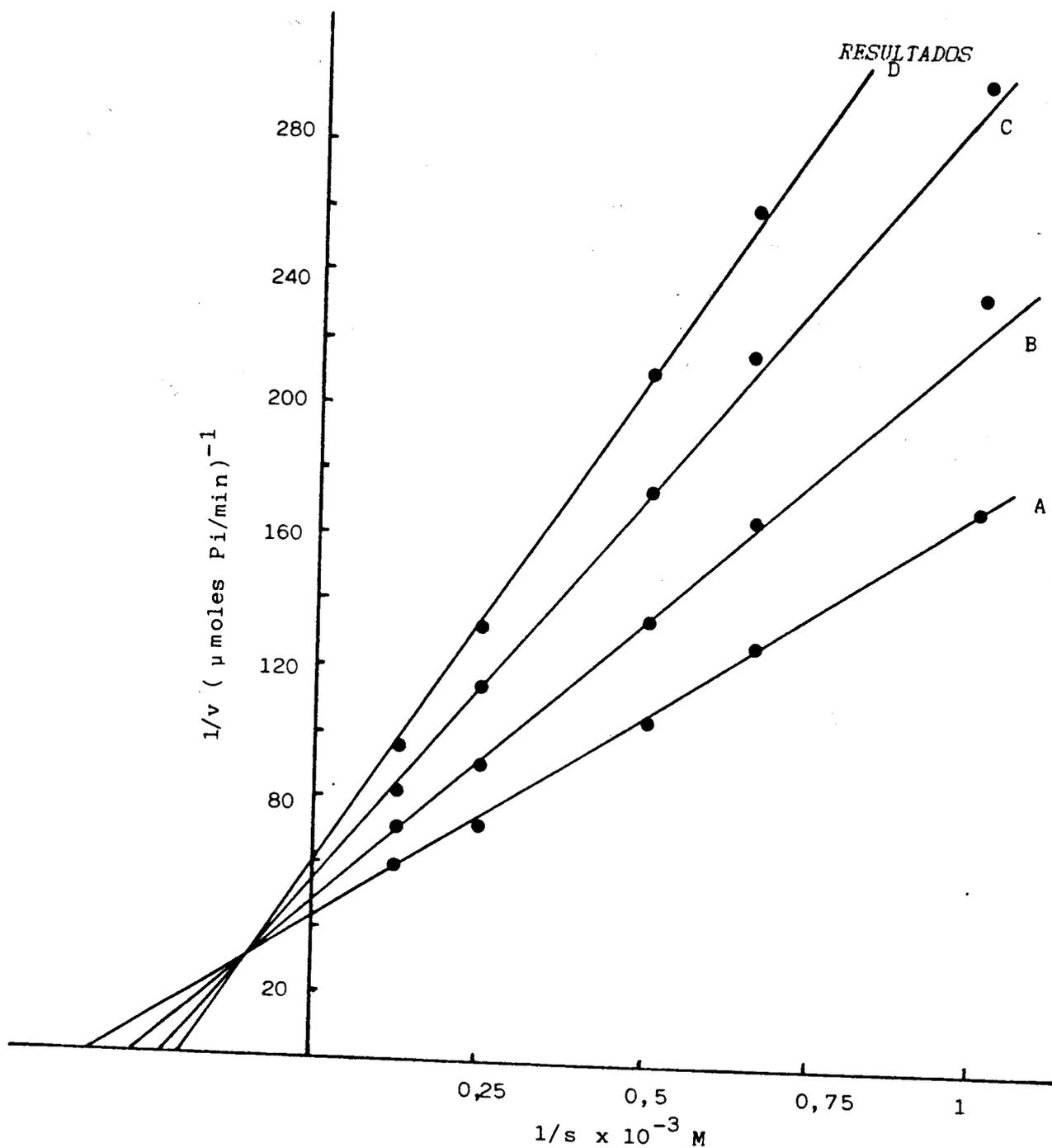


Figura 47. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para la glucosa-6-fosfato de la fosfatasa alcalina a diferentes concentraciones de glucosa. (A) 0 M glucosa, (B) 0,45 M glucosa, (C) 0,75 M glucosa y (D) 1,25 M glucosa.

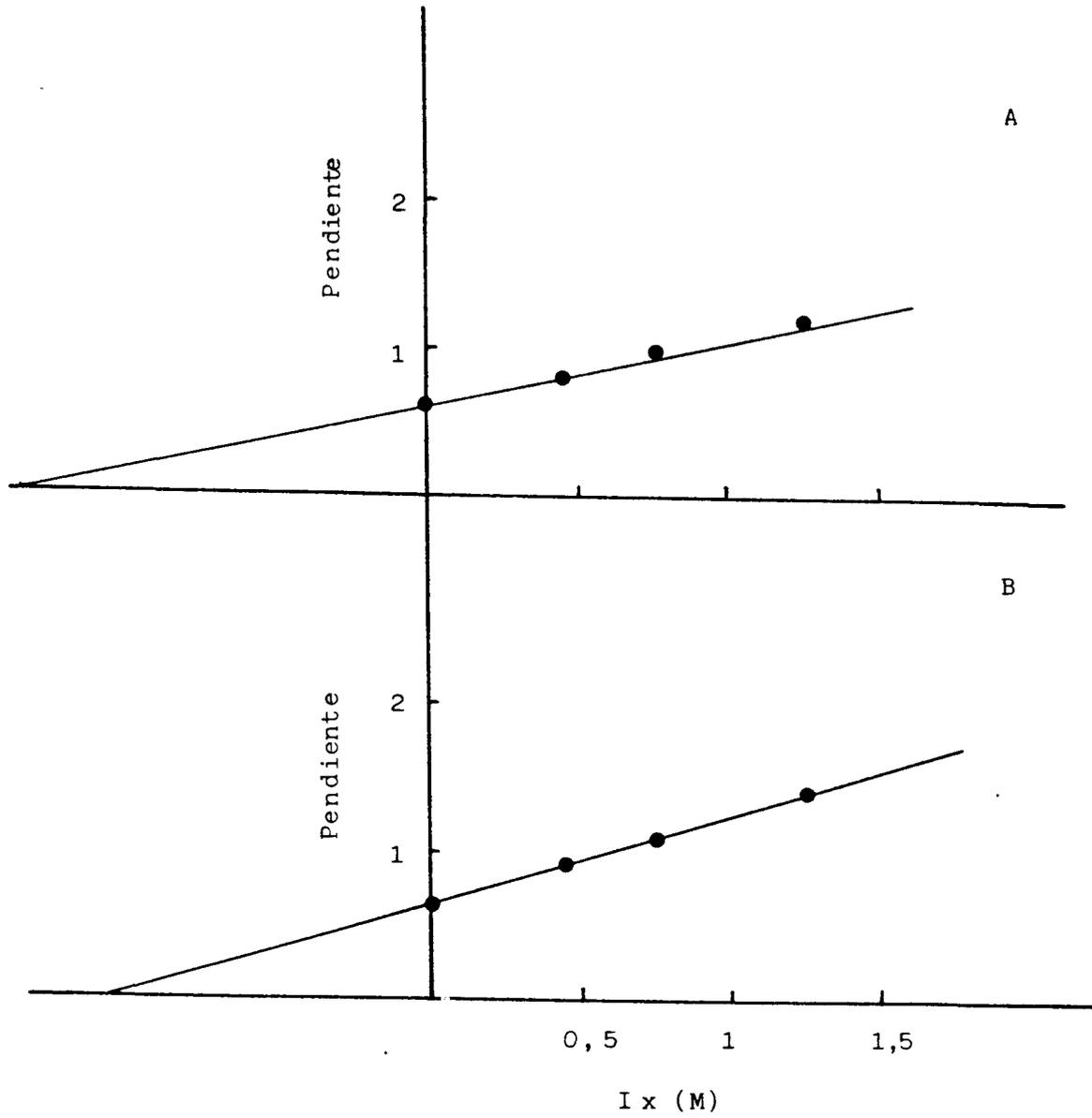


Figura 48. Pendientes de las representaciones inversas de las figuras 42 (A) y 43 (B) en función de la concentración de glucosa.

3. Estudios con β -glicerolfosfato

La producción de fosfato a partir de β -glicerolfosfato fue determinada a tres concentraciones diferentes de glicerol (0, 0,5 y 1,9 M).

La Figura 49 muestra la representación doble inversa para la fosfatasa ácida y la Figura 50 para la fosfatasa alcalina. Los valores de K_m inferidos de ellas son de $5 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa ácida y $3,33 \times 10^{-3}M$ para la alcalina.

La inhibición mostrada con el uso del glicerol fue de tipo no competitiva (lineal tipo mixto) para la fosfatasa ácida. La representación de las pendientes de cada representación inversa frente a la concentración de inhibidor dió un valor de K_i para el glicerol de 1,5 M (Figura 51).

La inhibición mostrada por la fosfatasa alcalina fue del tipo lineal no competitiva. La representación de Dixon (inversa de la velocidad frente a concentración de inhibidor) nos dió un valor de K_i para el glicerol de 3,9 M.

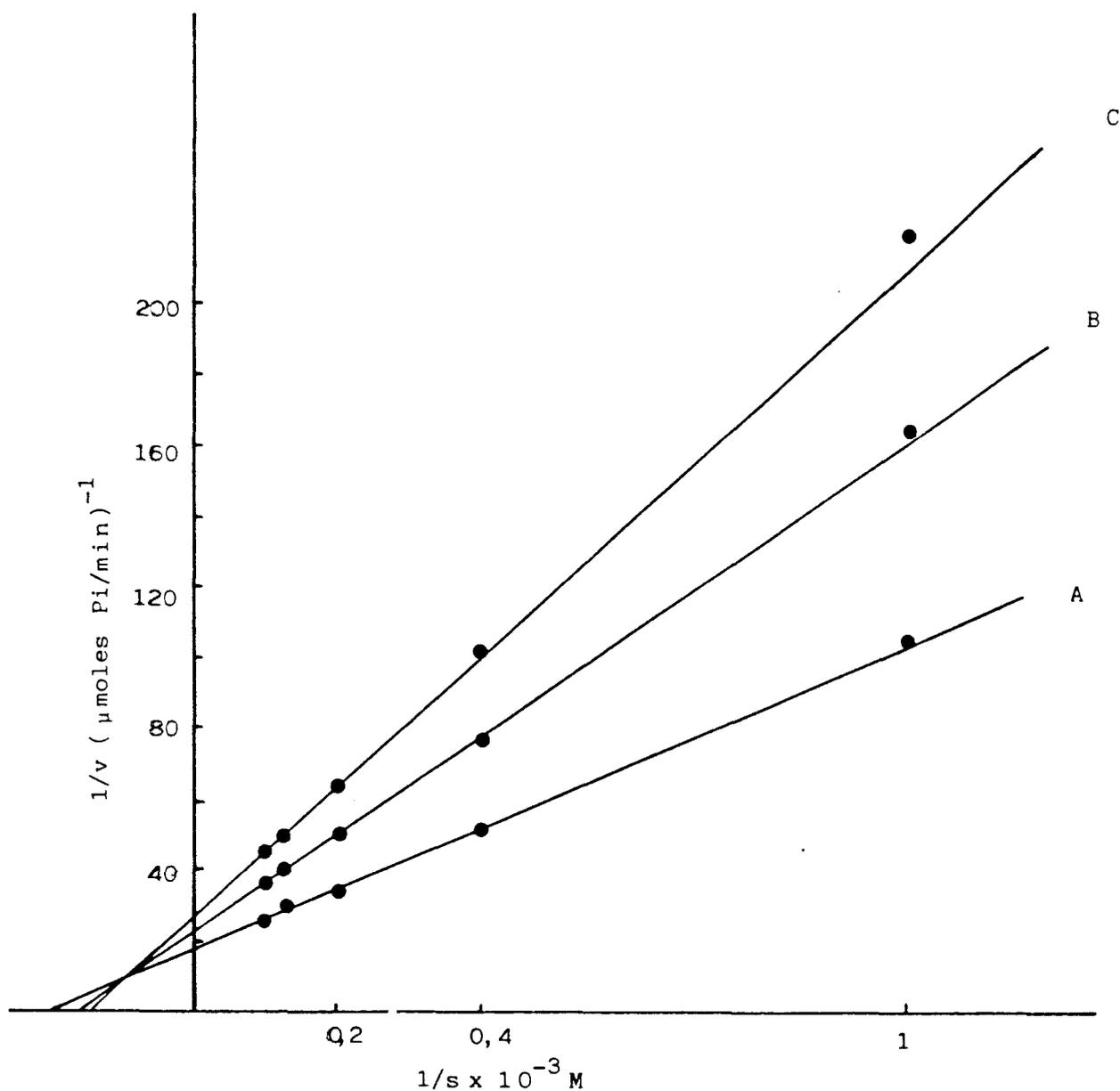


Figura 49. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el β -glicerolfosfato de la fosfatasa ácida a diferentes concentraciones de glicerol. (A) 0 M glicerol, (B) 0,5 M glicerol y (C) 1,9 M glicerol.

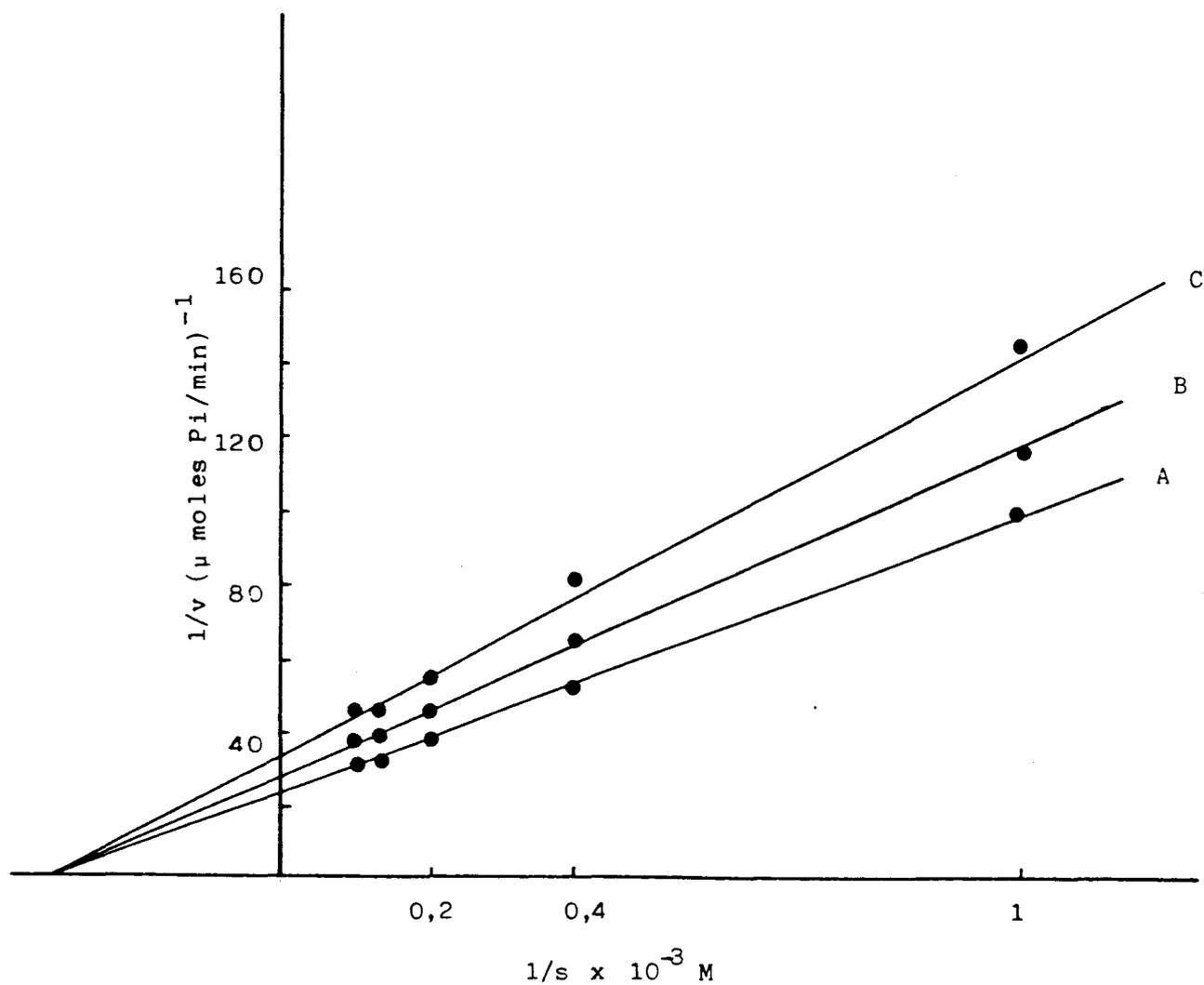


Figura 50. Representación de Lineweaver-Burk para determinar la K_m para el β -glicerolfosfato de la fosfatasa alcalina a diferentes concentraciones de glicerol. (A) 0 M glicerol, (B) 0,5 M glicerol y (C) 1,9 M glicerol.

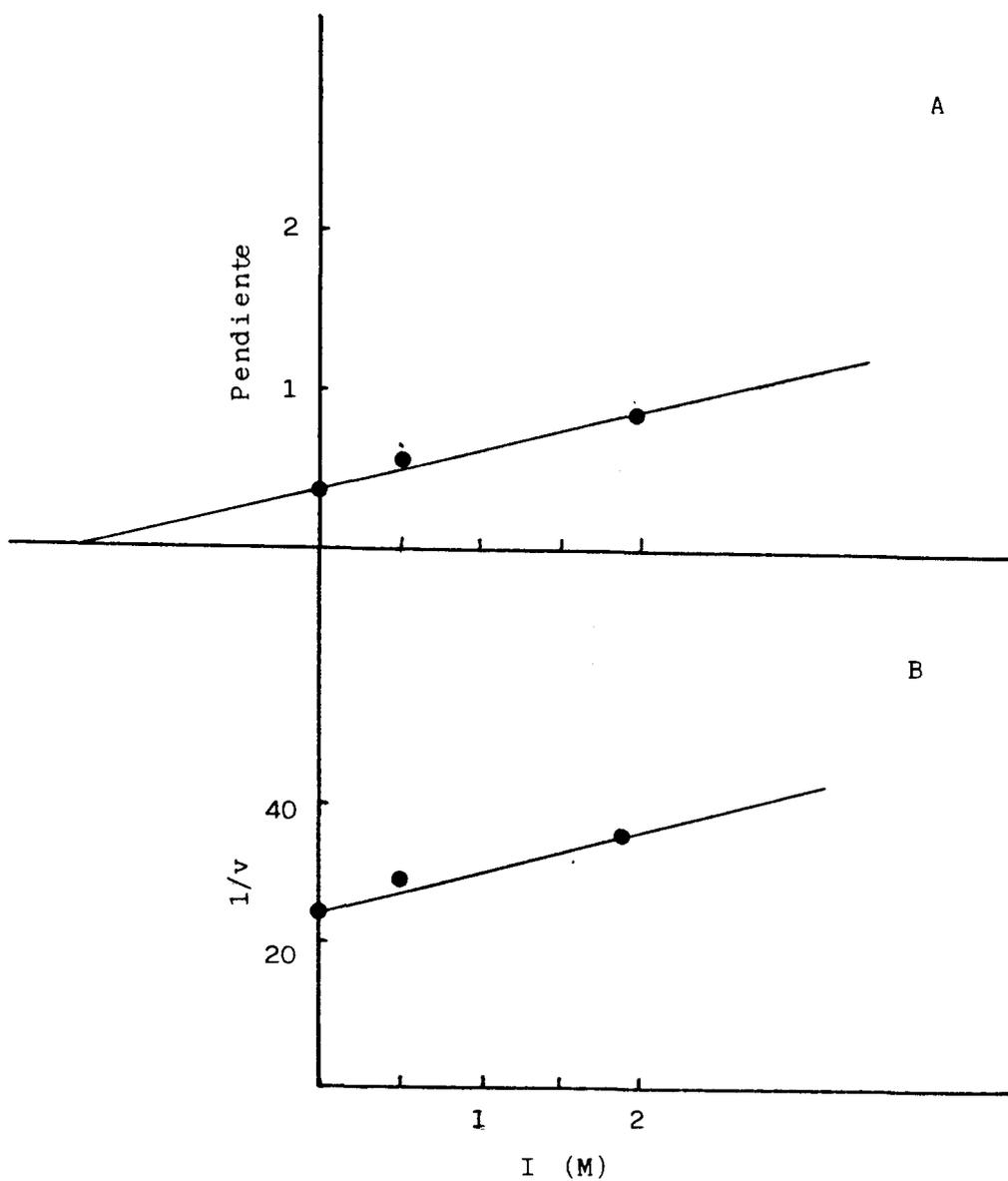


Figura 51. (A) Pendiente de las representaciones inversas de la figura 45 en función de la concentración de glicerol e (B) inversa de las velocidades de la figura 46 en función de la concentración de glicerol (representación de Dixon).

