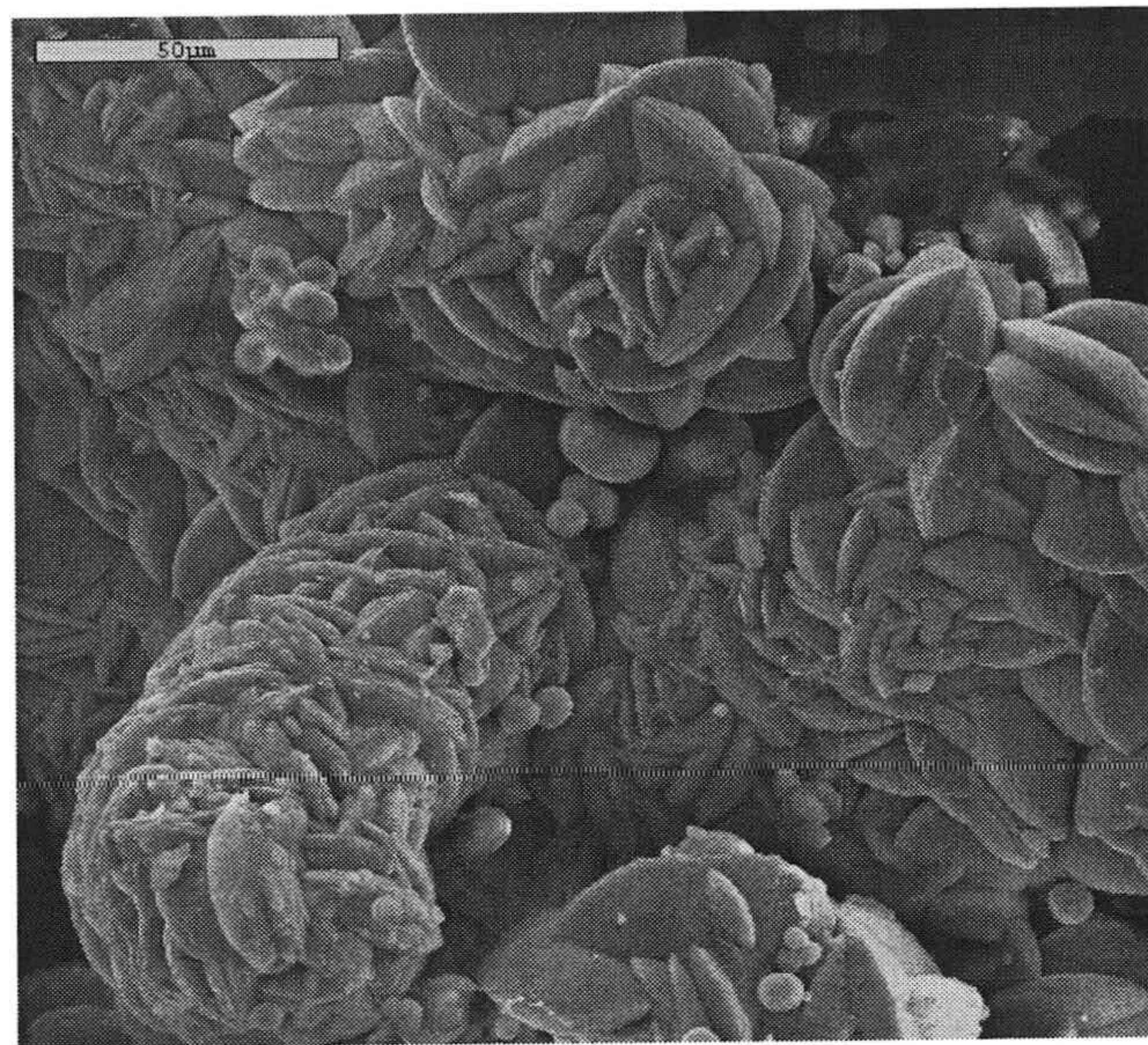


4/79



Universidad de Granada
Facultad de Ciencias
Departamento de Microbiología



UNIVERSIDAD DE GRANADA
Facultad de Ciencias
Fecha 1/4/02
ENTRADA NUM. 1290

UNIVERSIDAD DE GRANADA
22 MAR. 2002
COMISION DE DOCTORADO

Estudio fenotípico del mutante *DZF1Δoar* de *Myxococcus xanthus* y de su capacidad biomineralizadora.

M^a BELÉN FERNÁNDEZ LUQUE

TESIS DOCTORAL

Granada, 2002

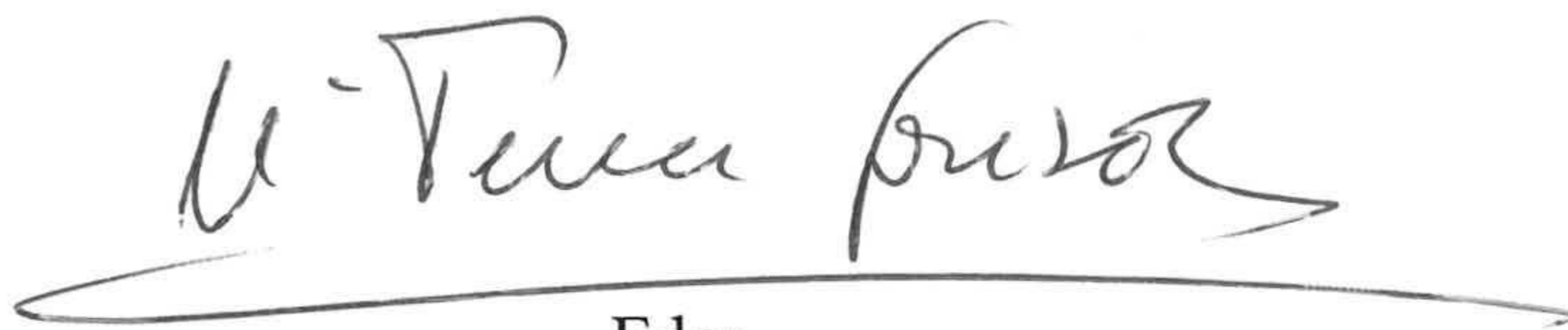
BIBLIOTECA UNIVERSITARIA
GRANADA
Nº Documento 613377656
Nº Copia 15497525

Departamento de Microbiología
Facultad de Ciencias
Universidad de Granada

ESTUDIO FENOTÍPICO DEL MUTANTE *DZF1Δoar* de *Myxococcus xanthus* Y DE SU CAPACIDAD BIOMINERALIZADORA

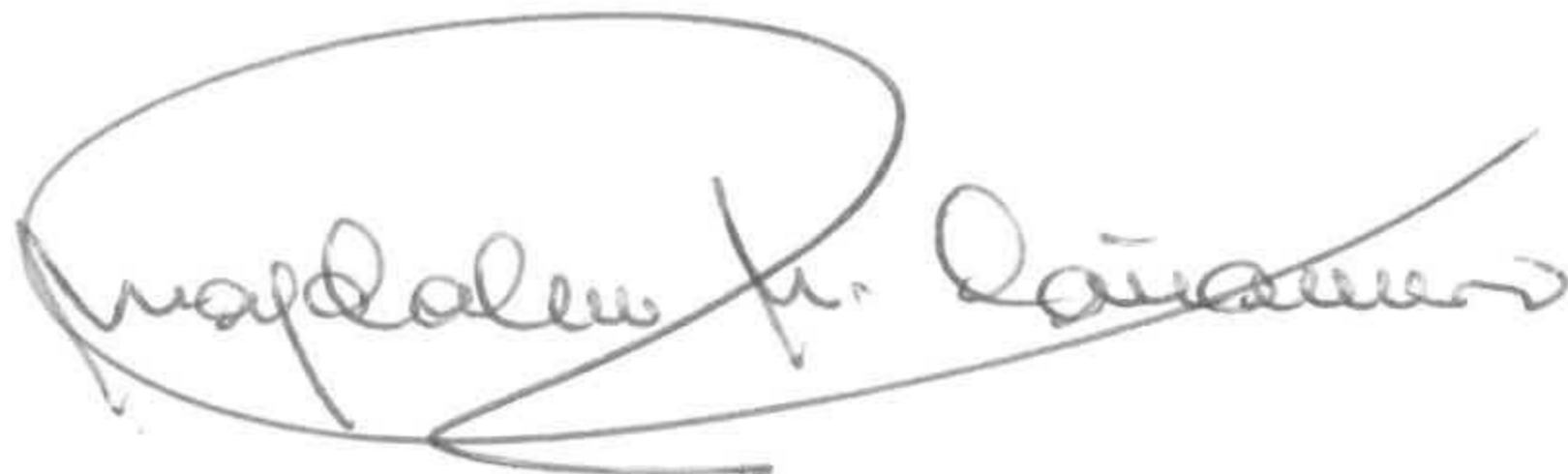
Memoria presentada por la licenciada en Biología Dña. M^a Belén Fernández Luque
para aspirar al grado de Doctor.

V^oB^o Los directores



Fdo:

Dra. M^a Teresa González Muñoz
Catedrática de Microbiología
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada



Fdo:

Dra. Magdalena Martínez Cañamero
Profesora Titular Interina de Microbiología.
Facultad de Ciencias Experimentales.
Universidad de Jaén.



Fdo:

Dr. José María Arias Peñalver
Catedrático de Microbiología.
Facultad de Ciencias.
Universidad de Granada.

La Doctoranda:



Fdo:

Dña. M^a Belén Fernández Luque

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Microbiología (Facultad de Ciencias) de la Universidad de Granada durante los años 1998-2002, dentro del Grupo de Investigación Mixobacterias.

Para realizar el trabajo de investigación la doctoranda disfrutó de una Beca- colaboración del Ministerio de Educación y Ciencia durante el curso 1995-96.

Dedico todo mi trabajo y esfuerzo a la memoria de mi padre. A él, por todo el cariño y ejemplo de superación que siempre supo darme.

AGRADECIMIENTOS

Al finalizar esta Tesis Doctoral, quiero expresar mi agradecimiento a las personas que, de un modo u otro, han contribuido a su realización:

A los directores de este trabajo, los Profesores M^a Teresa González Muñoz, Magdalena Martínez Cañamero y Jose M^a Arias Peñalver, por su incalculable ayuda, disponibilidad y orientación.

AL profesor Dr. Manuel Rodríguez Gallego, por sus valiosos comentarios científicos y su colaboración en la interpretación de datos cristalográficos.

A los profesores Carlos Rodríguez Navarro, Daniel Martín Ramos, y Giuseppe Cultrone por su gran ayuda y consejos.

A mi amiga y compañera Dr. Kaoutar Ben Chekroun, por su amistad, apoyo, y sobre todo por su enorme colaboración en la realización de este trabajo.

A todos los compañeros y profesores del Departamento, por su amistad y ánimo, especialmente a Cristina y a Pirri, por su gran ayuda con los "problemillas informáticos".

A mis compañeros de Puleva, que tanto me han animado y "soportado" en los días de más nervios.

A todos mis amigos, siempre conmigo.

A Eduardo, por su paciencia y comprensión. Por estar a mi lado en este largo recorrido. Gracias.

Por último (y no menos importante), quiero expresar mi más profundo agradecimiento a mi familia, a mis tíos y especialmente a mi madre, por su apoyo, paciencia y estímulo constante que han hecho posible este sueño.

A todos, Gracias.

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. MIXOBACTERIAS.....	3
1.1. ESTRUCTURA CELULAR.....	4
1.2. MOVILIDAD.....	8
1.3. NUTRICIÓN Y METABOLISMO.....	11
1.4. CICLOS DE VIDA.....	14
1.4.1. Factores implicados en el ciclo de desarrollo.....	22
2. OAR, UNA PROTEINA REQUERIDA PARA EL DESARROLLO DE <i>M. XANTHUS</i>	27
3. DISTRIBUCIÓN DE LAS MIXOBACTERIAS EN LA NATURALEZA.....	30
4. FORMACIÓN DE CRISTALES EN MIXOBACTERIAS.....	32
II. OBJETIVOS.....	37
III. MATERIAL Y MÉTODOS.....	43
1. MICROORGANISMOS.....	45
2. MEDIOS DE CULTIVO.....	45
2.1. MEDIOS DE CONSERVACIÓN, MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO BACTERIANO.....	45
2.2. MEDIOS DE FRUCTIFICACIÓN.....	48
2.3. MEDIOS DE GERMINACIÓN.....	49
2.4. MEDIOS PARA EL ESTUDIO DEL MOVIMIENTO.....	49
2.5. MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE MINERALES.....	50
3. TÉCNICAS GENERALES DE MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA.....	51
3.1. MODALIDADES DE CULTIVO.....	51
3.1.1. Cultivos en medios líquidos.....	51
3.1.2. Cultivos en medios sólidos.....	52
3.1.3. Cultivos en porta.....	52
3.2. MEDIDAS TURBIDOMÉTRICAS.....	52
3.3. MEDIDAS DE ph.....	53
3.4. MEDIDAS ESTROFOTOMÉTRICAS.....	53

3.5. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.....	53
3.6. TRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS.....	54
3.7. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	54
3.8. OBTENCIÓN DE CUERPOS FRUCTIFICANTES.....	54
3.9. RECUENTO DE ESPORAS.....	55
3.10. ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN.....	55
3.11. ESTUDIO DEL MOVIMIENTO.....	55
3.12. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE AGREGACIÓN Y COHESIÓN....	56
3.12.1. Estudio de agregación.....	56
3.12.2. Ensayo de cohesión.....	57
4. PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.....	57
5. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS.....	59
5.1. PREPARACIÓN DE GELES PAGE-SDS.....	59
5.2. CONDICIONES DE DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS.....	59
5.3. REVELADO DE GELES.....	60
6. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.....	61
6.1. EN MEDIOS LÍQUIDOS.....	61
6.2. EN MEDIOS SÓLIDOS.....	61
7. IDENTIFICACIÓN DE LOS CRISTALES.....	62
7.1. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA.....	62
7.1.1. Microscopía óptica.....	62
7.1.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB).....	62
7.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).....	63
7.2. ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X.....	65
<i>IV. RESULTADOS.....</i>	<i>67</i>
1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL MUTANTE DE <i>M. xanthus</i> DZF1 Δ oar.....	69
1.1. CURVAS DE CRECIMIENTO.....	69
1.2. ESTUDIO DEL MOVIMIENTO.....	71
1.2.1. Estudio del movimiento de los enjambres en placa.....	71
1.1.2. Estudio del movimiento de los enjambres en porta.....	72
1.3. PRODUCCIÓN DE CUERPOS FRUCTIFICANTES	73

1.4. ESTUDIO DE LA ESPORULACIÓN.....	75
1.4.1. Estudio de las esporas a microscopía electrónica.....	76
1.4.2. Estudio de las esporas mediante PAGE-SDS.....	78
1.5. ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN.....	80
1.6. ESTUDIO DE LA AGREGACIÓN.....	82
1.6.1. Observación de la agregación al microscopio óptico.....	82
1.6.2. Cuantificación de la agregación mediante medida del peso seco.....	84
1.6.3. Cuantificación de la agregación mediante medida de la proteína.....	86
1.7. MEDIDA DE LA COHESIÓN (ENSAYO CON ROJO-CONGO).....	88
1.8. ESTUDIO DE LAS FIBRILLAS.....	89
1.9. ESTUDIO DE DIFUSIÓN DE SEÑAL	91
1.10. ESTUDIOS DE COMPLEMENTACIÓN.....	92
2. PRODUCCIÓN DE MINERALES POR LAS CEPAS DE <i>M. xanthus</i> DZF1 Δ oar y 422.....	95
2.1. PRODUCCIÓN DE CARBONATOS EN MEDIO M-2.....	97
2.2. PRODUCCIÓN DE CARBONATOS Y OTROS MINERALES EN MEDIO M-3.....	101
2.3. PRODUCCIÓN DE MINERALES EN MEDIO M-9.....	106
2.4. PRODUCCIÓN DE CARBONATOS EN MEDIO CC.....	108
2.5. PRODUCCIÓN DE MINERALES EN MEDIOS CON DIFERENTES CATIONES.....	112
2.5.1. Medio CMFe.....	112
2.5.2. Medio CMMg.....	117
2.5.3. Medio CMMn.....	120
2.5.4. Medio CMCo.....	120
2.5.5. Medio CMBa.....	124
2.6. PRODUCCIÓN DE FOSFATOS EN MEDIO A-4.....	124
 V. DISCUSIÓN	 131
 VI. CONCLUSIONES.....	 167
 VII. BIBLIOGRAFÍA.....	 173

I. INTRODUCCIÓN

1. MIXOBACTERIAS

Las mixobacterias son bacilos Gram-negativos, unicelulares, con los extremos afilados o redondeados y que abundan en suelos y materia orgánica en descomposición. Presentan tres características sobresalientes que las diferencian del resto de las bacterias Gram-negativas:

Son capaces de hidrolizar una amplia variedad de macromoléculas insolubles, lo que les confiere un especial interés desde el punto de vista de su papel en la naturaleza.

Los bacilos vegetativos se mueven por deslizamiento sobre la superficie de sustratos sólidos.

Son microorganismos de hábitos sociales. Presentan dos ciclos alternantes, uno de crecimiento vegetativo y otro de desarrollo. El ciclo vegetativo es simple. Las células se multiplican por sucesivas divisiones binarias hasta que se produzca un agotamiento de nutrientes o acumulación de productos tóxicos. El segundo ciclo, de desarrollo, se da en las condiciones siguientes: una falta de nutrientes, presencia de un sustrato sólido y una alta densidad celular.

El movimiento por deslizamiento es inusual y lo comparten con algunas otras bacterias que, coloquialmente, son referidas como bacterias deslizantes. La tercera característica es única entre los procariotas, y sin duda, está relacionada con su alto potencial morfogenético y su comportamiento social. Estas propiedades están relacionadas entre sí y pueden justificarse por el comportamiento social y en la ecología de estos microorganismos (Reichenbach, 1984).

La taxonomía de las mixobacterias está basada exclusivamente en caracteres morfológicos, como son la forma de las células vegetativas y de las mixósporas, la estructura de los enjambres y la morfología de los cuerpos fructificantes.

Por tanto, las mixobacterias han sido clasificadas tradicionalmente como un solo orden (Myxobacterales) que junto con el orden Cytophagales constituyen las bacterias

INTRODUCCIÓN

deslizantes. En 1992, la posición filogenética de las mixobacterias, se estableció en base a las secuencias del ARN ribosómico 16S (Oyaizu y Woese, 1985; Shimkets y Woese, 1992).

Como puede verse en la figura 1, las mixobacterias están asignadas a una rama del grupo *Proteobacteria* (bacterias purpúreas), la rama delta, junto con *Bdellovibrio* y a las bacterias reductoras del azufre y sulfatos como parientes más próximos, no existiendo relación alguna con otras bacterias deslizantes (Shimkets, 1993).

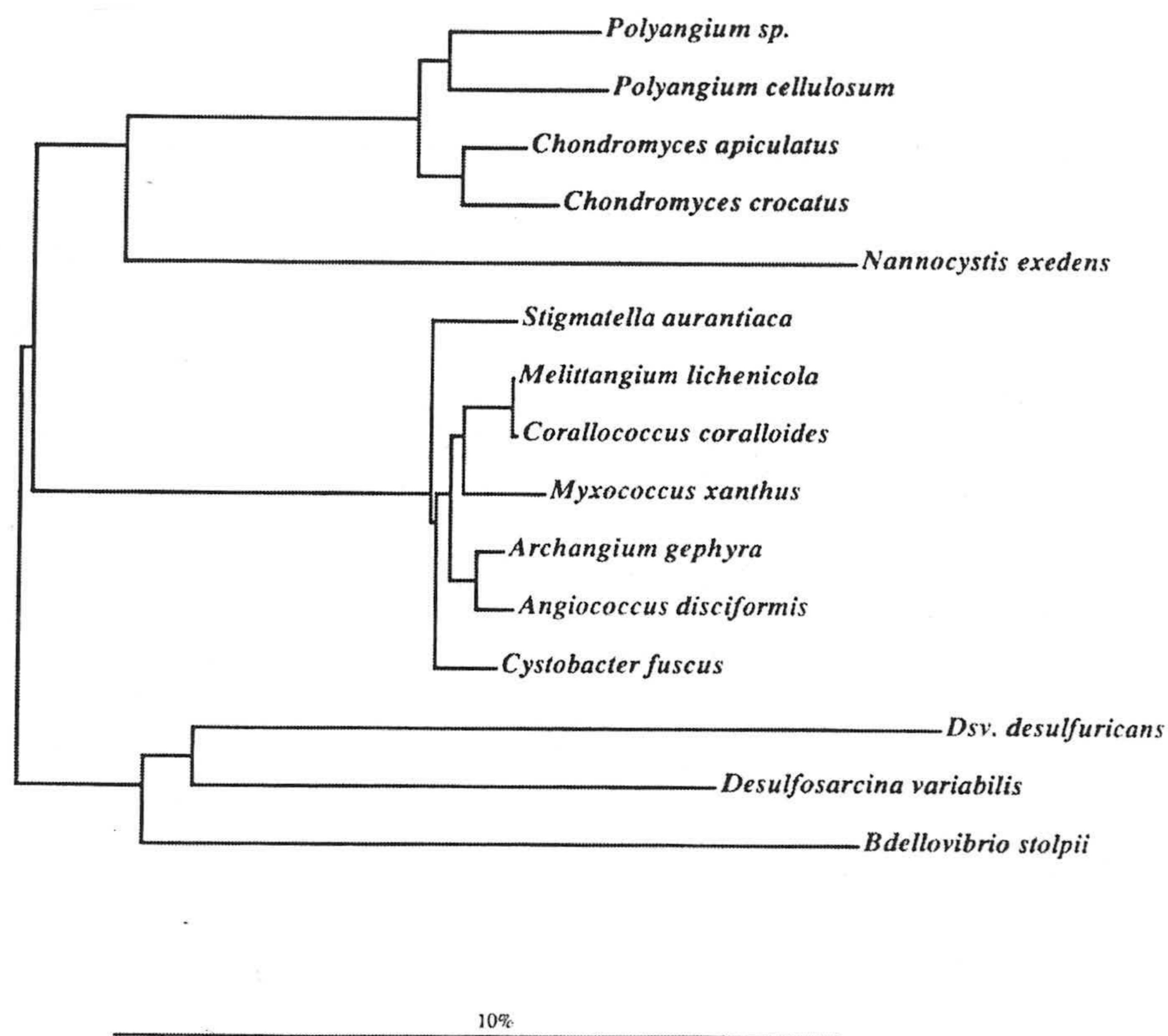


Figura 1. Árbol filogenético de las mixobacterias, establecido en base a estudios de ARN. 16S. Dsv., *Desulfovibrio*. Shimkets, L. and C. R. Woese 1992.

1.1. ESTRUCTURA CELULAR

Las células de las mixobacterias son bacilos que presentan una morfología de aspecto cilíndrico, con extremos redondeados o más frecuentemente afilados que se

multiplican por fisión binaria transversal. Las células se encuentran embebidas en un mucílago más o menos tenaz, constituyendo una colonia plana característica que recibe el nombre de "enjambre". En *M. xanthus*, el hidrolizado del polisacárido extracelular está formado mayoritariamente a base de glucosa, galactosa, manosa y ramnosa (Sutherland, 1979). A este mucílago se le han atribuido varias funciones, ninguna de las cuales ha sido demostrada claramente: facilitar la adhesión de unas células a otras; facilitar la adhesión a sustratos sólidos; suministrar protección frente a toxinas y bacteriófagos, y, por último, intervenir en el movimiento por deslizamiento. El mucílago constituye la matriz en la que se encuentran inmersas las mixósporas en el cuerpo fructificante (Dworkin, 1972).

Como el resto de las bacterias Gram negativas, las mixobacterias presentan una membrana externa consistente en lipopolisacárido, proteínas y fosfolípidos. Las mayores diferencias entre el lipopolisacárido de mixobacterias y el de las bacterias entéricas son la ausencia de heptosa, la presencia de ácidos grasos ramificados de número impar de átomos de carbono y, en algunas especies, la presencia de 3-O-metil-D-xilosa (Rosenfelder *et al.*, 1974). Los monosacáridos varían de unas cepas a otras e incluyen ribosa, manosa, galactosa, ramnosa, glucosa, glucosamina y galactosamina (Sutherland & Smith, 1973). La membrana externa es menos densa que la citoplasmática debido a su alto contenido en fosfolípidos, constituyendo la fosfatidiletanolamina el componente mayoritario con un 64% del total de fosfolípidos (Orndorff & Dworkin, 1980).

El periplasma de *M. xanthus* contiene varias proteínas con actividad enzimática: desoxirribonucleasas, fosfatasas, entre otras. De otra parte, se han descrito algunas proteínas implicadas en su movilidad. El choque osmótico libera dieciocho proteínas mayoritarias y provoca una inmovilidad transitoria. Sin embargo, no se ha examinado si estas proteínas son verdaderamente periplásmicas o, por el contrario, se encuentran en tránsito a la membrana externa (Burchard, 1974).

El peptidoglucano es cualitativamente similar al de *Escherichia coli*, pero se encuentra en cantidad relativamente baja, representando aproximadamente el 0,6% del

peso seco de la célula (White *et al.*, 1968). A diferencia del peptidoglucano de otras bacterias Gram negativas, no se encuentra formando una capa continua sino que se presenta como "paquetes" conectados por un material sensible a la tripsina y lauril sulfato sódico, formado por polímeros de glicocola y serina (White *et al.*, 1968). El bajo contenido en peptidoglucano y su especial disposición puede estar en relación con la flexibilidad de estas células y con la capacidad de conversión en formas esféricas o mixósporas (Kaiser *et al.*, 1979).

El peptidoglucano de *M. xanthus* se compone de ácido glutámico, ácido diaminopimérico, alanina, glucosamina y ácido murámico en una relación molar de 1:1:1,7:0,75:0,75. A estos compuestos hay que añadir cantidades sustanciales de glicina, serina y glucosa (White *et al.*, 1968)

En cuanto a la membrana plasmática, ésta se ajusta al modelo general, aunque los ácidos grasos de sus fosfolípidos, frecuentemente insaturados, presentan ramificaciones e hidroxilaciones en α o β (Schröder & Reichenbach, 1970; Ware & Dworkin, 1973; Fautz *et al.*, 1979). El fosfolípido mayoritario es la fosfatidiletanolamina (60% del total). El perfil de proteínas es muy diferente al de la membrana externa (Orndorff & Dworkin, 1980).

Se ha detectado la presencia de pigmentos de tipo carotenoide en la membrana citoplasmática de muchas mixobacterias. Estos compuestos son responsables, en parte, de la coloración de las colonias y de los cuerpos fructificantes, y parecen tener una función fotoprotectora (Kleining *et al.*, 1970; Reichenbach & Kleining, 1971; Kleining, 1972; Arias & Montoya, 1982).

Las mixobacterias presentan apéndices extracelulares de tipo fimbrias-pili de localización polar, a las que se atribuye un papel importante en la adhesión de las células en la comunidad, así como en el movimiento coordinado de estas bacterias (MacRae & McCurdy, 1975; Dobson *et al.*, 1979; Kaiser, 1979). Se han obtenido evidencias claras del papel de las fimbrias en el comportamiento social, ya que una desfimbriación mecánica no afecta al movimiento individual de las células (Rosenbluh & Eisenbach, 1992).

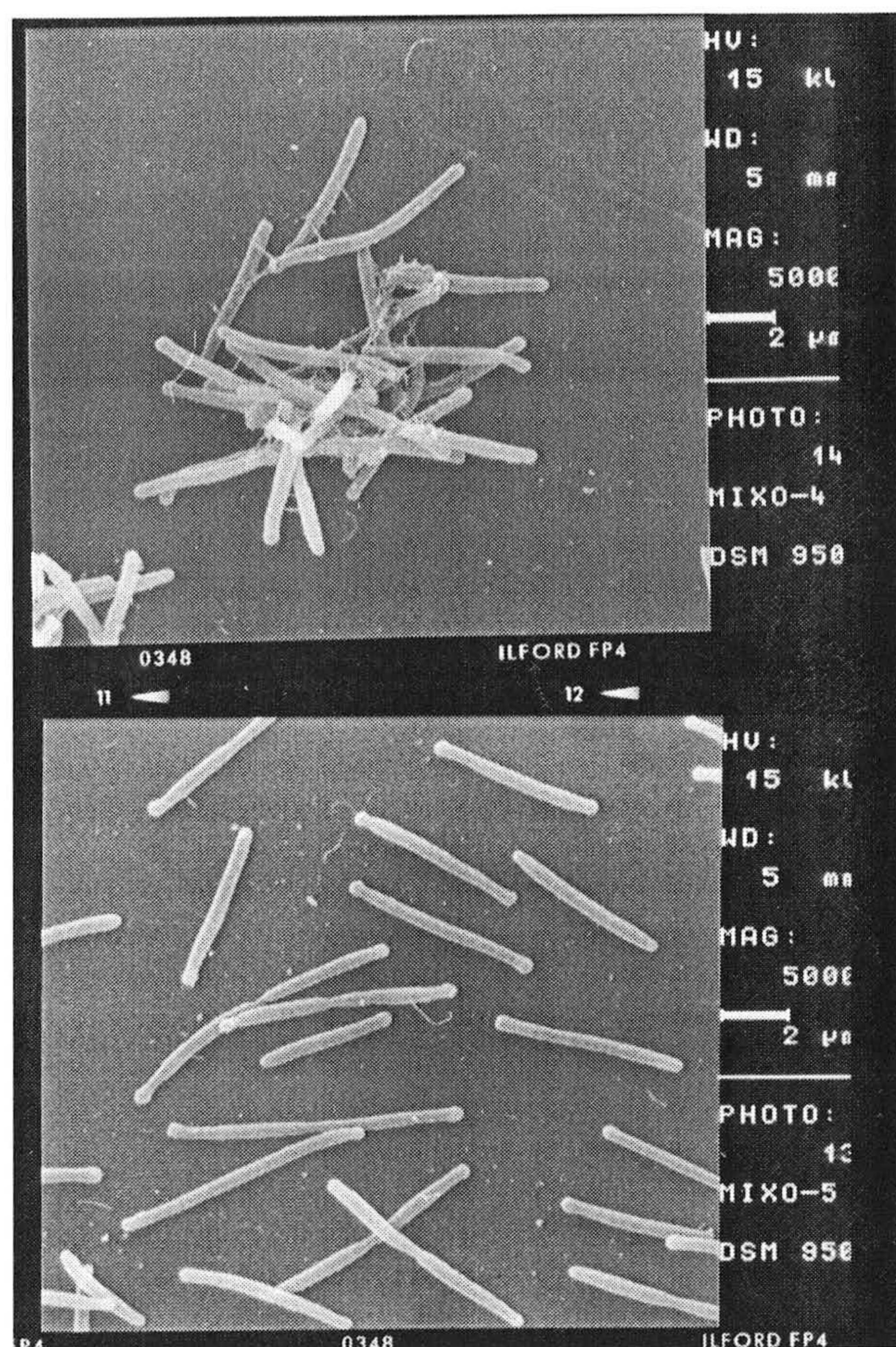


Figura 2: Células vegetativas de M. xanthus observadas al microscopio electrónico de barrido. Imagen de arriba muestra las células con fimbrias.

A pesar de ello, su papel no está del todo claro. Otros autores sugieren que las fimbrias actúan como sensores táctiles que indican la proximidad de otras células y que sería la señal para que las células sintetizen o exporten unos filamentos extracelulares (Arnold & Shimkets, 1988a y b), referidos como fibrillas, que hacen que las células permanezcan unidas durante su movimiento social (Behlamder & Dworkin, 1991). Recientemente se las ha vuelto a relacionar con el movimiento (Wall & Kaiser, 1999).

Las fibrillas de naturaleza glucoproteica están distribuidas alrededor de la célula. Su tamaño, de más de 50 nm de longitud por 15 a 30 nm de diámetro, indica que

son mucho más largas y gruesas que las fimbrias. Estas fibrillas conectan unas células con otras y representan las fuerzas cohesivas que mantienen a las células unidas en el enjambre. Su formación es dependiente de la densidad celular (Arnold & Shimkets, 1988b).

Las mixobacterias presentan uno de los genomios cromosómicos más grandes de los existentes en bacterias (Shimkets, 1990). En *M. xanthus* se ha demostrado que el genomio posee un tamaño de 9554 Kpb (Chen *et al.*, 1990). Este exceso de ADN podría tener que ver con funciones génicas relacionadas con su complejidad morfogénica y de desarrollo.

Este tamaño no está relacionado con la formación de esporas, ya que *B. subtilis*, una bacteria que forma endosporas, tiene un genomio similar al de *E. coli*, y presenta un genomio muy por debajo del de las mixobacterias.

Otra característica llamativa del genomio de las mixobacterias es su alto contenido en G+C que oscila entre 67-71 moles por ciento. Esta elevada porción de bases G+C se cree ha sido desarrollada por las mixobacterias a lo largo de la evolución para protegerse de la luz ultravioleta solar, a la que, por vivir normalmente en la superficie de los suelos, están muy expuestas (Yee & Inouye, 1984).

1.2. MOVILIDAD

Las mixobacterias se mueven por deslizamiento sobre superficies sólidas o en la interfase aire-agua. Este movimiento deslizante es lento (1 μ m/min) comparado con la velocidad de las bacterias flageladas (60 μ m/min).

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. Se trata de ondas oscilantes y rítmicas de células que discurren a través de las capas celulares dispuestas sobre una superficie sólida.

En *M. xanthus*, cada onda está compuesta de una cresta de varias capas de células con unas pocas células entre crestas. Shimkets y Kaiser (1982b) definieron las ondas como acumulaciones con forma rígida de células orientadas moviéndose en una forma sincrónica y pulsante, y han demostrado claramente que el peptidoglucano exógeno o una combinación de sus subunidades induce ondulación.

En *M. xanthus*, el deslizamiento es inducido por células bacterianas, peptidoglucano, y algunos componentes del peptidoglucano: N-acetilglucosamina, ácido N-acetil murámico, meso-diaminopimélico y D-alanina (Shimkets & Kaiser, 1982a).

El mecanismo por el cual las bacterias deslizantes se mueven sobre superficies sólidas ha sido discutido durante muchos años y no aclarado. Existen varias hipótesis, como son la expulsión direccional de una sustancia mucosa (Jahn, 1924; Henrichsen, 1972; Ridgeway & Laewin, 1973); elementos tubulares contráctiles existentes en el citoplasma (Schmidt-Lorenz & Kühlwein, 1968; Bisalputra *et al.*, 1975; Mac Rae & McCurdy, 1975, 1976; Burchard *et al.*, 1977); ondas de contracción a lo largo de la superficie celular (Doetsch & Hageage, 1968; Halfen & Castenholz, 1971; Henrichsen, 1972; Halfen, 1973; Humphrey *et al.*, 1979); fimbriación polar (MacRae & McCurdy, 1976); y excreción de un material surfactante (Dworkin *et al.*, 1983; Keller *et al.*, 1983).

El estudio de diferentes mutantes del deslizamiento ha evidenciado la existencia de dos sistemas de movilidad: el sistema A (de aventurero), que controla el deslizamiento de las células individuales, y el sistema S (de social), que controla el movimiento de grupos coordinados de células conocidos como enjambres (ver figura 2). Las células A^+S^+ se deslizan individualmente y/o en grupos. Las células A^-S^+ se mueven en densos enjambres pero nunca individualmente; estos mutantes no pueden realizar el fenómeno de ondulación, aunque la mayoría de ellos sí forman cuerpos fructificantes (Rodríguez & Spormann, 1999). Y finalmente, las células A^+S^- se mueven tan sólo de manera individual; aproximadamente 2/3 de estos mutantes no fructifican ni ondulan (Shimkets & Kaiser, 1982a; Yang *et al.*, 1998).