6.3.2 Reacción de transfosforilación

La capacidad de transfosforilación se determinó por medida simultánea del p-nitrofenol y del Pi liberado a partir del p-NPP. La cantidad de Pi perdido se consideró como Pi transfosforilado.

La Figura 52 presenta los resultados obtenidos en los estudios de transfosforilación. Los resultados indican que las dos fosfatasas poseen capacidades distintas de transferir fosfato, al menos en las condiciones ensayadas. El porcentaje medio de transfosforilación hallado para la fosfatasa ácida fue del 38,6% y del 17,9% para la fosfatasa alcalina.

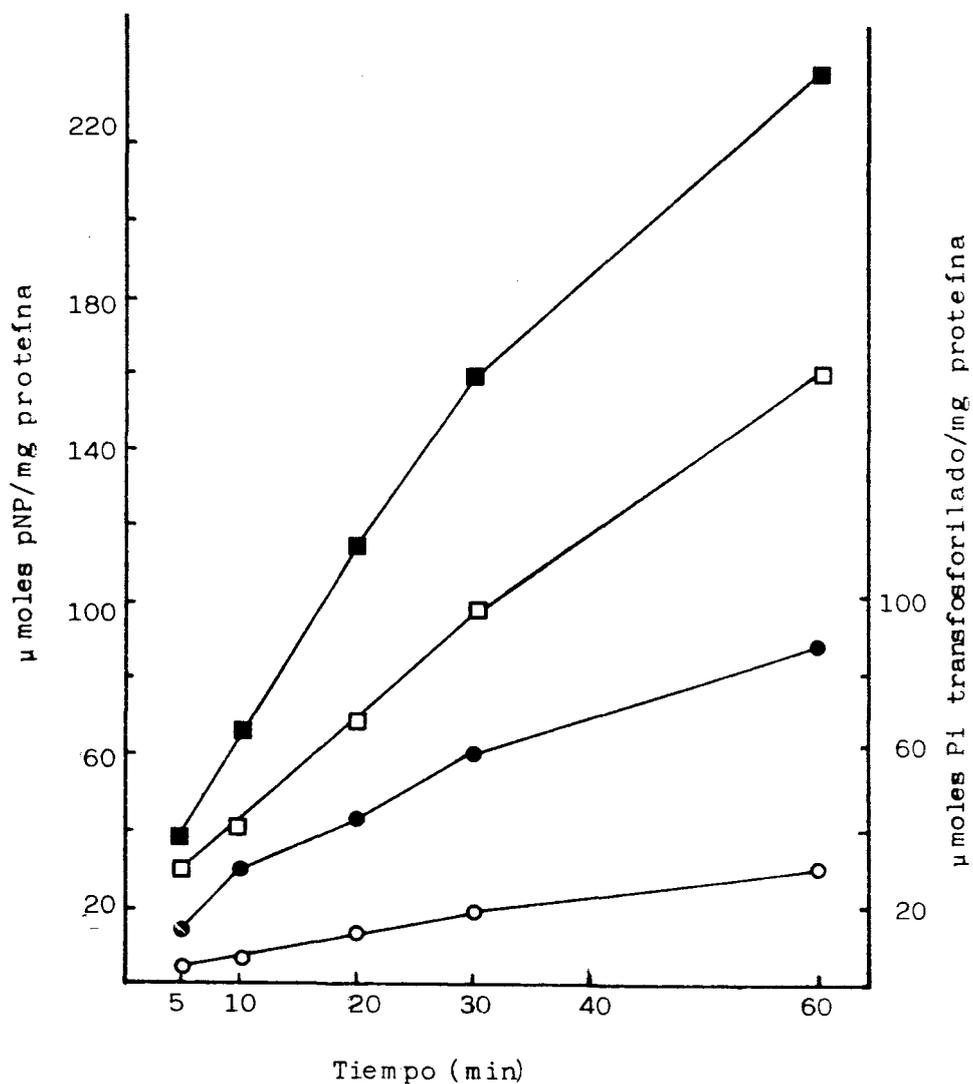


Figura 52. Transfosforilación para la fosfatasa ácida (■,□) y alcalina (●,○). El p-nitrofenol (símbolos negros) y el Pi liberado fueron medidos a distintos tiempos. La cantidad de fosfato perdido representa el Pi transfosforilado (símbolos blancos).

RESULTADOS

A continuación se presenta un resumen de las propiedades más significativas de las fosfatasas producidas por *M. coralloides* D.

	<u>Fosfatasa ácida</u>	<u>Fosfatasa alcalina</u>
pH óptimo	4,5	8,1
Peso molecular	> 250.000	31.000
Inhibición por fluoruro	Elevada	Media
" " EDTA	Baja	Media
" " NEM	Ausente	Ausente
Estabilidad frente al pH	Entre pH 3 y 9	Entre pH 6 y 9
Estabilidad a bajas temp.	Elevada	Media
Temp. de máxima actividad	43°C	37°C
Activación por Mg ⁺²	+	+++
Especificidad de sustrato	Escasa	Escasa
Fosfoazúcar más hidrolizado	Glucosa-6-fosfato	Fructosa-1,6-diP
Km p-nitrofenilfosfato	1,56 mM	5,0 mM
Ki Pi	6,2 mM	8,0 mM
Ki arseniato	8,4 mM	16,2 mM
Km Glucosa-6-fosfato	2,22 mM	2,85 mM
Ki Glucosa	1,35 mM	1,075 M
Km β-glicerol-fosfato	5,0 mM	3,33 mM
Ki Glicerol	1,5 M	3,9 M
% Transfosforilación	38,6	17,9

6.4 Localización citoquímica de las actividades fosfatasas celulares

Como indicabamos en la Introducción de esta memoria, las fosfatasa se suelen asociar con las envueltas celulares, de acuerdo con su acción sobre sustratos orgánicos fosforilados del medio.

Los estudios de localización citoquímica se basan en la visualización de sales de plomo, densas a los electrones. El ácido fosfórico liberado por acción de las fosfatasas se combina con una sal de plomo soluble para formar fosfato de plomo insoluble y denso a los electrones.

Este método ha permitido detectar la actividad fosfatasa ácida y alcalina a nivel de la membrana externa. La Figura 53 presenta el aspecto de las células control incubadas a pH 8,0 sin sustratos ni sal de plomo. Los controles a pH 5,0 presentaron una morfología similar. Las figuras 54 y 55 presentan un fino granulado, denso a los electrones, producto de la reacción citoquímica desarrollada a pH 5,0. Igualmente, las Figuras 56 y 57 muestran el producto de la reacción citoquímica llevada a cabo a pH 8,0.

Los precipitados detectados (granulado observable en las fotografías) muestran que las actividades de ambas enzimas se sitúan a nivel de la membrana externa, apreciándose actividad hasta en su superficie más exterior. Esta localización se presenta acorde con el papel de estas enzimas y con su secreción al medio.

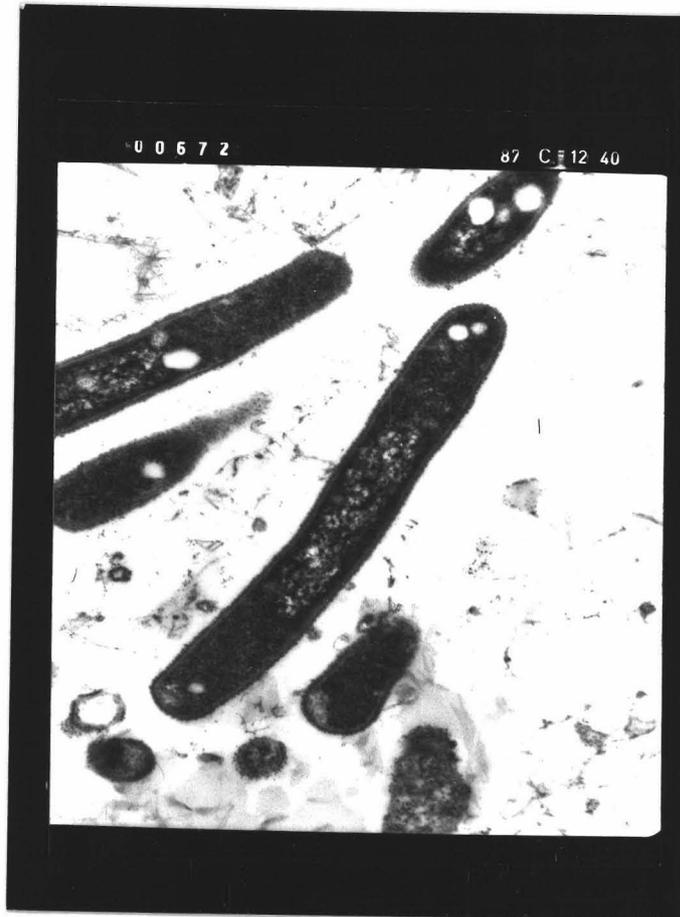


Figura 53. Localización citoquímica de las fosfatasas celulares de *M. coralloides* D. Preparaciones control incubadas a pH 8,0 sin sales de plomo ni sustratos de fosfatasas. 31.500 x.

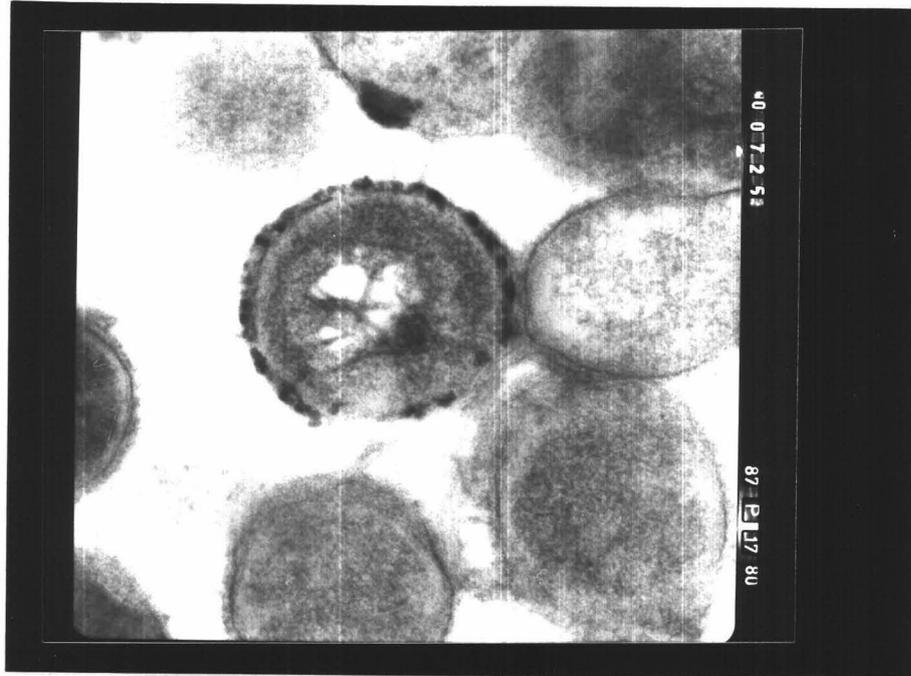


Figura 54. Localización citoquímica de la fosfatasa ácida de *Myxococcus coralloides* D. 100.000 x.

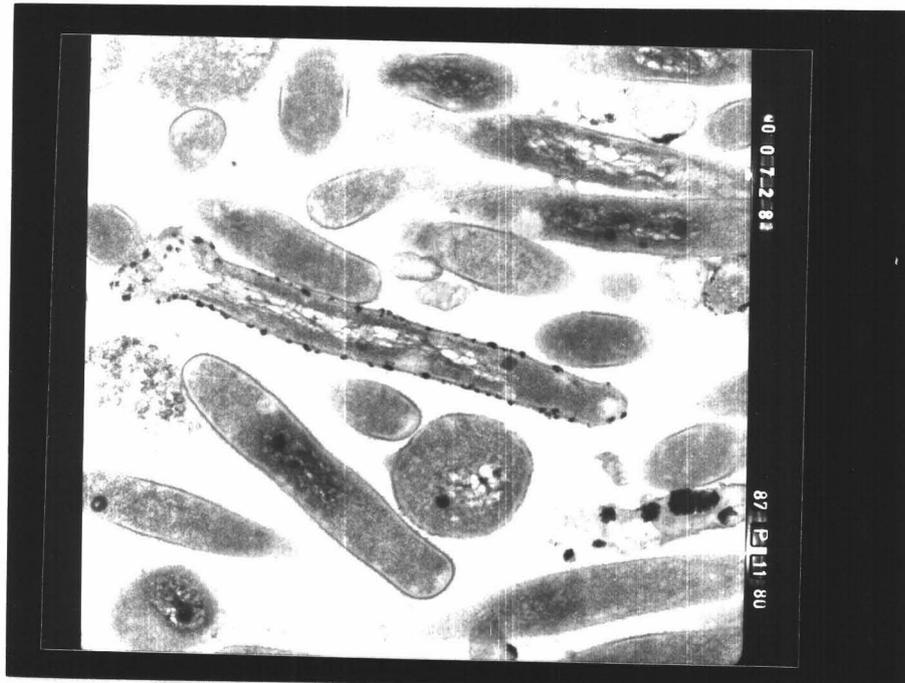


Figura 55. Localización citoquímica de la fosfatasa ácida de *Myxococcus coralloides* D. 25.000 x.



Figura 56. Localización citoquímica de la fosfatasa alcalina de *Myxococcus caralloides* D. 31.500 x.



Figura 57. Localización citoquímica de la fosfatasa alcalina de *Myxococcus caralloides* D. 40.000 x.

6.5 Estudio de la actividad fosfatasa extracelular

Durante los estudios previos sobre la producción de fosfatasas se presentaron algunos datos sobre la presencia de actividad fosfatasa en los caldos de cultivo.

En los resultados, sobre medios de crecimiento y producción, se ponía de manifiesto que la actividad detectada no difería significativamente entre los diferentes medios donde *M. coralloides* crecía eficazmente. Por otra parte, en los estudios de cinética de producción se observó que la actividad fosfatasa extracelular, tanto ácida como alcalina, era mayor al inicio del crecimiento vegetativo. La actividad presente durante las etapas de crecimiento no es atribuible a una lisis celular como ya se indicó con anterioridad, aunque el incremento posterior durante la fase de lisis sí es lógicamente debido a la liberación de enzimas celulares.

La presencia de estas actividades hidrolasas extracelulares en los caldos de cultivo no es extraña, dada la capacidad de producir diversos enzimas hidrolíticos que poseen las mixobacterias. Junto a los estudios de producción y cinética, se han abordado algunos otros puntos en relación con la actividad fosfatasa extracelular.

A. Recuperación de la actividad tras ultracentrifugación

La centrifugación de los sobrenadantes procedentes de cultivos con una densidad óptica de 0,3 a 108.000 x g durante 60 minutos a 4°C permitió recoger el 88% de la actividad ácida y el 84% de la actividad alcalina de los sobrenadantes del centrifugado. Así, las actividades detectadas parecen ser esencialmente solubles.

B. Concentración de los sobrenadantes

Los sobrenadantes de cultivo fueron concentrados por precipitación con acetona al 20% (v/v) como paso previo a los siguientes estudios. Trás la eliminación de la acetona a presión reducida, el concentrado obtenido se utilizó en estudios posteriores.

Dado que las actividades fosfatasas no fueron separadas por posteriores etapas de purificación, hemos de hablar de actividad fosfatasa y no específicamente de fosfatasa ácida y fosfatasa alcalina.

C. Estudios de inhibición y pérdida de actividad

Los estudios de cinética de producción mostraron un descenso en la actividad fosfatasa tras las primeras fases de crecimiento de *M. coralloides* D. Este crecimiento se ve acompañado, como vimos, de un incremento del pH del medio, probablemente provocado por la acumulación de productos nitrogenados como el ión amonio. Resultados anteriores mostraron que las fosfatasas celulares son inhibidas entre un 16 y un 32% por el ClNH_4 1 mM. Así mismo, observamos que en las mixósporas de glicerol no se detectó actividad fosfatasa extracelular. La posible implicación de proteasas responsables de la pérdida de actividad presente con anterioridad es una posibilidad que se contempla en la discusión posterior.

Por todo ello los estudios sobre las actividades fosfatasas extracelulares se han centrado en comprobar el efecto del pH, del ión amonio y de algunas proteasas sobre estas actividades. También se ha comprobado la inhibición por fosfato. La Tabla 26 muestra la estabilidad de ambas actividades para valores de pH comprendidos entre 6,5 y 8,5. Estos valores son los encontrados habitualmente en los caldos de cultivo a lo largo del crecimiento de *M. coralloides*. Ambas actividades presentaron una relativa alta estabilidad en este rango de pH. En la misma Tabla, se puede observar que las dos actividades se mostraron sensibles a las proteasas ensayadas, aunque en un grado menor para la Proteasa Tipo V, al igual que ocurría para las actividades celulares.

En la Tabla 27 se presentan los resultados obtenidos en los estudios por inhibición con cloruro amónico y fosfato potásico. El amonio provocaba una inhibición del 25% a una concentración de 10 mM y el fosfato producía una inhibición próxima al 40% a la misma

RESULTADOS

concentración. El fosfato está presente en el medio a esta concentración desde el inicio del crecimiento, por lo que el posterior descenso de actividad no debe ser producido por él. Por otra parte, desconocemos las concentraciones de amonio que se pueden alcanzar en los caldos de cultivo.

Así, el amonio y las proteasas se presentan como factores que pueden inhibir o eliminar la actividad fosfatasa extracelular, aunque desconocemos en que medida los estudios *in vitro* pueden reflejar las condiciones reales de los cultivos y las condiciones naturales en que actuarían los enzimas extracelulares de esta mixobacteria.

RESULTADOS

Tabla 26. Estabilidad frente al pH (2 horas a 28°C) y sensibilidad a diferentes proteasas de las actividades fosfatasas extracelulares de *M. coralloides* D.

<u>Tampón</u>	<u>Actividad residual (%)</u>	
	<u>ácida</u>	<u>alcalina</u>
MES pH 6,5	97	83
Tris pH 7,1	96	87
Tris pH 7,6	95	98
Tris pH 8,1	94	75
Tris pH 8,5	94	76
 <u>Enzima</u>		
Tripsina	40	32
Proteasa Tipo V	76	75
Proteasa Tipo XI	41	22

RESULTADOS

Tabla 27. Efecto del cloruro amónico y del fosfato potásico sobre las actividades fosfatasas extracelulares de *M. coralloides* D.

<u>Sal (concentración mM)</u>	<u>Actividad residual (%)</u>	
	<u>ácida</u>	<u>alcalina</u>
Cloruro amónico (1 mM)	90	91
" " (5 mM)	85	82
" " (10 mM)	76	73
" " (20 mM)	71	73
Fosfato potásico (1 mM)	89	85
" " (5 mM)	70	74
" " (10 mM)	62	61
" " (20 mM)	56	52

DISCUSSION

En el capítulo anterior se han expuesto los resultados obtenidos en la realización de esta Memoria. Basándonos en ellos, el presente apartado tiene por objeto comentar e interpretar estos resultados en función de la bibliografía consultada.

En relación con los aspectos de la fisiología de *M. coralloides* D que hemos estudiado, cabe destacar el diferente efecto del fosfato sobre cada uno de ellos. Así, el fosfato no influyó sobre la cantidad de proteína extracelular detectada, pero si mostró efecto sobre la síntesis de pigmentos.

Todas las especies de mixobacterias segregan una amplia variedad de enzimas que degradan biopolímeros y que les permiten sobrevivir como saprófitos o como depredadores en su hábitat natural, el suelo. Las proteínas producidas por *M. xanthus* no son acumuladas en su periplasma, como ocurre en otras bacterias Gram-negativas, como *E. coli*, sino que son segregadas al medio de cultivo (Kaiser *et al.*, 1979). De hecho, *E. coli* sólo segrega al medio proteínas muy especializadas como colicinas o hemolisinas. Sin embargo, otras bacterias Gram-negativas como *Aeromonas hydrophila*, *Vibrio alginolyticus* y *Pseudomonas aeruginosa*, si son capaces de segregar proteínas al medio, aunque el mecanismo y regulación de este proceso es poco conocido (Nielsen *et al.*, 1983). La secreción de proteínas es una propiedad bien conocida entre las bacterias Gram-positivas (Glenn, 1976).

Bacillus brevis 47 puede producir hasta 12 mg de proteína por ml bajo condiciones de cultivo en medios ricos. En medios definidos, la cantidad de proteína segregada varía desde 0,3 a 1 mg/ml, dependiendo de la concentración de fosfato del medio. A bajas concentraciones de fosfato, la cantidad de proteína era menor a 0,3 mg/ml, apreciándose un incremento en la secreción al aumentar la

DISCUSION

cantidad de fosfato en el medio (Tsukagoshi *et al.*, 1981). En el caso de *M. coralloides* D, la cantidad de proteínas extracelulares no se ve alterada por la concentración de fosfato externo. Durante la fase estacionaria no se detectó incremento en la cantidad de proteína extracelular, pero sí en la fase de autólisis. Así mismo, durante el crecimiento no se detectó actividad malato deshidrogenasa en los sobrenadantes, pero sí al inicio y durante la fase de autólisis. Estos dos hechos indican que la proteína extracelular detectada en la fase de crecimiento no es producto de muerte o lisis celular, sino resultado de un proceso real de secreción.

Por otra parte, la cantidad de proteína producida en función del número de células, permanece constante a lo largo de toda la fase de crecimiento, de forma similar a como se ha descrito en *M. xanthus* (Nicaud *et al.*, 1984). La constancia en la cantidad de proteína extracelular producida por célula sugiere un mecanismo que controla la cantidad total de proteína segregada. Una situación similar ha sido propuesta para bacterias Gram-positivas (Coleman, 1981).

La obtención de nutrientes, gracias a la acción de sus proteínas extracelulares, es un proceso esencial para las mixobacterias durante su vida en el suelo. Así, el control de esta producción, como etapa esencial para su metabolismo, debe estar estrictamente controlado.

En contraste con lo anterior, el fosfato produjo una disminución en el contenido de pigmentos de *M. coralloides* D, aunque este fenómeno también era producido por otros tampones orgánicos. Así, el efecto observado no es debido exclusivamente al fosfato. Cabría atribuir este efecto al incremento de la molaridad del medio, provocado por estos tampones; sin embargo, los resultados no fueron concluyentes, ya que, aún cuando un incremento de la molaridad del fosfato y del Tris disminuyó el contenido en pigmentos de las

células, los tampones orgánicos (Hepes y Mops) no tuvieron mayor efecto al aumentar su concentración de 10 a 30 mM.

En las mixobacterias estudiadas, el contenido específico en carotenoides es constante y fuertemente regulado durante el crecimiento, aunque dependiendo de diversos factores ambientales como la luz (Reichenbach & Kleinig, 1984). El contenido en carotenoides también depende de la raza empleada. El estudio del efecto del fosfato y la temperatura sobre la síntesis de pigmentos en diversos mutantes constitutivos para la carotenogénesis en *M. xanthus*, así como, en la raza salvaje, indicaron que el efecto de estos factores era muy variable según las razas. Así, en algunas razas la temperatura mostró ser el factor inhibidor de síntesis más importante, y en otras, lo fue el fosfato (Goicoechea *et al.*, 1987).

Por tanto, el control de la síntesis de pigmentos en mixobacterias se muestra complejo y susceptible a la acción de diversos factores. La luz, es sin duda, el más importante fotoinductor de la síntesis de carotenos, dado el papel de éstos en la protección de la fotólisis. Así, la carotenogénesis es activada a nivel de transcripción por un mecanismo inducido por la luz en *M. xanthus* (Balsalobre *et al.*, 1987). Sin embargo, el efecto de otros factores ambientales (temperatura, molaridad, etc) no está bien definido, desconociéndose si su acción sobre la síntesis de pigmentos es directa o bien por una acción indirecta sobre la fisiología de la bacteria.

Secundariamente al estudio de la acción sobre la síntesis de pigmentos se comprobó que los tampones orgánicos (Hepes y Mops) podían retrasar la fase de autólisis, si bien el incremento en su molaridad no provocaba un efecto mayor como en el caso del fosfato.

Es conocido que las mixobacterias excretan grandes cantidades de ión amonio durante su crecimiento sobre hidrolizados de proteínas, como resultado de la utilización de los aminoácidos del medio como fuentes de C, N, y energía (Gerth *et al.*, 1986). Este ión amonio u otros compuestos nitrogenados productos de desecho del

DISCUSION

metabolismo celular, pueden provocar el aumento del pH observado en los caldos de cultivo. De hecho, el mayor aumento de los valores de pH se da durante la fase exponencial, mientras que durante la fase estacionaria y la fase de lisis el incremento de pH es menor. Esto es concorde con la idea de que son los productos nitrogenados, excretados durante el crecimiento, los responsables de este aumento del pH.

La mayor molaridad del tampón presente en el medio de cultivo ofrece una mayor capacidad de tamponamiento del medio, sin embargo no hay una relación directa entre los valores de pH y la lisis observada. Así, valores de pH de 8,7-8,9 pueden encontrarse en cultivos lisados con una densidad óptica de 0,1 y en cultivos en fase estacionaria con densidad óptica de 0,9.

Aunque los tampones orgánicos (como Hepes y Mops) prevenían la lisis, el fosfato resultaba ser el más eficaz. El papel del fosfato en este proceso de lisis será comentado posteriormente.

El fosfato celular puede encontrarse libre, en forma de ortofosfato, unido a otras moléculas de fosfato, como fosfato más o menos polimerizado, o ligado a moléculas orgánicas. El estudio de los diferentes compuestos celulares con fósforo ha sido abordado por diferentes vías.

La extracción y fraccionamiento de compuestos fosforilados se llevó a cabo por un proceso secuencial que permitió determinar el contenido celular en fosfato libre (ortofosfato), y fosfato polimerizado. Este último se puede dividir en una fracción de menor grado de polimerización (fracción ácido soluble) y otra más polimerizada (fracción ácido insoluble). La adsorción con carbono activo tras el tratamiento con ácido en frío, permitió eliminar los metabolitos fosforilados de bajo peso molecular, igualmente el carbono eliminó la fracción de ácidos nucleicos tras la extracción con ácido en caliente. Las medidas de fósforo total realizadas mostraron que la fracción de fosfato ácido soluble-ácido estable atribuible, principalmente, a nucleótidos y fosfoazúcares era

cuantitativamente menor. Así mismo, se observó que los ácidos nucleicos eran bastante estables al tratamiento con ácido en caliente, al igual que se ha descrito en otros microorganismos (Terry & Hooper, 1970).

Los resultados obtenidos fueron diferentes según los medios y condiciones de cultivo. La síntesis de polifosfatos de larga cadena por células en cultivos líquidos fue mayor en medios que permiten un crecimiento menor (Tripticasa 0,25%) o al final del crecimiento exponencial y en la fase estacionaria de cultivos más ricos (Tripticasa 0,75%). Estos resultados son conformes con las condiciones generales descritas para la formación de formas altamente polimerizadas de fosfato. La síntesis de polifosfatos es promovida, generalmente, cuando el crecimiento es poco vigoroso (en fase estacionaria del crecimiento normal), o cuando el metabolismo refleja una deficiencia en nutrientes o un crecimiento no balanceado (Harold, 1966).

Por el contrario, el crecimiento en medio sólido no promovió la síntesis de polifosfatos, sino su degradación. Tan sólo durante la maduración de los cuerpos fructificantes se apreció un incremento en esta fracción.

El contenido de ortofosfato celular durante el crecimiento en medio líquido fue relativamente constante y sufrió un aumento continuado durante el crecimiento en medio sólido. Por otra parte la fracción de fosfato lábil presentó el comportamiento más irregular. En los dos medios líquidos utilizados, aumentó con el crecimiento para disminuir en la fase estacionaria y recuperarse posteriormente. En el medio sólido Agar levadura presentó un comportamiento paralelo a los polifosfatos de larga cadena y se mostró bastante estable durante el crecimiento sobre CTA.

A excepción de la síntesis de los polifosfatos en medio líquido, el análisis de las restantes fracciones se presenta complejo. Las diferencias en las condiciones de cultivo (medio sólido y líquido) y las diferencias de cada medio en particular (Agar

DISCUSION

levadura o CTA y Trypticasa 0,75% o 0,25%) pueden afectar de modo diverso al metabolismo de estas fracciones fosforiladas. Las variaciones en el contenido de ortofosfato celular y de las fracciones menores de polifosfatos se han relacionado con etapas concretas del desarrollo en *Dictyostelium discoideum* (Gezelius, 1974), con condiciones de anaerobiosis en *E. coli* (Rao et al., 1985) o con limitación del contenido celular de nucleótidos en *E. coli* (Kukko & Saarento, 1983) y *Nitrosomonas europaea* (Terry & Hooper, 1970). En levaduras el contenido de estas fracciones ha sido relacionado con diversas condiciones de crecimiento y con el contenido de la carga energética celular (Ermakova et al., 1981). Las diferentes posibilidades apuntadas serán comentadas posteriormente, tras hablar de otros aspectos del contenido en compuestos fosforilados de las células de *M. coralloides* D.

La unión del fósforo a moléculas orgánicas se realiza, básicamente, por enlaces fosfomonoésteres o fosfodiésteres. El enlace fosfodiéster posee una relativa estabilidad que permite al fosfato formar un puente que conecta dos unidades y apoya la creación de estructuras macromoleculares. De este modo aparece en el ADN, ARN y fosfolípidos. La cuantificación de este elemento en dichas moléculas es difícil, en virtud de la complejidad de las mismas. La determinación de ADN, ARN y la extracción de lípidos, sirvió para comprobar la utilidad de estas técnicas generales en el caso concreto de *M. coralloides* D.

El fósforo ligado a los ésteres fosfato simples forma parte de las vías centrales del metabolismo celular. Los adenín nucleótidos constituyen una forma de ésteres fosfato de gran importancia dado que constituyen el sistema energético celular. En la mayoría de las células creciendo en forma activa, los valores de carga energética se hallan entre 0,7 y 0,9. Cuando el crecimiento es poco vigoroso se presentan valores de 0,6. Valores menores a 0,5 suelen resultar en la muerte celular, aunque se pueden encontrar valores mucho menores

(aproximadamente de 0,1) en formas de resistencia como las endosporas de *Bacillus* (Dawes & Senior, 1973).

Los valores observados en células de *M. coralloides* D creciendo en medios ricos, se sitúan en torno a 0,8, mientras que los valores encontrados en células crecidas en un medio más pobre se situaban en torno a 0,6. Los valores en células recogidas en fase de lisis eran aún menores. De igual modo, durante el crecimiento sobre medios sólidos se detectaron valores entre 0,7 y 0,8, propios de células con una elevada actividad metabólica. El contenido en ATP, ADP y AMP de las células de *M. coralloides* D, durante el crecimiento sobre Agar levadura y sobre medio ALP fue superior al obtenido en el resto de los casos. Hay que indicar que estos medios contienen células de levadura de las que se nutren las mixobacterias y que, por tanto, asemejan más a su estado natural en el suelo, donde actúan como depredadores. En el medio CTA y en los medios líquidos que proporcionan los nutrientes como hidrolizados de proteínas, el contenido celular en adenín nucleótidos fue siempre menor.

Al igual que anteriormente, la carga energética adenilada encontrada durante los procesos de inducción y germinación de mixósporas fue elevada, en torno a 0,8. Parece que este valor se mantiene constante en todas las etapas de los ciclos de vida de *M. coralloides*. Estos resultados son similares a los referidos en *M. xanthus* (Hanson & Dworkin, 1974; Smith & Dworkin, 1980). Los valores de carga energética presentes en las mixósporas no sufren variación tras un proceso de desecación que imitó a ciertas condiciones naturales. Los valores de carga energética de las mixósporas de cuerpos fructificantes son mucho mayores a los encontrados en las endosporas de *Bacillus*. Esto apoyaría la idea de que las mixósporas son formas de reposo más que de resistencia.

El mantenimiento de los niveles de carga energética, con muy escasas variaciones, durante las diferentes etapas de los ciclos de vida, pueden poner en duda la importancia de este parámetro como indicador del estado metabólico celular. De hecho, diversas

limitaciones a la utilidad real de este parámetro han sido descritas por Knowles (1977).

Del estudio de los adenín nucleótidos y de las formas polimerizadas de fosfato se puede apreciar una relación inversa entre ellos. Como hemos señalado anteriormente, la síntesis de los polifosfatos de larga cadena está unida a condiciones generales que no favorecen el crecimiento activo celular. En *M. coralloides* apreciamos que el incremento y mayor contenido en polifosfatos se daba en estas condiciones durante el cultivo en medio líquido Tripticasa 0,25% y en la fase estacionaria de cultivos en medios más ricos. Otras variaciones son más complejas de explicar, pues aunque el contenido en adenín nucleótidos de las células crecidas en Agar levadura es alto, estos valores son menores para las células cultivadas sobre CTA y en ambos casos se aprecia un descenso en el contenido de polifosfatos.

En los otros dos procesos del desarrollo, inducción y germinación de mixósporas, se pueden encontrar algunas diferencias. En el proceso de inducción, el contenido en polifosfatos disminuye durante todo el proceso, con un incremento paralelo de las fracciones de polifosfatos menores y de ortofosfato, lo que parece indicar una degradación sucesiva de los polifosfatos de mayor longitud a lo largo del proceso de inducción. Por contra, estos polifosfatos no sufren variación alguna en la germinación de estas mixósporas. Las otras dos fracciones disminuyen en las primeras horas del proceso de germinación, hasta recuperar los valores usuales de las células vegetativas. El significado de estas variaciones se correlaciona posteriormente con otros hechos observados durante la inducción y germinación de mixósporas.

En general las fracciones de polifosfatos menores y ortofosfato es más variable y difícil de relacionar con hechos generales del metabolismo, mostrando una mayor variabilidad en su

contenido, lo cual concuerda con su mayor facilidad de movilización metabólica (Eigener & Bock, 1972; Domanski-Kaden & Simonis, 1972).

Junto a los procesos de extracción de polifosfatos y medida de adenín nucleótidos por ensayos de bioluminiscencia, el contenido celular en compuestos de fósforo fue estudiado por otros dos métodos.

La espectroscopía de resonancia magnética nuclear realizada sobre células y extractos sonicados permitió detectar diversos fosfomonoésteres azucarados y fosfodiésteres ligados a lípidos, así como la fracción de ortofosfato. Los estudios sobre extractos sonicados también permiten detectar una señal asignada a los nucleótidos fosforilados ATP y ADP. Los polifosfatos, sin embargo, no fueron detectados, posiblemente debido a encontrarse ligados a otros componentes celulares. Esto concuerda con resultados obtenidos en otros microorganismos (Kulaev & Vagabov, 1983).

El uso de la espectroscopía de resonancia magnética nuclear en el campo de la microbiología ha permitido el estudio de diferentes aspectos del metabolismo microbiano, siendo sin duda un campo aún no explotado en todas sus posibilidades (Baxter, 1985). Nosotros hemos utilizado esta técnica en una primera aproximación a su metodología y desarrollo. Cualquier intento posterior de estudio en procesos dinámicos del metabolismo de las mixobacterias, exigiría asegurar una fuerte oxigenación de las muestras sometidas al análisis por RMN. La oxigenación es el principal problema experimental en el estudio de muestras vivas por RMN (Hollis, 1980). Dado el carácter aerobio de las mixobacterias y la necesidad de alcanzar grandes densidades celulares en los pequeños volúmenes a estudiar, la oxigenación sería esencial en nuestro caso. Sin embargo, en los estudios de detección de compuestos, el trabajo con densas suspensiones de células o sonicados de las mismas en tampones adecuados puede desarrollarse con menos problemas.

La microscopía electrónica permite la observación de cuerpos de inclusión de polifosfatos. Estos se pueden presentar, según los procesos de fijación y tinción, como cuerpos densos a los electrones, como estructuras electrodensas en la periferia y electro transparentes en su centro o incluso como estructuras porosas, generalmente localizadas en el nucleoplasma celular (Harold, 1966; Kulaev & Vagabov, 1983). Los estudios de detección realizados en *M. coralloides* D permitieron la visualización de estos cuerpos como estructuras electrodensas localizados en el nucleoplasma, al igual que en *M. xanthus* (Voelz et al., 1966). En las células recogidas de los cultivos en Tripticasa 0,25% se pudieron detectar hasta cuatro gránulos de polifosfatos, si bien lo normal en estos cultivos y en los de Tripticasa 0,75%, era la presencia de uno o dos cuerpos de inclusión. Realmente los análisis a microscopía no permiten una valoración cuantitativa exacta, si bien apoyan, con su detección cualitativa, los estudios anteriores.

La vía glucolítica, constituida por fosfomonoésteres azucarados, es una ruta central del metabolismo celular. La utilización de esta vía metabólica para la obtención de energía ha sido puesta en duda en *M. xanthus* (Watson & Dworkin, 1968). En esta mixobacteria se ha descrito una actividad hexoquinasa-PPi dependiente, pero no actividad hexoquinasa-ATP dependiente (Shimkets, 1984). En nuestro caso estudiamos ambas actividades junto a una actividad hexoquinasa-polifosfato dependiente. De los resultados podemos concluir que *M. coralloides* D presenta una actividad hexoquinasa-ATP dependiente, al igual que otras razas de *M. coralloides* (Irschik & Reichenbach, 1985) y otras mixobacterias (McCurdy & Khouw, 1969; Sarao et al., 1985). Junto a esta actividad se detectó una actividad hexoquinasa-polifosfato dependiente, cinco veces menor a la anterior.

DISCUSION

La presencia de dos actividades hexoquinasas diferenciadas por la molécula donadora del enlace rico en energía que utilizan, está bien estudiada en diversas especies de *Propionibacterium*. En estas especies, la actividad polifosfato dependiente es 3 a 5 veces superior a la actividad ATP dependiente, indicando que los polifosfatos juegan un papel esencial en la fosforilación de la glucosa (Wood *et al.*, 1987).

En el caso de *M. coralloides* D, el ATP parece ser el principal sustrato que actúa en el proceso, siendo los polifosfatos un sustrato secundario. Para *M. xanthus*, el PPI (la forma más simple de polifosfatos) parece ser el único sustrato empleado, aunque desconocemos si en esta o en otras especies de mixobacterias donde se ha estudiado la actividad hexoquinasa se emplearon polifosfatos en los estudios realizados. La bibliografía consultada parece indicar que no se analizó tal posibilidad.

Obviamente, la detección en extractos crudos celulares de estas dos actividades no implica la existencia directa de dos enzimas diferentes, podría tratarse de un mismo enzima con mayor afinidad por el ATP que por los polifosfatos. En todo caso, la presencia de estas dos actividades hexoquinasa, contribuye al conocimiento del discutido metabolismo glucídico de las mixobacterias y abre las posibilidades de estudios posteriores. Así mismo, refuerza la idea del uso por los microorganismos de formas alternativas al ATP como fuente de energía en los procesos del metabolismo celular.

DISCUSION

En relación a los estudios sobre fosfatasa durante los ciclos de *M. coralloides* D, y como paso previo, se buscó el agente más adecuado para la permeabilización celular, encontrándose que el tolueno daba los mejores resultados junto con el DMSO. La elección del tolueno se realizó en base a su menor toxicidad, con lo que se evitaban los mayores riesgos de manipulación que exigía el DMSO. El empleo del SDS y del Triton X-100 solo o en diferentes mezclas con alcoholes provocaba una disminución acentuada de la actividad detectable en los controles. Aunque en los estudios con mixósporas no se realizaron controles, dada la elevada resistencia de estas formas a la ruptura por sonicación, la homogeneidad de los resultados obtenidos y las indicaciones encontradas en la bibliografía nos llevaron al uso común de este agente en todas las formas celulares, aunque con tiempos diferentes de tratamiento.