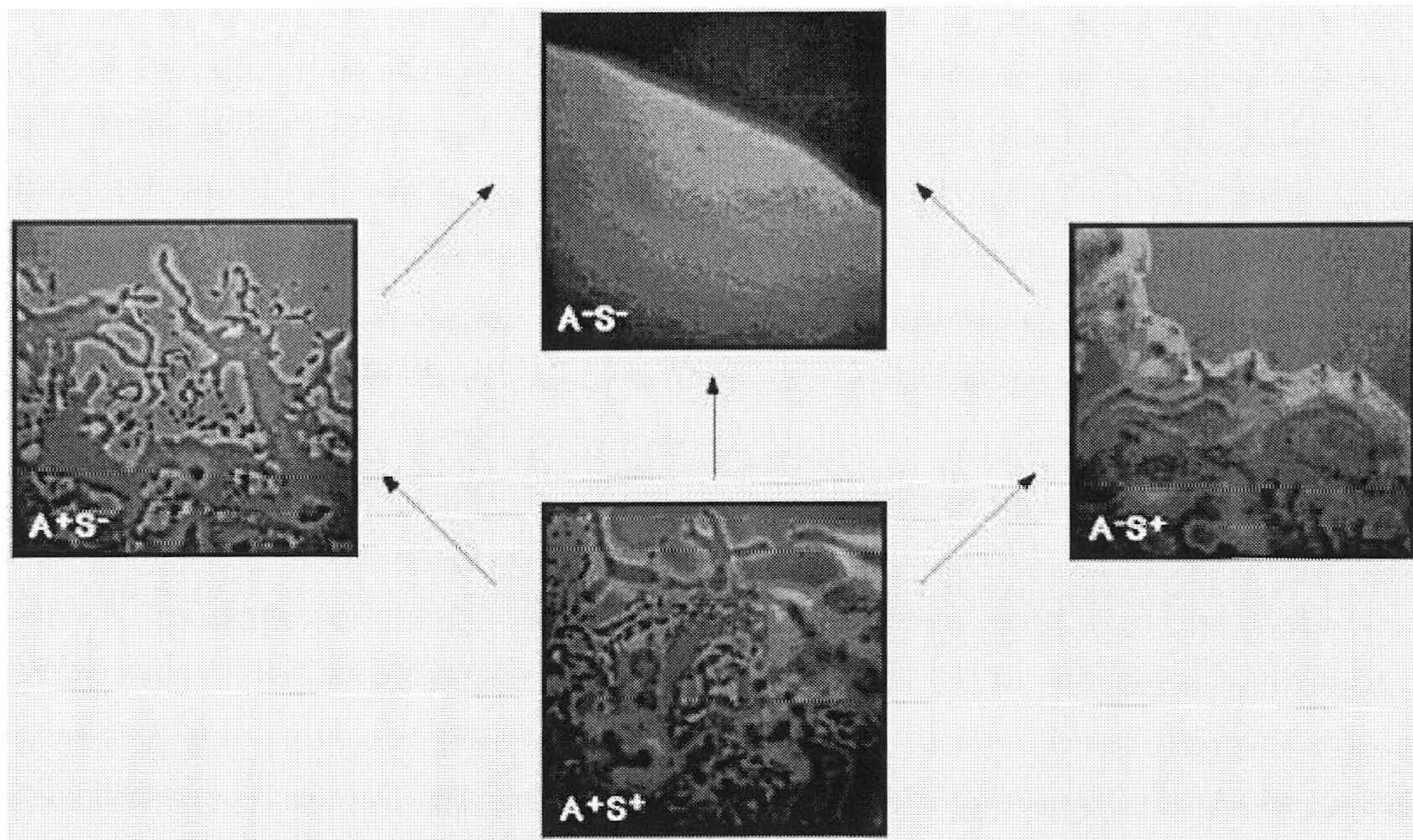


Figura 3: Diferentes fenotipos respecto al movimiento en *M. xanthus*. Cepa salvaje A^+S^+ y mutantes en movimiento social (S^-) y aventurero (A^-). Tomado de Hodgkin and Kaiser, 1979.

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 capacidad de las células para adherirse puede tener un profundo efecto sobre el comportamiento celular (Kaiser, 1979). De hecho, los pili tipo IV, que parecen estar involucrados en el movimiento social de *M. xanthus*, son los que median el movimiento de bacterias sobre superficies sin mediación de flagelos, produciendo el movimiento “twitching” en organismos como *Pseudomonas aeruginosa* o *Neisseria gonorrhoeae* (Wall & Kaiser, 1999). Además, el gen *sgl* ha mostrado codificar un homólogo a la secretina necesaria para la biogénesis de este tipo de pili (Wall et al, 1999).

Además de los loci de los sistemas A y S, se ha identificado otro que bloquea completamente la motilidad cuando muta (Stephens & Kaiser, 1987). Este locus se ha denominado *mgl* y contiene dos marcos abiertos de lectura, *mglA* y *mglB*. (Stephens et al., 1989). La mayoría de las mutaciones que bloquean la movilidad se localizan en el

gen *mglA*. Este gen codifica para una proteína de 22 kD que muestra una gran similitud a proteínas de unión a GTP. El gen *mglB*, por su parte, codifica para una proteína similar a la calmodulina (Hartzell & Kaiser 1991 a y b).

Otros genes involucrados en el movimiento de *M. xanthus* son los llamados *frz* (de frizzy) que controlan el cambio de sentido del movimiento de las células (Blackhart & Zusman, 1985 a y b). Los mutantes *frz* son móviles, pero han perdido el control del movimiento y cuando las células se agregan durante el ciclo de desarrollo no originan cuerpos fructificantes sino filamentos ziz-zagueantes. Hay 6 genes *frz*, denominados *frzA, B, C, D, E, F* y *G*, cinco de los cuales muestran gran homología con los genes de quimiotaxis en bacterias entéricas. El estudio de la frecuencia en el cambio de dirección ha sido estudiado también en otros mutantes (Spormann & Kaiser, 1999).

Por otra parte, se ha observado que las células de *S. aurantiaca* no aglutinan con células de *M. xanthus*, lo que sugiere algún tipo de especificidad en la cohesión celular (Qualls & White, 1982).

1.3. NUTRICION Y METABOLISMO

Es conocido desde hace mucho tiempo que las mixobacterias degradan y se alimentan de materia orgánica insoluble presente en el medio ambiente, como son proteínas desnaturalizadas, fragmentos de células y microorganismos vivos o muertos, tales como actinomicetos, cianobacterias, levaduras y hongos filamentosos; incluso se ha informado de la lisis de nematodos por algunas especies de *Sorangium* (Katznelson *et al.*, 1964). Esta actividad lítica es debida a la producción de una amplia variedad de enzimas capaces de romper las paredes celulares (Rosenberg & Varon, 1984).

Las enzimas líticas de la pared celular encontradas en mixobacterias pueden dividirse en cuatro grupos:

- a.- Muramidases, que escinden la unión 1-4 entre el ácido murámico y la glucosamina (Harcke *et al.*, 1971, 1972).

INTRODUCCIÓN

- b.- Glucosaminidasas, que escinden la unión 1-4 entre la glucosa y el ácido murámico (Hart & Zahler, 1966; Sudo & Dworkin, 1972; Haska, 1974).
- c.- Amidadasas, que rompen las uniones amida entre el ácido murámico y el residuo alanil del extremo N-terminal de las cadenas peptídicas (Katz & Strominger, 1967; Tsai *et al.*, 1965; Sudo & Dworkin, 1972).
- d.- Peptidasas, que hidrolizan las uniones peptídicas en los polipéptidos de unión (Tipper *et al.*, 1967).

Los tres primeros tipos rompen enlaces altamente específicos de la pared celular, mientras que las peptidasas pueden actuar también sobre otros polipéptidos distintos del peptidoglucano.

Las enzimas proteolíticas juegan un papel muy importante en la bacteriolisis, además de ser responsables del crecimiento de las mixobacterias a expensas de muy diversos tipos de proteínas. Son numerosas las enzimas de este tipo que han sido caracterizadas y en algunos casos purificadas.

La mayoría de las mixobacterias, con excepción de las celulolíticas, usan aminoácidos como fuente de carbono, nitrógeno y energía, y poseen vías metabólicas para oxidar dichos compuestos.

De otra parte, ha sido detectada la presencia de fosfatasas ácidas y alcalinas, extracelulares y periplásmicas, en *M. xanthus* (Nicaud *et al.*, 1984) y en *M. coralloides* D (González *et al.*, 1987), así como en otras mixobacterias (Muñoz *et al.*, 1989). En *M. coralloides* D la producción de fosfatasa ácida y alcalina es constitutiva, independientemente de la presencia de fosfato en el medio (González *et al.*, 1989).

Por lo que respecta a la hidrólisis de ácidos nucleicos, la utilización del ADN por mixobacterias fue ya descrita por Finck en 1950. Posteriormente Noren (1955) detectó actividad desoxirribonucleasa y ribonucleásica en varias mixobacterias, e incluso observó crecimiento de las mismas en medios suplementados con ADN y ARN como únicas fuentes de carbono y nitrógeno; esto último, sin embargo, fue negado por Loebeck y Klein (1956). Estudios más recientes (Mayer & Reichenbach, 1978) indican

que si bien una gran variedad de mixobacterias sintetizan abundantes nucleasas de restricción, la localización de las mismas es en el espacio periplásmico y, por tanto, no se segregan.

Otra actividad enzimática típica de las mixobacterias es la lipásica. Ruiz-Rodríguez (1980) encontró dos sistemas enzimáticos con actividad lipásica en *M. xanthus*, uno de ellos extracelular y otro unido a estructuras celulares.

Por último, las mixobacterias presentan capacidad hidrolítica frente a muy diversos tipos de polisacáridos que, aunque muy mal estudiada, es muy amplia, ya que abarca desde celulasas a amilasas y enzimas que degradan polisacáridos complejos presentes en la pared celular de las bacterias, levaduras y hongos filamentosos (Solntseva, 1940 y 1941; Beebe, 1943; Noren, 1955; McCurdy, 1969; Irschik & Reichenbach, 1985; Reichenbach, 1986).

Aparte de las enzimas citadas, también se ha atribuido un papel en la lisis de otros microorganismos a los antibióticos y bacteriocinas producidas por las mixobacterias, en el sentido de que su acción podría ser un paso previo a la lisis por las enzimas extracelulares. Son numerosas las mixobacterias productoras de antibióticos, en contraste con las productoras de bacteriocinas. Los antibióticos producidos por mixobacterias son, en general, sustancias de bajo peso molecular, estructura química compleja, mecanismo de acción variado y un amplio espectro antimicrobiano (Reichenbach, 1986). Las bacteriocinas, sin embargo, sólo se han descrito en cuatro especies de mixobacterias: *M. xanthus* (McCurdy & MacRae, 1974), *M. fulvus* (Hirsch, 1977), *M. virescens* (Brown *et al.*, 1976) y *M. coralloides* D (Muñoz *et al.*, 1984), si bien posiblemente sea un fenómeno general.

Al parecer los azúcares no son utilizados por las especies bacteriolíticas, aunque sorprendentemente utilizan polisacáridos, incluido el almidón. En *M. coralloides* D se ha encontrado la producción de una α -amilasa extracelular inducible por almidón (Fárez-Vidal *et al.*, 1992). La máxima actividad se produce durante el crecimiento vegetativo, reduciéndose progresivamente durante el ciclo de desarrollo hasta desaparecer, coincidiendo con la formación de las mixósporas; en la germinación de las

mixósporas se observa un incremento progresivo de dicha actividad (Fárez-Vidal *et al.*, 1990).

En relación con las enzimas de la vía glucolítica, que en estas bacterias parece funcionar en sentido inverso, se ha detectado en *M. xanthus* la presencia de una hexoquinasa dependiente de pirofosfato y no de ATP (Shimkets, 1984). Se han detectado en *M. xanthus* todas las enzimas necesarias para el ciclo de los ácidos tricarbónicos, así como los del ciclo del glioxalato, observándose que este último incrementa su actividad durante la esporulación (Shimkets, 1984).

Finalmente, y a pesar de que en *M. xanthus* los aminoácidos sirven como fuente de carbono, nitrógeno y energía, se conoce muy poco sobre el metabolismo intermediario de estos compuestos. La familia del aspártico y la aspartato-quinasa parecen jugar un papel en el control del desarrollo. La metionina requiere para su síntesis una fuente exógena de vitamina B₁₂ (Bretscher & Kaiser, 1978). Los aminoácidos ramificados (leucina, isoleucina y valina) deben ser aportados como nutrientes (Umbager, 1978); mientras que los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano) pueden ser sintetizados por la propia bacteria (Bretscher & Kaiser, 1978). El estudio de las numerosas actividades transaminasas y deshidrogenasas ligadas al metabolismo de los aminoácidos no ha pasado, en la mayoría de los casos, de su detección en extractos celulares (Shimkets, 1984).

1.4. CICLOS DE VIDA

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 de cientos de miles de células, 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.

INTRODUCCIÓN

Las mixobacterias pueden presentar dos ciclos de vida muy diferentes entre sí: un ciclo de desarrollo o fructificación y un ciclo vegetativo (fig. 3). El primero conduce a la aparición de los cuerpos fructificantes y mixósporas. 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). El segundo, es muy simple; tras sucesivas divisiones binarias, en medios sólidos, se produce una expansión del enjambre, mientras que en medios líquidos y, supuesto un crecimiento disperso, conduce a un aumento de la densidad celular del cultivo. Este crecimiento vegetativo se mantiene siempre que el medio contenga abundancia de nutrientes.

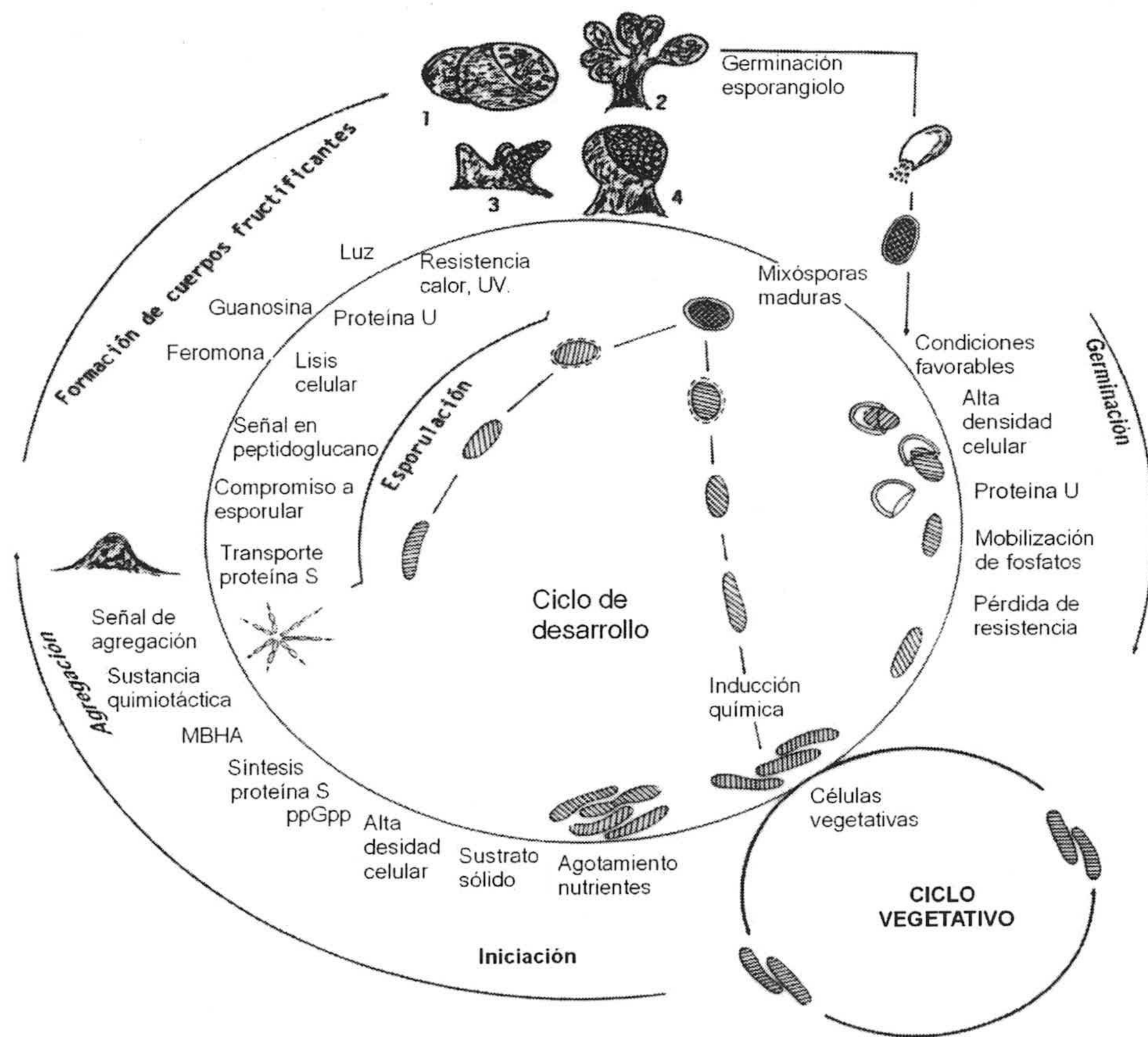


Figura 4: Ciclo de vida de la mixobacterias. 1-*Cystobacter*, 2-*Stigmatella*, 3-*M. coralloides* y 4- *M. xanthus*. (Arias y Montoya, 1990).

INTRODUCCIÓN

Cuando las mixobacterias crecen de manera dispersa en medios líquidos, muestran una intensa autólisis. Así, en estos cultivos, tras la fase de crecimiento exponencial, entran en una corta fase estacionaria que se continúa con una lisis espontánea que prácticamente lleva a la muerte de todas las células del cultivo. Este fenómeno ha sido descrito en *M. xanthus* (Mason & Powelson, 1958), *M. virescens* (Haskä & Stahl, 1971) y *M. coralloides* D (Fernández-Vivas *et al.*, 1983). Es en esta última mixobacteria en donde se han llevado a cabo la mayoría de los estudios sobre autólisis vegetativa.

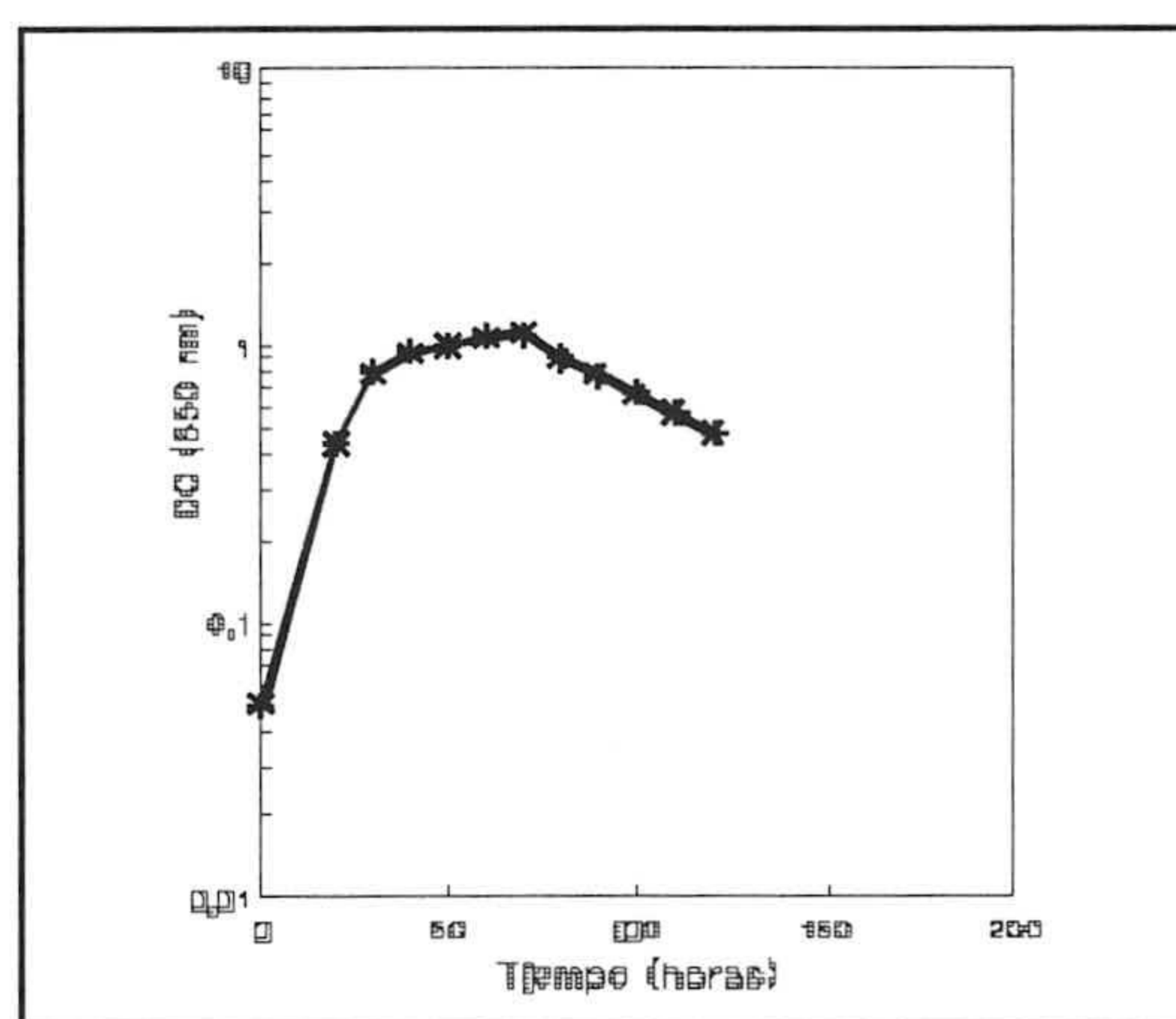


Figura 5: Curva de crecimiento de M. xanthus en medio de cultivo CT.

La composición del medio de cultivo influye poderosamente sobre la autólisis; en general, todos los factores que permiten alcanzar más rápidamente altas densidades celulares, hacen que los cultivos entren más tempranamente en fase de autólisis (Arias & Montoya, 1982). Por el contrario, aquellos que influyen negativamente sobre el crecimiento, retrasan el comienzo de la autólisis (Benhamú *et al.*, 1979).

Estos hechos fueron explicados en base a un posible fenómeno de cooperatividad celular; para que se disparara la autólisis era necesario que los cultivos superaran un nivel crítico de densidad celular y el proceso era más rápido cuanto mayor era la concentración de células alcanzada. Para explicar el mecanismo por el que se llevaría a cabo dicho fenómeno de cooperatividad celular, se encontraron evidencias de que la autólisis es disparada por un factor activador que es liberado al medio durante la

fase de crecimiento exponencial y que cuando alcanza una concentración crítica activa las enzimas autolíticas (Arias *et al.*, 1983). De otra parte, el fosfato inorgánico tiene una marcada influencia sobre la autólisis; así, concentraciones de ortofosfato de 40 mM inhiben totalmente el proceso (Fernández- Vivas *et al.*, 1983).

En cuanto al ciclo de desarrollo, éste viene condicionado por la existencia de unas señales intracelulares que detectarían el déficit nutricional y causarían la secreción de una/s señal/es intracelular/es que sincronizarían la respuesta de la población como un todo.

La privación parcial de los aminoácidos necesarios para el crecimiento vegetativo (alanina, valina, leucina e isoleucina), induce rápidamente el ciclo de desarrollo (Manoil y Kaiser, 1980b; Bretscher & Kaiser, 1978). De igual forma, la carencia de otros aminoácidos no esenciales, de una fuente de carbono y energía (piruvato) y de fosfatos inorgánicos, también disparan dicho proceso (Manoil & Kaiser, 1980b).

Muchos aminoácidos de la familia del aspártico ejercen un fuerte control sobre la iniciación del ciclo de desarrollo; así, los aminoácidos que modifican la actividad de la aspartatoquinasa, *in vitro*, afectan a la formación de los cuerpos fructificantes. De este modo, los aminoácidos que producen una estimulación de la aspartatoquinasa inhiben el desarrollo de células con carencia nutricional, entre ellos podemos citar la metionina y la isoleucina (Filer *et al.*, 1973; Shabtai *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1973; Campos & Zusman, 1975). Por otro lado los inhibidores de la actividad aspartatoquinasa, tales como treonina y mesodiaminopimélico, inducen el desarrollo de células sin carencia nutricional (Shabtai *et al.*, 1975; Rosenberg *et al.*, 1973; Campos & Zusman, 1975).

La naturaleza de las señales implicadas en la detección de los niveles de aminoácidos e iniciación del desarrollo permanece sin ser aclarada, habiéndose relacionado con la respuesta estricta y sus mediadores (Manoil & Kaiser, 1980a y 1980b), con la familia de aminoácidos del aspártico y la aspartatoquinasa, (Rosenberg

et al., 1973) y con compuestos derivados de la adenina y de nucleótidos cíclicos (Campos & Zusman, 1975; Manoil & Kaiser, 1980c; Passador & McCurdy, 1985).

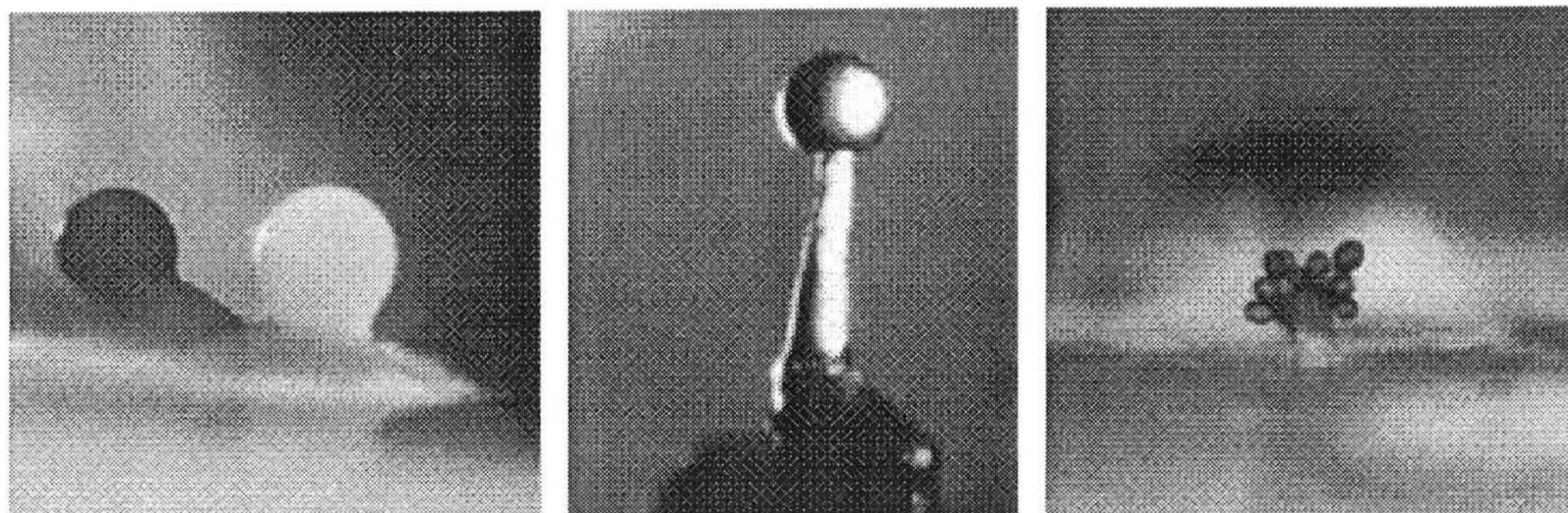
Para la agregación, además de la iniciación, son requeridos otros factores: la presencia de una superficie sólida, una densidad celular alta y, en algunas especies, la luz.

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).

Por otra parte se ha descrito una hemoaglutinina que puede jugar un papel importante en el proceso de agregación. Probablemente intervenga también en la esporulación, ya que algunos mutantes defectivos en este proceso no producen hemoaglutinina (la Rossa *et al.*, 1983). Esto podría representar un punto de unión entre agregación y esporulación.

Una vez cumplidos estos requisitos, las células 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 maduro. El tamaño de las células es de 5-10 μm , mientras que el cuerpo fructificante en ocasiones puede ser de varios cientos de micras, por tanto la formación de este cuerpo fructificante supone una notable empresa para estos microorganismos.

La morfología de los cuerpos fructificantes varía según los distintos géneros. Los más sencillos, formados por especies del género *Myxococcus*, son montículos esféricos o algo alargados, a veces con un tallo corto, de consistencia blanda y mucosa (Fig. 5). En otros géneros, como *Stigmatella*, los cuerpos fructificantes son más complejos, y constan de un pedúnculo del que salen varios esporangiolos con una pared dura. En el caso de *Chondromyces* el pedúnculo es ramificado y cada rama termina en un racimo de esporangiolos.



Myxococcus fulvus *Myxococcus stipitatus* *Stigmatella aurantiaca*

Figura 6: Fotos de cuerpos fructificantes de diferentes mixobacterias (Cortesía de Hans Reinchenbach, Braunschweig, Alemania)

Las células sufren una serie de cambios morfológicos, estructurales y bioquímicos que conducen a la formación de mixósporas. A diferencia de las endosporas clásicas que son formadas de *novo*, las mixósporas son formadas a partir de la transformación de la célula vegetativa completa. Además, aunque son algo más resistentes que las células vegetativas a las condiciones ambientales adversas, lo son mucho menos que las endosporas.

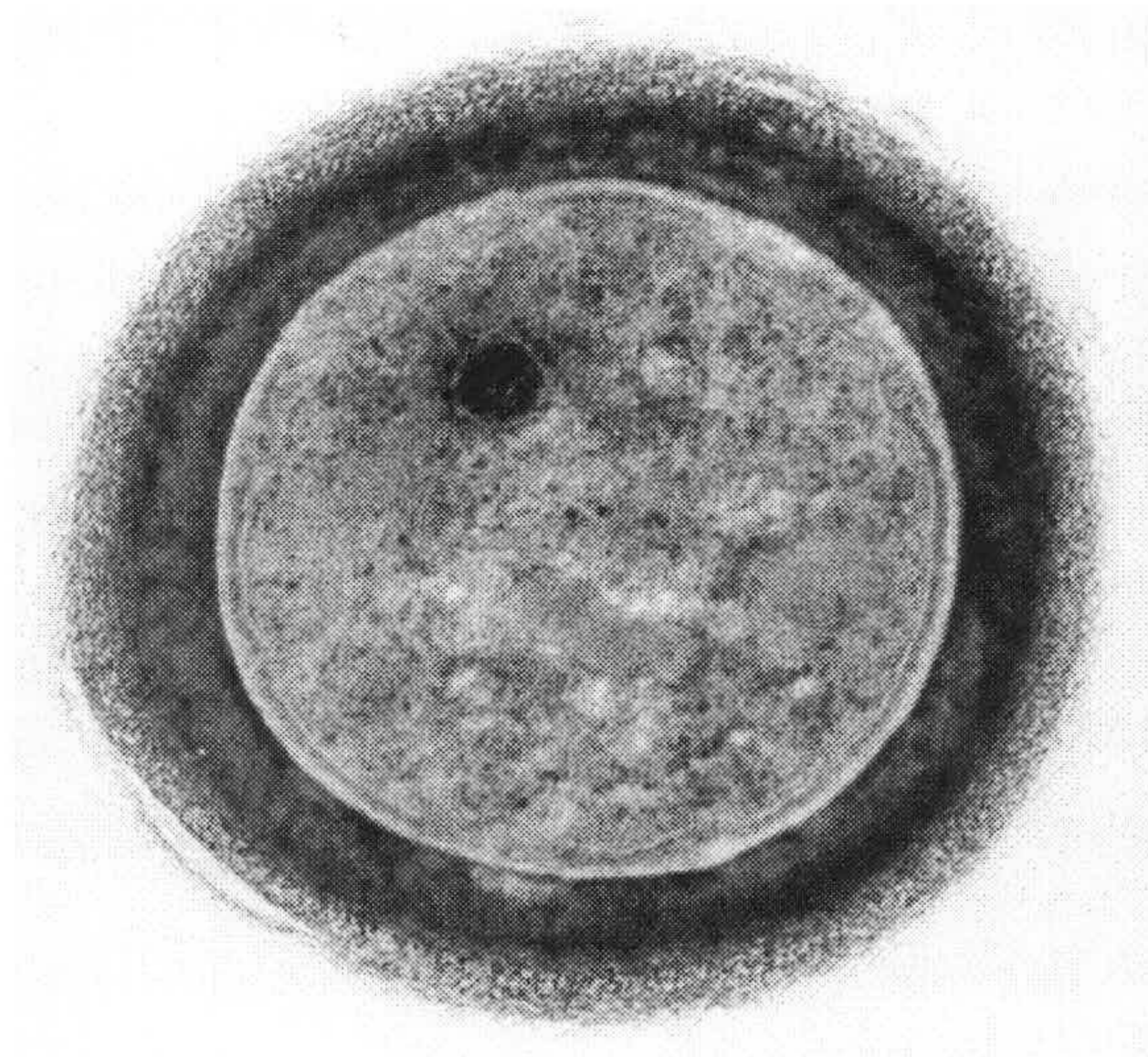


Figura 7: Mixóspora madura de *M. xanthus* observada con el microscopio electrónico de transmisión.

Una importante propiedad de las mixósporas es la resistencia a la desecación. Esta resistencia tiene una gran significación ecológica, porque las mixobacterias viven frecuentemente en medios ambientes que periódicamente se vuelven secos durante la época de sequía.

La germinación de las mixósporas (provenientes de los cuerpos fructificantes o inducidas artificialmente) ocurre cuando son colocadas en un medio rico, por lo que se cree que algunos nutrientes del medio deben actuar como señal para el desencadenamiento del proceso.

El hecho de que no aparezcan cuerpos fructificantes en medio líquido se debe a que las mixobacterias no pueden moverse en dichos medios, lo que impide que se concentren en puntos concretos. En cuanto a la densidad celular, la explicación parece estar en la necesidad de una distancia crítica entre célula y célula. Cuando se supera dicha distancia se dificulta la comunicación intercelular y no se produce agregación.

El complejo ciclo de desarrollo de las mixobacterias ha sido objeto de especulación durante mucho tiempo, y se ha llegado a la conclusión de que su función es asegurar el inicio de un nuevo ciclo a partir de una comunidad y no de una célula aislada. En este sentido, los cuerpos fructificantes serían colonias en reposo.

La explicación a que el ciclo se inicie con una comunidad podría ser que las mixobacterias viven en ambientes en los que existen macromoléculas en degradación. Para que una célula aislada pueda captar nutrientes tendrá que producir enzimas de varios tipos y excretarlos al exterior. Dichas enzimas difundirán por el medio y, a una distancia determinada de la bacteria productora, encontrarán un sustrato adecuado para digerir. Los nutrientes resultantes de esta digestión difundirán de manera radial, por lo que sólo una pequeña parte de ellos llegarán a la célula productora de las enzimas, siendo obviamente insuficientes para garantizar el crecimiento de dicha célula.

Si partimos de una comunidad de células, la producción de enzimas será mucho más alta, lo que implicará una mayor y más rápida degradación de macromoléculas del medio y, en consecuencia, una mayor disponibilidad de nutrientes. De esta forma cada célula tendrá acceso a los nutrientes liberados por actividad de toda la comunidad.

Mientras en el medio existan los nutrientes necesarios para garantizar el desarrollo vegetativo, este se mantendrá en óptimas condiciones. Si se produce un agotamiento de los nutrientes se disparará de nuevo el ciclo de desarrollo.

Además del alto potencial de producción de enzimas hidrolíticas, las células de mixobacterias cuentan con un movimiento por deslizamiento, ante cualquier opción de desarrollo. Así, durante el crecimiento vegetativo la atención de la colonia está enfocada hacia el movimiento y búsqueda de presas microbianas para su hidrólisis. La ausencia de tal fuente dispara el ciclo de desarrollo. Entonces los miembros de la colonia se deslizan hacia puntos de agregación, construyen los cuerpos fructificantes en cuyo interior se diferencian hasta la formación de mixósporas.

De otra parte, el ciclo de desarrollo conlleva el sacrificio de la mayor parte de las células de la comunidad inicial, con el claro objetivo de que unas pocas se puedan convertir en esporas y sobrevivir, al germinar, cuando los nutrientes vuelvan a estar disponibles.

En este sentido, un hecho muy destacado en el proceso de esporulación es la autólisis del 80 % aproximadamente de las células agregadas, de forma que sólo un 20 % llegan a formar mixósporas (Wireman & Dworkin, 1975 y 1977). Esta autólisis masiva parece ser que está ligada al programa de desarrollo, ya que los mutantes *SpoC*, que no muestran autólisis, no esporulan; la estimulación en estos mutantes de la esporulación se traduce paralelamente en unos niveles normales de autólisis (Shimkets & Kaiser, 1982b). Wireman & Dworkin (1977) han formulado la hipótesis de que, dado que el desarrollo supone un estado de inanición, la muerte y la lisis de la mayor parte de las células tiene por objeto suministrar a los supervivientes suficientes nutrientes para esporular. Esto podría ser considerado, desde un punto de vista socio biológico, como

un caso de altruismo por parte de la población que se sacrifica; aunque también cabe considerarlo como un caso de "*canibalismo*" por parte de la población superviviente.

Otra teoría mantiene que algunos de los productos liberados en la lisis podrían actuar como señales químicas que inducirían la esporulación. Los resultados obtenidos por Shimkets y Kaiser (1982a) apoyan esta hipótesis, ya que pudieron comprobar que los componentes del peptidoglucano son capaces de inducir la esporulación en mutantes *SpoC*.

Como en el caso anterior, esta última hipótesis también considera la autólisis como un fenómeno de cooperación entre las células de la población; sin embargo, hay que tener en cuenta que las células esporulantes que están sujetas a morfogénesis son osmóticamente delicadas y, por tanto, están expuestas a la lisis, que podría representar sólo un fracaso en el intento de esporular, con poco o ningún papel en el desarrollo (Zusman, 1984). Este proceso de desarrollo supone un gran esfuerzo energético que, parece ser, es suplido por la lisis de los miembros de la comunidad.

1.4.1. Factores implicados en el Ciclo de desarrollo.

La alimentación cooperativa y el desarrollo de las mixobacterias requieren la coordinación de muchas células. Esta coordinación es posible gracias al intercambio de varias señales intercelulares. Se han aislado cinco tipos diferentes de mutantes defectivos de señales (Hagen *et al.* 1978, Downard *et al.*, 1993). Estos mutantes son incapaces de esporular cuando crecen solos pero pueden ser rescatados añadiendo células salvajes o células de otro grupo de complementación. Los mutantes han sido denominados *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*, y las señales celulares de las que dependen son los factores A, B, C, D y E, respectivamente (A, B, C, D y E signal gene \equiv *asg*, *bsg*, *csg*, *dsg* y *esg*). Los factores A y B actúan al principio del desarrollo mientras que los factores D y C actúan a las 4 y 6 horas del agotamiento de nutrientes, respectivamente. La señal A es la que más temprano actúa de las cinco señales, ya que es producida cuando las células detectan un agotamiento de nutrientes y posteriormente actúa como un sensor de la densidad celular. Por último, la señal E se hace notar entre las 6 y 12 horas del inicio del desarrollo (Shimkets, 1999), (ver tabla 1)

Tabla 1: Momento de actuación de las señales implicadas en el ciclo de desarrollo de M. xanthus.

Señales	Momento de actuación
A	Inicio del desarrollo. Detecta el agotamiento de nutrientes
B	Inicio del desarrollo
C	A las 6 horas del comienzo del desarrollo
D	A las 4 horas del comienzo del desarrollo
E	Entre las 6 y 12 horas del comienzo del desarrollo

El factor A fue purificado y resultó estar constituido por dos actividades diferentes, una resistente al calor y dializable, y la otra sensible y no dializable (Kuspa *et al.*, 1992, Plamann *et al.*, 1992). El factor A sensible al calor fue identificado como una mezcla de proteínas con diferentes actividades proteolíticas, mientras que el resistente fue identificado como una mezcla de aminoácidos y pequeños péptidos.

Estos resultados indican que la señal A deben ser los péptidos y aminoácidos liberados por la acción de proteasas celulares. El producto del gen *asgA* es una proteína quinasa en histidina que consiste en un dominio receptor homólogo a los reguladores de respuesta de los sistemas de transducción de señales de dos componentes, seguido de un dominio de proteína quinasa en histidina propiamente dicho que también está conservado entre todas las proteínas sensoras de dichos sistemas (Dunmire *et al.*, 1999). *AsgD*, el producto del gen *asgD*, también resultó ser un nuevo regulador del sistema de dos componentes (Cho & Zusman, 1999).

De esta forma, parece que *AsgA* y *AsgD* actúan en una ruta de transducción de señales que conduce a la expresión de los genes requeridos para la producción de la señal A. El posible circuito de participación del factor A en el ciclo de desarrollo de *M.*

xanthus se muestra en la figura 6. No es la primera vez que esta transducción de señales ha sido encontrada en relación con el desarrollo (Yang & Kaplan, 1997).

El factor B no ha sido purificado aún, pero el gen *bsgA* (el único de los mutantes *bsg* que ha sido mapeado y clonado hasta ahora) codifica una proteasa dependiente de ATP similar a la proteasa lon de *E. coli*. Este hallazgo indica que cierta proteólisis intracelular debe haber en el transcurso de la señal dependiente del gen *bsgA* (Gill *et al.*, 1993).

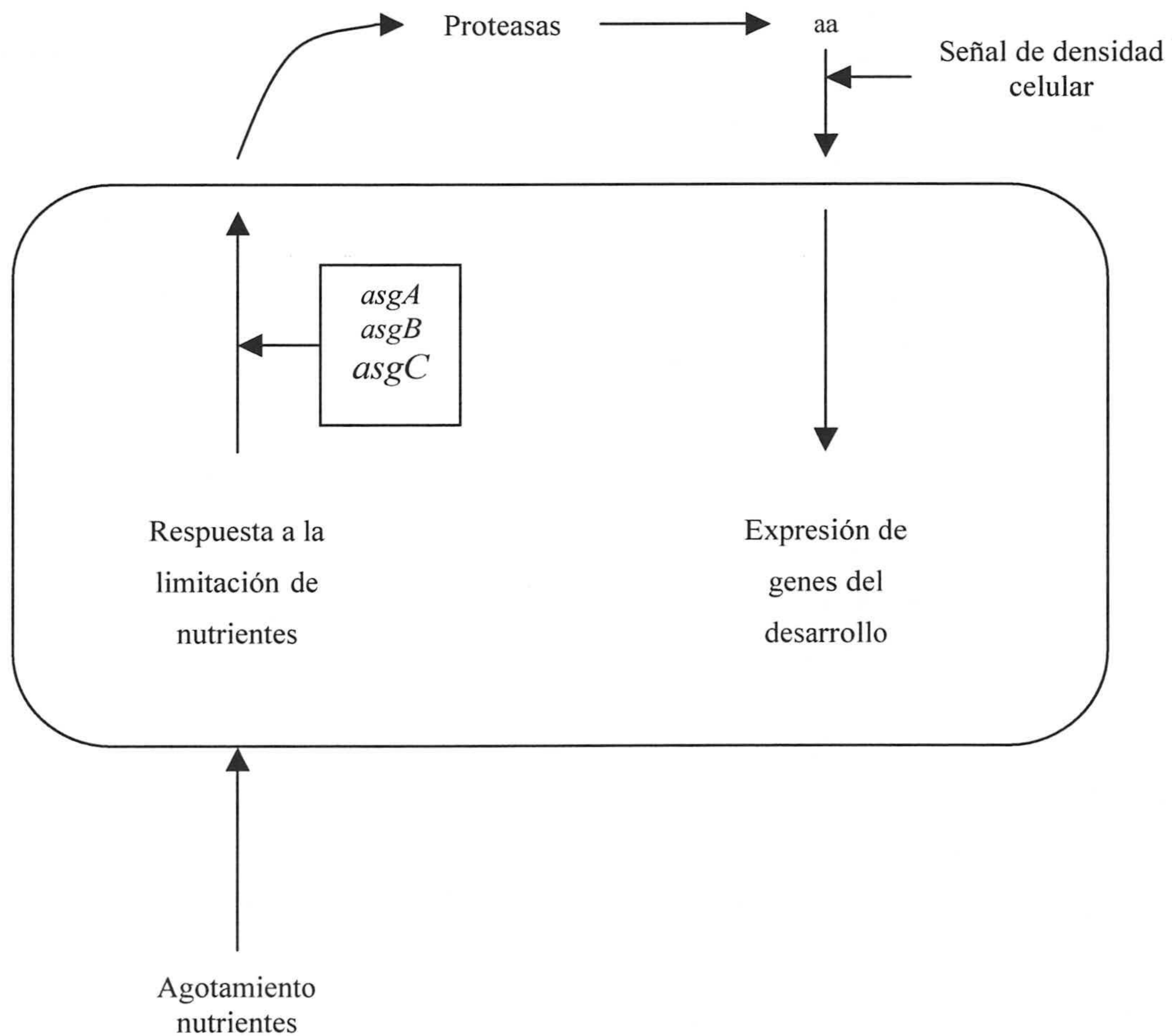


Figura 8: Esquema del circuito de la señal A en *M. xanthus*.

El factor C ha sido identificado como el producto del gen *csgA* (Kim & Kaiser, 1990a; Shimkets & Rafiee, 1990). El factor C es una proteína asociada a membrana con un péptido señal en su región aminoterminal similar a los de las bacterias entéricas (Hagen & Shimkets, 1990). El factor C no se libera al medio por lo que requiere el contacto de célula a célula para actuar. Por otra parte sí que requiere movilidad (Kim & Kaiser, 1990b). Las células inmóviles no expresan los genes dependientes del factor C, aunque las concentraciones del factor C sean normales. Se ha demostrado también que las células deben estar alineadas de una manera concreta. Cuando las células inmóviles se alineaban artificialmente podían transmitir la señal del factor C y expresar los genes dependientes.

Durante el desarrollo normal, las células se mueven para agregarse en ciertos puntos, aumentando la densidad celular unas 50 veces. En estos paquetes densos, las células se alinean de una manera determinada, permitiendo al factor C actuar (Kim & Kaiser, 1990c). Se ha propuesto que de alguna manera el factor C produce cambios de comportamiento (alta velocidad y baja frecuencia de cambio de dirección) en las células individuales durante el desarrollo (Jelsbak & Sogaardandersen, 1999). Más recientemente, se ha encontrado que su procedencia está regulada por el operón *act* formado por cuatro genes que se co-transcriben desde un mismo sitio de inicio. Los genes *actA* y *actB* regulan los niveles de factor C. Los genes *actC* y *actD* regulan el tiempo de expresión de CgsA (Gronewold & Kaiser, 2001).

El factor D no ha sido identificado aún. Un gen *dsg* ha sido clonado y caracterizado. Codifica el factor de iniciación de traducción IF3 de *M. xanthus* (Chen *et al.*, 1994; Kalman *et al.*, 1994), por lo que las inserciones del Tn5 en este gen son letales (Cheng & Kaiser, 1989). El fenotipo de los mutantes *dsg* puede ser explicado como un efecto indirecto causado por un fallo en la traducción de los genes responsables para la producción del factor D (Kalman *et al.*, 1994).

Los genes *esgA* y *esgB* codifican las proteínas E1 α y E1 β respectivamente del componente E1 de una deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada (Toal *et al.* 1995). Esta deshidrogenasa forma parte de una ruta que convierte cetoácidos de cadena ramificada en coenzima A derivados del ácido isovalérico (Downard & Toal, 1995). Los mutantes *esg* tienen niveles muy reducidos de ácidos grasos de cadena larga

INTRODUCCIÓN

ramificados que son normalmente sintetizados a partir de ácidos grasos de cadena corta ramificados (tabla 2).

Tabla 2: Señales intercelulares en el ciclo de desarrollo de *M. xanthus*.

Señales	Naturaleza	Genes	Productos génicos
A	Mezcla de aminoácidos y péptidos producidos por varias proteasas	<i>asgA</i>	Dos dominios: a) proteína quinasa en histidina b) regulador de respuesta
		<i>asgB</i>	Factor de transcripción
		<i>asgC</i>	Factor sigma 70 (σ^{70})
		<i>asgD</i>	Regulador de respuesta
B	Desconocido	<i>bsgA</i>	Proteasa dependiente ATP (90.4 KDa)
C	Proteína de membrana CsgA	<i>csgA</i>	Alcohol deshidrogenasa (cadena corta)
D	Ácidos grasos ?	<i>dsgA</i>	Factor de iniciación de traducción IF'3
E	Ácidos grasos (isovalérico, isobutírico, metilbutírico)	<i>esgA</i>	Proteína E1 _{α} (subunidad α) Proteína E1 _{β} (subunidad β) } componente E ₁ de una deshidrogenasa de cetoácidos de cadena ramificada
		<i>esgB</i>	

Aunque hay mucha información acerca de las señales que actúan durante el desarrollo y los genes cuya expresión depende de estas señales, aún se sabe poco sobre como se transducen las señales a través de la membrana para regular la expresión génica. El comportamiento social de las mixobacterias y las similitudes de su ciclo de desarrollo con el de *Dictyostelium discoideum* hizo pensar que las mixobacterias podrían utilizar sistemas de transducción de señales parecidos a los existentes en eucariotas. De hecho, el estudio en esta línea dio lugar al hallazgo de al menos cinco proteínas que unen GTP, dos de ellas en la fracción de membrana y el resto en la fracción soluble (Muñoz-Dorado *et al.*, 1990a). Otro intento de localizar otra ruta de

transducción de señales de tipo eucariótico en *M. xanthus* se enfocó en la detección de proteínas quinasas. El uso de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y análisis de hibridación mostraron que *M. xanthus* posee 26 proteínas quinasas diferentes (Zhang *et al.*, 1992). El gen *pkn1* codifica una proteína de 693 residuos que mostró ser la primera proteína quinasa en serina y treonina conocida en bacterias (Muñoz-Dorado *et al.*, 1991). Desde entonces se han encontrado también en otras muchas eubacterias (Motley & Lory, 1999).

2. OAR, UNA PROTEÍNA REQUERIDA PARA EL DESARROLLO DE MYXOCOCCUS XANTHUS.

En las páginas anteriores hemos hablado de la importancia del movimiento y la adhesión celular durante el proceso de desarrollo y diferenciación de *Myxococcus xanthus*. Como se ha dicho previamente, se sabe que las células de *M. xanthus* se mueven por deslizamiento sobre superficies semisólidas pero el mecanismo molecular para este movimiento aún no se conoce en su totalidad (Spormann, 1999).

En un intento por conocer más sobre las bases celulares y bioquímicas de este proceso, Martínez-Canamero *et al.*, (1993) aislaron posibles orgánulos que pudieran estar involucrados en el movimiento. Para ello se aplicó a *M. xanthus* DZF1, con algunas modificaciones, el método publicado previamente para aislar los cuerpos basales de la bacteria *Caulobacter crescentus* (Hannenberger y Shapiro, 1987). De este modo, las células se trataron con lisozima y tritón y la fracción insoluble se fraccionó mediante una centrifugación en gradiente de sacarosa. Cada fracción obtenida se analizó en un gel de proteínas SDS-PAGE. Al revelar el gel, se observó la existencia de una proteína (denominada posteriormente Oar) que migraba a un tamaño mayor que el patrón de 92.5 kDa y se concentraba notablemente en tres de las fracciones. Usando las subunidades β y β' de la RNA polimerasa de *Escherichia coli* como marcador, el peso molecular se estimó en 115 kDa.

Para determinar la localización celular de dicha proteína, las membranas internas y externas fueron separadas por centrifugación en gradiente de sacarosa

(Orndorff y Dworkin, 1980) y sus patrones de proteínas fueron analizados mediante SDS-PAGE. Es conocido que, al contrario que en *E. coli*, la membrana interna de *M. xanthus* tiene una densidad mayor ($\rho = 1.221$ g/ml) que la membrana externa (Orndorff y Dworkin, 1980). Al revelar el gel con las membranas fraccionadas, se pudo comprobar que la proteína Oar estaba localizada en las últimas fracciones, es decir, las más densas, por lo que se concluyó su localización en la membrana interna.

Para clonar el gen que codifica para Oar, la proteína fue purificada en un gel SDS-PAGE preparativo y digerida parcialmente con proteasa V8. Los fragmentos fueron nuevamente separados y una banda mayoritaria fue electroeluída del gel y mandada a secuenciar su extremo aminoterminal. A partir de esta secuencia se pudo deducir la secuencia nucleotídica correspondiente lo que sirvió para sintetizar un oligonucleótido degenerado que era complementario a dicha secuencia. Este nucleótido marcado fue utilizado para detectar por hibridación el gen *oar* en una genoteca de cromosoma de *M. xanthus* construida en el fago λ . El fragmento fue clonado, subclonado y secuenciado dando lugar a un suclon de 4681 nucleótidos que contenía dos genes muy próximos uno del otro (37 nucleótidos), lo que hacía pensar que pertenecían a un mismo operón. El primer gen codificaba para una proteína de 1061 aminoácidos (lo que coincidía con el tamaño de Oar) y presentaba en su interior la secuencia aminoacídica utilizada para su clonación. Además, el marco abierto de lectura presentaba un péptido señal de 26 residuos aminoacídicos en el extremo aminoterminal con las características típicas de los péptidos señales de procariontes publicadas con anterioridad (Inouye y Halegoua, 1980). De esta manera se pensó que Oar podría ser secretada a través de la membrana interna mediante este péptido señal, lo que coincidía con la localización observada en SDS-PAGE.

También se encontraron otras características, como una región de unión al ribosoma, GAGG, 8 nucleótidos antes del codon de iniciación. Además, exceptuando la región del péptido señal, la tercera posición de los codones en el resto del gen utiliza G o C en una proporción muy alta (89%) lo cual es típico de mixobacterias, que presentan un alto porcentaje de G-C (Inouye *et al.*, 1989).

Por todas estas características y por su semejanza a nivel aminoacídico con la

proteína OmpA de *Escherichia coli*, se decidió llamar a Oar a esta proteína (Oar = OmpA Related protein; OmpA = Outer Membrane Protein).

El segundo marco abierto de lectura codificaba un polipéptido de 236 aminoácidos. La alta utilización de G-C en la tercera posición de codones (81%) era también propia de mixobacterias. Los 21 aminoácidos aminoterminales incluyendo una caja o motivo indicativo de lipoproteínas. Por ello el gen fue denominado *mlpA* (membrane lipoprotein A). Su naturaleza lipoprotéica fue probada experimentalmente con posterioridad (Hanlon *et al.*, 1995).

Finalmente, 23 bases tras el codon de terminación de este gen se encontró un palíndromo de 9 bases repetidas e invertidas que formaba una estructura secundaria con una ΔG de -17 kcal (Salser, 1977). Este palíndromo probablemente servía como una señal de terminación de transcripción para el operón *oar*.

Para examinar las funciones de este operón, se construyó un mutante de delección $\Delta oar-mlpA$. El mutante fue comprobado a nivel de southern blot y, mediante SDS-PAGE de las membranas, se mostró que el mutante no presentaba ya la banda correspondiente a Oar.

Cuando el mutante creció en medio líquido CYE, mostró la misma curva de crecimiento que el fenotipo salvaje. Sin embargo, se adhería mucho menos que la cepa DZF1 al vidrio del matraz durante el final de la fase exponencial y la fase estacionaria, indicando que Oar podría estar relacionado con la cohesión celular. Cuando se examinó el proceso de desarrollo de los mutantes en agar CF, la formación de sus cuerpos fructificantes estaba mucho más retrasada que las células de DZF1, llegando a veces a no formarse nunca. En el caso del fenotipo salvaje, las células forman montículos agregados a las 24 horas y cuerpos fructificantes completamente maduros a las 48 horas. Sin embargo las células mutantes sólo mostraban una ligera tendencia a agregarse después de las 96 horas. La producción de mixósporas también se redujo significativamente en el mutante (30% después de 6 días).

Sin embargo, el mutante de delección resultó ser tan móvil como el fenotipo

salvaje, indicando que Oar no está asociada al movimiento por deslizamiento de *M. xanthus*. El tipo de crecimiento en medio líquido indicado anteriormente apuntaba, sin embargo, a un defecto en la adhesión celular, lo que, en caso de ser confirmado, afectaría necesariamente a la formación de cuerpos agregados y cuerpos fructificantes maduros.

3. DISTRIBUCIÓN DE LAS MIXOBACTERIAS EN LA NATURALEZA

A pesar de su apariencia, un tanto exótica, y de su complejo ciclo de desarrollo, las mixobacterias son microorganismos muy comunes. En rangos de pH entre 5 y 8, y en condiciones aerobias, prácticamente todos los suelos del mundo, sin reparar en el clima, presentan alguna mixobacteria. Su distribución ha sido estudiada muy ampliamente (Krzemieniewska y Krzemieniewski, 1927 a y b; Norén, 1952; Sabados-Saric, 1957; Kühlwein, 1960; Brockman y Boyd, 1963; Jeffers, 1964; McCurdy 1969; Reichenbach y Dworkin, 1969; Rückert, 1973; Rückert, 1978; Rückert, 1979; Dawid, 1979).

Se encuentran abundantemente en climas cálidos, semiáridos y áridos; en estos climas la resistencia de las mixósporas a la desecación les confiere una fuerte ventaja selectiva (Singh y Singh, 1971; Brockman, 1976; Rückert, 1978). También se han encontrado en menor cantidad en climas tropicales (Kühlwein, 1960; McCurdy, 1969; Dawid, 1978); en estos suelos, el pH ácido, puede actuar como limitante.

Algunas mixobacterias de los géneros *Myxococcus*, *Corallococcus* y *Nannocystis* son aparentemente muy flexibles con respecto a los hábitats que pueden colonizar. Quizás con la excepción de los climas fríos, *N. excedens* es la más común de todas las mixobacterias a pesar de no ser nunca mencionada en los estudios sobre la ecología de estas bacterias (Reinchnbach, 1993).

Si bien son básicamente microorganismos del suelo, también son capaces de colonizar otros hábitats, especialmente aquellas zonas ricas en comunidades microbianas como es la rizosfera de las plantas (Agnihotrudu *et al.*, 1959), los excrementos de herbívoros, madera y materia orgánica en descomposición (Peterson,

1959). Algunas especies parece que se han especializado en nichos particulares como ocurre en el caso del género *Haploangium*, el cual sólo ha sido observado en cortezas de árboles en descomposición; no se ha podido cultivar y no se conoce si es un organismo celulolítico (Reichenbach, 1993).

Las mixobacterias se encuentran también abundantemente en aguas dulces (Geitler, 1925; Hook, 1977), pero no se ha encontrado ninguna mixobacteria capaz de crecer en cultivos que tienen una concentración alta de sales equivalente a la de los océanos. Sin embargo, las mixobacterias pueden ser aisladas a partir de la arena de mar, (Rückert, 1975a), marismas (Rückert, 1983), zonas pantanosas de aguas marinas (Rückert, 1975b). Incluso se han encontrado en los sedimentos submarinos a una profundidad de 40 m cerca de Helgoland, una isla en el Mar del Norte lejos de la costa de Alemania. En ese caso, los organismos se aislaron utilizando medios usuales con una baja concentración de sales (Reichenbach, 1993). Sin embargo, últimamente se ha comunicado el aislamiento de bacterias formadoras de enjambres relacionadas con el género *Nannocystis* mediante los análisis con el ARN ribosómico 16S. Estas posibles mixobacterias sí que crecen en una concentración de sales del 2-3%. Incluso se han aislado ARNr16S de sedimentos del Mar del Norte que filogenéticamente han sido afiliados con las mixobacterias.

La presencia de las mixobacterias en turba de pantanos a un pH de 3,7 y a bajas concentraciones de oxígeno, es también sorprendente ,ya que *in vitro* las mixobacterias son aerobias estrictas y no crecen a un pH por debajo de 5.

Las mixobacterias son capaces de pasar a través del tracto digestivo de los animales, como se demostró experimentalmente con los esporangiolos de *Chondromyces apiculatus* (Kühlwein, 1950). También se encontraron en el tracto intestinal de peces de aguas dulces (Till, 1982); estas mixobacterias pasan probablemente a estos animales a través de los alimentos. La especie *Poliangium parasiticum* fue descrita como un parásito obligatorio de las algas verdes del género *Cladophora* (Geitler, 1925).

El número exacto de mixobacterias en suelos es muy difícil de estimar dado su tendencia a permanecer unidas entre ellas, formando comunidades de agregados celulares, entre ellos los cuerpos fructificantes en donde coexisten células vegetativas y mixósporas, así como, debido a que tienden a unirse a partículas inorgánicas del suelo, a restos vegetales en putrefacción, etcétera. Por último, otra dificultad reflejo de su comportamiento en el ciclo de desarrollo que llevan a cabo en la naturaleza, es que se necesita una cierta densidad celular para iniciar su crecimiento. Es por ello que son escasos los trabajos realizados sobre la densidad de las mixobacterias en sus hábitats naturales, especialmente el suelo; en general su número oscila entre $1,5 \times 10^3$ y 8×10^4 células por gramo de suelo, dependiendo de si se trata de suelos normales o ricos en materia orgánica (Singh, 1947; Sabados-Saric, 1957; McCurdy, 1969).

4. FORMACIÓN DE CRISTALES EN MIXOBACTERIAS.

De todas estas características expuestas se deduce el enorme atractivo de las mixobacterias en diversos campos: producción de enzimas y antibióticos, modelos para estudios de morfogénesis y diferenciación celular, así como de interacciones celulares, entre otros. En los últimos años se ha comenzado a estudiar el papel que estos microorganismos pueden desempeñar en procesos de **biomineralización**.

Es un hecho destacable el interés creciente despertado a lo largo de la última década acerca del papel de los microorganismos en los procesos geoquímicos y de biomineralización. Exponente de lo dicho es, de una parte, la emergencia de una nueva área de conocimiento, la Geomicrobiología, y de otra, la numerosa bibliografía que, de modo creciente, viene apareciendo en relación a procesos de este tipo (para mayor información puede consultarse el libro Geomicrobiology: Ehrlich, 1990 y el volumen monográfico Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals: Banfield y Nealson, 1997; así como las revisiones González *et al*, 1996 y Ben Omar *et al*, 1997). Las aportaciones que se han realizado empleando dos mixobacterias, *M. coralloides* y *M. xanthus*, han resultado fructíferas y altamente valiosas en este terreno de la investigación.

De los diversos estudios realizados se puede deducir que la capacidad de las bacterias para intervenir en procesos de biomineralización parece ser un fenómeno general, ya sea contribuyendo de forma indirecta mediante sus productos metabólicos, ya sea actuando de forma pasiva como núcleos heterogéneos de cristalización, o por ambas vías. No obstante lo dicho, esta capacidad general no es universal, existiendo cepas que carecen o han perdido esta habilidad (González *et al.*, 1996 , Ben Omar *et al.*, 1997 y Perito *et al.* 2000).

Los procesos de Biomineralización, en los que las células microbianas o sus fracciones celulares actúan como núcleos heterogéneos de cristalización, suponen un reconocimiento molecular entre grupos cargados, presentes en moléculas celulares, e iones presentes en el ambiente extracelular. En este sentido las membranas celulares, debido a su estructura y composición, parecen especialmente adecuadas para intervenir en procesos de biomineralización. En el campo de las mixobacterias, en concreto, se ha encontrado que las fracciones membranosas pueden actuar como núcleos heterogéneos de cristalización para estruvita y calcita (González *et al.* 1995).

La descripción de la participación de las mixobacterias en procesos de biomineralización se llevó a cabo por primera vez por nuestro grupo en 1992 (González *et al.* 1992) describiéndose la producción de un fosfato, la estruvita. Este trabajo se realizó con *M. coralloides D* y se encontró que esta tenía lugar en los medios de cultivo habituales de esta bacteria tanto sólidos como líquidos, y tanto en reposo como en agitación. La estruvita producida por *M. coralloides D*, según las distintas condiciones ensayadas, presenta una extraordinaria variedad de morfologías, hábitos cristalinos y formación de drusas, en un grado de diversidad no descrito para otra bacteria (Ben Omar *et al.*, 1996).

Otros estudios de interés en relación a la producción de estruvita por *M. coralloides D*, pusieron de manifiesto que no basta con el suministro del ión amonio, y de provocar un pH alcalino en el medio de cultivo, sino que es precisa la aportación por parte de la bacteria de algunos restos celulares que actúen como núcleos heterogéneos de cristalización y que son liberados en el proceso de autólisis típico de

esta bacteria. De ahí que, las condiciones que favorecen la autólisis, inducen la producción de estruvita (González *et al.* 1993).

Posteriormente se ha demostrado la producción de estruvita por *M. xanthus* cuando crece en medios de cultivo adecuados, tanto líquidos como sólidos, en reposo y en agitación. De la misma manera, las mejores condiciones para la producción de estruvita por *M. xanthus* se dan en los medios de cultivo que promueven un mayor crecimiento celular y una rápida autólisis (Ben Omar *et al.* 1994).

De otra parte se demostró que *M. coralloides* D, es capaz de producir en medios de cultivo líquidos estáticos, junto con la estruvita, cantidades menores de fosfatos y sulfatos considerados singenéticos con este mineral, concretamente newberyita, schertelita y taylorita. Estos resultados son de enorme interés ya que era la primera vez que se describía la producción de estos minerales por una bacteria (González *et al.* 1994).

En cuanto a *M. xanthus* se refiere, aunque produzca principalmente estruvita, también puede producir apatito en ciertas condiciones (Ben Chekroun, 2000).

En relación a otro tipo de minerales de gran interés, los carbonatos, se ha demostrado que *M. xanthus* es capaz de producir tres polimorfos: calcita, aragonito y vaterita, además de calcita magnésica e hidrocalcita. El caso de la calcita magnésica producida por *M. xanthus* reviste especiales características, ya que aparece con una diversidad de morfologías (debido a la forma de agruparse y desarrollarse los cristales producidos) que abarcan esferas, cilindros, formas de diablo, semi diablo y diablos semicruzados. Estas morfologías, producidas con la intervención de esta bacteria, sólo aparecen en el caso de calcita magnésica, hecho este en el que se aleja marcadamente del comportamiento descrito para otros microorganismos (González *et al.* 2000).

Se ha comprobado que las células de *M. xanthus* aportan núcleos heterogéneos de cristalización provocando de manera localizada los niveles de sobresaturación de los distintos iones requeridos para que se de la cristalización y las

condiciones termodinámicas adecuadas para el proceso (Ben Omar *et al.* 1994, 1995). En el caso de células íntegras, procedentes de cultivos viables, estos núcleos están localizados en deformaciones globulares detectadas en las células que están iniciando la fase de lisis. Igualmente, las células muertas y/o rotas aportan dichos núcleos, siempre que procedan de cultivos en el inicio de la fase de lisis (Ben Omar *et al.*, 1998).

De lo anteriormente dicho se deduce una notable capacidad de las mixobacterias, al menos del especies del género *Myxococcus*. Esta afirmación se soportan aún más en investigaciones no publicadas y que ponen de manifiesto la intervención de *M xanthus* en la producción de minerales del silicio y otra gama amplia de minerales como pueden ser weddelita, leonita y yeso (Ben Chekroun, 2000).

Por otra parte se ha puesto de manifiesto que en ciertas condiciones, *M. xanthus* es capaz de dar lugar a la mineralización de parte de su estructura, en concreto de sus envueltas celulares. Así, es posible encontrar formas celulares, que presentando el interior vacío, se han convertido en minerales tales como calcita y /o vaterita. Estos hechos abren el camino a la utilización de esta bacteria como modelo para estudiar procesos de fosilización (Ben Chekroun, 2000).

Con todos estos estudios realizados con *M. xanthus* y *M. coralloides* queda de manifiesto el amplio espectro que tienen estas cepas para ocasionar procesos de Biomineralización. Así, dependiendo de la composición del medio en que se encuentren, son capaces de inducir la producción de diversos minerales que abarcan, al menos, fosfatos, carbonatos, oxalatos, sulfatos y minerales de silicio. Un factor que tiene influencia decisiva en los minerales a producir es el estado del medio, o sea, el que esté en forma fluida o solidificada. De este modo, con soluciones de la misma composición química pueden producirse diferentes tipos de minerales. Ello indica que la forma y velocidad a que los iones difunden en el ambiente, así como la formación de gradientes tienen capital influencia en los minerales que se formarán (Ben Chekroun, 2000).

INTRODUCCIÓN

Desde otro punto de vista uno de los más notables y destacados estudios entre los numerosísimos realizados en los últimos años enfocados a aclarar los mecanismos que intervienen en los procesos que disparan y/o controlan los diversos aspectos de la biomineralización bacteriana, ha sido el realizado por Perito *et al.*, en el que se pone de manifiesto como ciertas mutaciones que afectan a diversas funciones bacterianas que están relacionadas con proteínas de membrana pueden incrementar, disminuir, o incluso eliminar la capacidad de producir carbonatos por *B. subtilis*. Estos hallazgos abren nuevas vías o perspectivas para la investigación del papel de las bacterias en procesos de carbonatogénesis y de producción de otros minerales.

II. OBJETIVOS

En los estudios de Biomineralización en las bacterias, de interés geomicrobiano y patológico, son muy abundantes, pero se centran fundamentalmente en la intervención de estos microorganismos en dichos procesos como consecuencia de su metabolismo. Y, salvo raras excepciones, no se ha estudiado el papel bacteriano en el aporte de núcleos heterogéneos de cristalización.

Nuestro grupo de investigación viene trabajando en este campo desde hace varios años con *M. xanthus*. Estos estudios se han centrado fundamentalmente en la producción de estruvita (González-Muñoz *et al.*, 1993, 1996; Ben Omar *et al.*, 1994, 1995, 1996, 1998) y algunos minerales singenéticos con ella, como schertelita y newberiyta (Ben Omar, 1996). Una investigación más reciente, utilizando las fracciones membranosas de este microorganismo, puso de manifiesto que pueden actuar como núcleos heterogéneos de cristalización para la estruvita y la calcita (González-Muñoz *et al.*, 1996; Ben Chekroun, 2000).

Desde otro punto de vista, y a fin de aclarar los mecanismos que intervienen en los procesos que disparan y/o controlan los diversos aspectos de la biomineralización bacteriana, han aparecido trabajos en los que se pone de manifiesto cómo ciertas mutaciones que afectan a diversas funciones bacterianas, como agregación y adhesión, y que están relacionadas con proteínas de membrana pueden incrementar, disminuir, o incluso eliminar la capacidad de producir carbonatos por *B. subtilis*. Estos hallazgos abren nuevas vías o perspectivas para la investigación del papel de las bacterias en procesos de carbonatogénesis y de producción de otros minerales (Perito *et al.*, 2000). La mayoría de las proteínas alteradas en estos mutantes son proteínas de membrana, la fracción subcelular donde residen gran parte de los grupos químicos activos como núcleos de cristalización.

Esto fue lo que condicionó la elección del mutante *M. xanthus* DZF1 Δ oar para realizar estudios comparativos en cristalización. Es por ello que el objetivo principal de esta Tesis Doctoral consista en el estudio comparativo de tres cepas de *Myxococcus xanthus*. Una cepa silvestre referida como 432 (Colección Española de

Cultivos Tipo) o 25232 (American Type Culture Collection); *M. xanthus* DZF1, una cepa *sglA1*-FB derivada de la cepa DK101 (Inouye et al., 1979) afectada en el movimiento social; y DZF1 Δ *oar*, una cepa derivada de DZF1 mediante delección del gen *oar* (Martinez-Canamero et al., 1993)

Oar es una proteína de 110-kDa asociada con la membrana interna. El gen que codifica para Oar ha sido clonado, secuenciado y deleccionado (Martinez-Canamero *et al.*, 1993). Codifica para un polipéptido de 1061 aminoácidos. Aguas debajo de este gen existe un segundo marco abierto de lectura que codifica para una lipoproteína de membrana (Hanlon *et al.*, 1995). La delección de ambos genes o sólo del primero produce serios defectos en la formación de cuerpos fructificantes. Estudios preliminares han mostrado que este defecto viene producido por la incapacidad del mutante de adherirse entre sí, y por tanto de agregarse. Es por tanto esencial caracterizar y cuantificar exactamente la capacidad de agregación del mutante en comparación con el salvaje y estimar el efecto que esta falta de agregación produce sobre la capacidad de actuar como núcleo de cristalización de *M. xanthus*.

De acuerdo con todo ello y en consonancia con la línea de trabajo que nuestro Grupo de Investigación lleva a cabo, se ha planteado desarrollar la investigación de la presente Tesis Doctoral con los objetivos que se describen a continuación:

1- El primer objetivo ha consistido en el estudio del fenotipo de este mutante a fin de comprobar, en las condiciones de nuestro laboratorio, que dicho fenotipo se mantenía tal y como había sido ya publicado con anterioridad. Para ello se comprobaron las dos cepas de *M. xanthus* DZF1, tanto en el crecimiento vegetativo, como en el ciclo de desarrollo y la producción de esporas.

2- Como segundo objetivo se ha investigado la producción de minerales por la cepa mutante DZF1 Δ *oar* para comparar su capacidad biomineralizadora con la

cepa silvestre, la 422, cuya capacidad de formación de carbonatos y fosfatos principalmente (aunque no exclusivamente) ha sido investigada previamente en nuestro laboratorio.

3- Además de completar la investigación, ensayar ambas cepas simultáneamente en condiciones y medios de cultivo en que previamente no se había trabajado con la cepa 422.