La permeabilización celular es muy usada en el estudio *in situ* de actividades enzimáticas en células de levadura (Ram *et al.*, 1983). Aunque estos microorganismos presentan una pared celular de gran grosor, la permeabilización con estos agentes permite el estudio de muy diversas actividades enzimáticas al facilitar la difusión de diversos sustratos. Las mixósporas poseen una pared celular de mayor grosor que la pared de las células vegetativas, pero no comparable a la presente en levaduras. Dado que el tratamiento de 15 minutos permitía detectar valores apreciables de actividad enzimática y que tratamientos más prolongados llevaban a la lisis celular, consideramos que la permeabilización de las mixósporas fue satisfactoria al igual que en las células vegetativas. La permeabilización celular permite, de este modo, disponer de un método rápido para el ensayo de las actividades enzimáticas buscadas.

El estudio sobre medios de producción permitió comprobar que, aunque no hubo grandes diferencias entre los diversos digeridos enzimáticos de proteínas, el crecimiento sobre hidrolizados ácidos

DISCUSION

fue mucho menor. La destrucción de algunos aminoácidos como el triptófano y la cisteína por la hidrólisis ácida puede provocar este menor crecimiento. Estos hidrolizados también contienen una elevada proporción de ClNa. Como ya se indicó en el capítulo de Resultados, la elección de Tripticasa-BBL se basó en su mejor disponibilidad, más barato coste y mayor homogeneidad de los lotes comerciales disponibles. Este medio desplazó al Casitone, utilizado habitualmente con anterioridad, dado que el Casitone-Difco es más caro y en algunos casos provocó problemas de crecimiento al usar algunos lotes comerciales adquiridos. La producción de fosfatasa celular y extracelular en los diferentes medios donde el crecimiento fue eficiente no presentó grandes variaciones. La producción de fosfatasa por *Lysobacter enzymogenes* si se ve afectada por el uso de diversas peptonas, especialmente la actividad extracelular (Von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1987).

El estudio del control de la producción de actividad fosfatasa, está mayoritariamente ligado a los niveles de fosfato presentes en el medio de cultivo. Como ya hemos indicado en la Introducción, las fosfatasas pueden proporcionar una fuente alternativa de fósforo en su acción sobre los fosfatos orgánicos. Aunque las fosfatasas son reprimidas por el fosfato inorgánico y se encuentran bajo la regulación del metabolismo del fósforo, en todos los grupos de microorganismos podemos encontrar fosfatasas no reprimibles por el Pi, fosfatasas que se consideran como constitutivas. En realidad aunque, la represión por fosfato en la síntesis de estas enzimas es un fenómeno generalizado, es también muy común la existencia de razas constitutivas para la síntesis de estas enzimas.

Así, la fosfatasa alcalina de *E. coli* disminuye sus niveles 300 veces en presencia de Pi 2,3 mM (Torriani, 1960), aunque se pueden aislar numerosas razas que producen este enzima de forma constitutiva (Kuo & Blumenthal, 1961). Esta dualidad puede encontrarse en otros microorganismos como *Serratia marcescens*

(Bhatti, 1974; Kranz *et al.*, 1975), *Staphylococcus aureus* (Kuo & Blumenthal, 1961), *Streptococcus mutants* (Greenman & Melville, 1978) y *Sporothrix schenckii* (Arnold *et al.*, 1986).

De igual modo podemos encontrar diferentes especies donde sólo se indica una producción constitutiva o una producción desreprimible. En el primer caso citamos a varias razas de *Pseudomonas* sp. (Stewart, 1972), *Citrobacter* sp. (Hambling *et al.*, 1987), varias especies de *Capnocytophaga* (Poirier & Holt, 1983a), *Bacteroides ruminicola* y *Bacteroides succinogenes* (Cheng & Costerton, 1973). En el segundo caso podemos citar a *Bacterionema* y *Actinomyces* (Franker *et al.*, 1978), *Pseudomonas aeruginosa* (Cheng *et al.*, 1970), varias especies de *Vibrio* (Woolkalis & Baumann, 1981) y *Lysobacter enzymogenes* (Von Tigerstrom, 1984). En cianobacterias podemos encontrar ejemplos de los dos tipos (Healey, 1982).

En levaduras y hongos micelares la situación es más compleja. *Saccharomyces cerevisiae* posee normalmente cuatro tipos de fosfatasa, dos reprimibles por Pi y otras dos constitutivas (Lemire *et al.*, 1985). En *Neurospora crassa* se han descrito razas con actividad constitutiva y razas desreprimibles (Kuo & Blumenthal, 1961). Las razas salvajes suelen poseer un actividad fosfatasa alcalina constitutiva y otra reprimible, junto a una forma ácida reprimible. Esta forma ácida se encuentra bajo el control del metabolismo del fósforo y del nitrógeno (Grove & Marzluf, 1980).

La actividad fosfatasa ácida y alcalina presentes en *N. coralloides* D no fueron reprimibles por el ortofosfato. Los niveles de actividad fosfatasa detectados fueron similares en medios con alta y baja concentración de fosfato. No se encontraron variaciones en los extractos celulares de cultivos en medio mínimo a diferentes concentraciones de fosfato. Si estas actividades celulares estuvieran bajo inducción de fosfatos orgánicos, presentes en los medios con peptonas, los niveles encontrados durante el crecimiento en el medio mínimo deberían haber sido menores. Por otra parte, la desrepresión por limitación de fosfato en el medio mínimo hubiera debido provocar

un aumento de actividad. Sin embargo, en todos los casos, la actividad específica encontrada fue similar, es decir, estas fosfatasa se comportan como enzimas no reprimibles por el fosfato inorgánico, siendo constitutivas.

Junto a las actividades celulares, la detección de actividad fosfatasa en los sobrenadantes durante el crecimiento de *M. coralloides* D en medio líquido indica su secreción al medio durante este crecimiento. La síntesis y secreción de las actividades extracelulares no se ve afectada, al igual que las celulares, por los niveles de fosfato inorgánico presentes en el medio.

Estas actividades presentes en los sobrenadantes fueron mayores al inicio del crecimiento y se presentaron en forma soluble en más de un 80%. La causa de la pérdida de esta actividad fue estudiada desde diferentes puntos de vista. Durante el crecimiento en medio líquido, se puede observar un aumento del pH debido, probablemente, a la acumulación del ión amonio en el medio. Las actividades extracelulares mostraron ser bastante estables frente a los valores de pH comprendidos entre 6,5 y 8,5, los usuales en los caldos de cultivo. El ión amonio provocaba una inhibición del 10% de estas actividades a concentraciones de 1 mM. El fosfato 10 mM (la concentración presente en el medio de cultivo) provocaba una inhibición próxima al 40%, sin embargo, este ión se encuentra en el medio desde el comienzo del crecimiento a esta concentración. Las actividades extracelulares se mostraron sensibles a la acción de las proteasas ensayadas. Así, el efecto del fosfato y del pH del medio no parecen ser los factores más importantes en la pérdida de actividad observada. El ión amonio como tal, podría por si mismo provocar una inhibición de las actividades, aunque cabría esperar una inhibición sucesivamente mayor a lo largo del crecimiento, hecho este que no ocurre. La degradación parcial de las actividades por proteasas segregadas por esta mixobacteria durante su crecimiento podría ser otra posibilidad a contemplar.

DISCUSION

En conjunto, todas estas acciones podrían provocar la pérdida de actividad observada, si bien, no conocemos en que medida tal pérdida es causada por cada uno de ellos o por otros agentes no estudiados, siendo lógico contemplar la interacción de todos ellos. En último caso, no conocemos en que medida los estudios *in vitro* corresponden a las condiciones reales de los cultivos.

Las mixobacterias son microorganismos propios del suelo, siendo la materia orgánica insoluble en agua una de las mayores fuentes de nutrientes en el mismo. La solubilización de estos nutrientes es cuantitativamente importante cuando las bacterias están presentes a altas densidades celulares, como en los enjambres de mixobacterias.

Ya hemos comentado que las mixobacterias sobreviven como saprófitos sobre materia vegetal o como depredadores de otros microorganismos en los suelos de todo el mundo. Su nutrición depende de la producción y secreción de un gran número de compuestos extracelulares como enzimas líticos, proteasas, lipasas, polisacaridasas y antibióticos (Shimkets, 1984). El papel nutricional de estos enzimas es claro. Las células que viven en densos enjambres acumulan altas concentraciones locales de enzimas hidrolíticos que apoyan un crecimiento más rápido al proveer a las células con más nutrientes. La importancia de estas secreciones en los enjambres de mixobacterias se ve reflejada en el fenómeno conocido como crecimiento cooperativo (Rosenberg *et al.*, 1977). Además, las altas concentraciones de enzimas extracelulares que habría en los enjambres podrían proteger de la hostilidad del medio ambiente del suelo a estos enzimas (Zahavi & Ralt, 1984). Por otro lado, el uso cooperativo de los enzimas segregados puede haber estimulado la presión selectiva para la evolución del comportamiento multicelular de las mixobacterias (Dworkin, 1972).

Los niveles de fósforo inorgánico soluble en el suelo son muy limitados, en torno a 10^{-8} (Beck & Munns, 1984)., constituyéndose la

fracción de fosfato orgánico en un 10-80% del total, según las diferentes condiciones (Alexander, 1977).

La acción de las fosfatasas como enzimas hidrolíticos que liberan fosfato a partir de ésteres orgánicos, tendría un claro papel nutricional en estas condiciones. De hecho, las fosfatasas son enzimas comunes en el suelo (Alexander, 1977). Por otra parte, la actividad fosfotransferasa detectada en los enzimas celulares podría colaborar al transporte y acumulación del fosfato en la célula.

Los enzimas hidrolíticos, y otras moléculas que provocan la lisis celular, proporcionarían sustratos a las fosfatasas que podrían suministrar fósforo a las células en crecimiento. Las actividades nucleasas presentes en las células de *M. coralloides* D (Martínez-Cañamero, 1986) podrían cooperar con las fosfatasas en esta acción.

La producción de fosfatasas y nucleasas ha sido estudiada en diversos microorganismos deslizantes como varias especies de *Capnocytophaga* (Poirier & Holt, 1983a), *Cytophaga* y *Lysobacter enzymogenes* (Von Tigerstrom, 1984; Von Tigerstrom & Stelmaschuk, 1987). *Capnocytophaga* produce fosfatasas celulares y extracelulares de forma constitutiva y *Lysobacter enzymogenes* presenta altos niveles celulares en presencia de fosfato inorgánico en el medio. Estas actividades, y su papel adaptativo y nutricional, han sido estudiadas en diversos microorganismos (Ricketts & Rappitt, 1974; Woolkalis & Baumann, 1981; Von Tigerstrom, 1984), incluidas varias especies de mixobacterias (Martínez-Cañamero *et al.*, 1987).

La síntesis y secreción de estos enzimas es concorde con el carácter de la nutrición de las mixobacterias y su uso natural de fuentes orgánicas de fósforo. Es razonable sugerir que la producción y secreción constitutiva de enzimas, fosfatasas en este caso, es ventajosa para la degradación de los sustratos nutritivos en los enjambres de mixobacterias. Zahavi y Ralt (1984) proponen un modelo de selección individual para explicar la selección de este fenómeno. Cabría preguntarse, ¿cual es la ventaja que representa para un individuo la producción continua de enzimas hidrolíticos?. La

DISCUSION

respuesta se basa en el comportamiento multicelular de estos microorganismos. La presión selectiva de su medio debió mover a las mixobacterias a colaborar entre ellas para producir más enzimas y con ello disponer de más nutrientes, siendo así ventajoso producir y segregar nuevas moléculas que aseguran la existencia de más colaboradores en esta tarea. Podemos hablar de un altruismo algo egoísta.

El estudio de las actividades fosfatasas celulares durante el crecimiento en medio sólido de *M. coralloides* D reveló diferencias entre los perfiles de actividad específica durante el crecimiento vegetativo sobre CTA y la formación de cuerpos fructificantes sobre Agar levadura. Las actividades fosfatasas alcanzaron un máximo durante los días de crecimiento, mientras que las actividades durante el desarrollo mostraron dos picos máximos de actividad. Cuando la fructificación fue inhibida con fosfato, el perfil de actividad fue similar al observado durante la formación de colonias vegetativas.

Durante la inducción de mixósporas con glicerol, también se detectaron variaciones en las actividades fosfatasas. Orlowski *et al* (1972) y Filer *et al* (1977) también observaron incrementos transitorios en diversas actividades enzimáticas durante este proceso en *M. xanthus*.

Las mixósporas de glicerol son más activas metabólicamente que las mixósporas de cuerpos fructificantes (Kaiser *et al.*, 1979). De acuerdo con ello, las actividades fosfatasas detectadas en las mixósporas de glicerol son un 60% mayores que las presentes en las formas de cuerpos fructificantes. Los dos tipos de mixósporas presentaron modelos de actividad diferentes durante el proceso de germinación. Por el contrario, ambas poseían valores de carga adenilada similares, como se comentó anteriormente.

Destacamos que ambos tipos de mixósporas no presentaban actividad fosfatasa extracelular, detectándose ésta sólo en el

DISCUSION

proceso de germinación en medios con nutrientes y no en suspensiones tamponadas. El modelo de actividad extracelular durante la germinación fue similar para ambos tipos de mixósporas. La pérdida de la actividad extracelular preexistente durante la inducción de mixósporas con glicerol podría ser debida a proteasas extracelulares. De hecho, hemos detectado actividad proteolítica durante la inducción, aunque las fosfatasas eran estables durante las primeras horas de la inducción, etapas en las que también era detectable actividad proteasa. La producción de nuevas proteasas específicas durante este proceso constituiría una posible explicación al fenómeno.

Estas variaciones en las actividades fosfatasas son, sin duda, reflejo de los cambios bioquímicos y fisiológicos que conllevan las diferentes etapas del desarrollo de las mixobacterias. Estas alteraciones en las actividades enzimáticas durante el proceso de diferenciación y desarrollo son usuales en todos los microorganismos que sufren estas variaciones en su ciclo de vida (Huttermann, 1972; Huttermann *et al.*, 1977; Vinter *et al.*, 1987). También en mixobacterias se han detectado estas variaciones, como indicábamos anteriormente.

En relación con las actividades enzimáticas durante los ciclos de vida, hemos de comentar otros dos puntos que aplazábamos anteriormente. Al inicio de esta Discusión indicábamos que el fosfato podía prevenir la autólisis celular observada en los cultivos líquidos de *M. coralloides* D. Hemos comentado que el proceso de fructificación es inhibido por el fosfato (González, 1985), observándose en este caso un crecimiento vegetativo similar al apreciable sobre CTA. Así, los perfiles de actividad fosfatasa sobre CTA y ALP son similares. Se ha sugerido que la correlación entre lisis celular y procesos de desarrollo es muy fuerte en las mixobacterias (Zusman, 1984). Por otra parte, se ha especulado sobre un posible papel del fosfato en el ciclo de desarrollo de las mixobacterias (Dworkin, 1973; Jones & Barr, 1983).

DISCUSION

Jones y Barr (1983) sugieren la existencia de al menos dos sistemas autolíticos en *M. xanthus*, uno sensible al fosfato, activo en células vegetativas y durante la germinación de mixósporas, y otro no sensible a los niveles de fosfato, activo durante la inducción de mixósporas y en los procesos de fructificación.

En *M. coralloides* D el fosfato puede actuar sobre la autólisis en medio líquido (Fernández-Vivas et al., 1983) y sobre el desarrollo de los cuerpos fructificantes (González, 1985). Sin embargo, la inducción de mixósporas con glicerol y su posterior germinación es independiente de la concentración de fosfato (González, 1985).

Las relaciones entre fosfato-lisis y fosfato-fructificación pueden verse reflejadas en las variaciones de actividad fosfatasa detectadas en medio sólido. Así, si las variaciones en la actividad fosfatasa sobre Agar levadura son propias de los procesos de desarrollo de esta mixobacteria, es de esperar que la inhibición de estos procesos evite también estas variaciones, como así ocurre. La inhibición del desarrollo por fosfato puede estar relacionada con la acción de este ión sobre los sistemas autolíticos que actúan en las células en desarrollo, si bien esta acción permanece sin ser aclarada.

Por otra parte, Dworkin (1973) apuntó la posibilidad de que el fosfato inorgánico actuara como señal intercelular para iniciar el proceso de germinación en *M. xanthus*. El fosfato inorgánico sería liberado de las mixósporas por inducción de su fosfatasa alcalina y movilización de sus depósitos de polifosfatos. En *M. coralloides* D hemos encontrado que las actividades fosfatasas celulares sufren un incremento durante las primeras horas de la germinación de sus mixósporas. Por otro lado, en el proceso de inducción de mixósporas, las reservas de polifosfatos eran degradadas, con un incremento paralelo en formas de polifosfatos menores y de ortofosfato. Posteriormente, en la germinación, los polifosfatos de larga cadena no sufren alteraciones pero si disminuyen los niveles de las otras dos fracciones. Podría haber, por tanto una liberación de ortofosfato

DISCUSION

por movilización de estas fracciones. Sin embargo, las fosfatasas celulares no mostraron actividad sobre los polifosfatos, como se desprende de estudios posteriores, aunque dado que estas enzimas fueron purificados de células vegetativas y no de mixósporas, la posible existencia de una actividad específica de mixósporas, activa sobre polifosfatos, no es descartable.

Estas evidencias, más o menos directas, sobre el papel del fosfato en la germinación y la implicación de sus reservas y de los enzimas que las movilizan, tienen dos importantes hechos en contra. Por un lado, en *M. xanthus*, la germinación de las mixósporas de cuerpos fructificantes no responde a la señal del fosfato (White, 1975). Por otra parte e igualmente, en *M. coralloides* D la germinación de las mixósporas es independiente de la concentración de fosfato del medio (González, 1985).

En relación al proceso de purificación llevado a cabo a partir de los extractos libres de células, éste consistió fundamentalmente en dos etapas basadas en criterios de diferenciación del peso molecular (cromatografía en Sephacryl) y de la carga eléctrica (cromatografía en CM-Sephadex). El tratamiento con cloruro magnésico permitió eliminar una parte de las proteínas eluidas en el frente de la cromatografía sobre Sephacryl.

En el proceso de purificación hemos considerado la posible existencia de una enzima con doble actividad fosfatasa-nucleasa como las presentes en *E. coli*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* (Weiss, 1981). Aunque la fosfatasa alcalina de *M. coralloides* eluía en Sephacryl S-200 junto a una actividad nucleasa con un pH de acción similar, ambas actividades fueron separadas en la etapa posterior de purificación por cromatografía de intercambio iónico sobre CM-Sephadex. Esta separación se comprobó posteriormente con el uso de un gel del tipo DEAE, donde la fosfatasa alcalina no se adsorbe en las condiciones de trabajo empleadas.

Igualmente, la fosfatasa ácida eluía en Sephacryl S-200 junto a una actividad nucleasa. En este caso ambas actividades mostraban pHs de acción muy diferentes. Además, en los estudios de purificación de la actividad nucleasa, esta mostró afinidad por intercambiadores de tipo aniónico en condiciones donde la actividad fosfatasa no presentaba esta característica (Martínez-Cañamero, comunicación personal). Por tanto, en ambos casos, podemos descartar la posible existencia de una enzima con doble actividad.

La presencia en una misma solución de actividad nucleasa y fosfatasa debida a diferentes enzimas es común y resulta enojosa en los estudios de especificidad de sustrato de ambos tipos de enzimas, pues puede llevar a errores al calificar ambas actividades (Schmidt & Laskowski, 1961). Es por ello necesario separar ambas actividades

DISCUSION

como paso previo a posteriores estudios. En nuestro caso, el uso de resinas de intercambio iónico permitió separar estas actividades.

En relación con la actividad alcalina presente en el frente de elución del Sephacryl S-200, los posteriores estudios indicaron que esta actividad es atribuible a la misma forma que eluye en fracciones posteriores de esta columna.

Así, las fracciones con actividad a pH 4,5, al ser sometidas a cromatografía en CM-Sephadex, eluían dicha actividad a una concentración de 0,1 M de ClNa. En estas fracciones no se encontraba actividad a pH 8,5. Esta actividad alcalina se encontraba en fracciones desplazadas del gel a una concentración de 0,04-0,05 M de ClNa. El nuevo fraccionamiento de esta actividad alcalina por Sephacryl S-200, permitía obtener su actividad en los mismos volúmenes de elución que las fracciones posteriores del primer eluido por Sephacryl S-200., no encontrándose actividad en el frente. Por otra parte, y de acuerdo con lo anterior, la cromatografía de intercambio iónico de las formas activas a pH 8,5, provenientes de las fracciones posteriores de la columna de Sephacryl, permitía obtener dicha actividad alcalina en fracciones desplazadas a una concentración de 0,05 M de ClNa.