II. MATERIAL Y MÉTODOS

1. MICROORGANISMOS

Para esta Tesis se ha usado de manera habitual *Myxococcus xanthus* DZF1, una cepa *sglA1*-FB derivada de la cepa DK101 (Inouye *et al.*, 1979) y *M. xanthus* DZF1 Δ *oar*, una cepa derivada de DZF1 mediante delección del gen *oar* (Martínez-Canamero *et al.* 1993). Para los estudios de producción de cristales, se ha utilizado también la cepa salvaje 422 de *Myxococcus xanthus* (CECT, 422; ATCC 25232). [CECT: Colección Española Cultivos Tipo, Burjasot, Valencia; ATCC: American Type Culture Collection, Rockville, USA].

2. MEDIOS DE CULTIVO

2.1. MEDIOS DE CONSERVACIÓN, MANTENIMIENTO Y CRECIMIENTO BACTERIANO.

Medio Agar-Levadura

Este medio ha sido utilizado para la conservación de las diferentes cepas de *Myxococcus xanthus*. En este medio las mixobacterias dan lugar a abundantes cuerpos fructificantes que se conservan viables durante varios meses. Se ajusta a la siguiente composición:

Levadura prensada de panadería	1%
Agar purificado (Merck)	1,6%
Agua destilada	
pH 7,2	

Para su preparación, la levadura se suspende, previamente, en una pequeña cantidad de agua destilada mediante la conveniente agitación, a fin de prevenir la formación de grumos. Posteriormente, se añade el agar previamente fundido. El pH se

ajustó con una solución de NaOH al 10%. El medio, como todos los restantes que se describen, se esterilizó a 120°C durante 20 minutos.

Medio CT

Utilizado para el crecimiento en forma dispersa de *M. xanthus*, y tiene la siguiente composición:

Bacto-Casitone (Difco)	0,5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
Tampón KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	10 mM
pH 6,5	

Medio CTA

Utilizado para el crecimiento vegetativo de las especies de *Myxococcus* sobre medios sólidos, responde a la siguiente composición:

Bacto-Casitone (Difco)	0,5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
Tampón KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	10 mM
Agar	1,8%
pH 7,2	

CT-Glicerol

Teniendo en cuenta la rápida autólisis que muestran los cultivos dispersos de *M. xanthus*, y las mixobacterias en general, para asegurar su conservación se ha procedido de la siguiente manera: células de un cultivo en fase exponencial de crecimiento, de entre 24 y 48 horas, eran recogidas por centrifugación y resuspendidas en medio CT

adicionado de glicerol 0,5 M. En estas condiciones pueden ser mantenidas congeladas durante largos períodos de tiempo.

Medio CTT

Utilizado también para el crecimiento en forma dispersa de *M. xanthus* y otras mixobacterias, tiene la siguiente composición:

Bacto-Casitone (Difco)	1%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2%
Tampón KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	1 mM
Tampón Tris HCl	10 mM
pH 6,5	

CTTA

Es el medio sólido correspondiente al caldo citado anteriormente. Su uso como tal ha sido limitado, pero derivaciones suyas se han utilizado en el estudio del movimiento. Su composición es, pues, la siguiente:

Bacto-Casitone (Difco)	1%
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2%
Tampón KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	1 mM
Tampón Tris HCl	10 mM
Bacto-agar (Difco)	1,8%
pH 6,5	

Medio CYE

Este y su correspondiente medio sólido, son otros dos medios básicos para el mantenimiento y crecimiento, tanto en sólido como en líquido, de *Myxococcus xanthus*.

Bacto-Casitone (Difco)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0,5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
pH 7,6	

Medio CYE-Agar

Bacto-Casitone (Difco)	1%
Extracto de levadura (Difco)	0,5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
Bacto-agar (Difco)	1,8%
pH 7,6	

2.2. MEDIOS DE FRUCTIFICACIÓN

Medio CF

Aparte del medio Agar-levadura, ya comentado en la sección de medios de mantenimiento, el único medio de fructificación de mixobacterias que se utilizó fue el medio de Fructificación de Clones (Clone Fruiting Medium), un medio oligonutriente cuya composición es la siguiente:

Tampón Tris HCl, pH 7,6	10 mM
K-Na ₂ PO ₃ , pH 6,8	1 mM
MgSO ₄ ·7H ₂ O	8 mM
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,02%
Casitone (Difco)	0,015%
Citrato	0,2%
Piruvato	0,1%
Bacto-agar	1,5%

El piruvato debe ser esterilizado por filtración y adicionado después de autoclavar.

2.3. MEDIOS DE GERMINACIÓN

Cualquier medio de crecimiento rico en nutrientes puede ser usado para la germinación. En este trabajo hemos utilizado el medio CYE-agar, con una sobrecapa de la misma composición pero adicionada sólo de un 0,7% de Bacto-agar.

2.4. MEDIOS PARA EL ESTUDIO DEL MOVIMIENTO

2.4.1. En placa

Medio ½CTT-agar

Para el estudio del movimiento por deslizamiento en placa, se utilizó medio ½CTT con un 1,5% de agar. Su composición es la siguiente:

Bacto-Casitone (Difco)	0,5%
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,1%
Tampón KH ₂ PO ₄ -K ₂ HPO ₄	0,5 mM
Tampón Tris HCl	5 mM
Bacto-agar (Difco)	1,5%
pH 6,5	

2.4.2. En porta

Medio ½CTT-agar

Para el estudio del movimiento por deslizamiento en porta, con objeto de su estudio al microscopio óptico, se utilizó medio ½CTT con un 1% de agar.

2.5. MEDIOS PARA LA PRODUCCIÓN DE MINERALES

Con esta finalidad se han utilizado una serie de medios líquidos y sólidos especialmente destinados a la producción de distintos tipos de minerales teniendo estudios previamente realizados (Ben Chekroun, 2000). De acuerdo con este estudio, los medios elegidos son, en su mayoría, adecuados para la producción de carbonatos.

Estos medios se han elegido y algunos modificados para investigar la posible formación de diferentes minerales de carbonato cálcico y otros. La composición de todos ellos se da en la tabla 3. Se utilizaron en forma líquida y/o en forma gelificada por la adición de 1,8% de agar-agar purificado.

Tabla 3: Medios de cultivo para la producción de minerales.

MEDIOS											
COMPONENTES	M-2	M-3	M-9	CC	CM Ba	CM Mn	CM Zn	CM Co	CM Fe	CM Mg	A-4
Bacto-casitone	1%	1%	1%	0,3%							0,5%
K ₂ HPO ₄ KH ₂ PO ₄	-	-	10mM								30mM
CaCl ₂	-	-	-	0,1%		0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	0,1%	
Ca(CH ₃ COO) ₂ .4H ₂ O	1%	1%	1%	0,4%							
Mg(CH ₃ COO) ₂ .4H ₂ O	2%	-	-	-							
NaHCO ₃	-	-	-	0,3%							
Extracto levadura	-	-	-	0,1%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	0,4%	
K ₂ CO ₃ .1/2H ₂ O	0,2%	0,2%	0,2%	-							
Carbonato sódico											1%
NaF											0,16%
Metal					2mM	1mM	1mM	1mM	1mM	1mM	
Agar	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%	1,8%
pH	8	8	8	8	7	7	7	7	7	7	8

Las sales para la preparación de los medios CMBa, CMMg, CMZn, CMCo, CMFe y CMMg, se han añadido al medio CM, un medio de composición muy simple, a fin de evitar la formación de y/o precipitación de estos cationes, y son las siguientes:

	<u>Reactivo</u>	<u>Casa Comercial</u>
□ Cloruro de bario :	Cl ₂ Ba.2H ₂	Probus(Q.P)
□ Nitrato de manganeso:	MnN ₂ O ₆ .4H ₂ O	Fluka
□ Nitrato de cinc:	N ₂ O ₆ Zn.6H ₂ O	Fluka
□ Cloruro de cobalto:	Cl ₂ Co.6H ₂ O	Probus
□ Cloruro férrico:	FeCl ₃ .6H ₂ O	Merck
□ Sulfato magnésico:	MgSO ₄ .7H ₂ O	Panreac

En el caso de estos medios con sales, el pH se ha ajustado utilizando una solución NaOH 1N.

3.- TECNICAS GENERALES DE MICROBIOLOGÍA Y BIOQUÍMICA

3.1.- MODALIDADES DE CULTIVO

Los cultivos de los distintos experimentos se realizaron en medios sólidos y/o líquidos, y estos últimos en reposo y/o en agitación. La incubación de *M. xanthus* se realizó a 28°C .

Las condiciones de cultivo, y según los distintos experimentos a que iban destinadas, se detallan a continuación.

3.1.1.- Cultivos en medios líquidos

a) Cultivos en agitación

Cultivos en tubos de ensayo. Se utilizaron tubos de ensayo de 15 x 160 mm, con 5 ml de medio. La agitación se efectuó en agitador Certomat-R, Braun, a 165 rpm.

Cultivos en matraces Erlenmeyer. Se utilizaron matraces Erlenmeyer de 250 ml con 100 ml de medio. La agitación se llevó a cabo en un agitador orbital Gallenkamp, a 200 rpm. La inoculación se efectuó con 1 ml de cultivo en fase de crecimiento exponencial.

b) Cultivos en reposo

Los cultivos en reposo se realizaron tanto en tubos de ensayo como en matraces, y la inoculación se efectuó de igual manera que en los casos de cultivos en agitación.

3.1.2. Cultivos en medios sólidos

Para el estudio en medios sólidos se utilizaron placas de Petri de 90 mm de diámetro adicionadas de 20 ml de los distintos medios de cultivo. Según los casos, la inoculación se hacía por uno de los procedimientos siguientes:

- inoculación en estría
- inoculación mediante espátula de cristal
- inoculación de gotas de 50 μ l con micropipetas sobre la superficie del medio.

3.1.3. Cultivos en porta

Para el estudio del movimiento, como ya se ha indicado, se utilizó medio $\frac{1}{2}$ CTT con 1% de agar, para evitar la deshidratación. El medio se extendió sobre el porta en una fina capa mediante una pipeta pasteur, se dejó solidificar y se mantuvieron condiciones de saturación de humedad durante todo el experimento.

3.2. MEDIDAS TURBIDOMETRICAS

Se llevaron a cabo mediante la medida de los valores de absorbancia a 650 nm en un Spectronic 20 D a intervalos regulares de tiempo. Las determinaciones se hicieron en cultivos líquidos en tubos de ensayo y en matraces erlenmeyer con tubo lateral.

3.3. MEDIDAS DE pH

Se efectuaron con un pHmetro Crison micro pH 2001 o mediante papel indicador Merck.

3.4. MEDIDAS ESPECTROFOTOMETRICAS

Todas las medidas espectrofotométricas realizadas se han llevado a cabo en un espectrofotómetro Unicam 8625 UV/VIS Spectrometer.

3.5. DETERMINACION DE PROTEINAS

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 465 nm a 595 nm. Este incremento en la absorción a 595 nm sirve para determinar la concentración de proteínas.

El reactivo se preparó como se expone a continuación: 100 mg de colorante Coomassie Brilliant Blue G-250 se disuelven en 50 ml de etanol 95%; a esta solución se añaden 100 ml de ácido fosfórico 85%. La solución resultante se llevó a un volumen final de 1 litro (con agua destilada), manteniéndose en agitación durante dos horas y se filtró antes de su uso. Este reactivo es estable durante, al menos, un mes a temperatura ambiente.

Para realizar el ensayo, la solución problema conteniendo entre 10 y 50 μg de proteína, se completa hasta un volumen de 0,1 ml del tampón correspondiente y 5 ml del reactivo, se agita vigorosamente y se mide la absorción a 595 nm, no antes de 2 minutos ni después de 1 hora, frente a un blanco con 0,1 ml del mismo tampón y 5 ml del reactivo.

La concentración de proteína presente en las muestras ensayadas es deducida frente a una curva estándar obtenida en ensayos por triplicado con albúmina de suero bovino (Sigma). La curva estándar para el ensayo ($100-500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) y el micro ensayo ($10-100 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$) se obtuvo para cada litro de reactivo preparado.

3.6. TRATAMIENTO CON ULTRASONIDOS

El tratamiento con ultrasonidos fue utilizado durante el estudio de la fructificación, una vez ya formadas las mixósporas, con objeto de eliminar las células vegetativas y separar las células resistentes. Las suspensiones celulares de los distintos tiempos, en tampón fosfato pH 6.5, fueron sonicadas utilizando un sonicador Branson, B-12 Sonifier (Branson Sonic Power Co., Danburg, Connecticut) operando a 80 W durante periodos de 3 minutos con 1 minuto de descanso. Las muestras se mantuvieron todo el tiempo en hielo.

Las mixósporas se rompieron utilizando el mismo tipo de sonicador.

3.7. CURVAS DE CRECIMIENTO

Para realizar las curvas de crecimiento de la cepa salvaje de *M. xanthus* DZF1 así como la del mutante, se emplearon como inóculo (4%) cultivos en fase estacionaria, crecidos durante un día a 28°C y se inoculaba una cantidad tal que todas las cepas a estudiar partieran con la misma densidad óptica y con un inóculo de la misma fase, de forma que se comenzara el estudio al principio de la fase exponencial o al final de la fase lag.

3.8.-OBTENCIÓN DE CUERPOS FRUCTIFICANTES

Para el estudio del ciclo de desarrollo de los mutantes y su comparación con el fenotipo salvaje, los cultivos se crecieron en medio CYE durante la fase exponencial. Cuando llegaron a una densidad óptica de 1.5 (600 nm) se concentraron 40 veces en

tampón TM (10 mM tris-HCl, pH 7,5; 8 mM MgSO₄), de forma que se obtuviera la misma densidad en todos los cultivos. A partir de estas muestras, se colocaron gotas de 20 ml en placas de agar CF, se dejaron secar y se incubaron a 28° C durante varios días hasta que se forman cuerpos fructificantes maduros.

3.9. RECUESTO DE ESPORAS

Los cuerpos fructificantes maduros fueron recogidos de la superficie de la placa, resuspendidos en tampón TM y sonicados a 80W, como se ha indicado anteriormente. Mediante este tratamiento, las células vegetativas y las esporas inmaduras son eliminadas, consiguiéndose además la separación de las esporas entre sí, para facilitar el recuento, que se realizó con una cámara Petroff Hausser. En los casos donde la adherencia entre esporas era excesiva, se añadió al tampón TM un 0,1% de SDS.

3.10. ESTUDIO DE LA GERMINACIÓN

Para analizar la capacidad de germinación de las esporas, tras el tratamiento anterior, se tomaron volúmenes discretos de suspensiones, con cantidades conocidas de esporas y se mezclaron con 3 ml de medio CYE al 0,7% de agar en sobrefusión. Esta sobrecapa se vertió sobre placas de CYE-agar y se dejaron solidificar. Al cabo de una semana aparecen colonias de mixobacterias que corresponden cada una a una espora diferente.

3.11. ESTUDIO DEL MOVIMIENTO

El movimiento se estudió en placa, para su observación con lupa binocular y en porta, para su observación en microscopio de contraste de fases.

En el primer caso, los cultivos se crecieron en medio CYE durante la fase exponencial. Cuando llegaron a una densidad óptica de 1,5 (600 nm) se concentraron 10, 20 y 40 veces en tampón TM (10 mM tris-HCl, pH 7,5; 8 mM MgSO₄), de forma que se obtuviera la misma densidad en todos los cultivos. A partir de estas muestras, se

colocaron gotas de 20 μ l en placas de agar ½CTT al 1,5% de agar, se dejaron secar y se incubaron a 28° C durante varios días con observación continuada

En el segundo caso, se siguió el mismo protocolo y se colocaron gotas de cultivos en portas de cristal cubiertos con una fina capa de ½CTT al 1% de agar. Una vez secas las muestras, los portas se colocaron en cámaras donde se mantenían condiciones de humedad altas y se incubaron a 28° C con observación periódica al microscopio de contraste de fases.

3.12. ESTUDIO DE LA CAPACIDAD DE AGREGACIÓN Y COHESIÓN

3.12.1. Ensayo de agregación.

Las células se recogieron de un cultivo líquido por centrifugación a 10.000xg durante 10 min. a 4° C. Posteriormente se resuspendieron hasta 4000 Klets en tampón TM y se colocaron alícuotas de 10 y 20 μ l en placas CF e incubadas a 30° C. Se utilizaron diferentes placas para diferentes tiempos de incubación. A partir de aquí, las células fueron recogidas a los tiempos indicados y resuspendidas en 1 ml de tampón TM. En este proceso era crucial no romper los agregados celulares. Las células y los agregados fueron centrifugados en tubos eppendorf de 1.5ml a 12000xg durante 1.5 min. en una microfuga. Tras resuspender en 400 μ l de tampón TM, se separaba una alícuota para medir la cantidad total de proteína. El resto de la suspensión se centrifugaba a 50xg durante 5 min. para precipitar los agregados. Las células individuales se mantenían en suspensión. El sobrenadante era separado cuidadosamente del precipitado, que a su vez era resuspendido en 400 μ l de tampón TM y la cantidad de proteína de cada muestra se medía en un lector de placas microtiter de Biorad a 595 nm usando el reactivo de proteínas de Biorad.

En el caso de que la estimación de la agregación se realizara mediante la medida del peso seco, el protocolo seguido fue el mismo, excepto que, tras centrifugar a bajas revoluciones, precipitados y sobrenadantes se secaron en un horno Pasteur durante toda la noche. Una vez secas las muestras, se pesaban en una balanza de precisión y se

sustraía el peso del tubo eppendorf en que se encontraba la muestra y que se había pesado previamente.

3.12.2. Ensayo de cohesión.

Este ensayo se realizó según la técnica publicada al respecto previamente (Shimkets, 1986). Las células se crecieron hasta alcanzar una densidad óptica de 100 unidades Klett, se centrifugaron a 10000xg durante 5 min. a 4° C, se lavaron en tampón MOPS 10 mM (ácido morpholinepropanesulfónico) pH 6.8 y se resuspendieron en tampón de aglutinación (MOPS 10 mM, con MgCl₂ 1 mM y CaCl₂ 1mM) hasta una densidad óptica de 100 unidades Klett. Las células se incubaron sin agitación a 30° C y se midieron los cambios en turbidez. En un experimento separado, las células fueron resuspendidas hasta 100 unidades Klett en tampón de aglutinación conteniendo 5 µg/ml de rojo Congo. La suspensión celular fue incubada a 26°C sin agitar. A varios tiempos se separó una alícuota y se centrifugó a 12000xg durante 5 min a 4° C. la absorbancia del sobrenadante se midió a 500nm para monitorizar la cantidad de rojo Congo que quedaba en suspensión (Arnold y Shimkets, 1988).

4.PRODUCTOS Y REACTIVOS EMPLEADOS.

Antibióticos

Los antibióticos, disueltos en agua o etanol, se adicionaron a los medios de cultivo a partir de soluciones 100 veces concentradas. Las soluciones acuosas fueron esterilizadas mediante filtración a través de membranas de 0,45 µm de tamaño de poro (Minisort Sartorius).

Las concentraciones empleadas fueron: Ampicilina (Amp) 50 µg/ml, Kanamicina (Km) 50 µg/ml, Cloranfenicol (Cm) 20 µg/ml, Tetraciclina (Tet) 10 µg/ml (Sigma Chemical Co USA).

Enzimas

Las enzimas utilizadas fueron suministradas por Boehringer Mannheim y Amersham Life Science.

Electroforesis en geles de poliacrilamida

Acilamida (Serva) y Bis Acilamida (Promega), SDS (Sigma), persulfato amónico, azul de bromofenol B0126 (Merck), TEMED (N',N',N',N-Tetramethylethylenediamine, Sigma), mercaptoetanol (Serva) y Page Blue 83 (BDH).

Membranas para transferencias de proteínas

Las membranas (0,45µm) de nitrocelulosa (NC BA85) y de nylon (Nytran) fueron suministradas por Schleicher and Schuell.

Disolventes

Acetonitrilo, isopropanol y ácido trifluoroacético (TFA) de alta pureza para HPLC (Scharlau).

Otros productos utilizados

Fenol, sacarosa, etanol absoluto, n-butanol, hidróxido sódico y ácido clorhídrico (Merck).

Cloruro sódico, citrato sódico, cloroformo, éter etílico y ácido tricloroacético (Panreac).
Albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma) y reactivo de bloqueo (Boehringer Mannheim).

5. TÉCNICAS DE PROTEÍNAS

5.1. PREPARACIÓN DE GELES PAGE-SDS

Gel de desarrollo al 15% de poliacrilamida (10 ml):

Acrilamida: Bis acrilamida (30%)	2,3 ml
Tris-HCl 1M, pH 8,8	2,5 ml
SDS (10%)	0,1 ml
Agua destilada	2,3 ml
Persulfato amónico (10%)	0,1 ml
TEMED	4 μ l

Gel de concentración al 5% de poliacrilamida (5 ml)

Acrilamida: Bis acrilamida (30%)	0,83 ml
Tris-HCl 1 M, pH 6,8	0,63 ml
SDS (10%)	0,05 ml
Agua destilada	3,4 ml
Persulfato amónico (10%)	0,05 ml
TEMED	5 μ l

5.2. CONDICIONES DE DESARROLLO DE LA ELECTROFORESIS

Las muestras a analizar y los marcadores de peso molecular empleados como referencia (Sigma Low Maker Range 6.500 - 66.000 d), se mezclaron en proporción 3:1 con la solución desnaturizante (4x) y se calentaron al baño maría durante 5 min a 100°C antes de ser aplicadas a los pocillos del gel.

La electroforesis se llevó a cabo a voltaje constante de 150 V hasta que el indicador de frente alcanzó el final del gel, empleando como tampón para los electrodos Tris-glicocola pH 8,3.

Solución desnaturalizante (4x)

Tris-HCl 1M, pH 6,8	2,5 ml
SDS (10%)	4 ml
Glicerol	2 ml
β -Mercaptoetanol	330 μ l
Azul de Bromofenol	0,004g
Agua destilada hasta	10 ml

Tampón de electroforesis

Tris base	0,025 M
Glicocola	0,192 M
SDS, pH 8,3	0,1%

5.3. REVELADO DE GELES

La tinción de las proteínas en los geles se realizó con azul de Coomasie al 0,25% en metanol:acético:agua (50:10:40) durante 1 hora. Para la posterior decoloración se empleó una mezcla de metanol:acético:agua (5:10:85).

Los geles una vez teñidos y decolorados se conservaron sumergiéndolos en una solución de glicerol (4%) durante 30 min y a continuación se secaron a vacío durante 2h a 70°C en un secador de geles (BioRad, modelo 583). Los geles entonces, se fotografiaron empleando una película Kodak en B/N (100 ASA).

Colorante

Page Blue 83 (BDH, Chemical LTD, Inglaterra)	0,2 g
Metanol	50 ml
Ácido acético glacial	10 ml
Agua destilada hasta	100 ml

6. TÉCNICAS DE PRODUCCIÓN, AISLAMIENTO Y PURIFICACIÓN DE LOS CRISTALES

6.1. EN MEDIOS LÍQUIDOS

Los cristales adheridos a las paredes del matraz se despegaron con un asa de platino y se recogieron por decantación eliminando el medio de cultivo. Los cristales sueltos en el medio de cultivo también se recogieron por decantación. Los cristales se lavaron repetidas veces con agua destilada hasta que quedaban limpios y por último se secaron en estufa de 37° C.

6.2. EN MEDIOS SÓLIDOS

La recuperación de los cristales se llevó a cabo mediante distintos métodos dependiendo de la situación de los cristales respecto al medio de cultivo.

-Cristales formados en la superficie del medio de cultivo. Para la recuperación de estos cristales se procedía raspando con asa de siembra y posteriormente eran depositados en placa de Petri limpia y lavados con agua destilada varias veces a fin de eliminar los restos del medio y de las células. Finalmente, el agua se eliminaba por evaporación en una estufa de 37° C.

-Cristales incrustados en el medio. Los cristales se recuperaron fundiendo los medios de agar-agar en horno microondas. Para ello se cortaron los trozos de medio de cultivo que contenían cristales incrustados y se depositaron en un vaso de precipitados, se les adicionó agua destilada, y se fundieron en horno microondas a 600 W durante 50 segundos. Por último los cristales se lavaron varias veces con agua destilada a fin de quitarles los restos celulares y de agar, y se secaron en una estufa a 37° C.

7. IDENTIFICACIÓN DE LOS CRISTALES

La identificación de los cristales se realizó mediante difracción de rayos X y/o microanálisis y difracción de electrones.

7.1. TÉCNICAS DE MICROSCOPIA

7.1.1. Microscopía óptica

Para el estudio del movimiento y de la fructificación se utilizaron un microscopio y una lupa Leitz binocular. En el recuento de mixósporas se usó una cámara de recuento de bacterias Petroff-Hausser.

Para la observación de los cristales se utilizó un microscopio Leitz binocular. Los cristales fueron observados directamente en las placas de Petri producidos y extraídos de los correspondientes medios de cultivo.

7.1.2. Microscopía electrónica de barrido (MEB)

Para la observación de las esporas y de las fimbrias en el microscopio electrónico de barrido (Zeiss DSM-950), las muestras se colocaron en membranas de Nucleopore de 13 mm y 0.2nm de tamaño de poro y fueron fijadas durante 2 min. tres partes de OsO₄ al 6%, tres partes de agua y una parte de HgCl₂ saturado. Posteriormente fueron lavadas tres veces en 0.1 M cocadilato pH 7.2 y 0.5% de sacarosa y deshidratadas a través de una serie de concentraciones crecientes de etanol (50, 70, 90, 95 y 100%) durante 10 minutos cada una. Seguidamente fueron secadas al punto crítico de CO₂. Las muestras secas fueron cubiertas con 25 nm de Gold-Palladium y observadas al MEB.

Para la observación y análisis de las muestras minerales se utilizó el mismo microscopio de barrido (Zeiss DSM-950), equipado con un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos X (Link QX 2000). Las muestras fueron preparadas

mediante vaporización con carbono. Para el microanálisis, las muestra fueron excitadas a 20 Kv y ventana de berilio. Una vez realizados los microanálisis correspondientes, las muestras se metalizaron con oro para la observación de la morfología de los cristales. Esto permite la obtención de imágenes de más calidad y mejor contrastadas.

7.1.3. Microscopía electrónica de transmisión (TEM).

Preparación de muestras biológicas

Las muestras se lavaron y resuspendieron en una suspensión en tampón Tris-HCl pH 6.5 y se mantuvieron en hielo durante aproximadamente cuatro horas antes de la fijación. Posteriormente fueron centrifugadas y lavadas en tampón fosfato durante 30 min. El protocolo de fijación y deshidratación fue como sigue:

2 horas en tampón fosfato 0.1M con glutaraldehído al 2.5%

Lavar en tampón fosfato 0.1 M

1 hora en tampón fosfato 0.1M con tetraóxido de Osmio al 1%

Lavar en tampón fosfato 0.1M

Deshidratación en etanol:

Etanol 50% 10min.

Etanol 75% 10min.

Etanol 85% 10min.

Etanol 95% 10min.

Etanol anhidro 1 hora

Las esporas fueron transferidas en óxido de propileno al 100% durante 30 min. y se fueron añadiendo gradualmente concentraciones mayores de resina Epóxida hasta que se alcanzó el 100% de resina. Seguidamente, las esporas se colocaron en moldes y fueron polimerizadas durante toda la noche a 68° C Finalmente, las esporas fueron seccionadas y teñidas con uranyl-acetato al 2% en agua y observadas con microscopio de transmisión.

Preparación de muestras minerales

Las distintas muestras a observar se prepararon de dos formas distintas, según las condiciones del experimento.

a) Las muestras se fijaron en una solución al 2% de glutaraldehído en tampón cacodilato 0,1 M pH 7,4 durante 2 horas a 4° C. A continuación se lavaron 3 veces en tampón cacodilato durante 10 minutos, se deshidrataron en gradiente de etanol del 30% al 100% y óxido de propileno durante 10 min. Después se embebieron durante 1h en una mezcla óxido de propileno-resina (Spurr) 1:1 y se dejaron toda la noche en resina pura. Posteriormente las muestras se polimerizaron en estufa a 60° C durante 14 h. Los cortes ultra finos de 2500 Å de sección fueron realizados con una cuchilla de diamante en un ultramicrotomo Reichert Ultracut S, montados sobre rejillas de cobre y sombreadas con carbón. Algunos cortes se contrastaron con acetato de uranilo y citrato de plomo. Las muestras así preparadas quedaban listas para su observación con MET.

b) Los cristales secos se suspendieron en etanol puro, y después se pusieron gotas de 10 µl de la suspensión sobre rejillas de cobre previamente metalizadas con carbón. Se dejaron secar en estufa a 37° C durante dos horas. De esta forma las muestras quedan listas para su observación con MET.

Para la observación de ambos tipos de muestras se utilizó un microscopio electrónico de transmisión de alta resolución Philips (CM 200, 200 Kv) dotado de un sistema de microanálisis por energía dispersiva de rayos X y de difracción de electrones.

7.2. ANÁLISIS DE DIFRACCIÓN DE RAYOS X

La difracción de rayos X se llevó a cabo con un difractómetro Philips PV 1710, radiación CuK α , rendija automática, monocromador de grafito y una velocidad de exploración de 1-6° por min.



IV.RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL FENOTIPO DEL MUTANTE *M. xanthus* DZF1 Δ oar.

El primer paso realizado para el estudio del fenotipo de este mutante fue comprobar que dicho fenotipo se mantenía tal y como había sido publicado con anterioridad, en las condiciones de cultivo de nuestro laboratorio. Para ello se compararon las dos cepas de *M. xanthus* DZF1, tanto en el crecimiento vegetativo, como en el ciclo de desarrollo y la producción de esporas.

1.1. Curvas de crecimiento

El estudio de las curvas de crecimiento se realizó según lo indicado en Material y Métodos: se partió de cultivos con una densidad óptica similar y en fase lag y se siguió tomando medidas de D.O. cada 3 horas hasta que los cultivos se lisaban superadas ya las 160 horas de incubación. El experimento se repitió 3 veces, con el resultado, en medias aritméticas, que se expone a continuación (tabla 4) y su representación gráfica (figura 9).

Tabla 4: *Curvas de crecimiento de las cepas salvaje y mutante de M. xanthus.*

Tiempo (h)	DO (DZF1)	DO (Oar)
0	0,06	0,05
3	0,13	0,1
6	0,3	0,2
9	0,48	0,31
24	1,3	1,24
28	1,5	1,48
31	1,5	1,53
48	1,63	1,81
52	1,55	1,83
70	0,65	1,27
76	0,49	1,08
79	0,41	0,98
93	0,2	0,61
103	0,18	0,48
118	0,2	0,38
127	0,18	0,33
142	0,19	0,32
151	0,19	0,25
166	0,18	0,22

Como se ha indicado con anterioridad, no existen grandes diferencias entre una cepa y otra. Sin embargo nos llamó la atención dos hechos que se repetían: un ligero menor crecimiento del mutante al comienzo de la curva que sin embargo alcanzaría valores mayores al final de la fase exponencial y en la lisis. Sin embargo, durante el experimento, se pudo comprobar que la cepa mutante no se adhería a la pared del cristal, como sí es habitual en la cepa salvaje. Dedujimos pues, que estas diferencias en la curva no eran debidas al propio crecimiento de las dos cepas, sino al hecho de que, al no adherirse, el 100% de las células mutantes quedaban en suspensión, subiendo ligeramente la D.O.

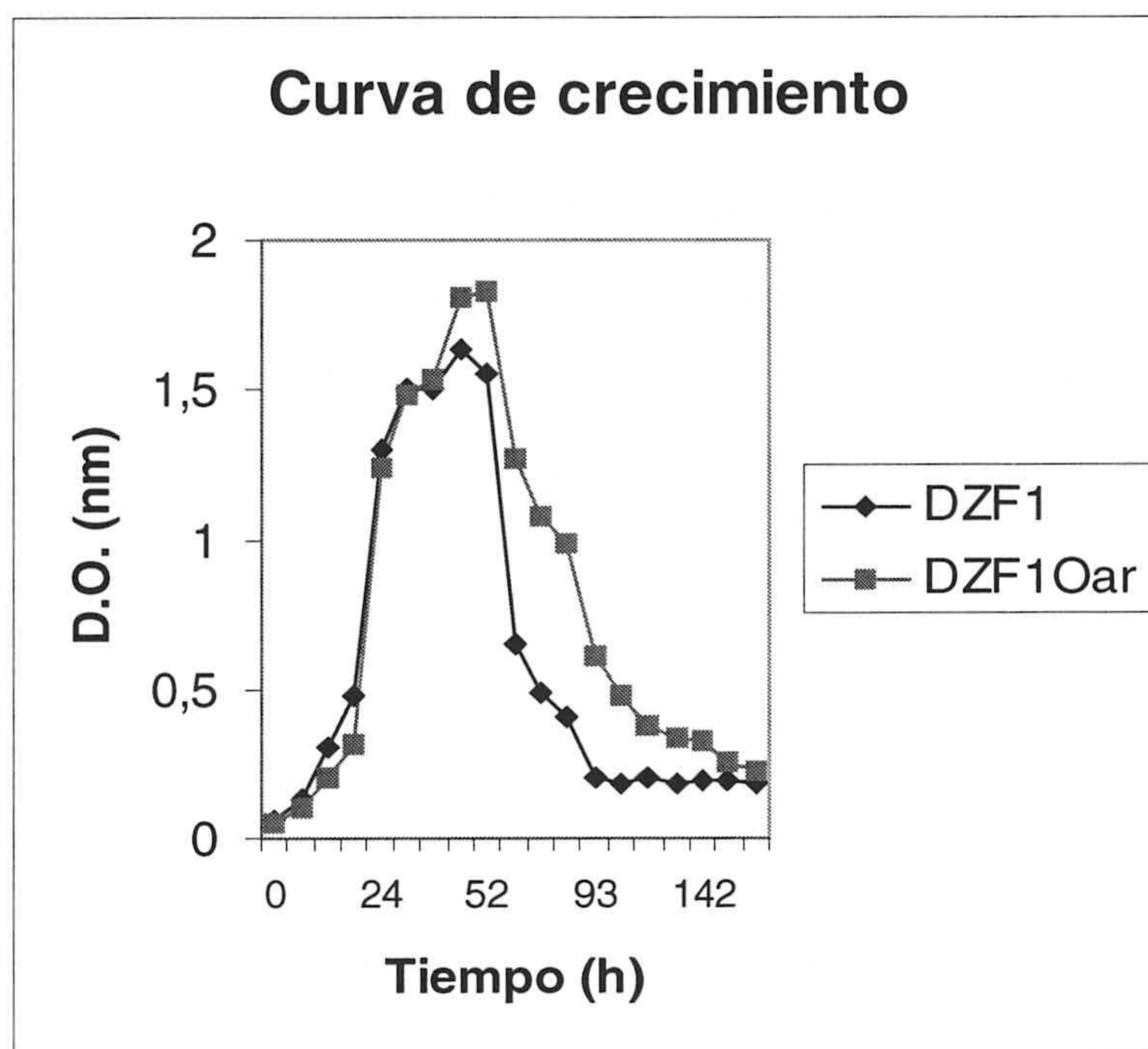


Figura 9: Representación gráfica de las curvas de crecimiento de las cepas salvaje y mutante de *M. xanthus*.

Otra característica que observamos fue que, si bien la cepa salvaje se lisaba completamente tras 140 horas de incubación, al observar la cepa mutante al microscopio óptico se pudo comprobar que, aproximadamente la mitad de las células existentes en suspensión eran bacilos con aspecto enfermo y ligeramente lisado. Sin embargo había

también un porcentaje muy alto de formas redondas similares a esporas, pero sin la refringencia característica de las mismas.

1.2. Estudio del movimiento

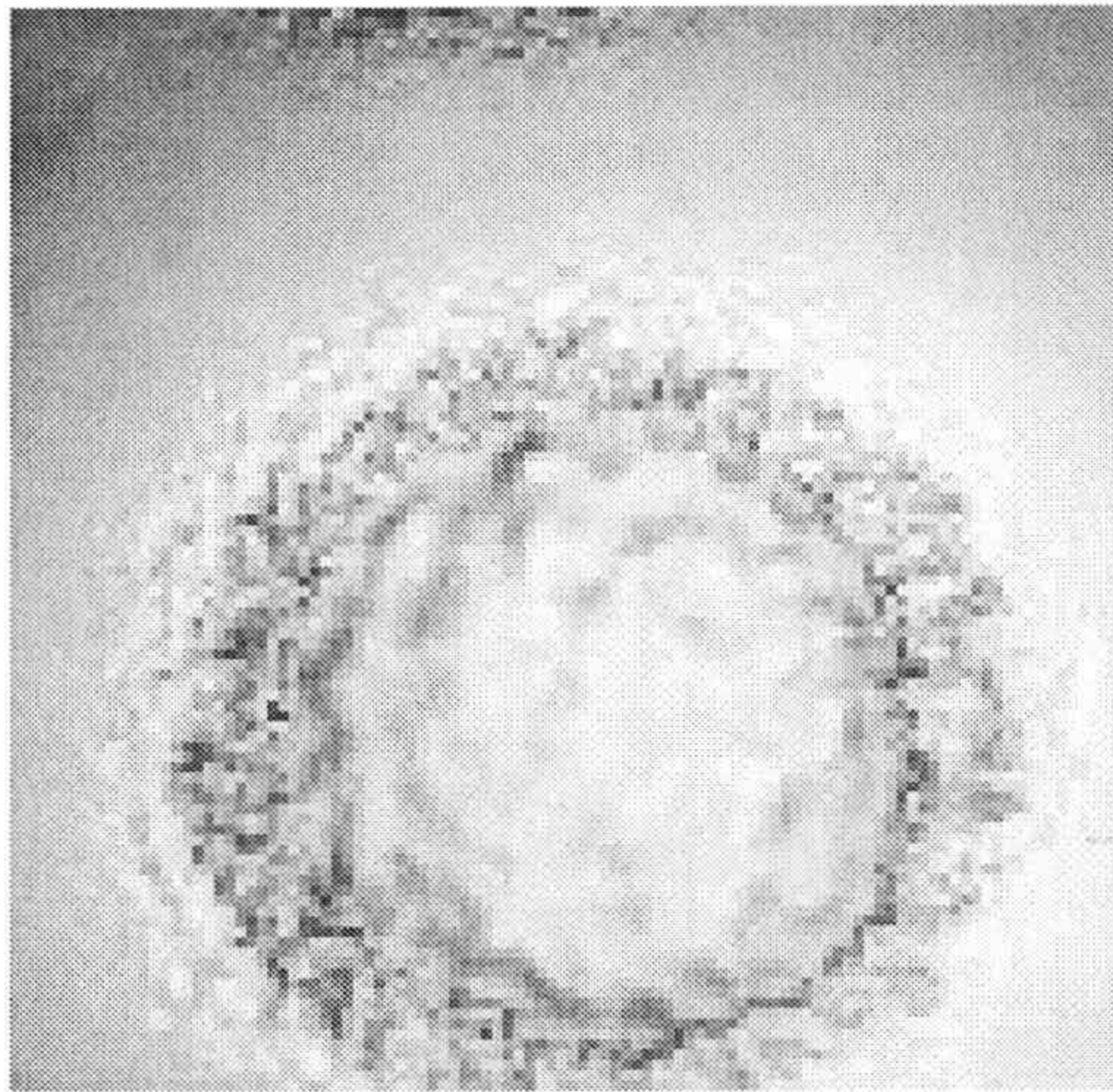
Una vez estudiado el ciclo vegetativo del mutante, quisimos confirmar que estas cepas no presentaban ningún defecto a nivel de movimiento. Muchos de los fallos a la hora de producir cuerpos fructificantes viables vienen dados por anomalías en el movimiento aventurero o social de las cepas, ya que ambas facetas de las mixobacterias están unidas muy íntimamente.

El estudio del movimiento se hizo a tres niveles: se observó el movimiento de los enjambres en placa, tanto a simple vista como a través de lupa de aumento para la observación detallada de los bordes, y se estudió también a través del microscopio de contraste de fases para la observación detallada del comportamiento de las células individuales. Los resultados obtenidos se indican a continuación.

1.2.1. Estudio del movimiento de los enjambres en placa.

El estudio en placa se llevó a cabo tal y como se indica en Material y Métodos. Los cultivos se crecieron en medio CYE durante la fase exponencial. Cuando llegaron a una densidad óptica de 1,5 (600 nm) se concentraron 10, 20 y 40 veces en tampón TM, de forma que se obtuviera la misma densidad en todos los cultivos. A partir de estas muestras, se colocaron gotas de 20 μ l en placas de agar $\frac{1}{2}$ CTT al 1,5% de agar, se dejaron secar y se incubaron a 28° C durante varios días con observación continuada.

Como se puede comprobar en la figura 10, no hubo diferencias apreciables entre las dos cepas.



A



B

Figura 10: Estudio del movimiento en placa utilizando medio de cultivo $\frac{1}{2}$ CTT. (A) cepa salvaje (x4000), (B) cepa mutante (x4000).

1.2.2. Estudio del movimiento de los enjambres en porta.

Para el estudio de los enjambres en porta se siguió el mismo protocolo que en el caso de las placas: se colocaron gotas de cultivos en portas de cristal cubiertos con una fina capa de $\frac{1}{2}$ CTT al 1% de agar. Una vez secas las muestras, los portas se colocaron en cámaras donde se mantenían condiciones de humedad altas y se incubaron a 28° C con observación periódica al microscopio de contraste de fases.

Los problemas más acuciantes en este grupo de experimentos eran dos: por una parte, la fina capa de agar se secaba con mucha facilidad, por lo que era esencial mantener condiciones de humedad máxima y continuada. Por otra parte, esta misma humedad favorecía las contaminaciones, lo que se solucionó añadiendo ampicilina al medio en el porta así como al tampón que se usaba para humedecer las cámaras.

Este tipo de observación al microscopio nos permitía distinguir el comportamiento de los enjambres en los bordes a nivel de células individuales. Así pudimos comprobar que las dos cepas presentaban un movimiento completamente normal tanto a nivel social como aventurero. Así, en la figura 11, se observan imágenes

del salvaje y el mutante al microscopio de contraste de fases. En todas estas microfotografías se pueden ver grupos de bacterias que se desgajan del enjambre de forma conjunta (movimiento social) así como bacterias que se separan unas cuantas micras unas de otras (movimiento aventurero). De aquí se deduce que no existe un defecto evidente en ninguno de los dos aspectos del movimiento mixobacteriano de estas cepas mutantes.

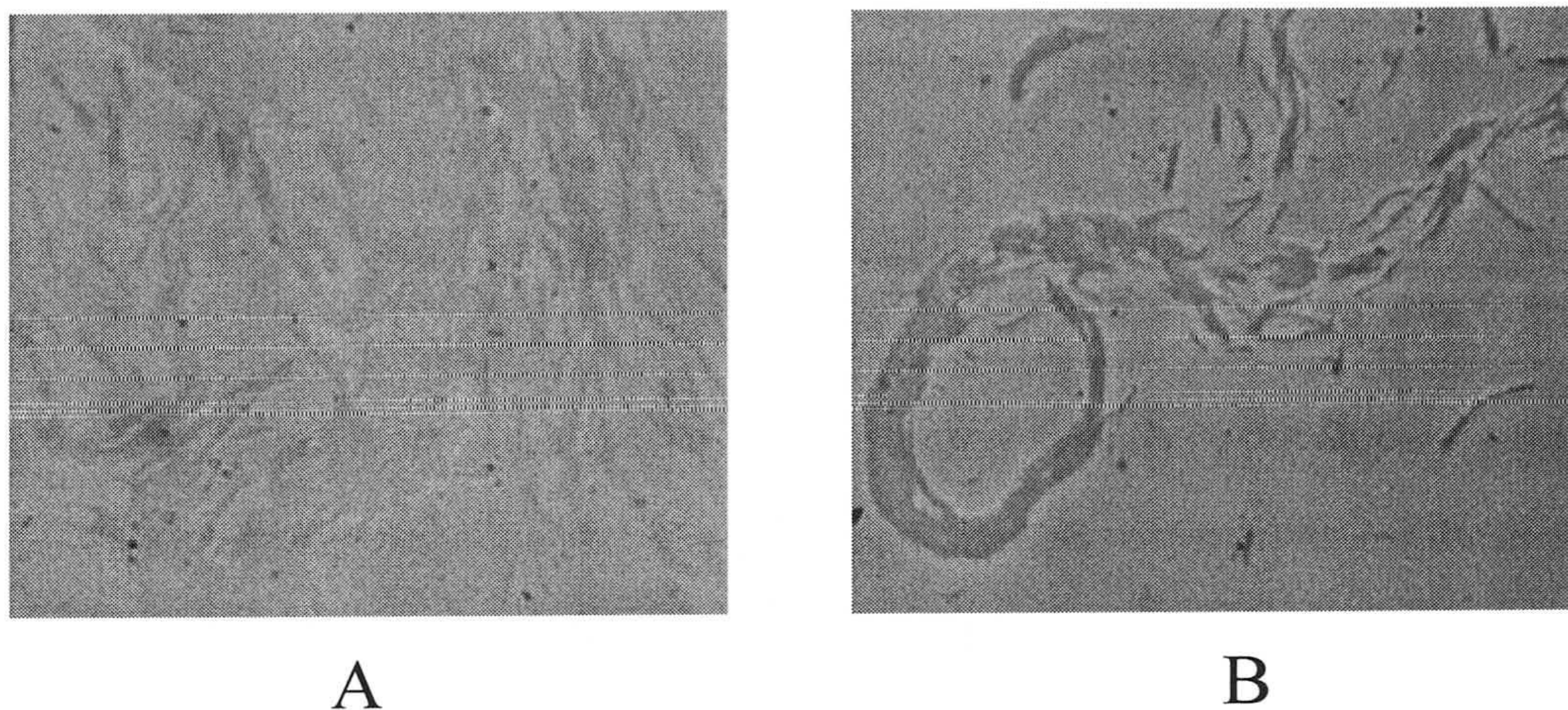


Figura 11: Observación del movimiento en portaobjetos al microscopio óptico; (A) cepa salvaje, (B) cepa mutante.

1.3. Producción de cuerpos fructificantes

El siguiente paso fue confirmar el comportamiento durante el proceso de desarrollo. Para ello se crecieron los cultivos bajo condiciones de falta de nutrientes en un medio definido (CF) tal y como se indica en Material y Métodos.

En condiciones normales, al cabo de 4-5 días las cepas salvajes de *M. xanthus* han completado totalmente la formación de cuerpos fructificantes maduros en cuyo interior se encuentran las mixósporas, formas de resistencia que se encuentran agrupadas. En muchas mixobacterias, el cuerpo fructificante toma una forma ramificada compleja, encontrándose las mixósporas asociadas en especies de ramas terminales denominadas mixosporangios. En el caso de *M. xanthus*, las formaciones no alcanzan tal magnitud, sino que consisten más bien en formas esféricas que reposan directamente sobre el medio sin que haya tallo alguno que medie. La madurez se detecta en la

opacidad de estos cuerpos fructificantes, así como en su individualidad y capacidad de producir mixósporas sanas. Cuando los cultivos mutantes de *M. xanthus*, así como el control salvaje, se pusieron en las condiciones idóneas para formar cuerpos fructificantes, la cepa mutante no produjo cuerpos fructificantes en ninguna ocasión, tal y como se esperaba (figura 12). Tan solo se podía observar un ligero intento de agregación a partir de las 120 horas, sin llegar a constituir cuerpos fructificantes maduros.

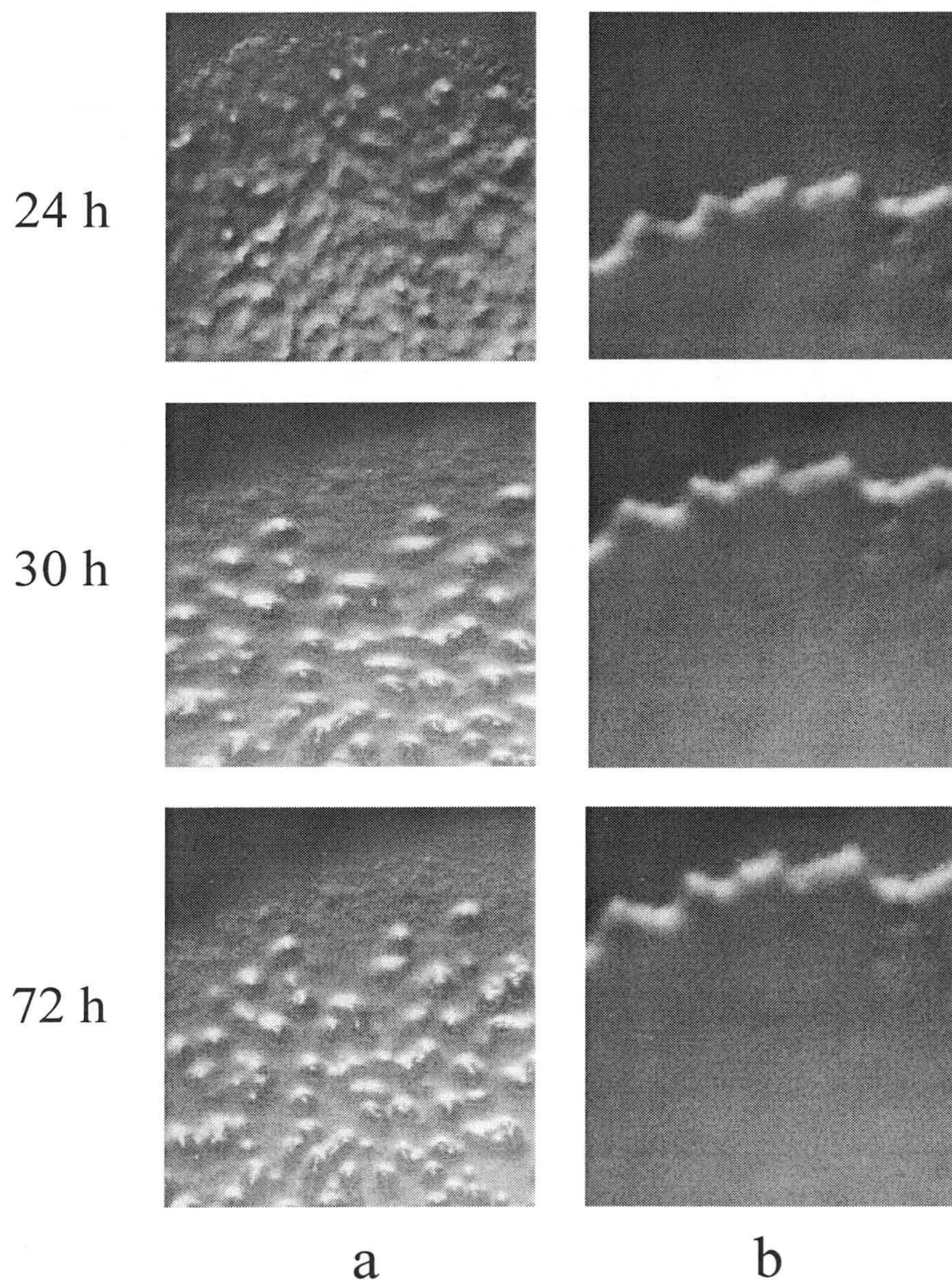


Figura 12: Fenotipos de los cuerpos fructificantes de la cepa salvaje (a) y mutante (b) en medio de cultivo CF, observados a través de lupa esteroscópica en los tiempos indicados.

Para conocer más acerca del alcance de este defecto y/o sus causas, se continuó con el estudio de las esporas producidas y su viabilidad, así como con el estudio del movimiento, ya que éste es esencial para la transmisión de señales y para la migración de las células durante la fructificación.

1.4. Estudio de la esporulación

Para estudiar la esporulación, las células se recogieron del medio CF, donde siguen el ciclo de desarrollo, a determinados tiempos hasta alcanzar las 140-160 horas, se resuspendieron en tampón TM y se sonicaron durante tres minutos para eliminar las células vegetativas no esporuladas y para separar bien entre sí las esporas restantes. Posteriormente, las esporas se contaron en una cámara de Petroff-Hausser en el microscopio óptico (ver Material y Métodos).

El experimento se hizo varias veces sin que hubiera variación significativa. La figura 13 muestra la representación gráfica del proceso de esporulación.

*Tabla 5: Esporulación de la cepa DZF1 de *M. xanthus* y su mutante a diversos tiempos. Porcentaje de esporulación del segundo con respecto al primero (%mut/DZF1).*

Tiempo (h)	DZF1(x10⁹)	Mut (x10⁹)	%mut/DZF1
24	0	0	0
48	5,6	0,35	6
72	7,6	1,9	17
96	8,1	1,7	18,5
168	7,9	3,5	44

Como se observa, hasta las 96 h el mutante produce solo un 30% de las esporas que produce la cepa salvaje, quedando en todo caso siempre por debajo del 50% incluso tras mucho tiempo de incubación.

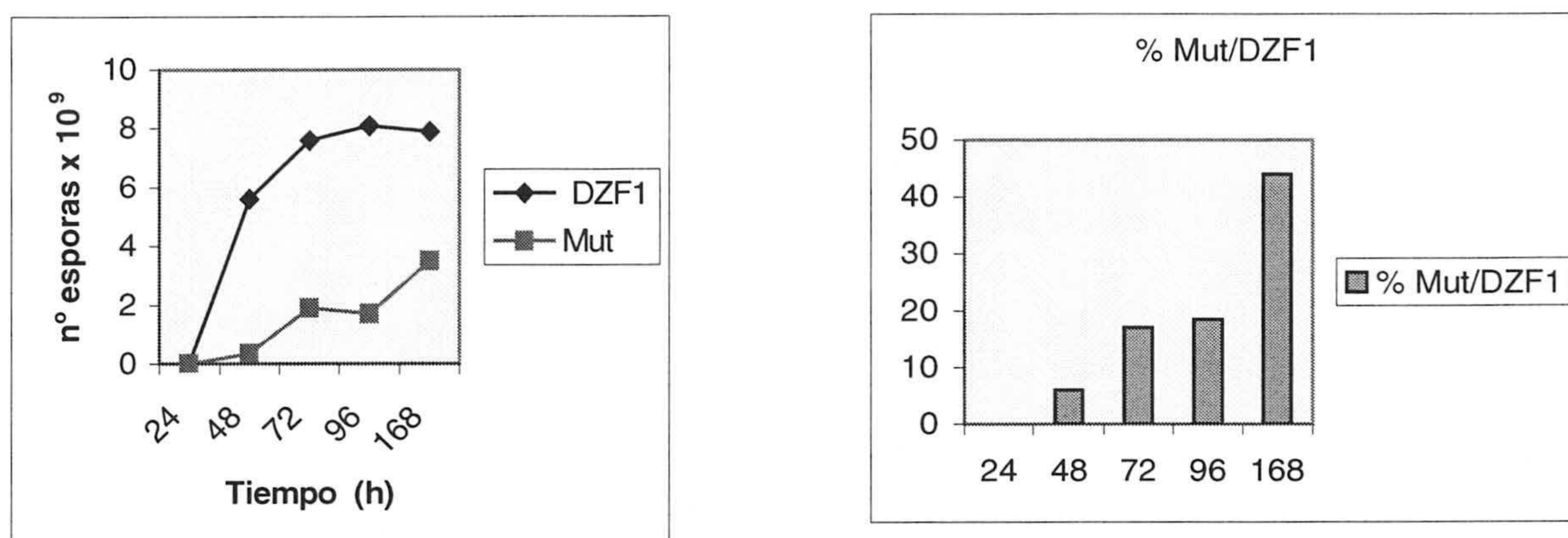
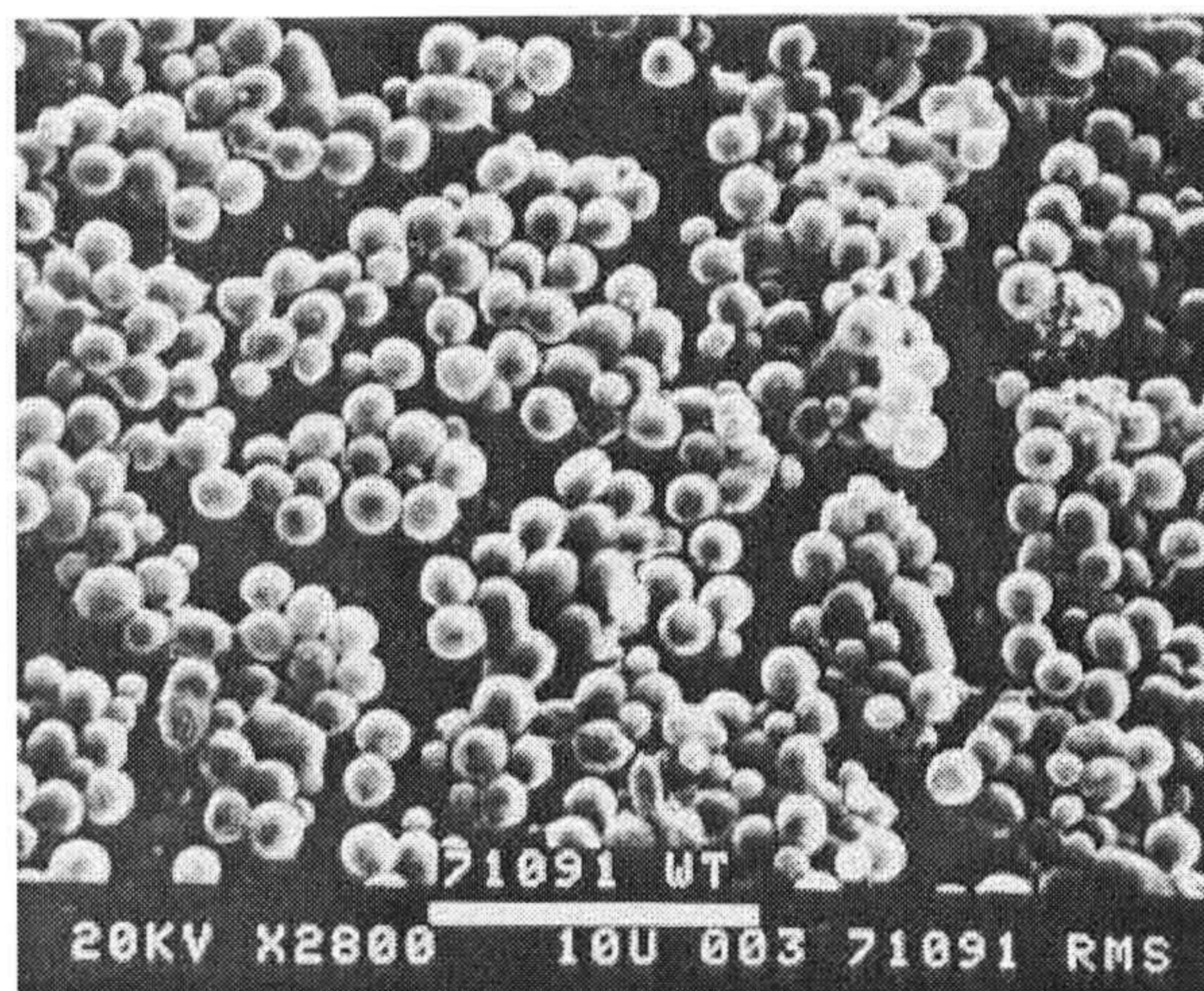


Figura 13: Representación gráfica del proceso de esporulación de la cepa DZF1 de *M. xanthus* y su mutante, a diversos tiempos.

1.4.1. Estudio de las esporas a microscopía electrónica

Una vez contabilizado el número de esporas, decidimos hacer un estudio más profundo a nivel de microscopía electrónica. Ya en la observación a microscopio óptico nos llamó la atención el hecho de que las esporas mutantes no presentaban tendencia a agregarse, lo que sí ocurre normalmente en las cepas salvajes. De hecho, el recuento de esporas salvajes era arduo porque, inmediatamente después de sonicar y separar las esporas, éstas se volvían a agregar. Para el estudio a microscopía electrónica, las muestras de esporas de ambas cepas se sometieron a los tratamientos indicados en la sección de Material y Métodos. De nuevo pudimos constatar la falta de agregación de las esporas del mutante, que hacía que perdiéramos la muestra mutante en los sucesivos lavados.

Al principio no podíamos localizar el problema y aumentábamos la concentración de esporas mutantes. Finalmente, con estas medidas y un aumento de las rpm en la centrifugación pudimos conseguir imágenes de ambas cepas (fig. 14, 15 y 16).

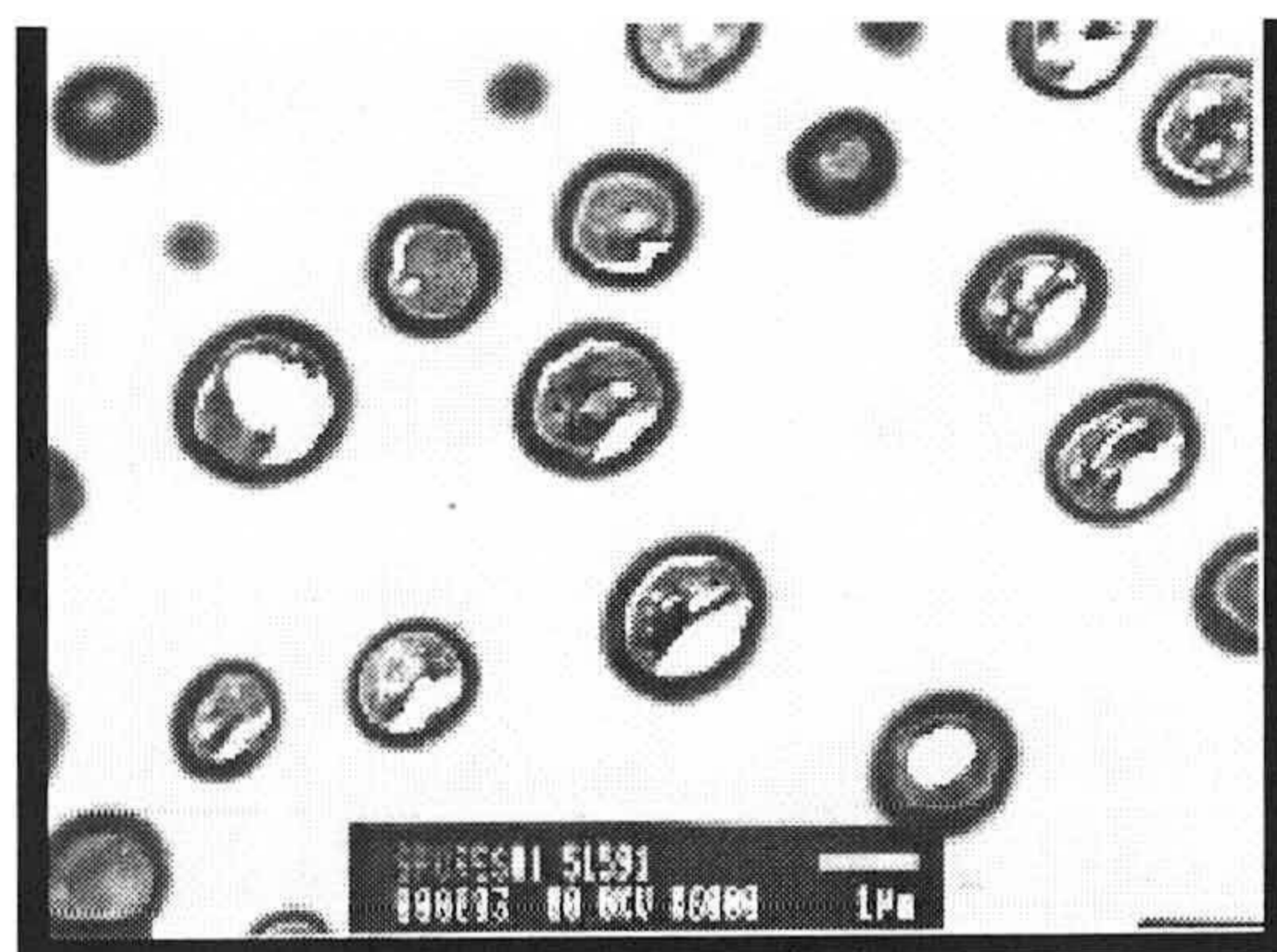


A

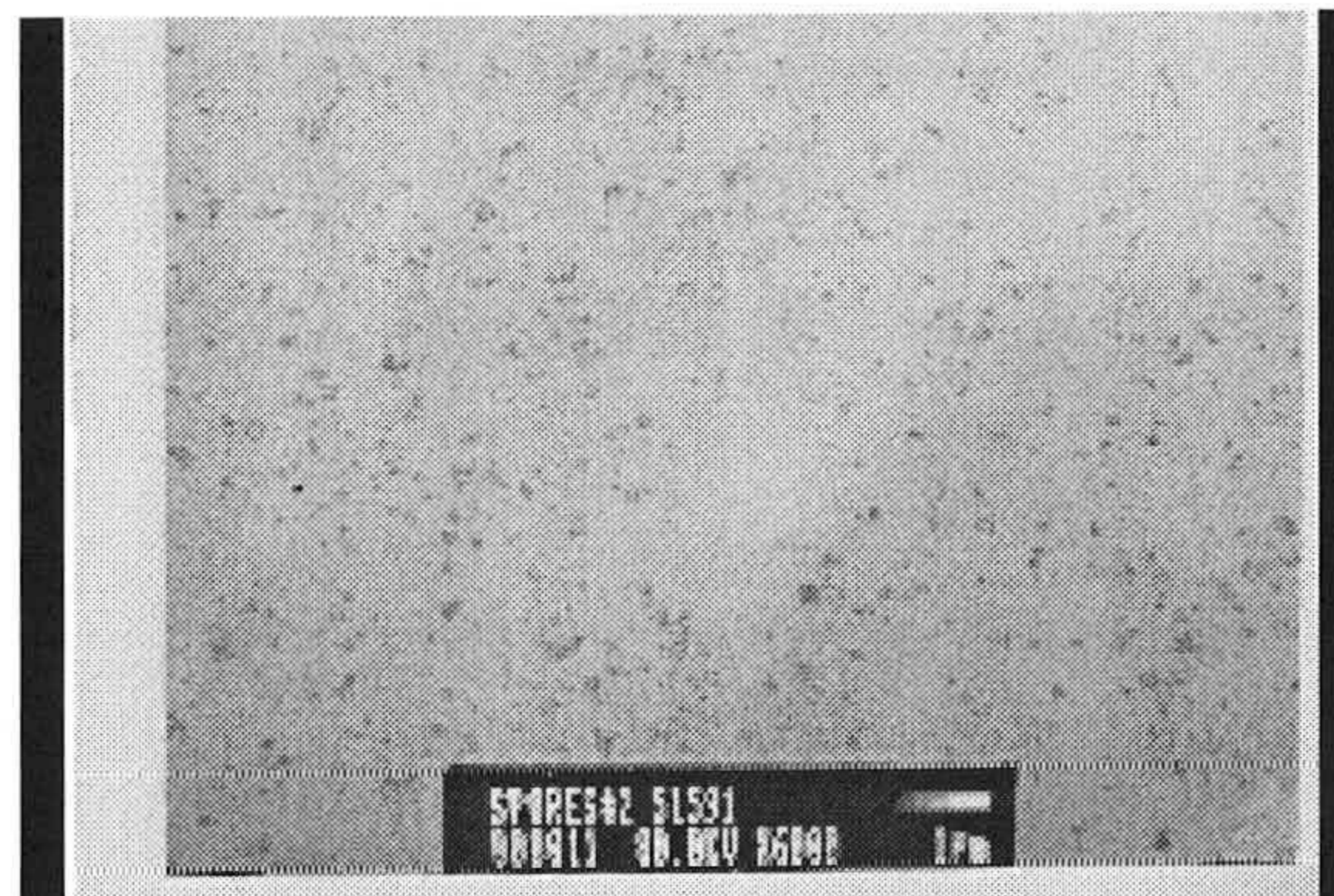


B

Figura 14: Esporas de la cepa DZF1 de M. xanthus (A) y su mutante (B), observadas a través del microscopio electrónico de barrido (x 45.000).



A



B

Figura 15: Observación a través del microscopio electrónico de transmisión de preparaciones de mixósporas de la cepa DZF1 de M. xanthus (A) y su mutante (B). (barra = 1 μm).

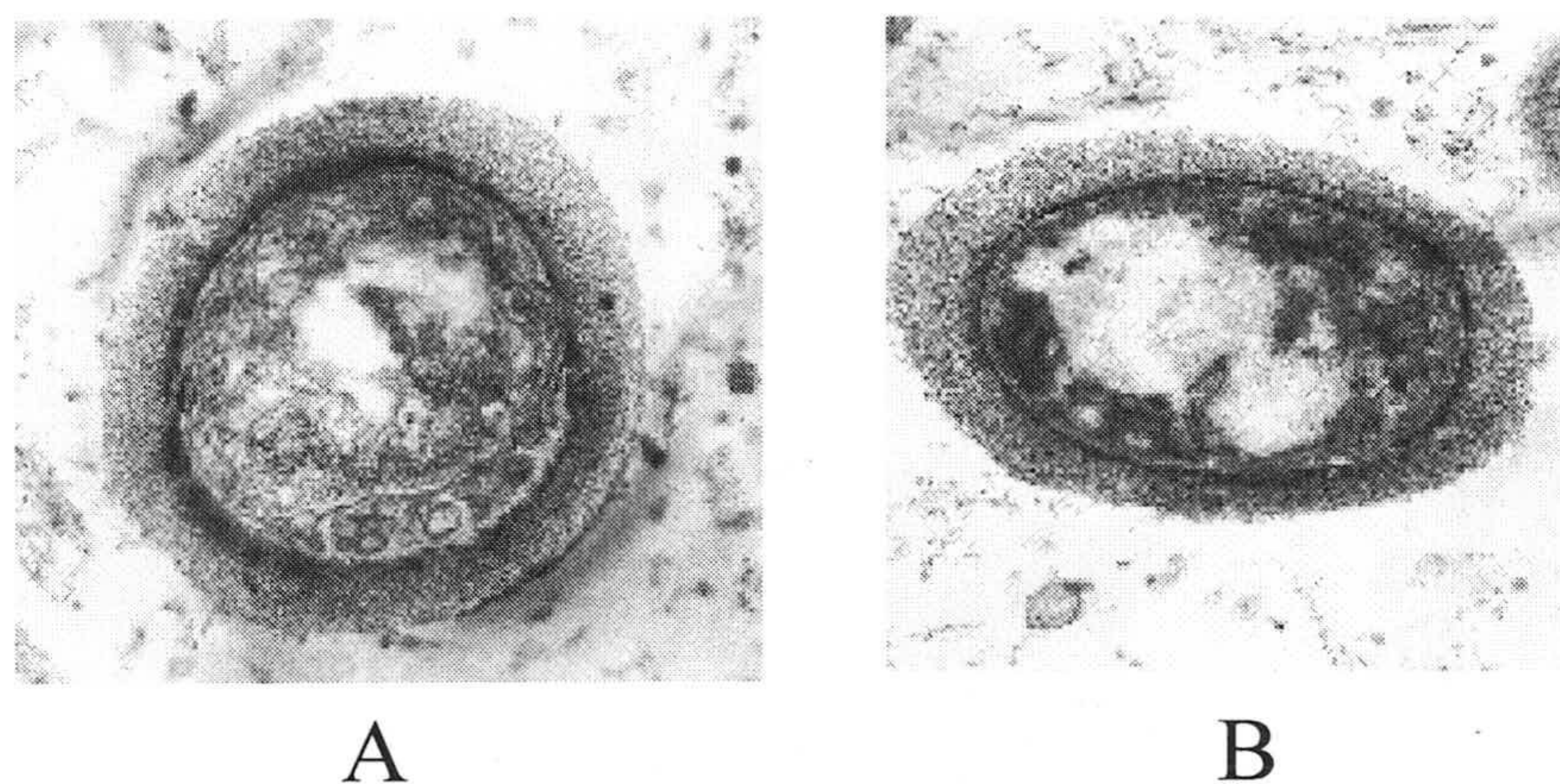


Figura 16: Esporas de la cepa DZF1 de M. xanthus (A) y su mutante (B) observadas al microscopio electrónico de transmisión.

En la figura 14 podemos observar la diferente agregación de ambos tipos de esporas. También es evidente otra característica que ya habíamos constatado: las esporas mutantes, además de estar en menor número y no agregarse, presentan formas ovoidales en mayor proporción que el salvaje, indicando quizás menos madurez. La figura 15 es una panorámica de un campo de esporas salvajes (a). Hemos adjuntado también una foto representativa de la muestra mutante, donde se puede observar la falta de esporas, fotografiándose tan sólo restos de membrana y celulares. Finalmente, a más aumentos, se consiguió por fin fotografiar ambos tipos de esporas (figura 16). De esta manera constatamos que, a pesar de la forma ovalada de la mayoría de esporas mutantes, su estructura ultramicroscópica era similar a las esporas salvajes, no mostrando ningún tipo de inmadurez.