Probablemente, una parte de la actividad alcalina sea arrastrada en el frente inicial por la existencia en él de grandes complejos de proteínas. El tratamiento con cloruro magnésico y la cromatografía de intercambio iónico permiten la separación de la actividad fosfatasa ácida y alcalina, correspondiendo esta última en sus propiedades a la forma que eluye por separado en la cromatografía por Sephacryl.

El proceso de purificación ha permitido obtener un rendimiento del 48% para la forma ácida y de un 27% para la alcalina, obviamente el factor de purificación es menor en el primer caso. El rendimiento obtenido en la purificación de las fosfatasas de otros microorganismos es muy variable. Así, se han descrito

DISCUSION

rendimientos del 60% en *E. coli* (Torriani, 1960), del 49% en *Lysobacter enzymogenes* (Von Tigerstrom, 1984), del 2-3% en *Capnocytophaga ochracea* (Poirier & Holt, 1983b), del 42% en *Serratia marcescens* (Bhatti, 1974), 34-44% en *Vibrio cholerae* (Roy et al., 1982), del 25% en *Vibrio splendidus* y del 19% *Vibrio harveyi* (Woolkalis & Baumann, 1981), del 38% en *Pseudomonas aeruginosa* (Day & Ingram, 1973), del 6% en *Rhizobium leguminosarum* (Glenn & Dilworth, 1980), del 20% en *Neurospora crassa* (Davis & Lees, 1972), del 54% en *Aspergillus ficuum* (Ullah & Cummins, 1987) y del 30% en *Saccharomyces* (Onishi et al., 1979). En general, y como es normal los rendimientos mayores fueron acompañados de un menor grado de purificación y viceversa. Así, en el caso de *E. coli* descrito, el factor de purificación fue de 3, aunque hay descritos otras métodos de purificación que permiten un factor de purificación de 115 con un rendimiento del 1,5% (Nesmeyanova et al., 1981).

El estudio de la homogeneidad de las muestras obtenidas tras los procesos de purificación fue realizado por electroforesis y densitometría, comprobándose esta homogeneidad en el caso de la fosfatasa ácida. Por lo que respecta a la fosfatasa alcalina, el grado de pureza obtenido fue igualmente satisfactorio para la realización de nuestros posteriores estudios de caracterización.

En el caso de la fosfatasa alcalina, el menor rendimiento obtenido puede ser en parte provocado por su menor estabilidad. Con el fin de tratar de aumentar los rendimientos y evitar la pérdida de actividades, procedimos a incorporar al tampón de elución de la columna de Sephacryl S-200 así como al extracto bruto inicial, un inhibidor de proteasas (PMSF) a una concentración final de 1 mM. Este tratamiento no permitió detectar mayores actividades. Aunque posteriormente se observó que las fosfatasas eran sensibles a proteasas, el uso de este inhibidor no permitió detectar niveles mayores de actividad en nuestro caso. Sin embargo, la presencia de Cl_2Mg en el tampón de elución de la columna de Sephacryl S-200 si

demostró ser importante para la detección de ambas actividades, especialmente para la forma alcalina. Esto es conforme con el efecto activador del ión Mg^{+2} que se observó posteriormente.

El estudio del tamaño molecular de la fosfatasa alcalina, por filtración por gel, asignó un peso molecular de 31.000 dalton para este enzima. Este tamaño es menor que el descrito para otras fosfatasas alcalinas de microorganismos. Así, se han referido valores de 60.000 d. en *V. cholerae* (Roy et al., 1982), 68.000 d. en *P. aeruginosa* (Day & Ingram, 1973), 80.000 d. en *E. coli* (Torriani, 1968), 100.000 d. en *S. marcescens* (Bhatti, 1974), 110.000 d. en *Campytophaga ochracea* (Poirier & Holt, 1983b), etc. Sin embargo, también, se han descrito fosfatasas alcalinas de pequeño peso molecular en una bacteria deslizante como *Lysobacter enzymogens*, cuya fosfatasa alcalina tiene 25.000 d. y en una halobacteria como *Halobacterium halobium* (Bonet et al., 1987) que presenta una fosfatasa alcalina de 24.000 d.

El tamaño molecular de la fosfatasa ácida no ha sido estudiado en mayor profundidad, si bien los datos iniciales indican que se presenta como una forma de elevado peso molecular.

Como paso previo a otros estudios posteriores de caracterización, se procedió al estudio de la influencia de la concentración de proteína y del tiempo de incubación. En las condiciones habituales de ensayo *in vitro*, el enzima esta presente en condiciones limitantes o catalíticas, mientras que las concentraciones de sustrato son mucho mayores. La relación entre la velocidad de reacción y la concentración de enzima es lineal sólo si se miden verdaderas velocidades iniciales, y ya que la velocidad varia con la concentración de sustrato, el periodo de ensayo debe acortarse lo suficiente para asegurar que sólo se utiliza una pequeña fracción del sustrato. Si se elige un intervalo de tiempo mayor al adecuado, la respuesta no será lineal para todas las concentraciones

DISCUSION

de enzima posiblemente utilizadas, y si se utiliza una concentración excesiva de enzima, la respuesta puede no ser lineal para un cierto tiempo. En el caso de las fosfatasas también puede ocurrir que la cinética de reacción se vea influida por la inhibición por fosfato, un producto de la reacción. Así, la determinación en los ensayos de estudios cinéticos de los límites de linealidad para la concentración de proteína a usar y del tiempo de reacción es esencial, manteniéndose en todos los estudios posteriores las condiciones de linealidad encontradas en nuestro caso.

Los valores de pH óptimo más usuales para la fosfatasa ácida y alcalina de microorganismos se sitúan en 4,5 y 8,5, respectivamente; aunque se han descrito valores óptimos de 2,5 y 6,5 para diferentes formas ácidas y de 7,1 y 11,1 para fosfatasas alcalinas. A continuación se muestran los valores de pH óptimo, para algunas fosfatasas ácidas y alcalinas de diversos microorganismos, incluyéndose los valores encontrados para *M. coralloides* D en este trabajo.

DISCUSSION

<u>Microorganismo</u>	<u>pH óptimo</u>	<u>Referencia</u>
<i>Escherichia coli</i>	2,5	Touati et al., 1987
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	5,1-5,7	Sakaguchi et al., 1972
<i>Pseudomonas</i> sp.	5,2	Stewart, 1972
<i>Bacillus subtilis</i>	4,6	Pickett & Dean, 1978
<i>Actinomyces</i> sp.	4-4,5	Howell & Fitzgerald, 1953
<i>Aspergillus ficuum</i>	2,5	Ullah & Cummins, 1987
<i>A. satoi</i>	3,0	"
<i>A. nidulans</i>	6,1	"
<i>A. niger</i>	4,0	"
<i>Geotrichum</i> sp.	4,6	Cotter & Martel, 1979
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	4,5-5,5	Becker, 1979
<i>Candida utilis</i>	4,5	Fernández et al., 1981a
<i>Myxococcus coralloides</i> D	4,5	Esta Memoria
<i>E. coli</i>	8,0	Reid & Wilson, 1971
<i>Lysobacter enzymogenes</i>	7,1-8,5	Von Tigerstrom, 1984
<i>V. parahaemolyticus</i>	10,5-11,1	Sakaguchi et al., 1972
<i>V. cholerae</i>	8,0	Roy et al., 1982
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	10,5	Day & Ingram, 1973
<i>B. subtilis</i>	8,0	Pickett & Dean, 1978
<i>Staphylococcus aureus</i>	10,1	Davies & James, 1974
<i>Neurospora crassa</i>	9,4	Davis & Lees, 1972
<i>S. cerevisiae</i>	8,5	Becker, 1979
<i>C. utilis</i>	8,9	Fernández et al., 1981b
<i>Anacystis nidulans</i>	8-9,5	Ihlenfeldt & Gibson, 1975
<i>Myxococcus coralloides</i> D	8,1	Esta Memoria

DISCUSION

En el estudio de la actividad ácida, los mayores valores de actividad se obtenían con el tampón acético-acetato cuyo pKa es de 4,76. El tampón cítrico-citrato posee valores de pK de 3,0, 4,74 y 5,4. Con este tampón se obtenían valores elevados de actividad entre valores de pH de 4 y 5 pero menores a 4,5 que con el tampón acético. Es usual elegir el tampón cuyo pK presenta un valor lo más próximo al pH óptimo observado. En la forma alcalina, la mayor actividad se encontró con el uso del tampón Tris, cuyo pK es de 8,1. Los valores a pH similares con los tampones Hepes y Glicina, cuyos pK son 7,5 y 9,6 respectivamente, fueron menores.

La estabilidad frente al pH de ambas enzimas mostró ser algo diferente. Así, la fosfatasa ácida era estable entre valores de pH de 3,0 y 9,0, mientras que la forma alcalina mostró estabilidad en valores comprendidos entre 6,0 y 9,0. Dada la estabilidad de los dos enzimas a valores de pH diferentes a su pH óptimo, la menor actividad a estos pHs puede deberse a de la formación de formas iónicas incorrectas del enzima y/o sustrato y no por una inactivación irreversible del enzima.

En cuanto a la temperatura, la fosfatasa ácida presenta su máxima actividad a 43°C y la alcalina a 37°C. En el estudio de las condiciones óptimas para la actividad, no se realizaron preincubaciones a diferentes temperaturas, por lo que no podemos hablar de una verdadera temperatura óptima, aunque se realizaron con controles del sustrato incubados a las mismas temperaturas que enzima y sustrato. Los estudios sin preincubación determinan la temperatura óptima para el tiempo de ensayo escogido, tiempo donde están actuando dos factores contrarios, el aumento de las colisiones enzima-sustrato que aumentan la actividad y el aumento de la velocidad de desnaturalización que la disminuye. Esta temperatura óptima se diferencia de la verdadera, en que esta última permitiría una actividad constante durante un periodo de tiempo tan largo como al menos el periodo de ensayo.

En relación a la estabilidad térmica, hemos observado que excepto a 50°C, la fosfatasa ácida se mostró más resistente a la inactivación por calor que la fosfatasa alcalina, aunque la inactivación es exponencial para ambas enzimas.

Igualmente, la actividad ácida mostró una mayor estabilidad a bajas temperaturas. Tras la congelación por dos meses se pudo detectar un 71% de la actividad original, por sólo el 51% de la actividad alcalina. El estudio de la estabilidad a 4°C fue de particular interés dado que todas las etapas de purificación se realizaron a esta temperatura. De nuevo encontramos una mayor estabilidad en la forma ácida. Sin embargo, ambas enzimas presentan una estabilidad muy similar a 37°C, valor próximo a la temperatura donde se detectó la mayor actividad ácida, y coincidente con la temperatura de mayor actividad de la fosfatasa alcalina.

Como era esperado, ambas actividades enzimáticas fueron sensibles a la acción de varias proteasas, pero no a enzimas que actúan sobre moléculas de naturaleza lipídica o glucídica. Esto parece indicar que estos compuestos están ausentes de la enzima o no son de importancia en su actividad catalítica. De hecho, las fosfatasas bacterianas son, en todos los casos descritos, proteínas sin ningún otro componente, al contrario que las fosfatasas de levaduras y hongos que son de naturaleza glucoproteica (Onishi *et al.*, 1979; Ullah & Cummins, 1987).

Indiquemos que en el estudio de las condiciones óptimas de actividad, también se consideró la molaridad del tampón, apreciándose que ambas enzimas presentaban elevada actividad en un rango de 10 a 50 mM.

En el estudio de diferentes inhibidores enzimáticos sobre las actividades fosfatasas, encontramos un comportamiento similar con otras fosfatasas bacterianas y que caracteriza a todos estos enzimas.

El ácido tartárico y otros α -hidroxiácidos son inhibidores característicos de las fosfatasas ácidas de tejidos animales

(Hollander, 1971) y de algunos como *Sporothrix schenckii* (Arnold et al., 1986), pero no son inhibidores de las fosfatasas bacterianas. Así, estos compuestos no presentaron acción significativa sobre las fosfatasas de *M. coralloides* D. La inhibición encontrada en algunos casos, no más de un 10%, puede atribuirse a la capacidad de estos ácidos de captar iones necesarios para la actividad enzimática. Los agentes quelantes más efectivos, como el EDTA, son inhibidores comunes de todas las fosfatasas, tanto ácidas como alcalinas, observándose un efecto algo menor sobre las formas ácidas (Hollander, 1971). En nuestro caso, también se apreció este menor efecto del EDTA sobre la actividad ácida.

La ausencia de inhibición por EDTA sólo ha sido descrita en fosfatasas que no tienen requerimientos de iones metálicos para su actividad, como en la forma alcalina de *Lysobacter enzymogenes* (Von Tigerstrom, 1984) y en las fosfatasas de *Citrobacter* sp. (Hambling, 1987). En estos casos se aprecia que el Mg^{+2} tampoco tiene acción alguna sobre la actividad enzimática, mientras que en las fosfatasas inhibidas por EDTA, este ión actúa como un activador.

Las fosfatasas, tanto ácidas como alcalinas, suelen describirse como metaloenzimas que requieren la presencia de cofactores metálicos. En cada caso particular, la acción de los diferentes iones como activadores o inhibidores es diverso. Así, el papel de cofactor del Zn^{+2} para las fosfatasas alcalinas de *E. coli* (Torriani, 1968) y *Pseudomonas aeruginosa* (Day & Ingram, 1973) ha sido establecido en virtud del análisis de absorción atómica de los enzimas purificados. El Ca^{+2} , Co^{+2} , Mn^{+2} y Ni^{+2} pueden restaurar la actividad de la fosfatasa alcalina de *Vibrio cholerae* (Roy et al., 1982). Co^{+2} , Mn^{+2} , Mg^{+2} y Zn^{+2} son activadores de la fosfatasa alcalina de *Vibrio parahaemolyticus* y el Co^{+2} de su forma ácida (Sakaguchi et al., 1972). El Co^{+2} es también activador de la fosfatasa alcalina de *Bacillus licheniformis* (Spencer et al., 1981). Mg^{+2} y Zn^{+2} activan la fosfatasa alcalina de *Rhizobium*

leguminosarum (Glenn & Dilworth, 1980) y a las formas alcalinas de *Schizosaccharomyces pombe* (Dhamija et al., 1987).

Así mismo, el efecto inhibitor de diferentes iones se encuentra ampliamente descrito en la bibliografía. Metales como el cobalto, níquel, cobre y zinc, en forma de cationes divalentes, inhiben las fosfatasas de *Citrobacter* sp. (Hambling et al., 1987); el litio y sodio inhiben la forma alcalina de *R. leguminosarum* (Glenn & Dilworth, 1980) y sodio, potasio y magnesio actúan como inhibidores de la fosfatasa alcalina de *V. cholerae* (Roy et al., 1982). Plomo, mercurio, hierro, cadmio, berilio y otros iones metálicos son inhibidores de fosfatasas de muy diversas fuentes (Stadtman, 1961; Schmidt, 1961).

En nuestro estudio, sólo el Mg^{+2} se mostró como activador, de forma más acentuada en la forma alcalina. Esta misma forma era la más afectada por el EDTA. La ausencia del magnesio durante los procesos de purificación conducía a una disminución de los niveles de actividad, si bien su aumento por encima de concentraciones de 10 mM no provocaba mayor actividad. Estos fenómenos eran comunes en ambas actividades, aunque de forma más marcada para la fosfatasa alcalina.

El resto de los iones metálicos ensayados actuaron como inhibidores en grados diversos. El fosfato y su análogo, el arseniato, provocaron una inhibición de un 50% para concentraciones próximas a 16 mM.

El fluoruro es un potente inhibidor de las fosfatasas activas a pH ácido, presentando menor acción sobre las formas alcalinas (Hollander, 1971). Así, la fosfatasa ácida de *M. coralloides* D fue inhibida totalmente por concentraciones de 5 mM de FNa, mientras la forma alcalina era inhibida en un 42%.

Ambas actividades enzimáticas fueron insensibles a la acción de la N-etilmaleimida, un agente metilante que actúa sobre los grupos -SH libres. Las fosfatasas, como enzimas inespecíficos, no suelen depender de estos grupos para su actividad enzimática.

Al igual que en su comportamiento frente a inhibidores, las fosfatasas estudiadas presentaron en su actividad frente a diversos sustratos las características propias de las fosfomonoesterasas no específicas. Los dos enzimas hidrolizan a tasas variadas diversos fosfomonoésteres azucarados, adenín nucleótidos y varios ésteres de fosfato de síntesis.

La fosfatasa ácida presenta una pequeña actividad sobre el ATP, el pirofosfato y el tripolifosfato. La forma alcalina es más activa sobre los dos primeros sustratos pero no hidroliza al último de ellos. En ningún caso se detectó actividad fosfodiesterasa sobre el AMPc, ni polifosfatasa sobre las formas de polifosfatos ensayados.

Como indicamos en cada caso, por su comportamiento frente a los diversos inhibidores e iones ensayados y por su especificidad de sustrato, las fosfatasas de *M. coralloides* D responden a las características generales de las fosfomonoesterasas inespecíficas.

Los estudios de cinética enzimática han ido encaminados a comprobar si los resultados obtenidos eran acordes con el mecanismo de reacción propuesto para estos enzimas. Este mecanismo es del tipo Uni-Bi ordenado, el cual predice que el primer producto de reacción sería el alcohol y actuaría como un inhibidor lineal no competitivo y que el fosfato sería el segundo producto, actuando como un inhibidor lineal competitivo.

La primera predicción es confirmada por el estudio con los sustratos glucosa-6-fosfato y β -glicerolfosfato, donde el producto alcohol correspondiente, glucosa y glicerol, actuaron como inhibidores lineales no competitivos. La segunda predicción es confirmada por el estudio con p-nitrofenilfosfato, donde el fosfato se comportó como un inhibidor lineal competitivo. Por tanto, en su conjunto, los resultados se ajustan al mecanismo predicho de forma general para estos enzimas.

Los valores obtenidos en los estudios cinéticos son, obviamente, aplicables sólo en las condiciones utilizadas en cada caso. Esta limitación en los estudios cinéticos es común a todos los casos citados en la bibliografía, donde se hace referencia explícita de que los valores obtenidos sólo son válidos en las condiciones utilizadas en el trabajo.

En general, es el p-nitrofenilfosfato el sustrato más utilizado en los estudios de cinética y el fosfato el inhibidor más empleado. Considerando las limitaciones indicadas se dan a continuación los valores de K_m (para el p-nitrofenilfosfato) y de K_i (para el fosfato y arseniato) encontrados en diferentes fosfatasas de origen microbiano.

No se pretenden realizar comparaciones, dado que las condiciones de pH, molaridad, tampón, temperatura y grado de purificación de los enzimas es diferente para cada caso citado. Tan sólo, sirvan los valores mostrados como ilustración de la diversidad de valores encontrados en la bibliografía consultada. En cada ejemplo, se presenta sólo el valor del pH al que fueron realizados los estudios de cinética enzimática.