1.4.2. Estudio de las esporas mediante PAGE-SDS

Para asegurarnos de que no existía realmente diferencia alguna, decidimos someter el perfil de proteínas a una electroforesis de poliacrilamida con SDS. Para ello, las esporas se sometieron a ultrasonido con perlas de vidrio. En la figura 17 se presenta el perfil obtenido tras este tratamiento a diferentes tiempos. En esta ocasión no se separaron las esporas de los bacilos periféricos y se puede observar la graduación en el perfil proteínico a lo largo del tiempo, especialmente en el mutante, debido a la gran

abundancia de éstos bacilos con respecto a las esporas. Por el contrario, el perfil vegetativo de proteínas prácticamente desaparece desde el principio en la cepa salvaje. Lo más destacado de este resultado es la ausencia de una proteína de unos 16 KDa que aparece claramente en la cepa salvaje. Sin embargo, hay que decir que este resultado no era siempre repetitivo. Así, por ejemplo, en la figura 18, la proteína aparece en las últimas horas de incubación. En este caso, las esporas fueron separadas de los bacilos mediante la técnica empleada en el ensayo de agregación, por lo que se aprecia más la diferencia en el perfil proteico de ambas especies celulares en el mutante. Como hemos dicho, a las 66 horas comienza a aparecer ligeramente la banda y a las 90 horas ya aparece con igual intensidad que la banda anterior. Llegamos a la conclusión de que la banda aparecía en aquellos casos en que se apreciaba una ligera agregación del mutante al final del periodo de incubación. Por ello pensamos que no encontramos diferencias al microscopio electrónico: las esporas del mutante que han llegado a madurar completamente no presentan ningún defecto. Y esta maduración parece estar relacionada con el grado de agregación alcanzado, como se discutirá más adelante.

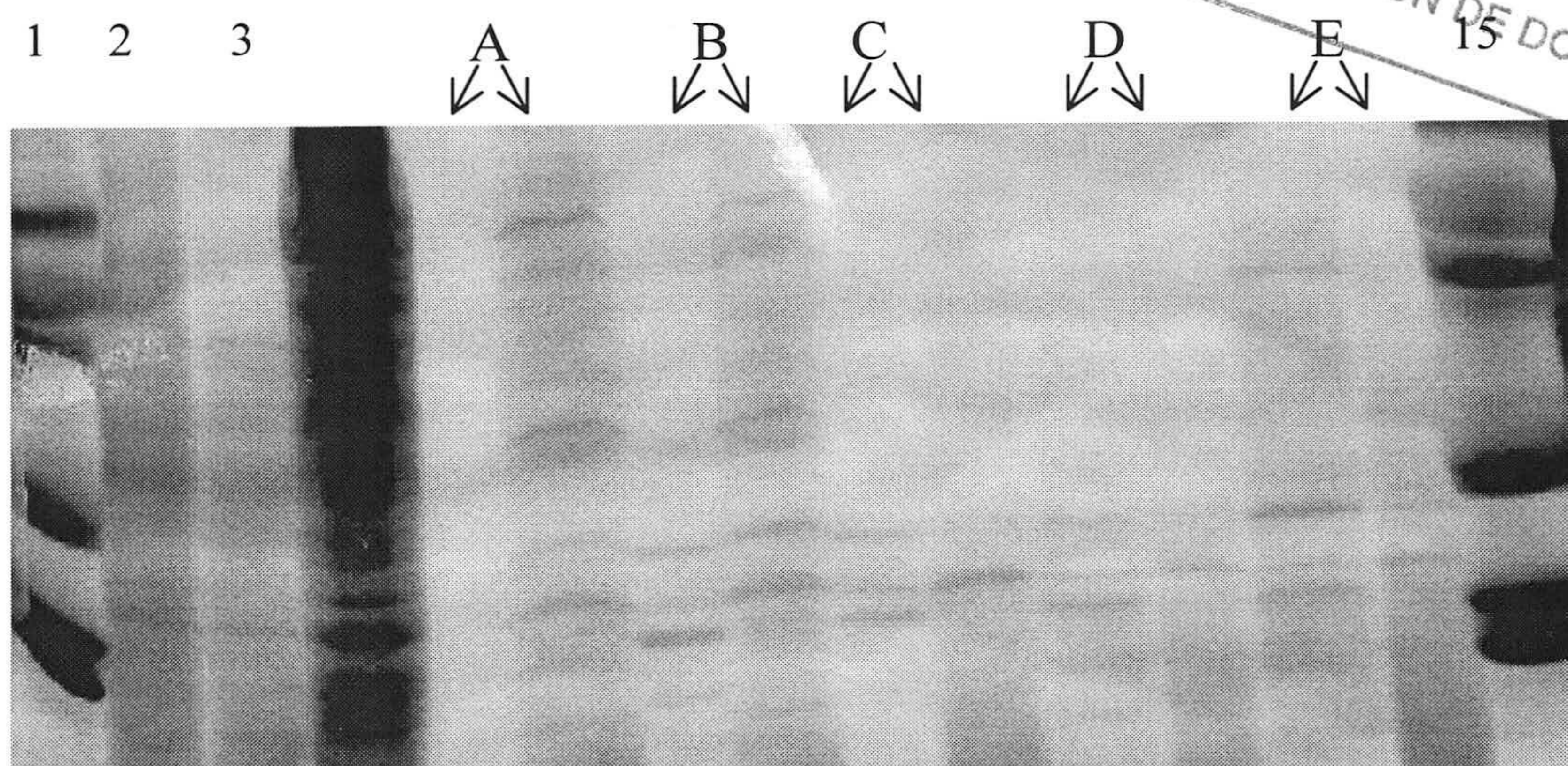


Figura 17: Perfil proteínico de la cepa salvaje y mutante a diferentes tiempos de incubación [24(A), 48(B), 96(C), 144(D) y 192(E) horas], durante el proceso de diferenciación. Las calles 1 y 15 son los patrones de pesos moleculares. Las calles 2 y 3 son el perfil proteínico típico de las células vegetativas de la cepa salvaje (2) y mutante (3).

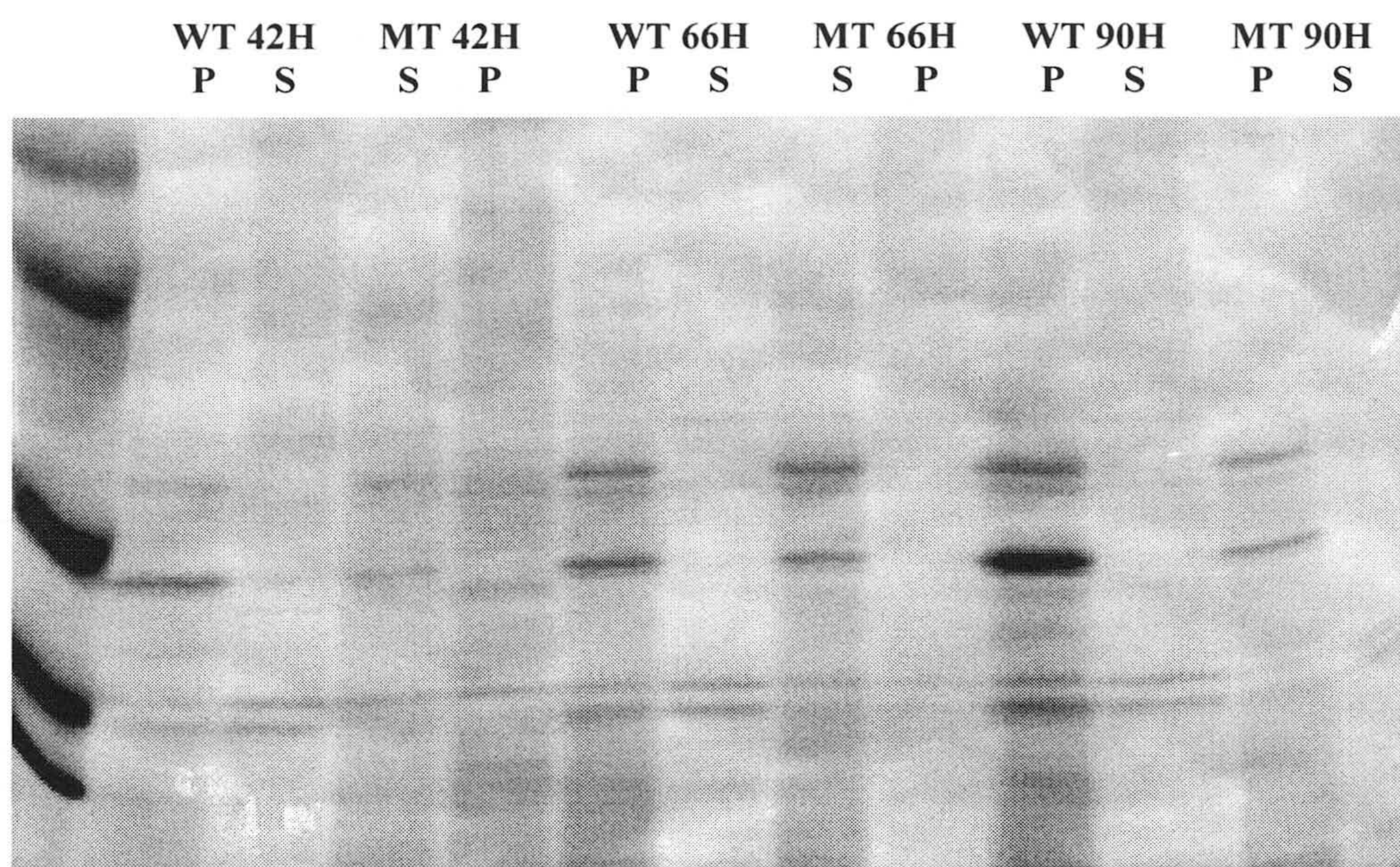


Figura 18: Perfil proteínico de las esporas y bacilos periféricos de la cepa salvaje y mutante a diferentes tiempos de incubación durante el proceso de diferenciación. Las calles 1 y 15 son los patrones de pesos moleculares. S = sobrenadante (bacilos principalmente) P = precipitado (esporas principalmente)

1.5. Estudio de la germinación

La germinación se llevó a cabo según lo expuesto en Material y Métodos, contabilizando el número de esporas de cada tiempo y midiendo cuántas de estas esporas eran capaces de germinar. Las esporas se sonicaron para separarlas y se sembraron en medio CYE con sobrecapa, adicionado de ampicilina para evitar contaminaciones. Las placas se mantuvieron a 28° C hasta que se visualizaron las colonias (alrededor de una semana).

Para poder dar una información lo más exacta posible, se muestra un experimento representativo del total. El resultado fue siempre muy similar.

RESULTADOS

Tabla 6: Número de esporas de la cepa salvaje (DZF1) y mutante, número de colonias obtenidas tras la germinación, y porcentaje de viabilidad de ambas cepas.

Tiempo (h)	n° esporas contabilizadas		n° esporas germinadas		%viab.DZF1	%viab.Mut
	DZF1(x10 ⁹)	Mut (x10 ⁹)	DZF1(x10 ⁹)	Mut (x10 ⁹)		
40	3,3	1,3	0,6	0,33	18	25
96	5,7	2,9	0,9	0,52	17	17,9
144	8,5	2,3	3	0,73	35	31

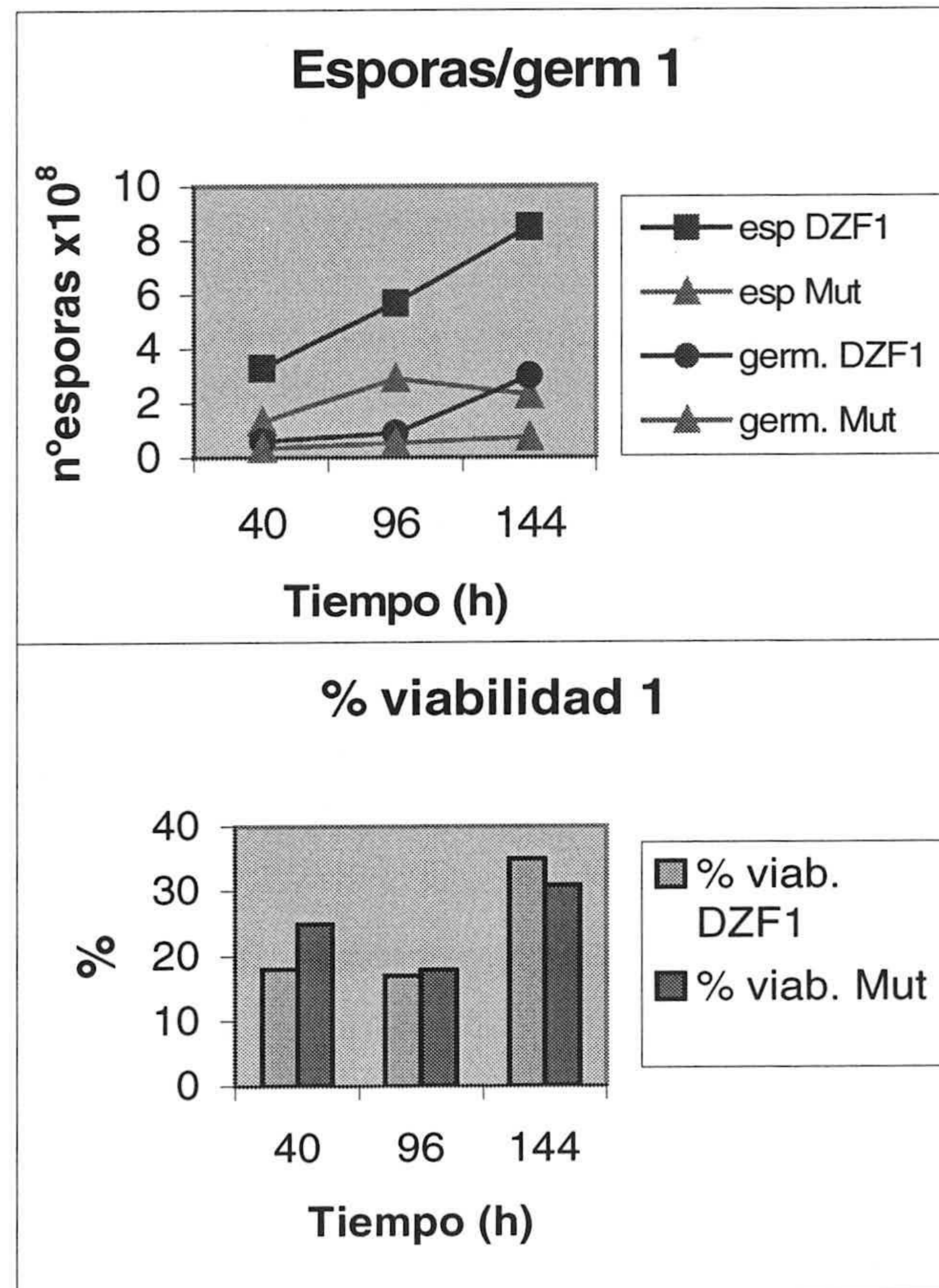


Fig. 19. Representación gráfica del número de esporas de la cepa salvaje (DZF1) y mutante. Número de colonias obtenidas tras la germinación, y porcentaje de viabilidad de ambas cepas.

Como se puede observar (tabla 6 y figura 19), si bien el número de esporas del mutante es bajo, como ya se ha explicado, el porcentaje de germinación de la cepa mutante es comparable al presentado por la cepa salvaje.

1.6. Estudio de la agregación

1.6.1. Observación de la agregación al microscopio óptico

Las primeras etapas del ciclo de desarrollo de *M. xanthus* se caracterizan por una migración en espiral de los bacilos hacia puntos centrales donde forman acúmulos conocidos como cuerpos agregados. En su interior, los bacilos sufren el proceso de diferenciación dando lugar a esporas maduras.

Puesto que *M. xanthus* DZF1 Δ oar no produce cuerpos fructificantes maduros y sólo presenta una ligera tendencia a agregarse en algunos casos y después de una larga incubación, lo primero que hicimos fue observar la presencia o no de cuerpos agregados al microscopio de contraste de fases y lo hicimos a bajos aumentos (x250) para ver mayor amplitud de campo y a 10000 aumentos para observar con más detalle (figura 20). Para ello, las muestras se recogieron de las placas CF una vez que el proceso de desarrollo había terminado en la cepa salvaje y con cuidado de no romper los cuerpos agregados, éstos se colocaron entre porta y cubre y se observaron al microscopio.

El resultado fue que, ciertamente, los cuerpos agregados no existían en la cepa mutante, ni en detalle ni se observaban con una mayor amplitud de campo.

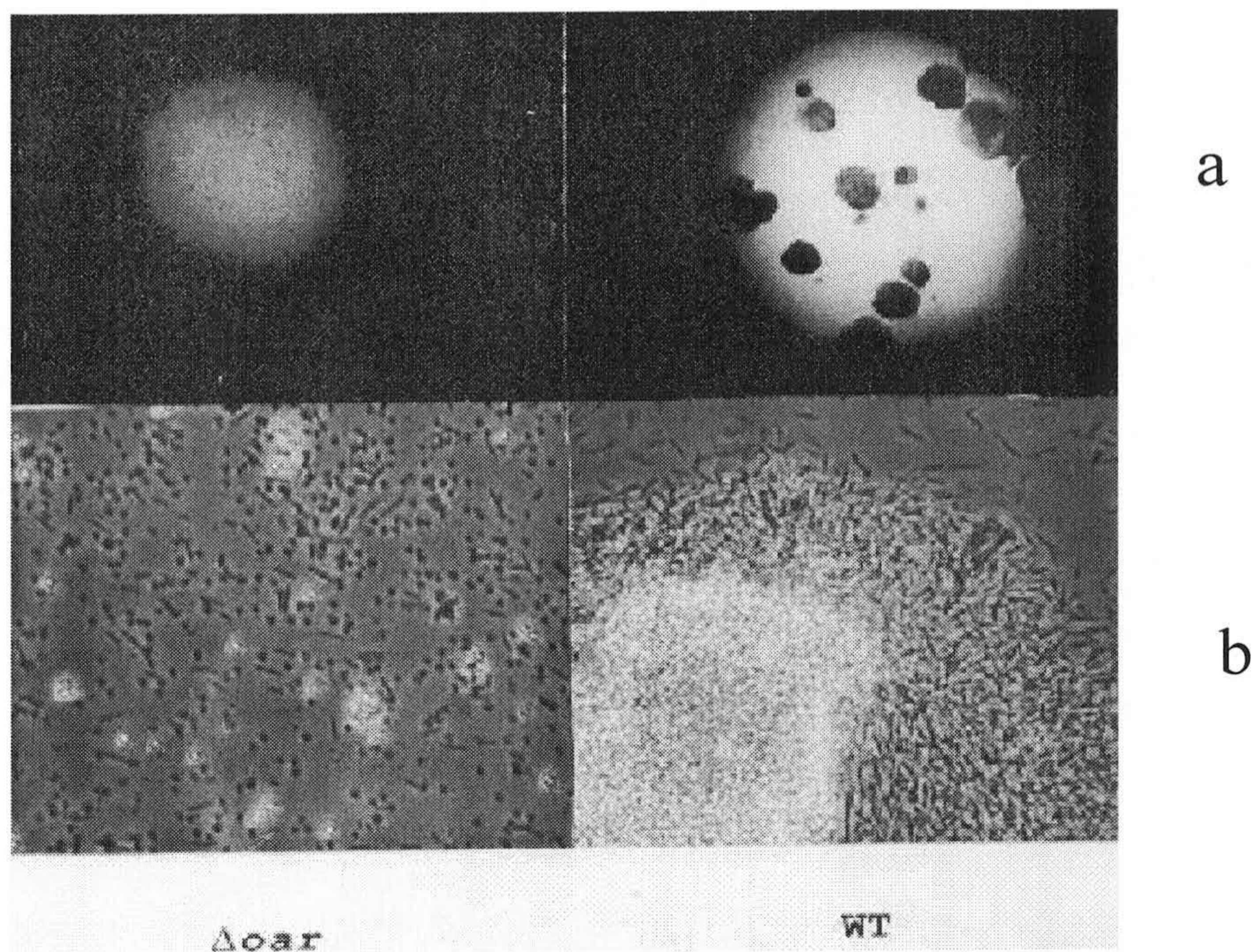


Figura 20. Observación de la agregación al microscopio óptico de las cepas mutante (Δoar) y salvaje (*wt*). a: x250; b: x100.

Para conocer en qué momento se produce el defecto, el proceso de desarrollo se observó al microscopio de contraste de fases mediante la técnica de cultivo en porta sobre medio CF. De esta manera se pudo observar que la cepa mutante iniciaba el movimiento hacia los puntos centrales al mismo tiempo que la cepa salvaje pero sin embargo nunca superaba la fase correspondiente a las 24 horas en *M. xanthus* DZF1, momento en que se establecen corrientes circulares de bacilos periféricos que dejan en su interior a otros bacilos cuyo destino será formar los cuerpos agregados y las esporas maduras en un futuro. Por el contrario, los bacilos que no pueden llegar a estos puntos interiores morirán, confiriendo nutrientes a las células que esporulan. En nuestro mutante, otra característica que lo diferencia es que esta lisis periférica no llega a producirse, al menos de forma evidente.

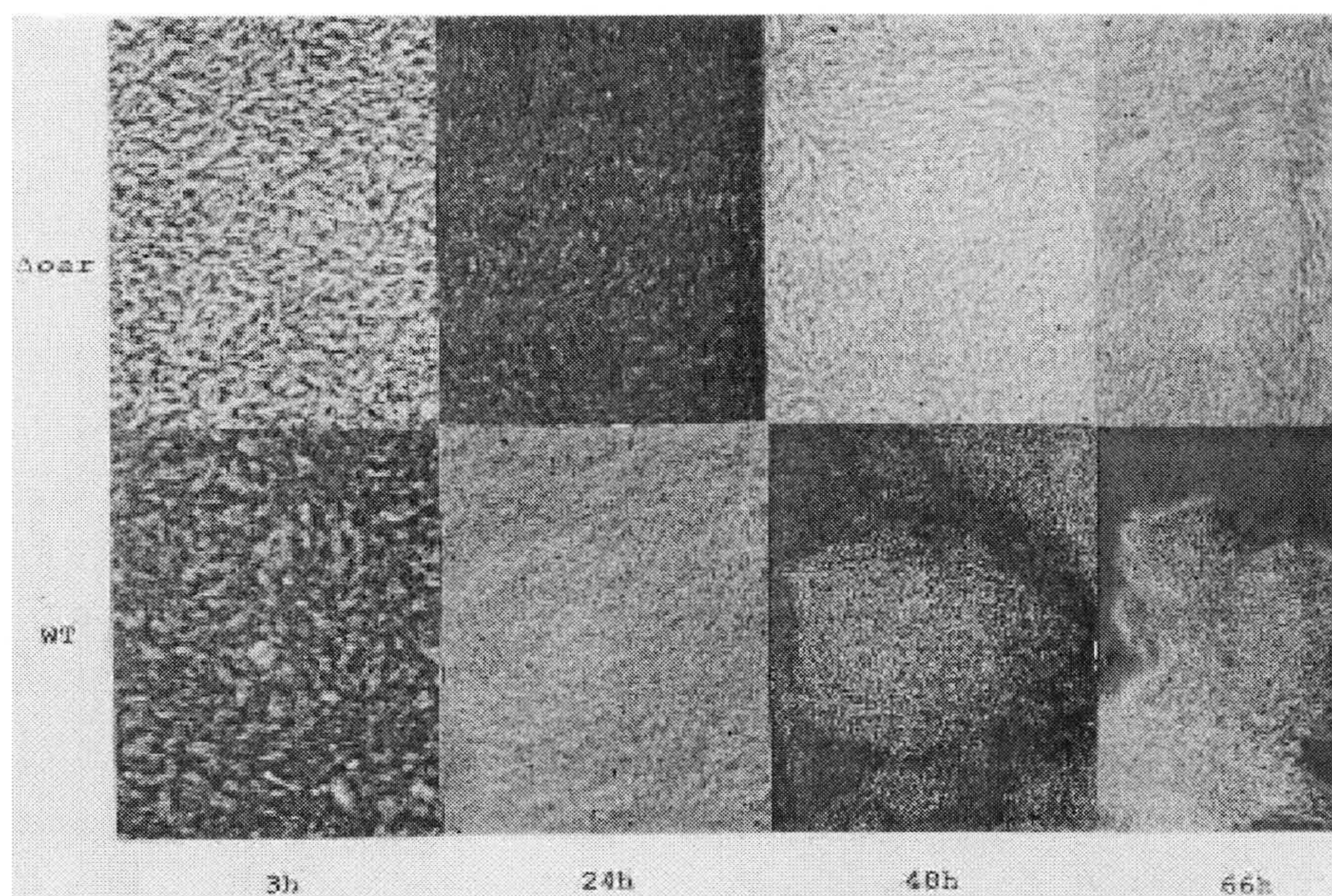


Figura 21: Proceso de agregación de las cepas salvaje y mutante a lo largo del tiempo.

1.6.2. Cuantificación de la agregación mediante medida del peso seco

Puesto que el mutante no formaba cuerpos fructificantes ni presentaba tendencia a formar cuerpos agregados, uno de los pasos primeros del ciclo de desarrollo en *M. xanthus*, procedimos a medir con exactitud la capacidad de agregación que el mutante presentaba. Para ello de nuevo se crecieron los cultivos bajo condiciones de falta de nutrientes en el medio definido CF para provocar el proceso de diferenciación, tal y como se ha explicado previamente. Las gotas de cultivo se recogieron a determinados intervalos de igual manera que se hizo en los experimentos anteriores. Pero esta vez la muestra se dividía en dos: tras retirar una alícuota que nos serviría para contar las esporas, mediante el protocolo seguido usualmente, el resto se secó para medir las diferencias en peso seco del mutante y el salvaje tal y como se explica en Material y Métodos. El resultado se puede observar en la tabla 7 y figura 22.

RESULTADOS

Tabla 7: Número de esporas y peso seco de los agregados ambas cepas. La última columna indica la relación existente entre el defecto de esporulación y agregación del mutante y se obtiene dividiendo la séptima columna por la cuarta.

Tiempo (h)	n° esporas		% esp mut/DZF1	Agregación (g peso seco)		% agregación mut/DZF1	% agreg/esp mutante
	DZF1(x10 ⁹)	Mut (x10 ⁹)		DZF1(x10 ⁻⁴)	Mut (x10 ⁻⁴)		
24	0,005	0	0	30	3	10	
48	2,4	0,4	20	45	5	11	55
96	6,5	1,2	20	38	3	8	40
144	7,2	1,3	20	42	3	7	35
192	6,7	1,9	25	25	3	12	48

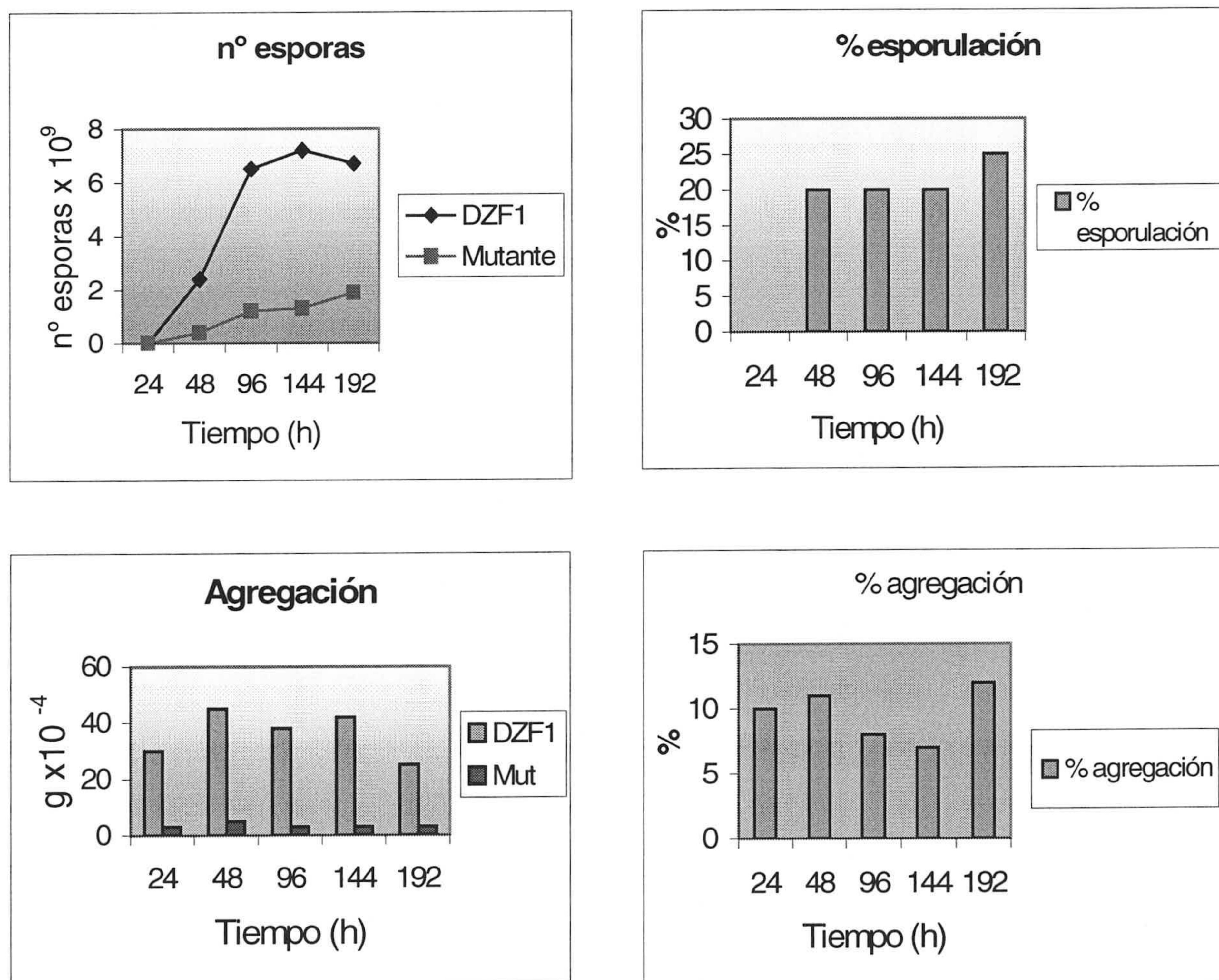


Figura 22: Representación gráfica del número de esporas, agregación y % de esporulación y agregación de las cepas DZF1 y DZF1Δoar de *M. xanthus*.

Como se observa, el mutante se comporta como se esperaba, con una formación de agregados mucho menor que la cepa salvaje. Sin embargo, es interesante comprobar que, al comparar la esporulación con la agregación, el mutante produce más esporas de lo que se podía esperar considerando el bajo nivel de esporulación. De hecho, el porcentaje de esporulación es el doble del porcentaje de agregación.

1.6.3. Cuantificación de la agregación mediante medida de la proteína

Para tener otra medida de la agregación de *M. xanthus* DZF1 Δ oar realizamos también ensayos de agregación del mismo modo que con anterioridad pero midiendo la cantidad de proteína en lugar del peso seco. De esta manera, una vez centrifugadas a bajas revoluciones (50g) las muestras para separar los agregados de los bacilos en suspensión, se resuspendía el precipitado en agua hasta alcanzar el mismo volumen original de la muestra (400 μ l). De estas suspensiones se tomaban 10 μ l que se completaban hasta 80 μ l y se medía la proteína mediante el método de Bradford. Previamente, se habían tomado 10 μ l de la muestra inicial, sin centrifugar, para medir la proteína total como control. En la tabla 8 ésta es la proteína total que aparece. Sin embargo, los porcentajes se realizaron sobre la suma de los valores de sobrenadante y precipitado para obtener el 100%. Como se puede observar, el error es mínimo, considerando el propio margen de error del método Bradford.

Tabla 8: *Cuantificación de la agregación celular referida a proteínas.*

Días	DZF1 sob	DZF1 prec	DZF1 total	Mut sob	Mut prec	Mut total
1	0,424	0,158	0,609	0,648	0,13	0,943
2	0,146	0,18	0,388	0,852	0,16	1,045
4	0,15	0,355	0,517	0,539	0,117	0,724
6	0,15	0,486	0,614	0,465	0,145	0,888

La figura 23 muestra el porcentajes de agregación de ambas cepas y el porcentaje de agregación del mutante con respecto al salvaje, como se indicó en la sección anterior.

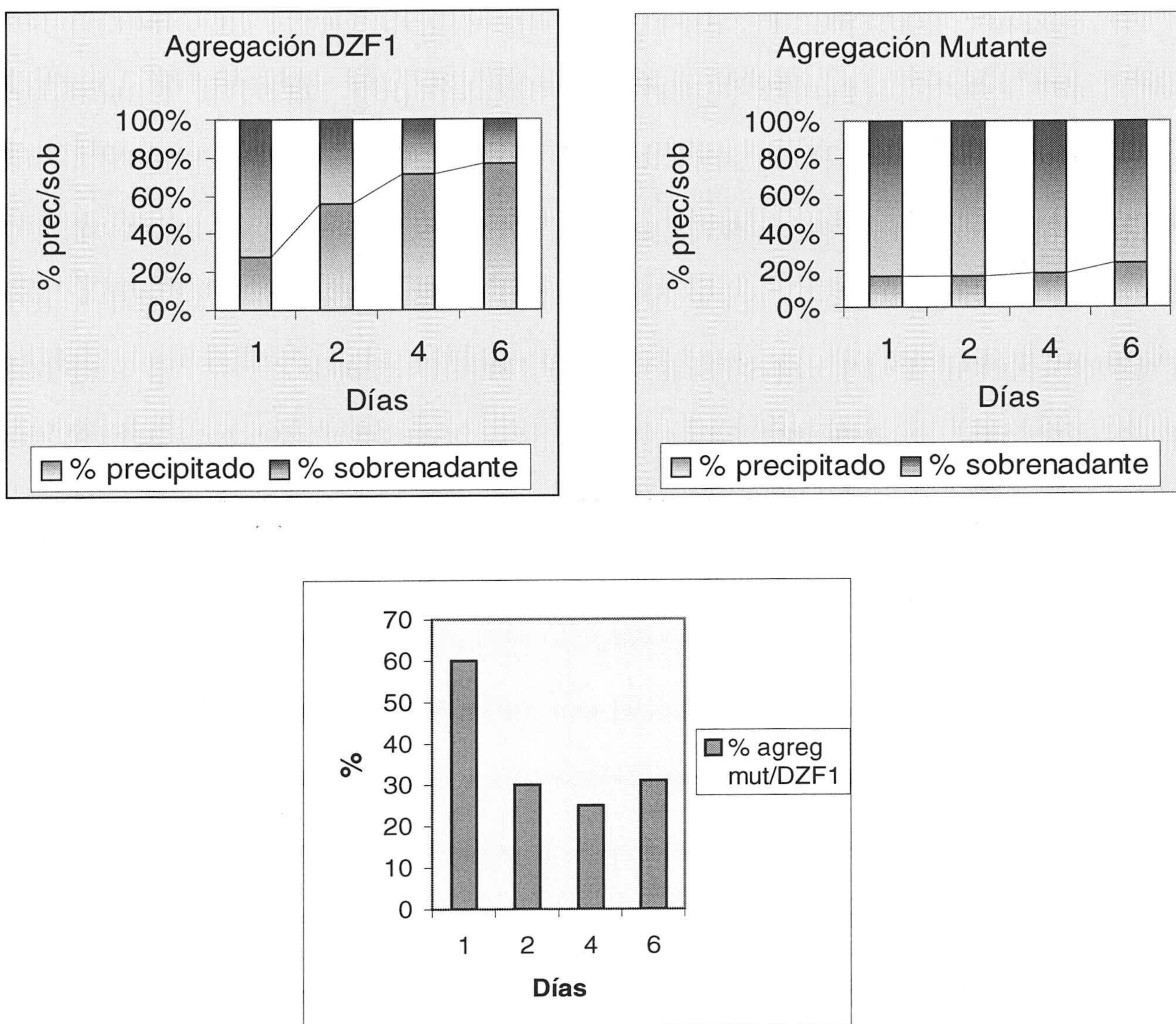


Figura 23: Porcentajes de agregación de las cepas salvaje y mutante, y de éstas entre sí

Como se puede observar, en esta ocasión el porcentaje de agregación del mutante con respecto al salvaje es mayor, si lo comparamos con los datos anteriores en peso seco. Esto puede ser debido al método de medida, como se explicará en la discusión.

1.7. Medida de la cohesión (ensayo con rojo -Congo)

La cohesión de *M. xanthus* es una propiedad diferente de la formación de cuerpos agregados e indica la capacidad de unión de los bacilos durante el ciclo vegetativo. La cepa salvaje utilizada para crear nuestro mutante, *M. xanthus* DZF1, es una cepa *sglA*⁻ que presenta menor cohesión, propiedad que es muy útil para su cultivo en medios líquidos. Sin embargo, esta característica no merma en absoluto su capacidad de formar cuerpos fructificantes y esporas. A pesar de ello, quisimos medir la capacidad de aglutinación de ambas bacterias, para lo cual se realizaron los dos ensayos expuestos en material y métodos: el ensayo de cohesión en tampón de aglutinación (10mM MOPS, 1mM MgCl₂ y 1 mM CaCl₂), midiendo la DO a distintos tiempos (figura 24), así como el mismo ensayo añadiendo rojo-Congo y centrifugando la muestra a distintos tiempos para medir, a 500 nm, la cantidad de colorante que quedaba en el sobrenadante. Como se explicará en la discusión, el rojo-Congo se une a determinados sitios de la pared de los bacilos inhibiendo su cohesión, por lo que la medida de colorante que no se ha unido a los bacilos es también una medida de cohesión celular (figura 25).

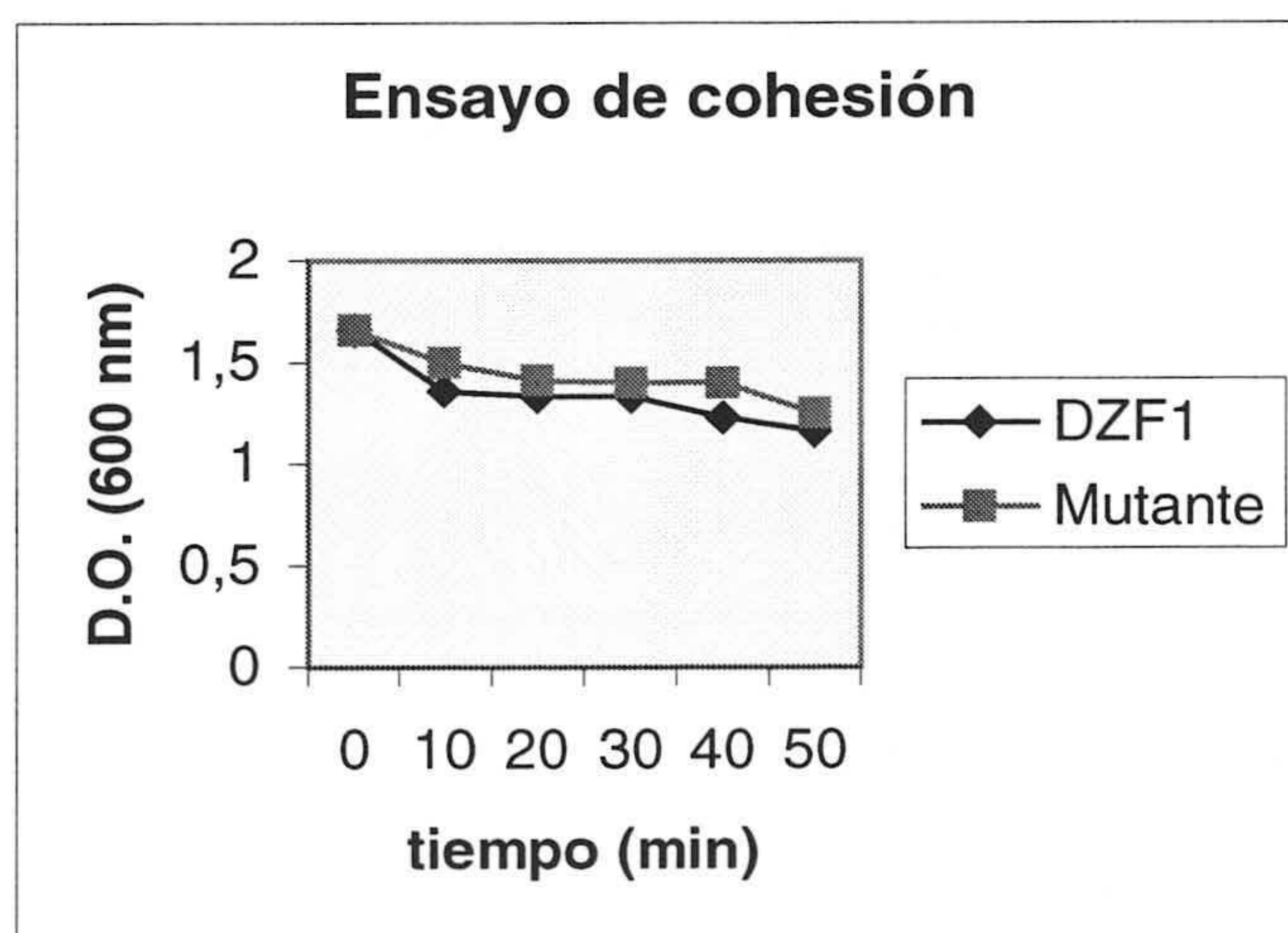


Figura 24: Ensayo de cohesión celular de la cepa salvaje y su mutante.

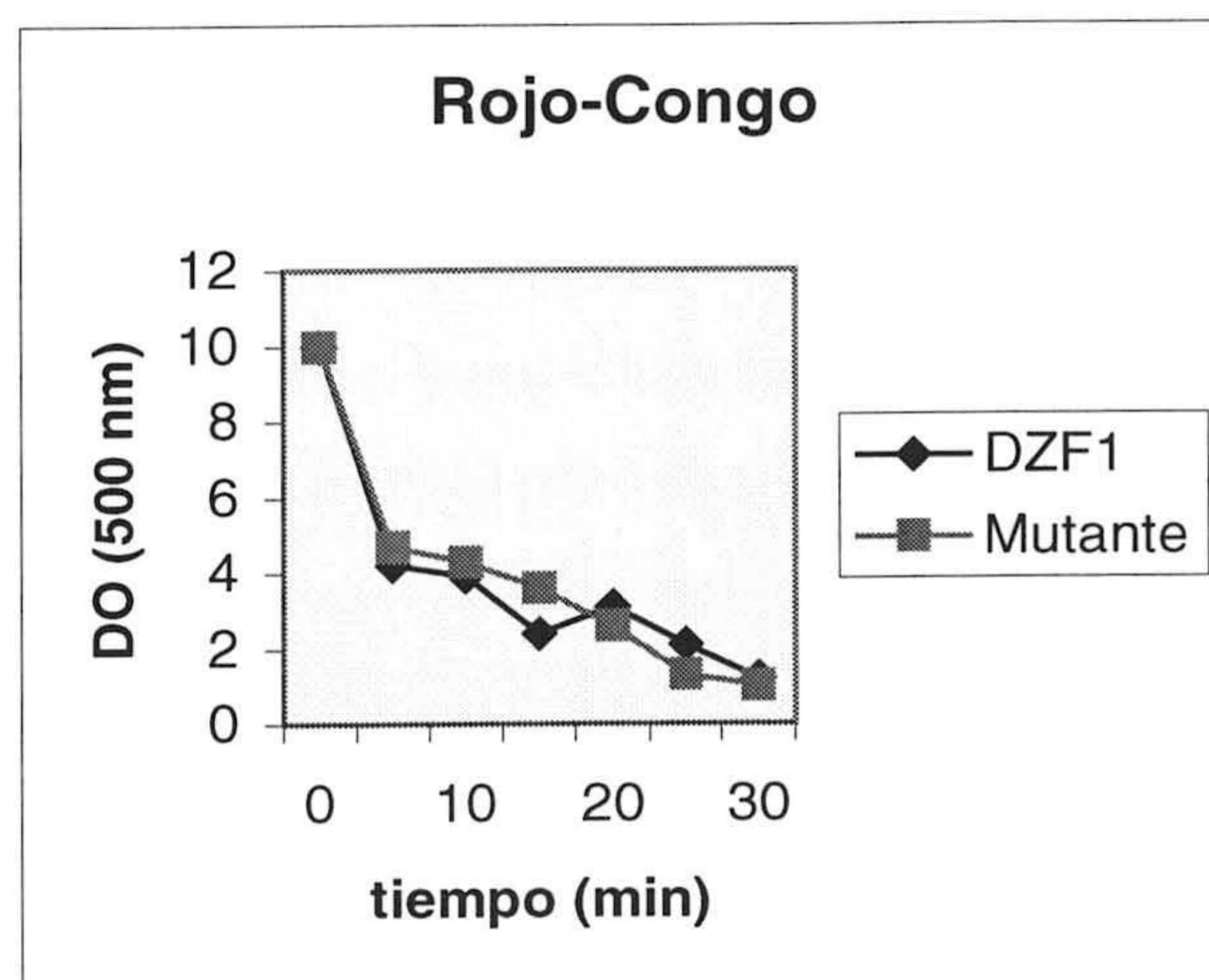


Figura 25: Inhibición de la cohesión celular de las cepas salvaje y mutante utilizando rojo-Congo.

Tanto DZF1 como su mutante Δoar mostraron sólo una ligera cohesión celular en el marco de una hora. Sin embargo, como se ha explicado antes, esto era esperable debido a la mutación que ya de por sí sufre la cepa salvaje. Por el contrario, la mutación Δoar no agudizó este defecto. Por otra parte, la adición de rojo-Congo dio un resultado concluyente, ya que el colorante fue retirado del sobrenadante de ambas cepas en los primeros 10 minutos de incubación. Por tanto, la mutación Δoar no parece producir ninguna variación significativa en el comportamiento de DZF1 en las condiciones estudiadas.

1.8. Estudio de las fibrillas

Otra de las estructuras relacionadas con la capacidad de agregación y cohesión de *M. xanthus* son las fibrillas o apéndices de naturaleza gluco-protéica diferentes de los pilis o fimbrias, que sirven para la unión de las células entre sí o con el sustrato. Por ello, el paso siguiente más obvio era comprobar si las fibrillas de *M. xanthus* DZF1 Δoar eran normales o por el contrario presentaban algún defecto. Para ello se siguieron dos estrategias que se exponen a continuación.

1.8.1. Estudio de las fibrillas a microscopio electrónico de scanning

Las dos cepas mutante y salvaje, se crecieron en placas de medio CYE para el crecimiento vegetativo y CF para el comienzo del desarrollo y se sometieron al tratamiento indicado en el Material y Métodos para ser observadas al microscopio electrónico. El resultado se puede observar en la figura 26.

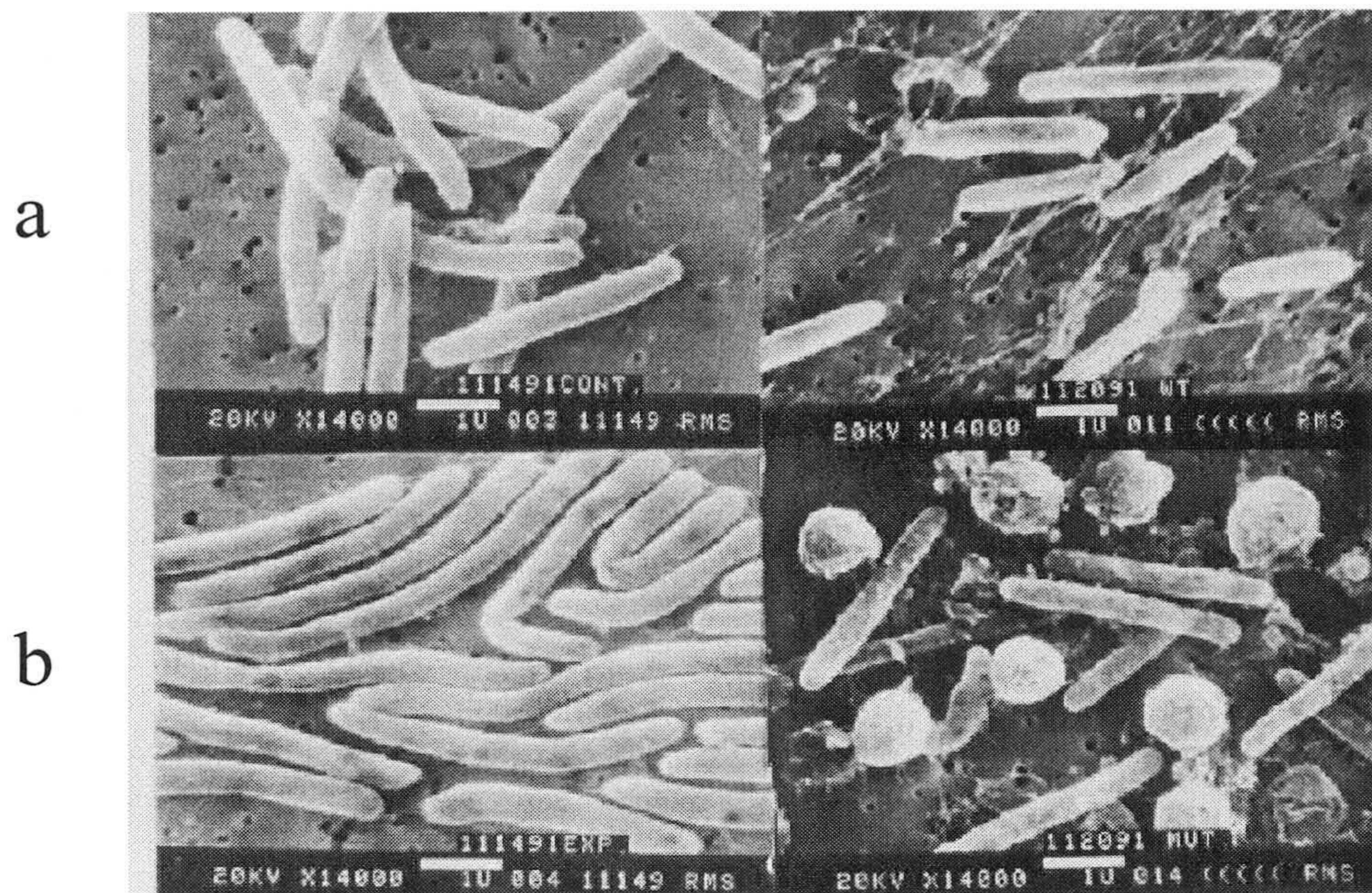


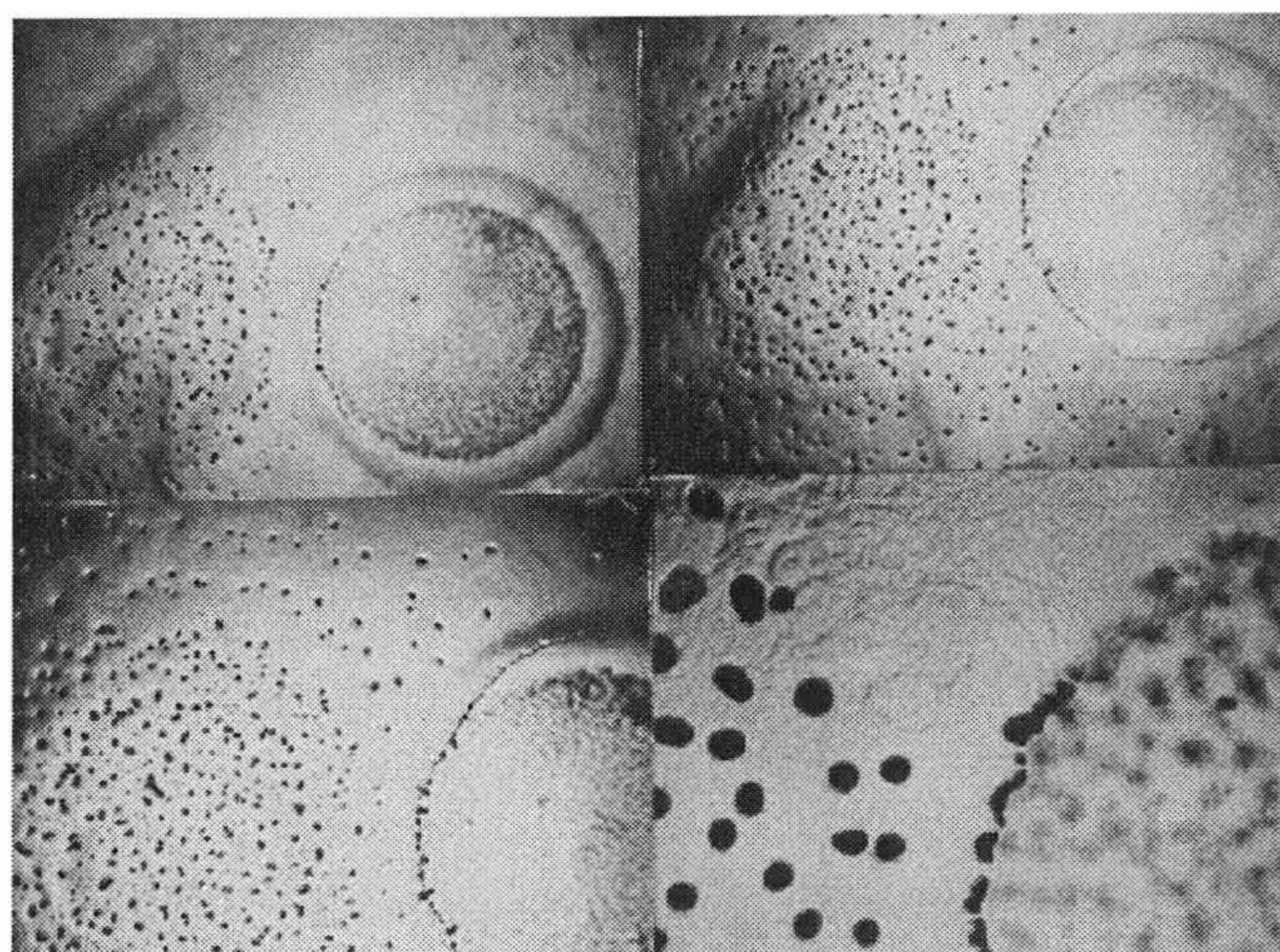
Figura 26: Observación de fibrillas en el microscopio electrónico de scanning de células vegetativas (izquierda) y durante el comienzo del ciclo de desarrollo (derecha) de *M. xanthus* DZF1 (a) y DZF1 Δ oar (b)

En estas fotografías obtenemos una serie de resultados. Primero, podemos constatar la existencia de microfibrillas en todos los casos, tanto en la cepa salvaje como la mutante. Sin embargo, el número es bastante más reducido en la cepa mutante, tanto en crecimiento vegetativo en medio sólido como en el proceso de desarrollo. En cualquier caso, la disminución del número de fibrillas no puede ser consecuencia directa de la falta de Oar, ya que ésta proteína ha desaparecido por completo de la cepa mutante, lo que no ocurre con las fibrillas.

Otro resultado que nos llamó la atención de estos experimentos fue el hecho evidente de que los bacilos de *M. xanthus* DZF1 Δ oar son de longitud mucho mayor que los salvajes, presentando en muchas ocasiones formas dobladas y en "V".

1.9. Estudios de difusión de señal

Muchas de las señales de desarrollo de *M. xanthus* son moléculas pequeñas, capaces de difundir en el agar y complementar a un mutante que carezca de ellas. Por eso, uno de los experimentos realizados fue comprobar si el defecto presente en nuestro mutante era debido a la falta de alguna señal difusible. Para ello, tanto mutante como salvaje se inocularon en condiciones de desarrollo en medio CF a una distancia suficientemente cercana como para permitir la difusión de cualquier señal de un enjambre al adjunto. La figura 27 muestra el resultado obtenido.



*Figura 27: Observación con lupa binocular del posible efecto de difusión de señales entre *M. xanthus* DZF1 (derecha) y *M. xanthus* DZF1 Δ oar (izquierda) en medio de frutificación CF.*

De nuevo, podemos extraer varios resultados de esta fotografía. Primero, ciertamente no existe ninguna señal difusible que pueda rescatar el fenotipo salvaje, puesto que sólo se forman cuerpos fructificantes cuando ambos tipos de células están en contacto directo. Segundo, aunque anteriormente habíamos visto que no existían diferencias entre ambas cepas a nivel de movimiento, en este experimento se puso en evidencia la mayor capacidad migratoria de la cepa salvaje, que era capaz de invadir el terreno presuntamente colonizado por *M. xanthus* DZF1 Δ oar. Tercero, aún cuando ambas cepas pertenecen a la misma especie de *Myxococcus* y son genéticamente idénticas excepto en un locus, existe una cierta incompatibilidad entre ellas, que lleva a la cepa salvaje a intentar rodear el enjambre de la cepa mutante, incluso cuando, como

se ha indicado, la primera presenta una clara ventaja competitiva. Cuarto, en cualquier caso, cuando la cepa salvaje y la mutante están en contacto físico, sí se producen cuerpos fructificantes maduros. La cuestión, ahora, era saber si estos cuerpos fructificantes estaban formados sólo por la cepa salvaje o por ambas.

1.10. Estudios de complementación

Para responder a la pregunta anterior, se llevaron a cabo estudios de complementación en donde ambas cepas se crecían en fase logarítmica y se concentraban con objeto de inocularlas en gotas en medio CF para provocar el ciclo vegetativo, pero antes eran mezcladas en diferentes proporciones, manteniendo el mismo volumen final.

La figura 28 muestra el primer resultado obtenido en este experimento. Las proporciones usadas fueron (DZF1:DZF1 Δ oar) 4:0, 3:1, 1:1, 1:3, 0:4. El resultado fue que la complementación recuperaba el fenotipo salvaje en la cepa mutante, a nivel de número y madurez de los cuerpos fructificantes. Sin embargo, la complementación no era completa, ya que una de las características de la cepa mutante, la menor proporción de lisis de los bacilos periféricos, se mantenía aún. Esto indicaría que la recuperación de la fructificación no se debe a una señal extracelular no difusible, ya que si así fuera, la complementación sería total.

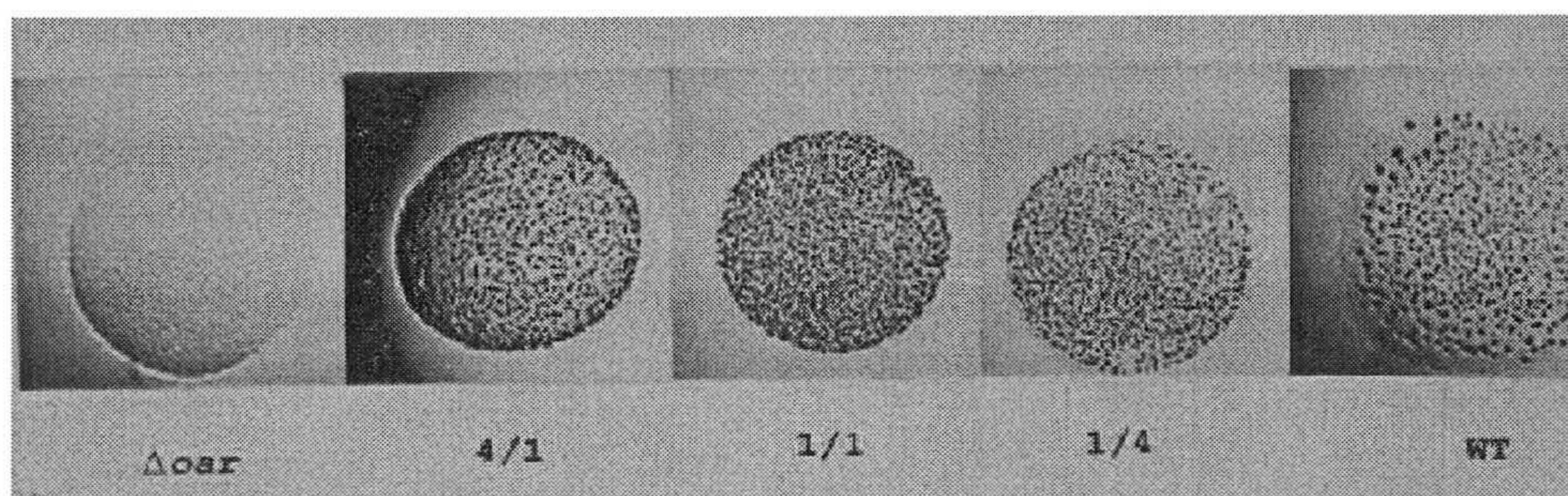


Figura 28: *Formación de cuerpos fructificantes a partir de enjambres híbridos en diferentes proporciones.*

Una vez conocido esto, era interesante observar si también se recuperaba el número de esporas y si éstas provenían de bacilos de la cepa salvaje o de la cepa

mutante. Esto era fácil de hacer puesto que la cepa mutante contenía un cassette de resistencia a la kanamicina que serviría de marcador para diferenciar las esporas mutantes de las salvajes.

De esta manera, los cuerpos fructificantes de cada una de las complementaciones se recogieron, se sonicaron y se contaron las esporas. Posteriormente, las esporas se dejaron germinar y una vez germinados los enjambres, se pasaron a medio CYE adicionado de kanamicina para observar la proporción de enjambres que eran resistentes. El resultado (la media de 5 experimentos) se resume en la tabla 9 y la figura 29.

Tabla 9: Estudio de complementación. Porcentaje de esporulación y porcentaje de esporas resistentes a la kanamicina.

% mutante	nº esporas	% esporulación	% resistentes
0 %	43	100	0
25%	42	100	0
50%	48	100	5
75%	50	100	5
100%	8	18	100

Cabe destacar que, con respecto al porcentaje de esporas resistentes a la kanamicina, en dos ocasiones sólo aparecieron esporas mutantes en los casos en que no había cepa salvaje presente (100%). Por tanto, podemos decir, que la cepa DZF1 es capaz de recuperar el fenotipo salvaje de la cepa DZF1 Δ oar al menos hasta en una proporción del 25% de cepa salvaje, pero sin embargo todas las esporas producidas de esta complementación son esporas salvajes. Esto confirma que no se trata de una complementación verdadera, sino que, en cierto modo, la cepa salvaje se sirve de la mutante como base para asegurar una generación futura tan sólo constituida por sus propios descendientes.

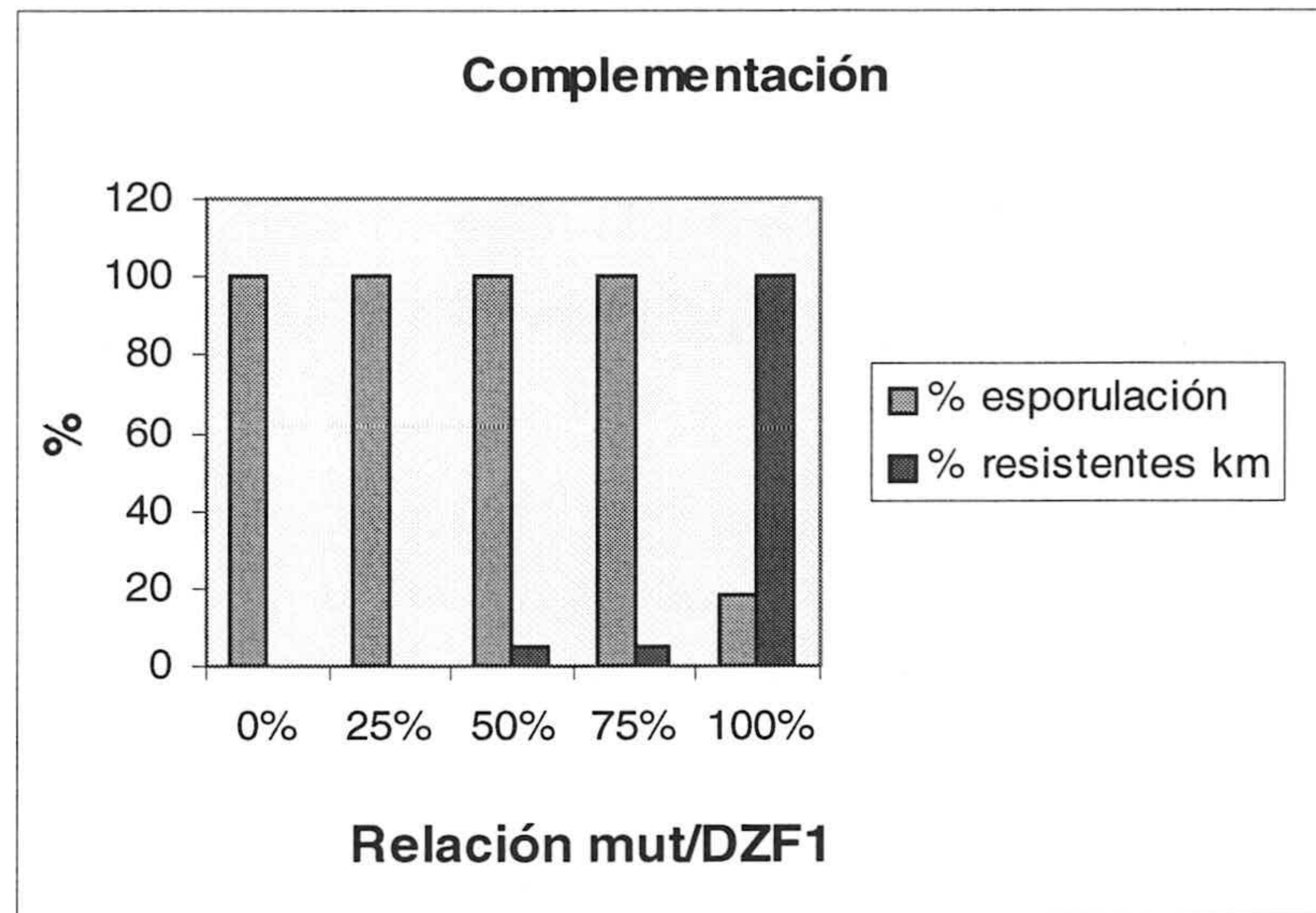


Figura 29: Gráfica correspondiente al estudio de complementación.

2. PRODUCCIÓN DE MINERALES POR LAS CEPAS DE *M. xanthus* DZF1 Δ oar y 422.

Como se ha dicho en los objetivos de esta memoria se ha investigado la producción de minerales por la cepa mutante DZF1 Δ oar para comparar su capacidad biomineralizadora con la de una cepa silvestre, la 422, cuya capacidad de producción de carbonatos y fosfatos principalmente (aunque no exclusivamente) ha sido investigada previamente por otros autores.

Además, para completar la investigación se han ensayado ambas cepas simultáneamente en condiciones y medios de cultivo en que previamente no se había trabajado con la cepa 422.

En todos los experimentos se realizaron controles, utilizando los mismos medios de cultivo pero sin inocular, e incubándolos en las mismas condiciones. En ningún caso, salvo en el que se indica más adelante, se detectó la producción de minerales en ausencia de las bacterias.

Los medios de cultivo seleccionados para los ensayos de esta memoria han sido aquellos en los que la cepa 422 había puesto de manifiesto notable capacidad de producción de los carbonatos calcita y/o vaterita principalmente, y algunos en los que presentó la capacidad de producción de otros minerales tales como el apatito o weddelita. Además, se han diseñado unos medios de cultivo especiales, basados en el medio CM, (ver Material y Métodos), en el que se ha sustituido total o parcialmente el CaCl₂ por una sal de otro catión a fin de comprobar la posibilidad de producción de otros carbonatos (o minerales).

Como experimento previo se utilizó precisamente uno de estos últimos medios citados, el CMFe, para comprobar la capacidad biomineralizadora de la cepa DZF1 progenitora de la cepa DZF1 Δ oar. Los resultados obtenidos confirmaron este presupuesto.

RESULTADOS

Tabla 10: Minerales producidos por las cepas 422, DZF1 y DZF1Δoar de *M. xanthus*.

MEDIO	CEPA	t.ap/t.rec	pHi/ pHf	MINERAL	PRODUCT.	OBSERVAC.
M-2 sólido	422	5días/90d	8/8.5	Calcita Magnésica	+++	
	Aoar	5días/2mes	8/8.2	Calcita Magnésica	+++	
M-2 líq reposo	422	---/3meses	8/8.5	Calcita Magnésica	++	
	Aoar	---/1mes	8/8.2	Calcita y otro carbonato	++	
M-2 líq agitación	422	--/60 días	8/8.5	Calcita	++	
	Aoar	1 mes	8/8.5	Calcita Magnésica	+	
M-3 sólido	422	2días/40d	8/8.5	Vaterita	++	Células Calcif.
	Aoar	5días/1mes	8/8.5	Vaterita	++	No Células Calcif.
M-3 líq reposo	422	----/3meses	8/8.7	Vaterita ,Calcita, Weddelita	++	Células Calcif.
	Aoar	---/1mes	8/8.7	Vaterita	++	No Células Calcif.
M-3 líq agitación	422	---/40días	8/9	Vaterita ,Calcita, Weddelita	+++	
	Aoar	--- /1 mes	8/9.2	Vaterita	+	
M-9 sólido	422	3días/20d	8/8.5	Calcita	+++	Células Calcif
	Aoar	1mes-/2mes	8/9	Vaterita, Calcita		No Células Calcif
CC sólido	422	2días/30d	8/8.5	Calcita, Vaterita (50%)	+++	Células Calcif.
	Aoar	5días/2mes	8/8.5	Calcita, Vaterita	+	No Células Calcif.
CC líq reposo	422	---/3 meses	8/9	Calcita, Vaterita.	+++	
	Aoar	---/1mes	8/8.9	Vaterita	+++	Test. Vaterita
CC líq agitación	Aoar	---/1mes	8/8.5	Calcita, Vaterita	+++	Test. amorfo
CMFe sólido	422	40día/2mes	7/9	Hidroxilapatito, Calcita	++	
	Aoar	40día/2mes	7/6	Apatito, Brushita	++	
	DZF1	40día/2mes	7/9	Calcita, Vaterita Hidroxilapatito, Weddelita	++	Huellas células Calcificadas
CMMg sólido	422	40día/2mes	7/7.8	Weddelita,	+	
	Aoar	40día/2mes	7/7	Estanfieldita, Foforroesslerita	+	
CMMn sólido	422	40día/2mes	7/8.7	Calcita, Hidroxilapatito	++	
	Aoar	40día/2mes	7/8.3	Hidroxilapatito.	+	
CMCo sólido	422	40día/2mes	7/8	Hidroxilapatito, Weddelita	+	
	Aoar	40día/2mes	7/6.7	Fluoroapatito, Weddelita	+	
CMBa sólido	422	20día/2mes	7/7.8	Barita , fosfato	+	
	Aoar	20día/2mes	7/7.5	Barita , fosfato	+	
A-4 líq agitación	422	---/40días	8/8.7	Apatito	+	
	Aoar	---/1mes	8/9	Natofosfato	+	

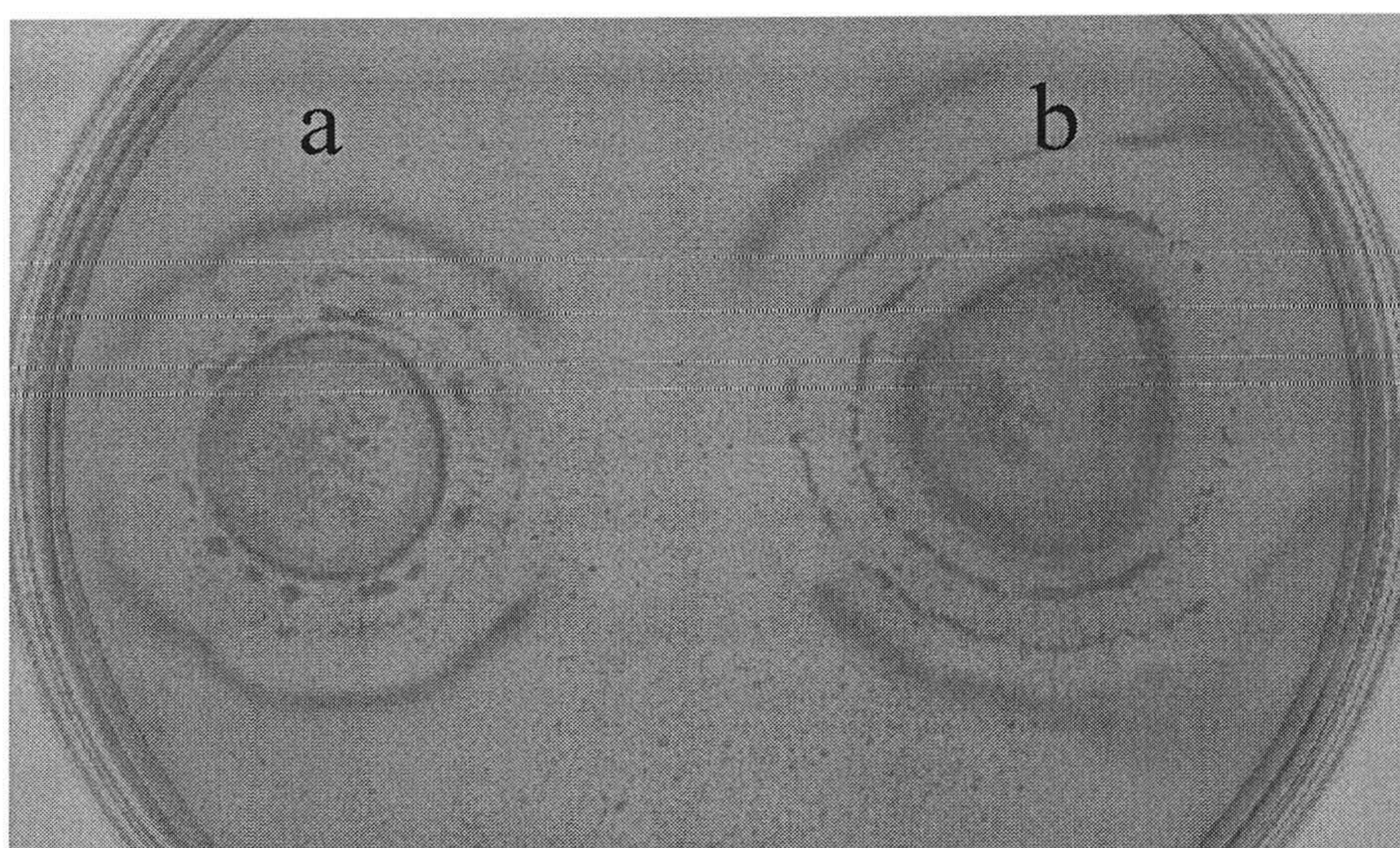
Para facilitar la comparación entre los resultados obtenidos con la cepa mutante y la cepa 422 se ha compuesto una tabla (tabla 10). En ella se han incluido, además de los resultados obtenidos en esta investigación, los datos referentes a la cepa 422 obtenidos en los mismos medios de cultivo utilizados en investigaciones previas (Ben Chekroun, 2000; González Muñoz, 2000). Estos últimos, para diferenciarlos de los originales de esta memoria, se han marcado en rojo.