DISCUSION

<u>Microorganismo</u>	<u>pH</u>	<u>Km</u>	<u>Ki</u>	<u>Referencia</u>
<i>Pseudomonas</i> sp.	5,2	1,5 mM	---	Stewart, 1972
<i>Candida utilis</i>	4,5	3,0 mM	---	Fernández <i>et al.</i> , 1981a
<i>Candida utilis</i>	4,5	0,8 mM	---	Fernández <i>et al.</i> , 1981a
<i>Geotrichium</i> sp.	4,6	0,56mM	---	Cotter & Martel, 1979
<i>Aspergillus ficuum</i>	2,5	0,25mM	0,34 mM	Ullah & Cummins, 1987
<i>Aspergillus satoii</i>	3,0	2,1 mM	---	" " "
<i>Aspergillus nidulans</i>	6,1	0,22mM	---	" " "
<i>Aspergillus niger</i>	4,0	1,0 mM	---	" " "
<i>S. cerevisiae</i>	4,5	0,28mM	---	" " "
<i>M. coralloides</i> D	4,5	1,56mM	6,2 mM	Esta memoria
			8,4 mM*	Esta memoria
<i>Neurospora crassa</i>	9,5	1,7 mM	---	Davis & Lees, 1972
<i>Escherichia coli</i>	8,0	0,09mM	0,01 mM	Reid & Wilson, 1971
			0,025mM*	" " "
<i>P. aeruginosa</i>	10,5	0,06mM	---	Day & Ingram, 1973
<i>Vibrio cholerae</i>	8,0	0,24mM	0,033 mM	Roy <i>et al.</i> , 1982
<i>Serratia marcescens</i>	8,8	0,11mM	0,92 mM	Bhatti, 1974
<i>R. leguminosarum</i>	9,0	0,045mM	0,045 mM	Glenn & Dilworth, 1980
			0,035 mM*	" " "
<i>Candida utilis</i>	8,9	2,5 mM	2,4 mM	Fdez <i>et al.</i> , 1981b
			0,1 mM*	" "
<i>M. coralloides</i> D	8,1	5,0 mM	8,0 mM	Esta Memoria
			16,2 mM*	" "

* Ki para el arseniato

DISCUSION

La actividad fosfotransferasa es una propiedad común a las fosfatasas, independientemente de su tipo y origen. La capacidad de transferir el grupo fosfato a moléculas alternativas a la del agua puede aumentar la hidrólisis de los sustratos. Los dos enzimas difieren en su capacidad de transfosforilación, siendo esta mayor para la fosfatasa ácida. Por tanto las diferencias observadas en las velocidades máximas durante los estudios de cinética pueden ser debidas, en parte, a las diferentes capacidades de transfosforilación de estos enzimas. Como en el resto de las fosfatasas, la discriminación del agua como aceptor del fosfato frente alcoholes presentes en menor concentración, parece indicar la naturaleza poco hidrofílica del centro activo de estos enzimas.

En relación a la localización de las actividades fosfatasas, ya indicabamos en la Introducción que estos enzimas se sitúan en las envueltas celulares, localización relacionada con su actividad sobre sustratos orgánicos fosforilados que no tienen facilitada su entrada a la célula y que pueden proporcionar una fuente alternativa de fósforo. Dentro de las bacterias deslizantes, las fosfatasas se han descrito localizadas en el periplasma y la membrana externa de varias especies de *Capnocytophaga* (Poirier & Holt, 1983a), y en el periplasma y la superficie externa de la membrana citoplasmática de *M. xanthus* (Voelz & Ortigoza, 1968).

En nuestro caso, los estudios de localización citoquímica han puesto de manifiesto que tanto la fosfatasa ácida como la alcalina de *M. coralloides* D se localizan, al menos, a nivel de la membrana externa celular.

Las interacciones de las fosfatasas con los componentes de la membrana externa, su paso por el periplasma y la forma de secreción de estos enzimas son cuestiones abiertas para futuros estudios.

Los mecanismos de control para la síntesis y secreción de estos enzimas, junto con un estudio más amplio de su metabolismo

DISCUSION

fosforilado son, también, temas abiertos a nuevas investigaciones. El uso de técnicas de manipulación genética, ampliamente desarrolladas en mixobacterias, podría permitir un mayor y más profundo conocimiento de estos temas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1. El nivel de fosfato inorganico en los medios de cultivo no afecta a la producción de proteínas extracelulares por *Myxococcus coralloides* D. Por el contrario, la concentración de fosfato modifica la cantidad de pigmentos carotenoides y no carotenoides presentes en las células de esta mixobacteria.
2. El contenido celular en polifosfatos se ve incrementado en condiciones desfavorables para el crecimiento de *Myxococcus coralloides* D. Estas inclusiones han sido visualizadas por microscopia electronica en forma de granulos densos, localizados en el nucleoplasma celular.
3. La detección de actividad hexoquinasa a partir de extractos libres de células, ha revelado la existencia de una actividad hexoquinasa-ATP-dependiente y otra actividad hexoquinasa-polifosfato-dependiente.
4. Los niveles de carga energética adenilada permanecen constantes, con muy escasas variaciones, durante las diferentes etapas de los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D.
5. Los ensayos *in situ* de las actividades fosfatasas en células permeabilizadas han permitido detectar dos actividades ligadas a células. Ambas actividades han sido localizadas, por citoquímica, a nivel de la membrana externa.
6. Las actividades fosfatasas celulares durante los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D, exhiben diferentes perfiles de actividad durante el crecimiento vegetativo y en el proceso de fructificación. También se aprecian diferencias en los niveles de actividad de los dos tipos de mixósporas.

CONCLUSIONES

7. La producción en medio líquido de las fosfatasas celulares y de las actividades extracelulares es independiente de la concentración de fosfato inorgánico, siendo estas actividades de tipo constitutivo.

8. La purificación de las fosfatasas ligadas a células mediante cromatografía por Sephacryl S-200 y cromatografía de intercambio iónico, ha permitido separar estas dos actividades celulares.

9. La fosfatasa alcalina presenta un pH óptimo de 8,1, habiéndose estimado su peso molecular en 31.000 daltons, mientras que la fosfatasa ácida presenta un pH óptimo de 4,5 y un peso molecular superior. La fosfatasa ácida muestra una mayor estabilidad, frente al pH y la temperatura, que la fosfatasa alcalina.

10. Las dos fosfatasas purificadas presentan actividad fosfomonoesterasa y fosfotransferasa.

11. El fluoruro actúa como un potente inhibidor de la fosfatasa ácida, mientras que el EDTA es un inhibidor de la fosfatasa alcalina. Ambas actividades no se ven afectadas por la acción de agentes alquilantes ni por ácidos α -hidroxicarboxílicos. El ión Mg^{+2} actúa como un activador de la fosfatasa alcalina.

12. Cuando se emplea como sustrato el p-nitrofenilfosfato la fosfatasa ácida presenta una K_m de $1,56 \times 10^{-3}M$ y la fosfatasa alcalina de $5 \times 10^{-3}M$. Los valores de K_i encontrados en presencia de fosfato son de $6,2 \times 10^{-3}M$ en el caso de la fosfatasa ácida y de $8 \times 10^{-3}M$ para la alcalina. En los estudios de inhibición con arseniato se encontraron valores de K_i de $8,4 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa ácida y de $16,2 \times 10^{-3}M$ para la alcalina.

CONCLUSIONES

Los valores de K_m de la fosfatasa ácida cuando se emplea glucosa-6-fosfato fueron de $2,22 \times 10^{-3}M$ y de $2,85 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa alcalina. Los valores de K_i encontrados con la glucosa fueron de 1,35 M y 1,075 M, respectivamente.

Cuando se utiliza β -glicerolfosfato los valores de K_m fueron de $5 \times 10^{-3}M$ para la fosfatasa ácida y $3,33 \times 10^{-3}M$ para la alcalina. Los valores de K_i con glicerol fueron de 1,5 M y 3,9 M, respectivamente.

BIBLIOGRAFIA

- Agnihotri, V.P. 1970. Solubilization of insoluble phosphates by some soil fungi isolated from nursery seedbeds. *Can J. Microbiol.* 16: 877-880.
- Alexander, M. 1977. Microbial transformations of phosphorus. In *Introduction to soil microbiology*, 2^a Ed. John Wiley & Sons. New York. pp. 333-349.
- Allen, M.H. 1984. Cyanobacterial cell inclusions. *Ann. Rev. Microbiol.* 38: 1-25.
- Ames, B.N. 1966. Assay of inorganic phosphate, total phosphate and phosphatases. In *Methods in Enzymology Vol.VIII*. Ed. Colowick & Kaplan. Academic Press. New York. pp. 115-118.
- Arias, J.M. & Montoya, E. 1978. Dispersed growth and cell lysis in *Myxococcus coralloides*. *Microbios Letters* 5: 81-84.
- Arnold, W.N., Mann, L.C., Sakai, K.H., Garrison, R.G. & Coleman, P.D. 1986. Acid phosphatase of *Sporothrix schenckii*. *J. Gen. Microbiol.* 132: 3421-3432.
- Avery, L. & Kaiser, D. 1983a. *In situ* transposon replacement and isolation of a spontaneous tandem duplication. *Mol. Gen. Genet.* 191: 99-109.
- Avery, L. & Kaiser, D. 1983b. Construction of tandem genetic duplication with defined endpoints in *Myxococcus xanthus*. *Mol. Gen. Genet.* 191: 110-117.

BIBLIOGRAFIA

- Bacon, K., Clutter, D., Kottel, R.H., Orlowski, M. & White, D. 1975. Carbohydrate accumulation during myxospore formation in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 124: 1635-1636.
- Bagnara, A.S. & Finch, L.R. 1974. The effect of bases and nucleosides on the intracellular contents of nucleotides and 5-phosphorybosil-pyrophosphate in *Escherichia coli*. Eur. J. Biochem 41: 421.
- Balsalobre, J.M., Ruiz-Vazquez, R.M. & Murillo, F.J. 1987. Light induction of gene expression in *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 84: 2359-2362.
- Baltscheffsky, M. & Nyren, P. 1987. P_{Pi} in the energy conversion system of *Rhodospirillum rubrum*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 260-263.
- Bauer, K., Benz, R., Brass, J. & Boos, W. 1985. *Salmonella typhimurium* contains an anion-selective outer membrane porin induced by phosphate starvation. J. Bacteriol. 161: 813-816.
- Baxter, R.L. 1985. Microbial applications of NMR spectroscopy. Part 1. Microbiological Sciences 2: 203-211.
- Beck, D.P. & Munns, D.N. 1984. Phosphate nutrition of *Rhizobium* spp. Appl. Environ. Microbiol. 47: 278-282.
- Becker, J. 1979. Isolation and characterization of an acid phosphatase interfering with phosphorylase determinations in crude extracts from yeasts. Arch. Microbiol. 123: 233-238.

- Benhamú, C. 1978. Estudios sobre fenómenos de autólisis en *Myxococcus coralloides*. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Bergey's manual of Determinative Bacteriology. 8ª edición. 1974. The Williams and Wilkins Co. Baltimore.
- Bhatti, A.R. 1974. Purification and properties of the alkaline phosphatase of *Serratia marcescens*. Arch. Microbiol. 95: 255-266.
- Bielecki, R.L. 1968. Effect of phosphorus deficiency on levels of phosphorus compounds in *Spirodela*. Plant. Physiol. 43: 1309-1316.
- Blackhart, B.D. & Zusman, D.R. 1985a. Cloning and complementation analysis of the "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus*. Mol. Gen. Genet. 198: 243-254.
- Blackhart, B.D. & Zusman, D.R. 1985b. "Frizzy" genes of *Myxococcus xanthus* are involved in control of frequency of reversal of gliding motility. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 8767-8770.
- Bonet, M.L., Llorca, F.I. & Cadenas, E. 1987. Purificación y algunas propiedades de la fosfatasa alcalina de *Halobacterium halobium*. En XIV Congreso Nacional de la Sociedad Española de Bioquímica. Málaga. España.
- Boos, W. 1987. Mechanism and energetics of phosphate transport in other organism: Introduction. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. p. 185.

- Bostian, K.A., Lemire, J.M. & Halvorson, H.O. 1983. Physiological control of repressible acid phosphatase gene transcripts in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* 3: 839-853.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72: 248-254.
- Bretscher, A.P. & Kaiser, D. 1978. Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium. *J. Bacteriol.* 133: 763-768.
- Brown, H.L., Burchard, R.P., Morris, D.W., Parish, J.H., Stow, W.D. & Tsopanakis, D. 1976. Phage and defective phages of strains of *Myxococcus*. *Arch. Microbiol.* 108: 271-279.
- Brzoska, P., Schweizer, H., Argast, M. & Voos, V. 1987. *ugp*-dependent transport system for sn-glycerol-3-phosphate of *Escherichia coli*. In Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 164-169.
- Burchard, R.P. 1974. Studies on gliding motility in *Myxococcus xanthus*. *Arch. Microbiol.* 99: 271-280.
- Burchard, R.P. & Dworkin, M. 1966. Light induced lysis and carotenogenesis in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 91: 535-545.
- Burchard, R.P. & Parish, J.H. 1975. Mutants of *Myxococcus xanthus* insensitive to glycerol-induced myxospore formation. *Arch. Microbiol.* 104: 289-292.

- Campos, J.M. & Zusman, D.R. 1975. Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3':5' cyclic AMP, ADP and nutrition. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 72: 518-522.
- Cleland, W.W. 1963. The kinetics of enzyme catalysed reactions with two or more substrates or products. I. Nomenclature and rate equations. Biochim. Biophys. Acta 67: 104-137.
- Coleman, G. 1981. Pleiotropic compensation in the regulation of extracellular protein formation by low α -toxin producing variant of *Staphylococcus aureus* (WOOD 46). J. Gen. Microbiol. 122: 11-15.
- Cortay, J., Bleicher, F., Rieul, C., Reeves, H.C. & Cozzone, A.J. 1988. Nucleotide sequence and expression of the *aceK* gene coding for isocitrate dehydrogenase kinase/phosphatase in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 170: 89-97.
- Cotter, D.A. & Martel, A.J. 1979. Acid phosphatase activity and polyol levels during the life cycle of *Geotrichum* sp. Microbios Letters 8: 85-93.
- Cowan, W.M., Fawcett, J., O'Leary, D. & Stanfield, B. 1984. Regressive events in neurogenesis. Science 225: 1258.
- Cozzone, A.J. 1984. Protein phosphorylation in bacteria. TIBS 9: 400-403.
- Craven, P.A. & Hayasaka, S.S. 1982. Inorganic phosphate solubilization by rhizosphere bacteria in a *Zostera marina* community. Can. J. Microbiol. 28: 605-610.

- Cruden, D.L., Durbin, V.E. & Markovetz, A.J. 1983. Utilization of PPI as an energy source by a *Clostridium* sp. Appl. Environ. Microbiol. 46: 1403-1408.
- Cumsky, M. & Zusman, D.R. 1979. Myxobacterial hemagglutinin, a development-specific lectin of *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5505-5509.
- Cumsky, M. & Zusman, D.R. 1981a. Purification and characterization of myxobacterial hemagglutinin, a development-specific lectin of *Myxococcus xanthus*. J. Biol. Chem. 256: 12581-12588
- Cumsky, M. & Zusman, D.R. 1981b. Binding properties of myxobacterial hemagglutinin. J. Biol. Chem. 256: 12596-12599.
- Cheng, K.J., Ingram, J.M. & Costerton, J.W. 1970. Alkaline phosphatase localization and spheroplast formation of *Pseudomonas aeruginosa*. Can. J. Microbiol. 16: 1319-1324.
- Cheng, K.J. & Costerton, J.W. 1973. Localization of alkaline phosphatase in three gram-negative rumen bacteria. J. Bacteriol. 116: 424-440.
- Cholli, A.L., Yamane, T. & Jelinski, L.W. 1985. Combining solid-state and solution state ^{31}P -NMR to study *in vivo* phosphorus metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 391-395.
- Davies, A.L. & James, A.M. 1974. Phosphatase activity of methicillin-resistant and methicillin-sensitive cells of *Staphylococcus aureus*. Microbios 10: 257-268.

- Davis, F.W.J. & Lees, H. 1972. Alkaline phosphatase of *Neurospora crassa*. Part II: product inhibition studies. *Can. J. Microbiol.* 18: 407-421.
- Dawes, E.A. & Senior, P.J. 1973. The role and regulation of energy reserve polymers in microorganism. *Adv. Microbiol. Physiol.* 10: 135-266.
- Dawson, H. & Jones, M.B. 1979. Cell wall turnover during myxospore formation in *Myxococcus xanthus*. *J. Gen. Microbiol.* 112: 143-148.
- Day, D.F. & Ingram, J.M. 1973. Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* alkaline phosphatase. *Can. J. Microbiol.* 19: 1225-1233.
- Dhamija, S.S., Fluri, R. & Schweingruber, M.E. 1987. Two genes control three alkaline phosphatase in *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr. Genet.* 11: 467-473.
- Dhundale, A.R., Furuichi, T., Inouye, S. & Inouye, M. 1985. Distribution of multicopy single-stranded DNA among myxobacteria and related species. *J. Bacteriol.* 164: 914-917.
- Dobzhansky, T., Ayala, F.J., Stebbins, G.L. & Valentine, J.W. 1977. *Evolution*. San Francisco: Freeman.
- Domanski-Kaden, J. & Simonis, W. 1972. Changes in phosphate fractions, especially the polyphosphates, in synchronously growing cultures of *Ankistrodesmus braunii*. *Arch. Mikrobiol.* 87: 11-28.

- Dorrer, E. & Teuber, M. 1977. Induction of polymyxin resistance in *Pseudomonas fluorescens* by phosphate limitation. Arch. Microbiol. 114: 87-89.
- Dworkin, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 84: 250-257.
- Dworkin, M. 1972. The myxobacteria: new directions in studies of procaryotic development. CRC Critical Reviews in Microbiology 1: 453-452.
- Dworkin, M. 1973. Cell-cell interactions in the myxobacteria. En Microbial Differentiation, ed. J.M. Ashworth, J.E. Smith. Soc. Gen. Microbiol. Symp. Cambridge Univ. Press. Cambridge. vol. 23, pp. 125-142.
- Dworkin, M. & Niederpruem, D.J. 1964. Electron transport system in vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 87: 316-322.
- Dworkin, M. & Gibson, S.M. 1964. A system for studying microbial morphogenesis: rapid formation of microcysts in *Myxococcus xanthus*. Science 146: 243-244.
- Eigener, U. & Bock, E. 1972. Synthesis and breakdown of the polyphosphate fractions in cells of *Nitrobacter winogradskyi* Buch. Arch. Mikrobiol. 81: 367-378.
- Elvin, C.H., Hardy, C.M. & Rosenberg, H. 1987. Molecular studies on the phosphate inorganic transport system of *Escherichia coli*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 156-158.

- Ermakova, S.A., Mansurova, S.E., Kalebina, T.S., Lobakova, E.S., Selyach, I.O. & Kulaev, I.S. 1981. Accumulation of pyrophosphate and other energy-rich compounds under various conditions of yeast growth. *Arch. Microbiol.* 128: 394-397.
- Fernández, M.P., Suarez-Rendueles, M.P. & Gascón, S. 1981a. Molecular forms of yeast acid phosphatase: cellular localization. *Cell and Molecular Biology* 27: 113-118.
- Fernández, M.P., Gascón, S. & Schwencke, J. 1981b. Some enzymatic properties of vacuolar alkaline phosphatase from yeast. *Curr. Microbiol.* 6: 121-126.
- Fernández-Vivas, A., Arias, J.M. & Montoya, E. 1983. Autolysis in *Myxococcus coralloides* D. *FEMS Microbiol. Lett.* 20: 97-101.
- Fernley, H.N. 1971. Mammalian alkaline phosphatases. En *The Enzymes* Vol. IV, 3^a Ed., Ed. P.D. Boyer, Academic Press. New York. pp. 417-447.
- Filer, D., Kindler, S. H. & Rosenberg, E. 1977. Myxospore coat synthesis in *Myxococcus xanthus*: enzymes associated with uridine 5'-diphosphate-N-acetylgalactosamine formation during myxospore development. *J. Bacteriol.* 131: 745-750.
- Foster, J.W. & Spector, M.P. 1986. Phosphate starvation regulon of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* 166: 666-669.
- Franker, C.K., McGee, M.P. & Rezzo, T.P. 1978. Alkaline phosphatase activity in a strain of *Bacterionema matruchotti*. *Journal Dental Research* 58 1705-1708.

- Furukawa, K., Hasunuma, K. & Shinohara, Y. 1987. Characterization of Pi-repressible enzymes secreted in culture media by *Neurospora crassa* wild-type cells and null-type mutants. *J. Bacteriol.* **169**: 4790-4795.
- Gerth, K., Reichenbach, H., Lehmann, J. & Hecht, V. 1986. The influence of ammonia on growth and antibiotic production in *Myxococcus virescens*. En 13th. International Conference on the Biology of the Myxobacteria. Granada. España.
- Gezelius, K. 1974. Inorganic polyphosphates and enzymes of polyphosphate metabolism in the cellular slime mold *Dictyostelium discoideum*. *Arch. Microbiol.* **98**: 311-329.
- Gill, J.S. & Dworkin, M. 1986. Cell surface antigens during submerged development of *Myxococcus xanthus*, examined with monoclonal antibodies. *J. Bacteriol.* **168**: 505-511.
- Glaessner, M.F. 1976. Early phanerozoic annelid worms and their geological and biological significance. *J. Geol. Soc. London.* **132**: 259-275.
- Glenn, A.R. 1976. Production of extracellular proteins by bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **30**: 41-62.
- Glenn, A.R. & Dilworth, M.J. 1980. The effect of metal ions on the alkaline phosphatase of *Rhizobium leguminosarum*. *Arch. Microbiol.* **126**: 251-256.
- Gnospeilius, G. 1978a. Purification and preparations of an extracellular protease from *Myxococcus virescens*. *J. Bacteriol.* **133**: 17-25.

- Gnospelius, G. 1978b. Myxobacterial slime and proteolytic activity. Arch. Microbiol. 116: 51-59.
- Goicoechea, M.A., González, F., Muñoz, J. & Arias, J.M. 1987. Effect of phosphate and temperature on the synthesis of pigments in *Mycococcus xanthus*. En First European Symposium on myxobacteria. Braunschweig, Republica Federal de Alemania.
- Goldstein, A.H. 1986. Bacterial solubilization of mineral phosphates: historical perspective and future prospects. American Journal of Alternative Agriculture 1: 51-57.
- Goldstein, A.H. & Liu, S.T. 1987. Molecular cloning and regulation of a mineral phosphate solubilizing gene from *Erwinia herbicola*. Biotechnology 5: 72-74.
- González, F. 1985. Influencia del fosfato en los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D y estudio de sus fosfatasas. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Gottesman, S. 1984. Bacterial regulation: global regulatory networks. Ann. Rev. Genet. 18: 415-441.
- Greenman, J. & Melville, T.H. 1978. The influence of certain growth conditions on the phosphatase activity of *Streptococcus mutants* grown in batch and continuous culture. Microbios 21: 23-32.
- Groat, R.G., Schultz, J.E., Zychlinsky, E., Bockman, A. & Martin, A. 1986. Starvation proteins in *Escherichia coli*: kinetics of synthesis and role in starvation survival. J. Bacteriol. 168: 486-493.

- Grove, G. & Marzluf, G.A. 1980. Nitrogen regulation of acid phosphatase in *Neurospora crassa*. J. Bacteriol. 141: 1470-1473.
- Hagen, D.C., Bretscher, A.P. & Kaiser, D. 1978. Synergism between morphogenetic mutants of *Myxococcus xanthus*. Dev. Biol. 64: 289-292.
- Halvorson, H.O. & Nakata, A. 1987. Phosphate regulation in diverse microorganism: Introduction. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. pp. 41-42.
- Halvorson, H.O., Suresh, N., Roberts, M.F., Coccia, M. & Chikarmane, H.M. 1987. Metabolically active surface polyphosphate pool in *Acinetobacter lwoffi*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. pp. 220-224.
- Hambling, S.G., Macaskie, L.E. & Dean, A.C.R. 1987. Phosphatase synthesis in a *Citrobacter* sp. growing in continuous culture. J. Gen. Microbiol. 133: 2743-2749.
- Hancock, R.E.W., Poole, K. & Benz, R. 1982. Outer membrane protein P of *Pseudomonas aeruginosa*: regulation by phosphate deficiency and formation of small anion-specific channels in lipid bilayer membranes. J. Bacteriol. 150: 730-738.
- Harcke, E., Huttermann, A. & Kuhlwein, H. 1971. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales). I. Purification and some properties of the bacteriolytic and proteolytic activity. Arch. Microbiol. 77: 86-95.
- Harcke, E., Huttermann, A. & Kuhlwein, H. 1972. Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (Myxobacterales). II.

- Identification of the bacteriolytic enzyme as a muramidase. Arch. Microbiol. 85: 6-12.
- Harder, W. & Dijkhuizen, L. 1983. Physiological responses to nutrient limitation. Ann. Rev., Microbiol. 37: 1-23.
- Harold, F.M. 1966. Inorganic polyphosphates in biology: structure, metabolism and function. Bacteriol. Rev. 30: 772-794.
- Hartmann, W., Tan, I., Huttermann, A. & Kuhlwein, H. 1977. Studies on the cell cycle of *Myxobacter* AL-1. Arch. Microbiol. 114: 13-18.
- Haska, G. & Noren, B. 1967. Growth and enzyme activity of *Myxococcus virescens* in liquid medium. Physiologia plantarum 20: 851-861.
- Haska, G. 1974. Extracellular lytic enzymes of *Myxococcus virescens*. IV. Purification and characterization of a D-alanyl- ϵ -N-lysine endopeptidase. Physiol. Plant. 31: 251-256.
- Hanson, C.W. & Dworkin, M. 1974. Intracellular and extracellular nucleotides and related compounds during the development of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 118: 486-496.
- Healey, F.P. 1973. Inorganic nutrient uptake and deficiency in algae. CRC Critical Reviews 3: 69-113.
- Healey, F.P. 1982. The Phosphate. En The Biology of Cyanobacteria, Berkeley: Univ. California Press. Carrs & Whitton Eds. pp. 94-124.
- Herbert, D., Phipps, P.J. & Strange, E.E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. Methods in Microbiology Vol. 5B. Academic Press. London. pp. 209-344.

- Hirsch, H.J. 1977. Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*). Arch. Microbiol. 115: 45-49.
- Hodgkin, J. & Kaiser, D. 1979. Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus* (*Myxobacterales*): two gene systems control movement. Mol. Gen. Genet. 171: 177-191.
- Hollander, V.P. 1971. Acid phosphatases. En The Enzymes Vol IV, 3^a Ed., Ed. P.D.Boyer. Academic Press. New York. pp. 449-498.
- Hollis, D.P. 1980. Phosphorus NMR of cells, tissues and organelles. En Biological Magnetic Resonance Vol. 2. Ed. Berliner & Reuben. Plenum Press. New York. pp. 1-44.
- Howell, A. & Fitzgerald, R.J. 1953. The production of acid phosphatases by certain species of *Actinomyces*. J. Bacteriol. 66: 437-442.
- Hulett, F.M. 1987. Alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis*: proteins and genes. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 43-48.
- Huttermann, A. 1972. Isoenzyme pattern and "de novo" synthesis of phosphodiesterase during differentiation (spherulation) in *Physarum polycephalum*. Arch. Mikrobiol. 83: 155-164.
- Huttermann, A., Gebaner, M. & Chet, I. 1979. Studies on isoenzyme pattern during differentiation (spherulation) of *Physarum polycephalum*. Arch. Microbiol. 120: 113-123.
- Ihlenfeldt, M.J.A. & Gibson, J. 1975. Phosphate utilization and alkaline phosphatase activity in *Anacystis nidulans* (*Synechococcus*). Arch. Microbiol. 102: 23-28.

- Inouye, M., Inouye, S. & Zusman, D.R. 1979. Biosynthesis and self-assembly of protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. **76**: 209-213.
- Inouye, S., Ike, Y. & Inouye, M. 1983. Tandem repeat of the genes for protein S, a development specific protein of *Myxococcus xanthus*. J. Biol. Chem. **258**: 38-40.
- Irschik, H. & Reichenbach, H. 1985. An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Coralloccoccus (Myxococcus) coralloides*. Arch. Microbiol. **145**: 40-44.
- Jackson, R.L. & Wolfe, R.S. 1968. Composition, properties and substrate specificities of myxobacter AL-1 protease. J. Biol. Chem. **243**: 870-888.
- Janssen, G.R. & Dworkin, M. 1985. Cell-cell interactions in developmental lysis of *Myxococcus xanthus*. Dev. Biol. **112**: 194-202.
- Jeanjean, R., Bedu, S., Rocca-Serra, J. & Foucault, C. 1984. Phosphate uptake in the yeast *Candida tropicalis*: purification of phosphate-binding protein and investigations about its role in phosphate uptake. Arch. Microbiol. **137**: 215-219.
- Jeanjean, R., Bedu, S., Nieuwenhuis, B.J. & Hiru, M. 1986. Immunological evidence for the involvement of cell wall proteins in phosphate uptake in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Arch. Microbiol. **144**: 207-212.
- John, A.C. & Goldberg, A.L. 1980. Effects of starvation for potassium and other inorganic ions on protein degradation and ribonucleic

- acid synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 143: 1223-1233.
- Johnson, R.J. & White, D. 1972. Myxospore formation in *Myxococcus xanthus*: chemical changes in the cell wall during cellular morphogenesis. J. Bacteriol. 112: 849-855.
- Jones, M.V. & Barr, V.E. 1983. Phosphate-stimulated autolysis and cellular morphogenesis of *Myxococcus xanthus*. FEMS Microbiol. Lett. 16: 359-362.
- Kadner, R.J., Shattuck-Eidens, D.M. & Weston, L.A. 1987. Exogenous induction of the *uhp* sugar phosphate transport system. In Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 178-184.
- Kaiser, D. 1979. Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 76: 5952-5956
- Kaiser, D. 1986. Control of multicellular development: *Dictyostelium* and *Myxococcus*. Ann. Rev. Genet. 20: 539-566.
- Kaiser, D., Manoil, C., Dworkin, M. 1979. Myxobacteria: cell interactions, genetics and development. Ann. Rev. Microbiol. 33: 595-639.
- Katz, W. & Strominger, J.L. 1967. Structure of the cell wall of *Micrococcus lysodeikticus*. II. Study of the structure of the peptides produced after lysis with the myxobacterium enzyme. Biochem. 6: 930-937.

- Knowles, C.J. 1977. Microbial metabolic regulation by adenine nucleotide pools, pp. 241-283. En *Microbial energetics*. Ed. Haddock & Hamilton. Cambridge University Press. Cambridge.
- Komano, T., Brown, N., Inouye, S. & Inouye, M. 1982. Phosphorylation and methylation of proteins during *Myxococcus xanthus* spore formation. *J. Bacteriol.* 151: 114-118.
- Komano, T., Inouye, S. & Inouye, M. 1980. Patterns of protein production in *Myxococcus xanthus* during spore formation induced by glycerol, dimethyl sulfoxide, and phenethyl alcohol. *J. Bacteriol.* 144: 1076-1082.
- Korteland, J., Tommassen, J. & Lugtenberg, B. 1982. PhoE protein pore of the outer membrane of *Escherichia coli* K12 is a particularly efficient channel for organic and inorganic phosphate. *Biochim. Biophys. Acta.* 690: 282-289.
- Korteland, J. & Lugtenberg, B. 1984. Increased efficiency of the outer membrane PhoE protein in *Escherichia coli* K-12 mutants with heptose-deficient lipopolysaccharide. *Biochim. Biophys. Acta.* 774: 119-126.
- Kranz, D.M., Page, L.V. & Tsang, J.C. 1975. Alkaline phosphatase from clinical and non-clinical strains of *Serratia marcescens* grown in two types of media. *Microbios* 14: 183-193.
- Kroos, L. & Kaiser, D. 1984. Construction of Tn5lac, a transposon that fuses lacZ expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 5816-5820.

- Kroos, L., Kuspa, A. & Kaiser, D. 1986. A global analysis of developmentally regulated genes in *Myxococcus xanthus*. Dev. Biol. 117: 252.
- Kukko, E. & Saarento, H. 1983. Accumulation of pyrophosphate in *Escherichia coli*: relationship to growth and nucleotide synthesis. Arch Microbiol. 136: 209-211.
- Kulaev, I. & Vagabov, V. 1983. Polyphosphate metabolism in microorganism. Adv. Microbiol. Physiol. 24: 83-171.
- Kulaev, I., Vagabov, V. & Shabalin, Y.A. 1987. New data on biosynthesis of polyphosphates in yeasts. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 233-238.
- Kuner, J.M. 1980. Developmental genetics of *Myxococcus xanthus*. Ph. D. dissertation, Stanford University, Stanford, California.
- Kuner, J.M. & Kaiser, D. 1981. Introduction of transposon Tn5 into *Myxococcus* for analysis of developmental and other non selectable mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 78: 425-429.
- Kuo, M. & Blumenthal, H.J. 1961. Absence of phosphatase repression by inorganic phosphate in some microorganism. Nature 190: 29-31.
- Kuspa, A., Kroos, L. & Kaiser, D. 1986. Intercellular signaling is required for developmental gene expression in *Myxococcus xanthus*. Dev. Biol. 117: 267.
- Lang, V.K., Glassey, K. & Archibald, A.R. 1982. Influence of phosphate supply on teichoic acid and teichuronic acid content of *Bacillus subtilis* cell walls. J. Bacteriol. 151: 367-375.

- Lanier, W.P. 1987. A myxobacteria-like microbial fossil from the 2.0 billion year old Gunflit formation Canada. XIV International Conference of the Biology of the Myxobacteria. Pingree Park. Colorado.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. & Kaiser, D. 1983. Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. J. Bacteriol. 153: 1394-1401.
- Larson, T.J. 1987. *glpT*-dependent transport of sn-glycerol-3-phosphate in *Escherichia coli* K-12. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 164-169.
- Lemire, J.M., Willcocks, T., Halvorson, H.O. & Bostian, K.A. 1985. Regulation of repressible acid phosphatase gene transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 5: 2131-2141.
- Li, H. 1982. Phosphoprotein phosphatases. En Current Topics in cellular regulation. Vol. 21. Ed. Horecker & Stadtman. Academic Press. New York. pp. 129-174.
- Lichko, L.P., Okorokov, L.A. & Kulaev, I.S. 1982. Participation of vacuoles in regulation of levels of K^+ , Mg^{+2} and orthophosphate ions in cytoplasm of the yeast *Saccharomyces carlsbergensis*. Arch. Microbiol. 132: 289-293.
- Lindberg, R.A. & Drucker, H. 1984. Regulation of a *Neurospora crassa* extracellular RNase by phosphorus, nitrogen and carbon derepressions. J. Bacteriol. 157: 380-384.
- Ludwing, W., Schleifer, K.H., Reichenbach, H. & Stackebrandt, E. 1983. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: *Myxococcus fulvus*,

BIBLIOGRAFIA

Stigmatella aurantiaca, *Cystobacter fuscus*, *Sorangium cellulosum* and *Nannocystis exedens*. Arch. Microbiol. 135: 58-62.

Lugtenberg, B. 1987. The *pho* regulon in *Escherichia coli*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 1-2.

- MacDonald, M.R. 1955. Deoxyribonucleases. En *Methods in Enzymology*, Vol II. Ed Colowick & Kaplan. Academic Press. New York. pp. 437-447.
- Maeba, P.Y. 1984. Iodination of *Myxococcus xanthus* during development. *J. Bacteriol.* **155**: 1033-1041.
- Maloney, P.C., Ambudkar, S.V., Thomas, J. & Schiller, L. 1984. Phosphate/Hexose-6-phosphate antiport in *Streptococcus lactis*. *J. Bacteriol.* **158**: 238-245.
- Mandel, M. & Lewin, R.A. 1969. Deoxyribonucleic acid base composition of flexibacteria. *J. Gen. Microbiol.* **58**: 171-178.
- Mann, B.J., Akins, R.A., Labowitz, A.M. & Metzenberg, R.L. 1988. The structural gene for a phosphorus-repressible phosphate permease in *Neurospora crassa* can complement a mutation in positive regulatory gene *nuc-1*. *Mol. Cell. Biol.* **8**: 1376-1379.
- Manoil, C. & Kaiser, D. 1980a. Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development. *J. Bacteriol.* **137**: 295-300.
- Manoil, C. & Kaiser, D. 1980b. Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate during starvation and myxospore formation. *J. Bacteriol.* **141**: 297-304.
- Margulis, L. 1981. *Symbiosis in cell evolution*. San Francisco. Freeman.

- Martin, J.F. & Demain, A.L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**: 230-251.
- Martin, S., Sodergren, E., Masuda, T. & Kaiser, D. 1978. Systematic isolation of transducing phages for *Myxococcus xanthus*. *Virology* **88**: 44-53.
- Martínez-Cañamero, M^a.M. 1986. Desoxirribonucleasas producidas por *Myxococcus coralloides* D. Memoria de Licenciatura. Universidad de Granada.
- Martínez-Cañamero, M^a.M., González, F., Goicoechea, M.A., Muñoz, J., Extremera, A.L. & Arias, J.M. 1987. Deoxyribonuclease and phosphatase activities in myxobacteria. En First European Symposium on Myxobacteria. Braunschweig, Republica Federal de Alemania.
- Mayer, H. & Reichenbach, H. 1978. Restriction endonucleases: General survey procedure and survey of gliding bacteria. *J. Bacteriol.* **136**: 708-713.
- McCarter, L.L. & Silverman, M. 1987. Phosphate regulation of gene expression in *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* **169**: 3441-3449.
- McCurdy, H.D. & Khouw, B.T. 1969. Studies on *Stigmatella brunnea*. *Can. J. Microbiol.* **15**: 731-738.
- McCurdy, H.D. & MacRae, T.H. 1974. Xanthacin, a bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb. *Can. J. Microbiol.* **20**: 131-135.
- Morrison, C.E. & Zusman, D.R. 1979. *Myxococcus xanthus* mutants with temperature-sensitive, stage-specific defects: evidence for

- independent pathways in development. *J. Bacteriol.* **140**: 1036-1042.
- Muller-Felter, S. & Ebel, J.P. 1962. Séparation des acides ribonucléiques et des polyphosphates inorganiques. II. Mise au point d'une technique de séparation par adsorption différentielle sur charbon. *Bull. Soc. Chim. Biol. (Paris)*. **44**: 1175-1184.
- Muñoz, J., Arias, J.M. & Montoya, E. 1984. Production and properties of a bacteriocin from *Myxococcus coralloides* D. *J. Appl. Bacteriol.* **57**: 69-74.
- Nelson, D.R., Cumsy, M.G. & Zusman, D.R. 1981. Localization of myxobacterial hemagglutinin in the periplasmic space and on the cell surface of *Myxococcus xanthus* during developmental aggregation. *J. Biol. Chem.* **256**: 12589-12595.
- Nelson, D.R. & Zusman, D.R. 1983a. Evidence for long-lived mRNA during fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **80**: 1467-1471.
- Nelson, D.R. & Zusman, D.R. 1983. Transport and localization of protein S, a spore coat protein during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **154**: 547-533.
- Nesmeyanova, M.A., Motlokh, O.B., Kolot, M.N. & Kulaev, I.S. 1981. Multiple forms of alkaline phosphatase from *Escherichia coli* cells with repressed and desrepressed biosynthesis of the enzyme. *J. Bacteriol.* **146**: 453-459.
- Nicaud, J.M., Breton, A., Younes, G. & Guespin-Michel, J. 1984. Mutants of *Myxococcus xanthus* impaired in protein secretion: an

- approach to study of a secretory mechanism. Appl. Microbiol. Biotechnol. 20: 344-350.
- Nielsen, J.B.K., Mezes, P.S.F. & Lampen, J.O. 1983. Secretion by *Pseudomonas aeruginosa*: fate of cloned gram-positive lipoprotein deletion mutant. J. Bacteriol. 156: 559-566.
- Nikaido, H. & Vaara, M. 1985. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. Microbiol. Rev. 49: 1-32.
- O'Connor, K.A. & Zusman, D.R. 1983. Coliphage P1 mediated transduction of cloned DNA from *Escherichia coli* to *Myxococcus xanthus*: use for complementation and recombinational analyses. J. Bacteriol. 155: 317-329.
- O'Connor, K.A. & Zusman, D.R. 1987. Reexamining the role of autolysis in the developmental cycle of *Myxococcus xanthus*. XIV International Conference of the Biology of the Myxobacteria. Pingree Park. Colorado.
- Okorokov, L.A., Lichko, L.P. & Kulaev, I.S. 1980. Vacuoles: main compartments of potassium, magnesium and phosphate ion in *Saccharomyces carlsbergensis* cells. J. Bacteriol. 144: 661-665.
- Onishi, H.R., Tkacz, J.S. & Lampen, J.O. 1979. Glycoprotein nature of yeast alkaline phosphatase. J. Biol. Chem. 254: 11943-11952.
- Orlowski, M., Martin, P., White, D. & Wong, M.C. 1972. Changes in activity of glyoxylate cycle enzymes during myxospore development in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 111: 784-790.

- Orndorff, P.E. & Dworkin, M. 1980. Separation and properties of the cytoplasmic and outer membranes of vegetative cells of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **141**: 914-927.
- Orndorff, P.E. & Dworkin, M. 1982. Synthesis of several membrane proteins during developmental aggregation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **149**: 29-39.
- Oshima, Y. 1982. Regulatory circuits for gene expression: the metabolism of galactose and of phosphate, p. 159-180. En *The molecular biology of the yeast Saccharomyces: metabolism and gene expression*. Cold Spring Harbor Laboratory, N.Y.
- Oyaizu, H. & Woese, C.R. 1985. Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria. *System. Appl. Microbiol.* **6**: 257-263.
- Panasenko, S.M. 1983. Protein and lipid methylation by methionine and S-adenosylmethionine in *Myxococcus xanthus*. *Can. J. Microbiol.* **29**: 1224-1228.
- Passador, L. & McCurdy, H.D. 1985. Cyclic nucleotides and development of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants. *Curr. Microbiol.* **12**: 289.
- Peterson, E.A., Gillespie, D.C. & Cook, F.D. 1966. A wide-spectrum antibiotic produced by a specie of *Sorangium*. *Can. J. Microbiol.* **12**: 221-230.
- Pickett, A.W. & Dean, A.C.R. 1978. Phosphatase activities of cadmium and zinc resistant strains of *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and *Pseudomonas* sp. *Microbios Letters* **6**: 103-109.

- Poirier, T.P. & Holt, S.C. 1983a. Acid and alkaline phosphatases of *Capnocytophaga* species. I. Production and cytological localization of the enzymes. *Can. J. Microbiol.* 29: 1350-1360.
- Poirier, T.P. & Holt, S.C. 1983b. Acid and alkaline phosphatases of *Capnocytophaga* species. II. Isolation, purification and characterization of the enzymes from *Capnocytophaga ochracea*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1361-1368.
- Poole, K. & Hancock, R.E.W. 1986. Phosphate-starvation-induced outer membrane proteins of members of the families *Enterobacteriaceae* and *Pseudomonadaceae*: demonstration of immunological cross-reactivity with an antiserum specific for porin protein P of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 165: 987-993.
- Pritchard, A.E. & Vasil, M.L. 1986. Nucleotide sequence and expression of a phosphate-regulated gene encoding a secreted hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 167: 291-298.
- Qualls, G.T. & White, D. 1982. Developmental cell cohesion in *Stigmatella aurantiaca*. *Arch. Microbiol.* 131: 334-337.
- Ram, S.P., Sullivan, P.A. & Shepherd, M.G. 1983. The *in situ* assay of *Candida albicans* enzymes during yeast growth and germ-tube formation. *J. Gen. Microbiol.* 129: 2367-2378.
- Ramaley, R.F. 1979. Molecular biology of extracellular enzymes. *Adv. Appl. Microbiol.* 25: 37-55.
- Rao, N.N., Roberts, M.F. & Torriani, A. 1985. Amount and chain length of polyphosphates in *Escherichia coli* depend on cell growth conditions. *J. Bacteriol.* 162: 242-247.

- Rao, N.N., Wang, E., Yashphe, J. & Torriani, A. 1986. Nucleotide pool in *pho* regulon mutants and alkaline phosphatase synthesis in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 166: 205-211.
- Rao, N.N., Roberts, M.F. & Torriani, A. 1987. Polyphosphate accumulation and metabolism in *Escherichia coli*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 213-219.
- Reeves, R.E. 1987. Metabolic energy supplied by PPi. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 255-259.
- Reichenbach, H. 1981. Taxonomy of the gliding bacteria. Ann. Rev. Microbiol. 35: 339-364.
- Reichenbach, H. 1984. Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes, en Myxobacteria: Development and cell interactions, Rosenberg, E., Ed. Springer-Verlag, New York. pp 1-50.
- Reichenbach, H. & Dworkin, M. 1981. Introduction to the gliding bacteria. En The Prokaryotes: a handbook on habitats, isolation and identification of bacteria, ed. M.P. Starr, H. Stolp, H.G. Trueper, A. Balows, H.G. Schlegel. Spinger Verlag. Berlin. Vol. 1, pp. 315-327.
- Reichenbach, H. & Kleinig, H. 1984. Pigments of myxobacteria. En Myxobacteria: Developmental and cell interactions. Ed. E. Rosenberg, Springer-Verlag. New York. pp. 127-137.
- Reid, T.W. & Wilson, I.B. 1971. *E. coli* alkaline phosphatase. En The Enzymes. Vol. IV, 3^a Ed. Ed. P.D. Boyer, Academic Press. New York. pp. 373-415.

- Reizer, J. & Saier, M.H. 1987. Mechanism and regulation of phosphate transport in *Streptococcus pyogenes*. J. Bacteriol. 169: 297-302.
- Ricketts, T.R. & Rappitt, A.F. 1974. Endocytosis and the adaptative acid hydrolases in *Tetrahymena pyriformis* GL. Arch. Microbiol. 98: 115-126.
- Roberts, M.F., Evans, J.N.S & C.J. Tolman. 1987. Nuclear magnetic resonance studies of methanogens: what use is a cyclic pyrophosphate?. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 246-254.
- Robertson, B.R. & Button, D.K. 1979. Phosphate-limited continuous culture of *Rhodotorula rubra*: kinetics of transport, leakage and growth. J. Bacteriol. 138: 884-895.
- Rodríguez, C. & Montoya, E. 1980. Enzimas proteolíticos y bacteriolíticos producidos por *Myxococcus xanthus*. Anales de Edafología y Agrobiología XXXIX: 169-176.
- Romeo, J.M., Esmon, B. & Zusman, D.R. 1986. Nucleotide sequence of the myxobacterial hemagglutinin gene contains four homologous domains. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 83: 6332-6336.
- Rosenberg, E., Kataraki, M. & Gottlieb, P. 1967. Deoxyribonucleic acid synthesis during exponential growth and myxocyst formation in *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 93: 1402-1408.
- Rosenberg, E., Keller, K.H. & Dworkin, M. 1977. Cell density-dependent growth of *Myxococcus xanthus* on casein. J. Bacteriol. 129: 770-777.

- Rosenberg, E. & Cohen, I.R. 1983. Microbial biology. Ed. CBS Colleague Publishing. Philadelphia.
- Rosenberg, E. & Varon, M. 1984. Antibiotics and lytic enzymes, en Myxobacteria: Development and cell interactions, Rosenberg, E., Ed. Springer-Verlag, New York. pp 109-125.
- Rosenfelder, G., Luderitz, O. & Westphal, O. 1974. Composition of lipopolysaccharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and non-fruiting myxobacteria. Eur. J. Biochem. **44**: 411-420.
- Roy, N.K., Ghosh, R.K. & Das, J. 1982. Monomeric alkaline phosphatase of *Vibrio cholerae*. J. Bacteriol. **150**: 1033-1039.
- Rudd, K. & Zusman, D.R. 1979. Rifampin resistant mutants of *Myxococcus xanthus* defective in development. J. Bacteriol. **137**: 295-300.
- Sakaguchi, O., Yokota, K. & Koshi, T. 1972. Acid and alkaline phosphatases of *Vibrio parahaemolyticus*. Japan. J. Microbiol. **16**: 351-358.
- Sarao, R., McCurdy, H.D. & Passador, L. 1985. Enzymes of the intermediary carbohydrate metabolism of *Polyangium cellulosum*. Can. J. Microbiol. **31**: 1142-1146.
- Schmidt, G. 1961. Nonspecific acid phosphomonoesterases. En The Enzymes Vol.5, 2^a ed. Ed. P.D. Boyer. Academic Press. New York. pp. 37-47.
- Schmidt, G. & Laskowski, M. 1961. Phosphate ester cleavage (survey). En The Enzymes Vol. 5 2^a ed. Ed. P.D. Boyer. Academic Press. New York. pp. 3-36.

- Schopf, J.W. 1978. The evolution of the earliest cells. *Sci. Am.* **239**: 111-138.
- Seki, T., Yoshikawa, H., Takahashi, H. & Saito, H. 1987. Cloning and nucleotide sequence of *phoP*, the regulatory gene for alkaline phosphatase and phosphodiesterase in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **169**: 2913-2916.
- Shabtai, Y., Rosenberg, E. & Kindler, S.H.. 1975. Aspartokinase isoenzymes of the fruiting myxobacterium *Myxococcus xanthus*. *Biochim. Biophys. Acta.* **403**: 345-354.
- Shimkets, L.J. 1984. Nutrition, metabolism and the initiation of development. En *Myxobacteria: Development and cell interactions*. Ed. E. Rosenberg. Springer-Verlag. New York. pp 91-108.
- Shimkets, L.J. 1986. Correlation of energy-dependent cell cohesion with social motility in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **166**: 837-841.
- Shimkets, L.J. 1987. Control of morphogenesis in myxobacteria. *CRC Critical Reviews in Microbiology* **14**: 195-227.
- Shimkets, L.J. & Dworkin, M. 1981. Excreted adenosine is a cell density signal for the initiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **84**: 51-60.
- Shimkets, L.J. & Kaiser, D. 1982a. Induction of coordinated cell movement in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **152**: 451-461.

- Shimkets, L.J. & Kaiser, D. 1982b. Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 152: 462-470.
- Shimkets, L.J., Gill, R.E. & Kaiser, D. 1983. Developmental cell interactions in *Myxococcus xanthus* and the *spoC* locus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80: 1406-1410.
- Shinabarger, D.L., Schmitt, E.K., Braymer, H.D. & Larson, A.D. 1984. Phosphonate utilization by the glyphosate-degrading *Pseudomonas* sp. strain PG2982. Appl. Environ. Microbiol. 48: 1049-1050.
- Skujins, J. 1976. Extracellular enzymes in soil. CRC Critical Reviews 4: 383-421.
- Smith, B.A. & Dworkin, M. 1980. Adenylate energy charge during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 142: 1007-1009.
- Sodergren, E., Cheng, Y., Avery, L. & Kaiser, D. 1983. Recombination in the vicinity of insertions of transposon Tn5 in *Myxococcus xanthus*. Genetics 105: 281-291.
- Sorhaug, T. 1974. Glycerol ester hydrolase, lipase of *Myxococcus xanthus* fb. Can. J. Microbiol. 20: 611-615.
- Spencer, D.B., Chen, C. & Hulett, F.M. 1981. Effect of cobalt on synthesis and activation of *Bacillus licheniformis* alkaline phosphatase. J. Bacteriol. 145: 926-933.
- Stadtman, T.C. 1961. Alkaline phosphatases. En The Enzymes Vol 5. 2nd ed. Ed. P.D. Boyer. Academic Press. New York. pp. 55-71.

- Stephens, K., Hegemenan, G.D. & White, D. 1980. Morphogenetic effects of light and guanine derivatives on the fruiting myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. J. Bacteriol. 144: 322-326.
- Stephens, K., Hegemenan, G.D. & White, D. 1982. Pheromone produced by the myxobacterium *Stigmatella aurantiaca*. J. Bacteriol. 149: 739-747.
- Stewart, D.J. 1972. Acid phosphomonoesterase activity of certain fluorescent pseudomonads. Microbios 5: 183-188.
- Sudo, S.Z. & Dworkin, M. 1969. Resistance of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 98: 883-887.
- Sudo, S.Z. & Dworkin, M. 1972. Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 110: 123-132.
- Surin, B.P., Rosenberg, H. & Cox, G.B. 1985. Phosphate-specific transport system of *Escherichia coli*: nucleotide sequence and gene-polypeptide relationships. J. Bacteriol. 161: 189-198.
- Surin, B.P., Dixon, M.E. & Rosenberg, H. 1986. Purification of the PhoU protein, a negative regulator of the *pho* regulon of *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. 168: 631-635.
- Sutherland, I.W. & Wilkinson, J.F. 1971. Chemical extraction methods of microbial cells. Methods in Microbiology Vol 5B. Academic Press. London. pp. 345-383.
- Tamai, Y., Toh-e, A. & Oshima, Y. 1985. Regulation of inorganic phosphate transport systems in *Saccharomyces cerevisiae*. J. Bacteriol. 164: 964-968.

- Terry, K.R. & Hooper, A.B. 1970. Polyphosphate and orthophosphate content of *Nitrosomonas europaea* as a function of growth. J. Bacteriol. 103: 199-206.
- Timmerman, M.V. 1984. Biological phosphorus removal in wastewater treatment. Microbiological Sciences 1: 149-152.
- Tipper, D.J., Strominger, J.L. & Ensign, J.C. 1967. Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus*, strain Copenhagen. VII. Mode of action of the bacteriolytic peptidase from myxobacter and the isolation of intact cell wall polysaccharides. Biochem. 6: 906-920.
- Torriani, A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatases by *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta. 38: 460-479.
- Torriani, A. 1968. Alkaline phosphatase of *Escherichia coli*. En Methods in Enzymology Vol XII-B. Ed. Colowick & Kaplan. Academic Press. New York. pp. 212-218.
- Toshida, K., Kuromitsu, Z., Ogawa, N., Ogawa, K. & Oshima, Y. 1987. Regulatory circuit for phosphatase synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 49-55.
- Touati, E., Dassa, E., Dassa, J. & Boquet, P.L. 1987. Acid phosphatase (pH 2,5) of *Escherichia coli*: regulatory characteristics. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 31-40.
- Truman, J.W. 1984. Cell death in invertebrate nervous systems. Ann. Rev. Neurosci. 7: 171.

- Tsai, C.S., Whitaker, D.R., Jurasek, K. & Gillespie, D.C. 1965. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Action of the α and β -lytic proteases on two bacterial mucopeptides. *Can. J. Biochem.* **43**: 1971-1983.
- Tsukagoshi, H., Yamada, H., Tsuboi, A. & Udaka, S. 1981. Effects of phosphate in medium on protein secretion in a protein-producing bacterium, *Bacillus brevis* 47. *Appl. Environ. Microbiol.* **42**: 370-374.
- Ullah, A.M.J. & Cummins, B.J. 1987. Purification, N-terminal amino acid sequence and characterization of pH 2,5 optimum acid phosphatase (E.C. 3.1.3.2) from *Aspergillus ficuum*. *Preparative Biochemistry* **17**: 397-422.
- Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu. Rev. Biochem.* **47**: 533-606.
- Van Groenestijn, J.W., Deinema, M.H. & Zehnder, A.J.B. 1987. ATP production from polyphosphate in *Acinetobacter* strain 210A. *Arch. Microbiol.* **148**: 14-19.
- Van Steveninck, J., Schuddemant, J., Van Leeuwen, C.M. & Van den Broek, P.J.A. 1987. Polyphosphates and sugar transport in yeasts. In *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism*. ASM Washington. pp. 239-244.
- Varon, M., Cohen, S. & Rosenberg, E. 1984. Autocides produced by *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **160**: 1146-1150.
- Varon, M., Tietz, A. & Rosenberg, E. 1986. *Myxococcus xanthus* autocide AMI. *J. Bacteriol.* **167**: 356-361.

- Vinter, V, Smid, F. & Smrckova, I. 1987. Factors influencing the activity of cellular alkaline phosphatase during growth and sporulation of *Bacillus cereus*. *Folia Microbiol.* **32**: 89-95.
- Voelz, H.G. & Dworkin, M. 1962. Fine structure of *Myxococcus xanthus* during morphogenesis. *J. Bacteriol.* **84**: 943-952.
- Voelz, H. & Ortigoza, R.O. 1968. Cytochemistry of phosphatases in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **96**: 1357-1365.
- Voelz, H., Voelz, U. & Ortigoza, R.O. 1966. "The polyphosphate overplus" phenomenon in *Myxococcus xanthus* and its influence on the architecture of the cell. *Arch. Mikrobiol.* **53**: 371-388.
- Von Tigerstrom, R.G. 1984. Production of two phosphatases by *Lysobacter enzymogenes* and purification and characterization of the extracellular enzyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **47**: 693-698.
- Von Tigerstrom, R.G. & Stelmaschuk, S. 1987. Comparison of the phosphatases of *Lysobacter enzymogenes* with those of related bacteria. *J. Gen. Microbiol.* **133**: 3121-3127.
- Wackett, L.P., Shames, S.L., Venditti, C.P. & Walsh, C.T. 1987a. Bacterial carbon-phosphorus lyase: products, rates and regulation of phosphonic and phosphinic acid metabolism. *J. Bacteriol.* **169**: 710-717.
- Wackett, L.P., Wanner, B.L., Venditti, C.P. & Walsh, C.T. 1987b. Involvement of the phosphate regulon and the *psiD* locus in carbon-phosphorus lyase activity of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **169**: 1753-1756.

- Vanner, B.L.** 1987a. Bacterial alkaline phosphatase gene regulation and the phosphate response in *Escherichia coli*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 12-19.
- Vanner, B.L.** 1987b. Control of *phoR*-dependent bacterial alkaline phosphatase clonal variation by the *phoM* region. J. Bacteriol. **169**: 900-903.
- Vanner, B.L.** 1987c. Phosphate regulation of gene expression in *Escherichia coli*. En *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: cellular and molecular biology, Vol. 2. ASM Washington. pp. 1326-1333.
- Vanner, B.L. & Chang, B.** 1987. The *phoBR* operon in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **169**: 5569-5574.
- Vanner, B.L., Wilmes, M.R. & Hunter, E.** 1988. Molecular cloning of the wild-type *phoM* operon in *Escherichia coli* K-12. J. Bacteriol. **170**: 279-288.
- Watson, B.F. & Dworkin, M.** 1968. Comparative intermediary metabolism of vegetative cells and microcysts of *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. **96**: 1456-1473.
- Weinberg, R.A. & Zusman, D.** 1987. Alkaline phosphatase and threonine deaminase: two developmental markers of *Myxococcus xanthus*. En 14th. International Conference on the Biology of the Myxobacteria. Pingree Park (Colorado), USA.
- Weiss, B.** 1981. Exodeoxyribonucleases of *Escherichia coli*. En The Enzymes Vol XIV. Ed. P.D. Boyer. Academic Press. New York. pp. 203-231.

- Whitaker, R.C. 1965. Lytic enzymes of *Sorangium* sp. Isolation and enzymatic properties of the α and β -lytic proteases. Can. J. Biochem. 43: 1935-1954.
- White, D. 1975. Myxospores of *Myxococcus xanthus*. En Spores VI, pp. 44-51. Ed. Gerhardt, Sadoff & Costilow. ASM. Washington.
- White, D., Dworkin, M. & Tipper, D.J. 1968. Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis. J. Bacteriol. 95: 2186-2197.
- Wireman, J.W. & Dworkin, M. 1977. Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*. J. Bacteriol. 129: 796-802.
- Wistow, G., Summers, L. & Blundell, T. 1985. *Myxococcus xanthus* spore coat protein S may have a similar structure to vertebrate lens β,γ -crystallins. Nature (London)315: 771.
- Wodzinski, R.J. 1979. Introduction to extracellular enzymes: from the ribosome to the market place. Advances in Applied Microbiology Volumen 25, 1-6. Academic Press. N. York.
- Wood, H.G. & Goss, N.H. 1985. Phosphorylation enzymes of the propionic acid bacteria and the roles of ATP, inorganic pyrophosphate and polyphosphates. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 82: 312-315.
- Wood, H.G., Robinson, N.A., Pepin, C.A. & Clarck, J.E. 1987. Polyphosphate kinase and polyphosphate glucokinase of *Propionibacterium shermanii*. En Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism. ASM Washington. pp. 225-232.

- Woolkalis, M.J. & Baumann, P.** 1981. Evolution of alkaline phosphatase in marine species of *Vibrio*. *J. Bacteriol.* **147**: 36-45.
- Yagil, E.** 1987. Transport of phosphate and phosphorylated compounds in *Escherichia coli*: Introduction. En *Phosphate metabolism and cellular regulation in microorganism*. ASM Washington. pp. 143-144.
- Yee, T. & Inouye, M.** 1982. Two dimensional DNA electrophoresis applied to the study of DNA methylation and the analysis of genome size in *Myxococcus xanthus*. *J. Mol. Biol.* **154**: 181-196.
- Yee, T. & Inouye, M.** 1984. Genome of *Myxococcus xanthus*. En *Myxobacteria: Development and cell interactions*. Ed. E. Rosenberg. Springer-Verlag, New York. pp. 69-90.
- Zahavi, A. & Ralt, D.** 1984. Social adaptations in myxobacteria. En *Myxobacteria: Development and cell interactions*. Ed. E. Rosenberg, Springer-Verlag. New York. pp. 216-221.
- Zusman, D.R.** 1984. Developmental program of *Myxococcus xanthus*. En *Myxobacteria: Developmental and cell interactions*. Ed. E. Rosenberg, Springer-Verlag, New York, pp. 185-213.