2.1. Producción de carbonatos en medio M-2

En el medio M-2 la cepa 422 había demostrado producir calcita y calcita magnésica cuando se utilizaba gelificado con agar-agar y sólo calcita cuando los cultivos se realizaban en líquido agitación.

Para esta memoria se ha ensayado la cepa mutante en sólido y en líquido con agitación y ambas cepas en líquido-reposo.

Como puede observarse en la imagen que se incluye más abajo, el crecimiento de la cepa mutante *DZF1Δoar* (b) en medio sólido puso de manifiesto la producción de colonias más extendidas que la que origina en el mismo medio la cepa 422 (a), además de presentar una pigmentación amarillenta más intensa, cosa que ocurre en todos los casos en que se han ensayado ambas cepas en medio sólido .



Los cristales comenzaron a aparecer al cabo de los 5 días, al igual que con la cepa 422, para la que está descrita la aparición a los 5 días. Los cristales se recogieron tras dos meses de incubación mediante el procedimiento descrito en Material y Métodos. La identificación se llevó a cabo con MEB, microanálisis por EDX y difracción de rayos X. Las imágenes y diagramas obtenidos se muestran en la figura 31. De ellos se deduce que la cepa mutante produce calcita magnésica.

En medio líquido y reposo, tras incubación de un mes con la cepa mutante y tres meses con la cepa 422, se recogieron los precipitados producidos según se indica en Material y Métodos, y se estudiaron mediante MEB, microanálisis por EDX y difracción de rayos X. Los resultados se muestran en la figura 30, y ponen de manifiesto que la cepa mutante dio origen a la producción de calcita y carbonato de calcio, potasio y magnesio, mientras que la cepa 422 dio lugar a la producción de calcita magnésica.

En medio líquido y agitación, tras 30 días de incubación, se detectó, siguiendo los mismos procedimientos analíticos, la producción de calcita magnésica como puede verse en la tabla 10. En las mismas condiciones está descrito que la cepa 422 originaba la formación de calcita.

El crecimiento de los cristales de calcita magnésica en medio sólido en la cepa 422 se produce en torno a los halos circundantes de la colonia (Ben Chekroun, 2000), mientras que para la cepa mutante se ha observado un crecimiento en el centro de la colonia.

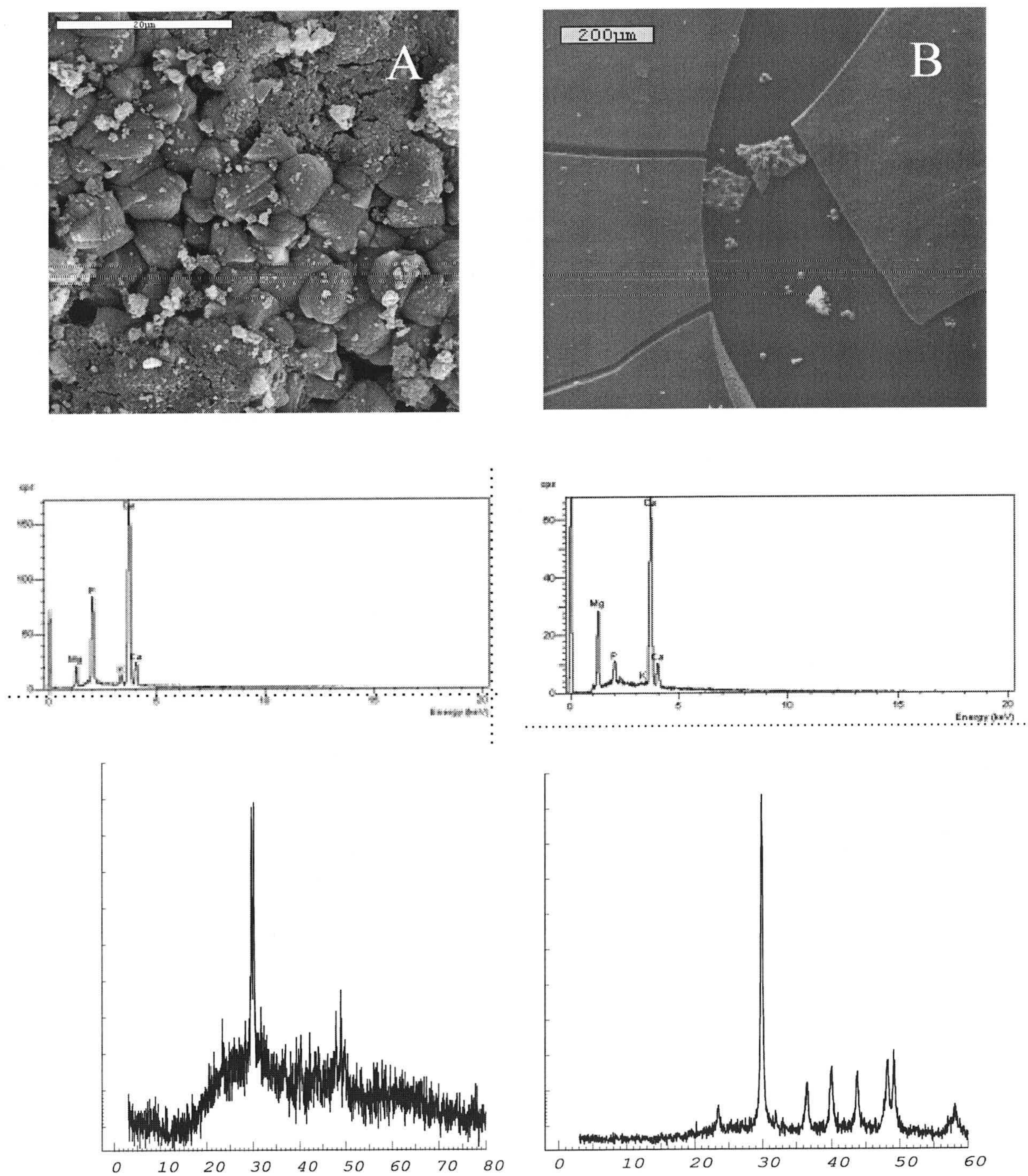


Figura 30: Calcita magnésica producida en el medio M-2 por las cepas 422 (A) y mutante (B) en cultivos líquidos en reposo. Microanálisis y difractogramas correspondientes.

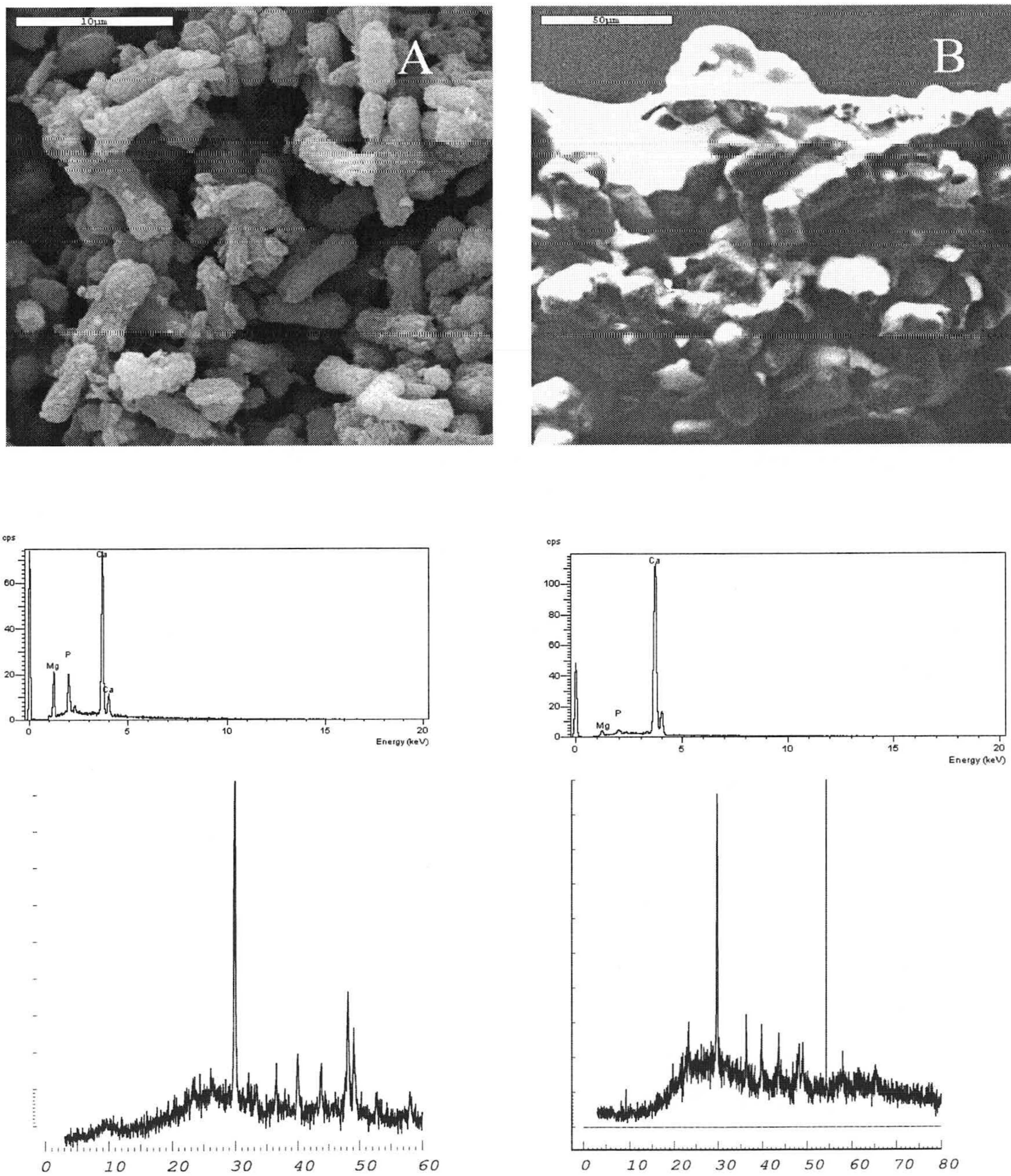


Figura 31: Calcita magnésica producida por la cepa mutante en el medio M-2 líquido con agitación (A) y sólido (B). Microanálisis y DRX correspondientes.

2.2. Producción de carbonatos y otros minerales en medio M-3

En el medio M-3 se había descrito un interesante comportamiento de la cepa 422. En sólido producía vaterita y en líquido y agitación originaba la formación de los dos polimorfos calcita y vaterita, y de un oxalato cálcico, la weddelita.

En los experimentos realizados para esta memoria se ha encontrado lo siguiente: en medio sólido los cristales procedentes de la cepa mutante comenzaban a aparecer tras 5 días de incubación en lugar de los 2 días en que se había descrito la aparición de los mismos con la cepa 422. Los cristales se recogieron tras 30 días de incubación y se estudiaron mediante MEB, microanálisis por EDX y difracción de rayos X (figura 35), lo que permitió identificarlos como vaterita. No obstante, a pesar de esta coincidencia con los producidos por la cepa 422, hay una notable diferencia. En los cristales producidos por la cepa mutante no se ha podido detectar la presencia de células calcificadas, cosa que se describió que ocurría en el caso de la vaterita producida por la cepa 422 en estas condiciones. Parece, además, que el grado de cristalinidad de la vaterita producida por la cepa mutante es menor.

En medio líquido y agitación, los cristales se recogieron tras un mes de incubación. Los resultados de los ensayos realizados con ellos se dan en la figura 34, de los que se deduce que se trata de vaterita. En estas condiciones hay una significativa diferencia con la mineralización descrita para la cepa 422, ya que esta última producía, además de vaterita, calcita y weddelita, (figuras 32 y 33). La difracción de rayos X de la vaterita producida por la cepa mutante indica una magnífica cristalinidad.

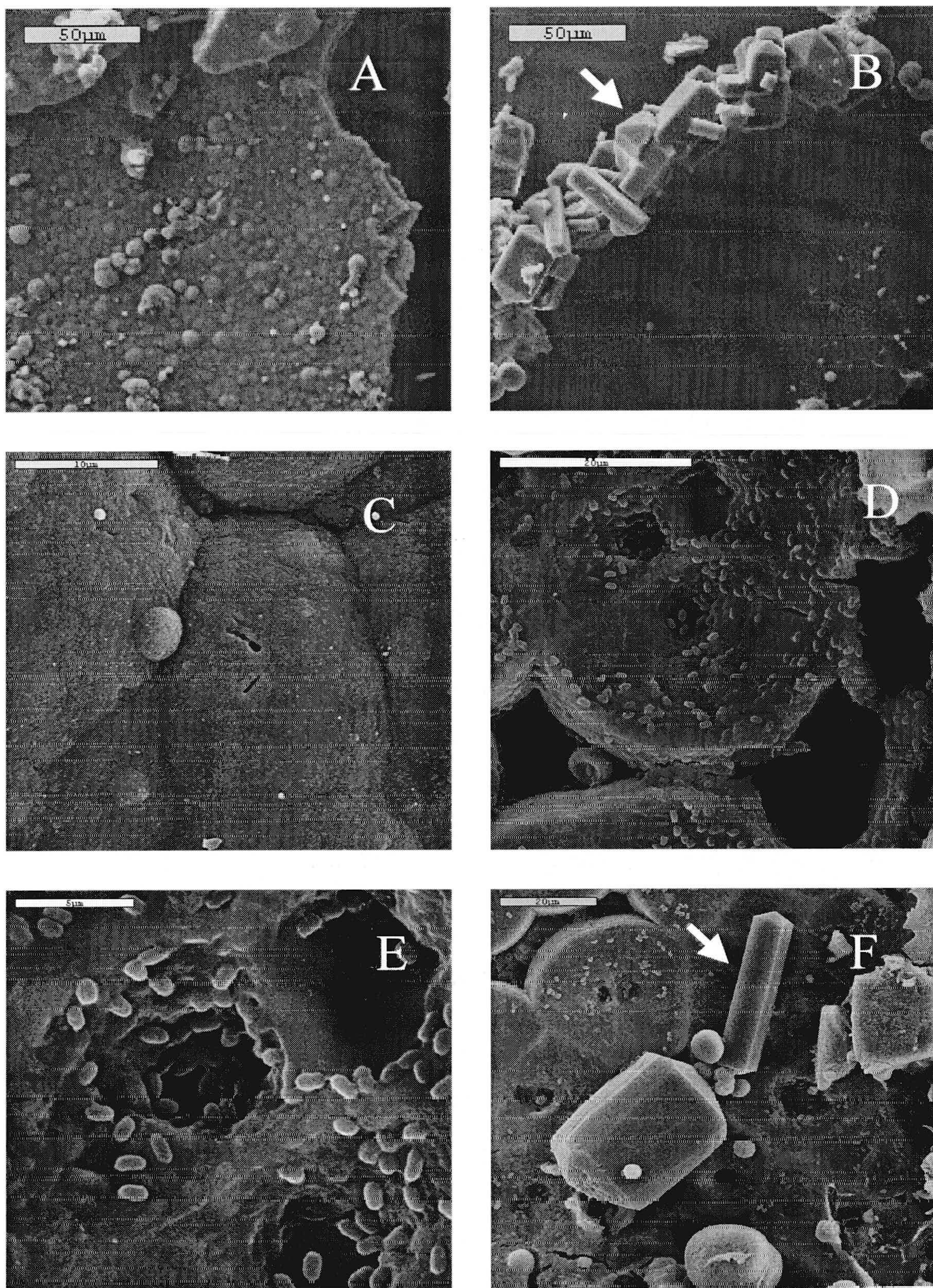


Figura 32: Cristales de vaterita, calcita y weddelita producidos por la cepa 422 en medio M-3 líquido reposo. A: posiblemente vaterita. B y F ,marcados con flecha, cristales de weddelita. D, E y F: células calcificadas.

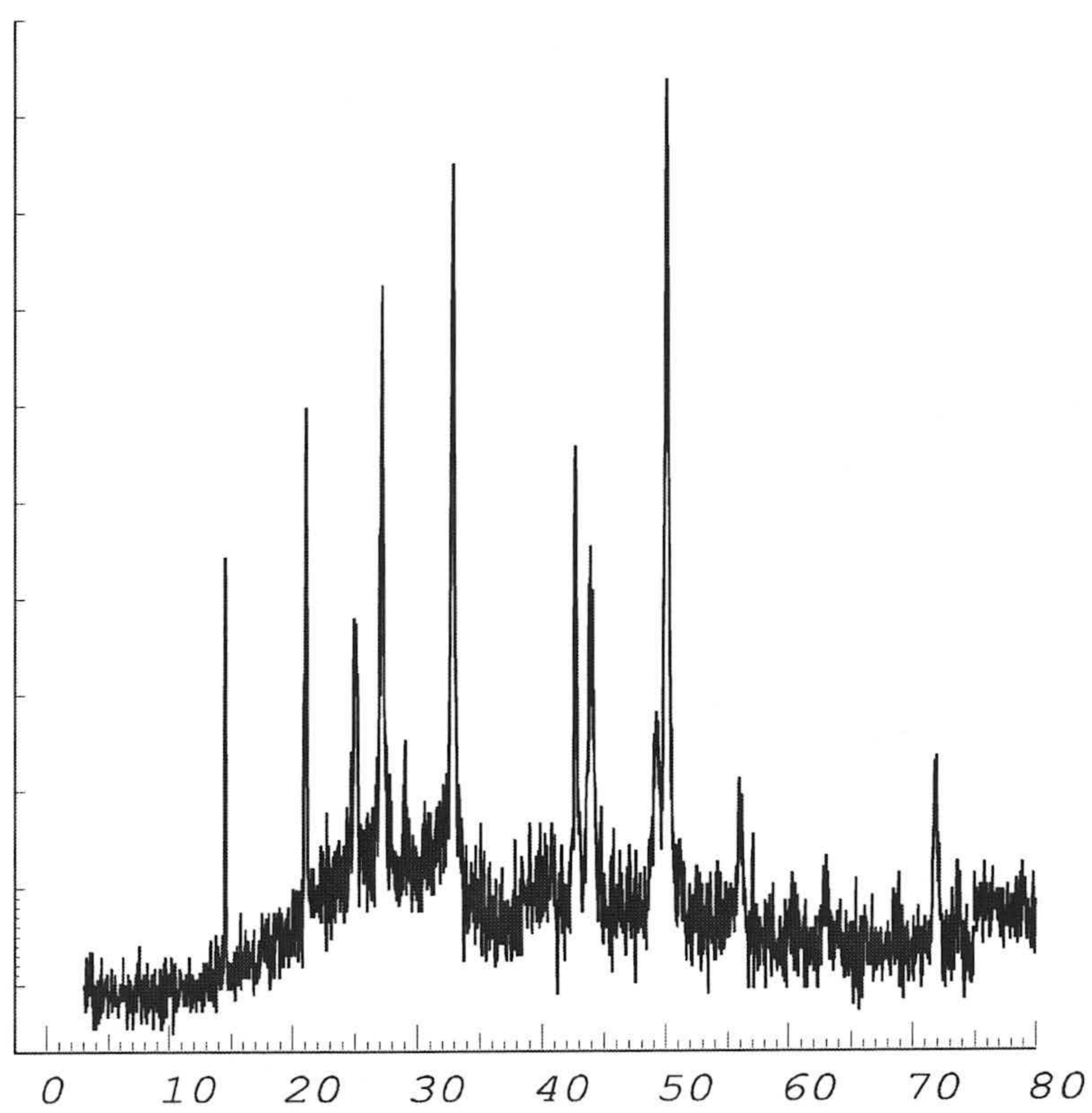
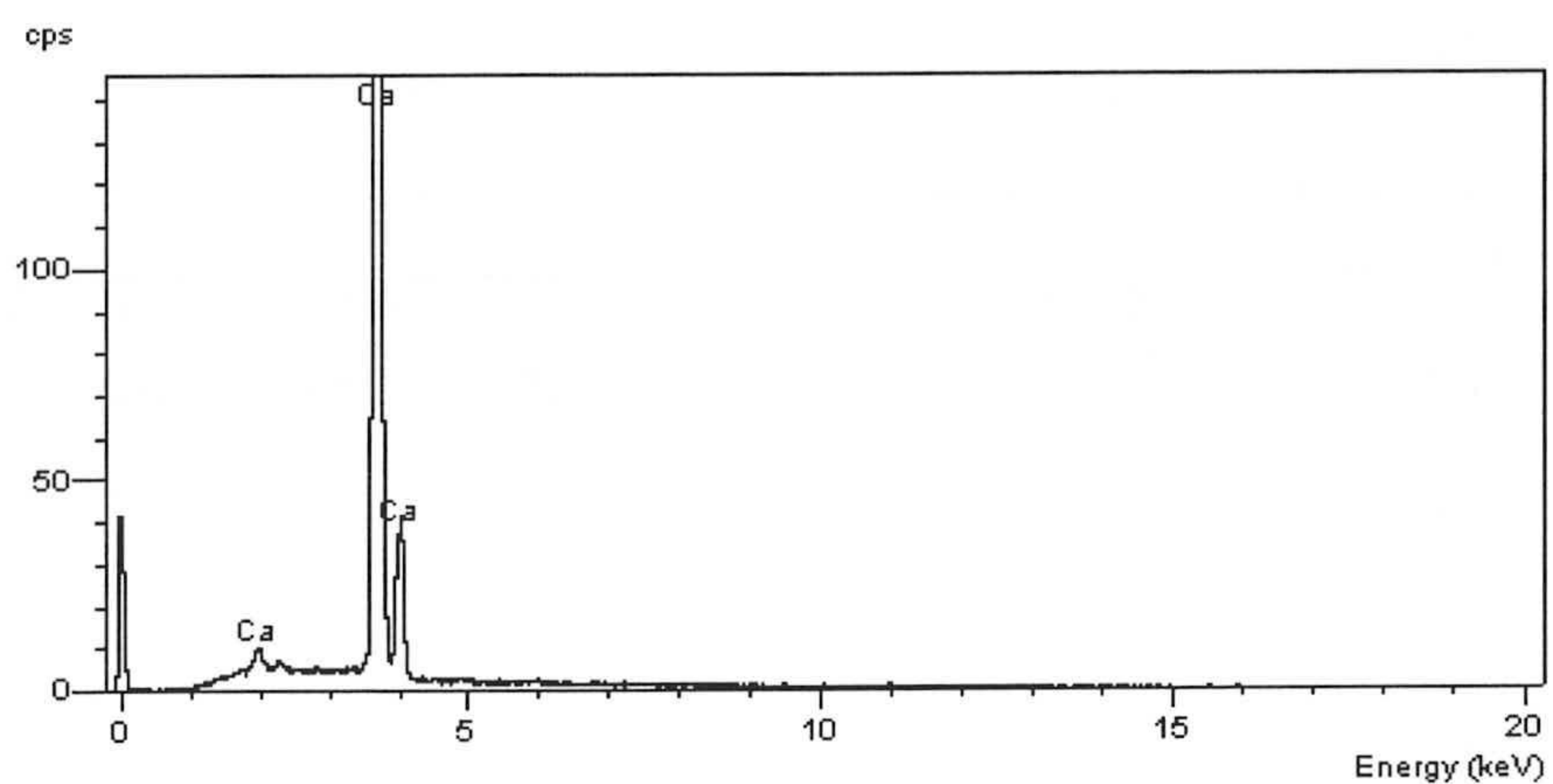


Figura 33: Microanálisis y difractograma correspondientes a los minerales de la figura 32

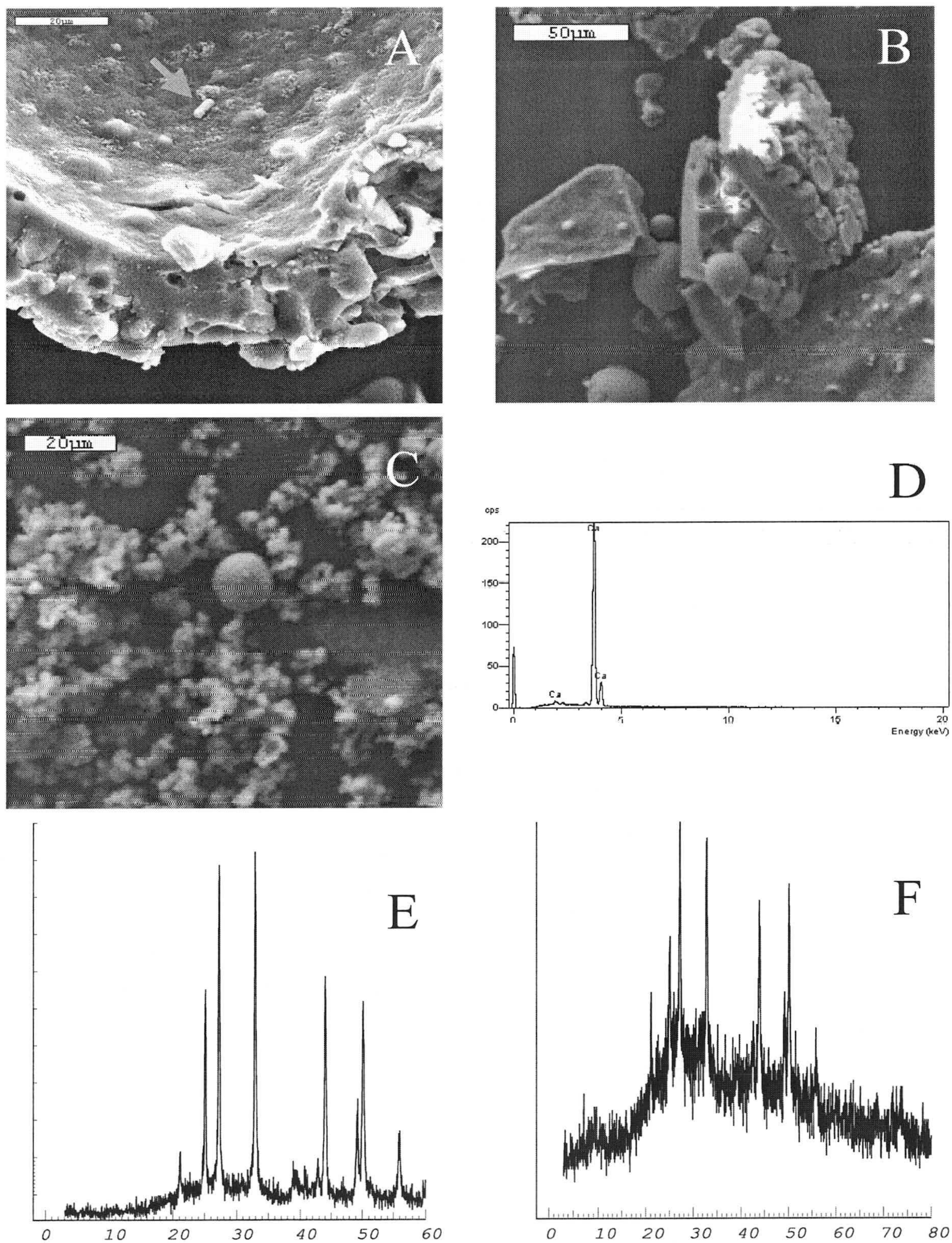


Figura 34: Cristales de vaterita producida por la cepa mutante en medio M-3 líquido, en reposo (A y B) y en agitación (C). D: microanálisis, E y F difractogramas correspondientes a los minerales obtenidos en reposo y agitación respectivamente.

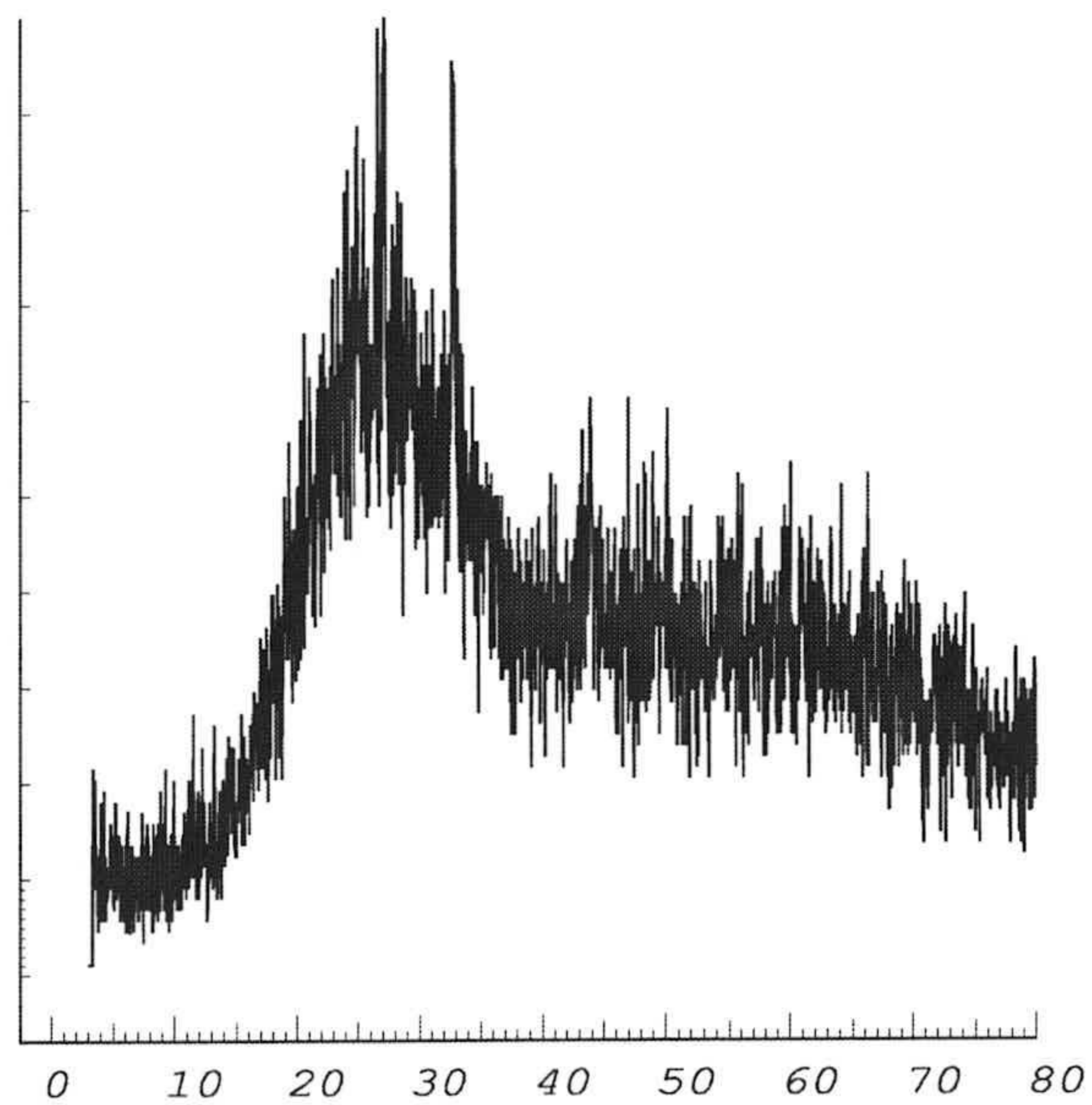
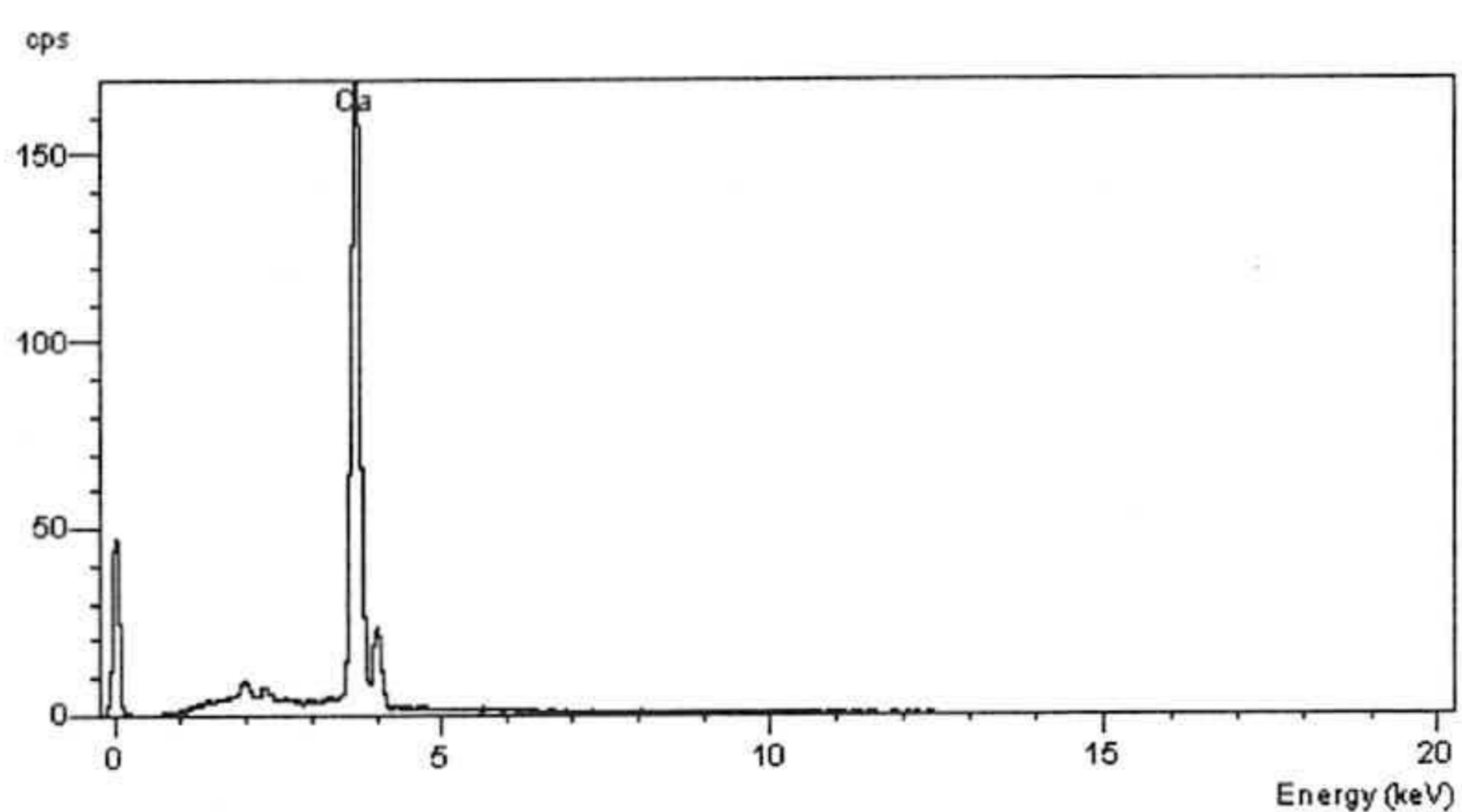
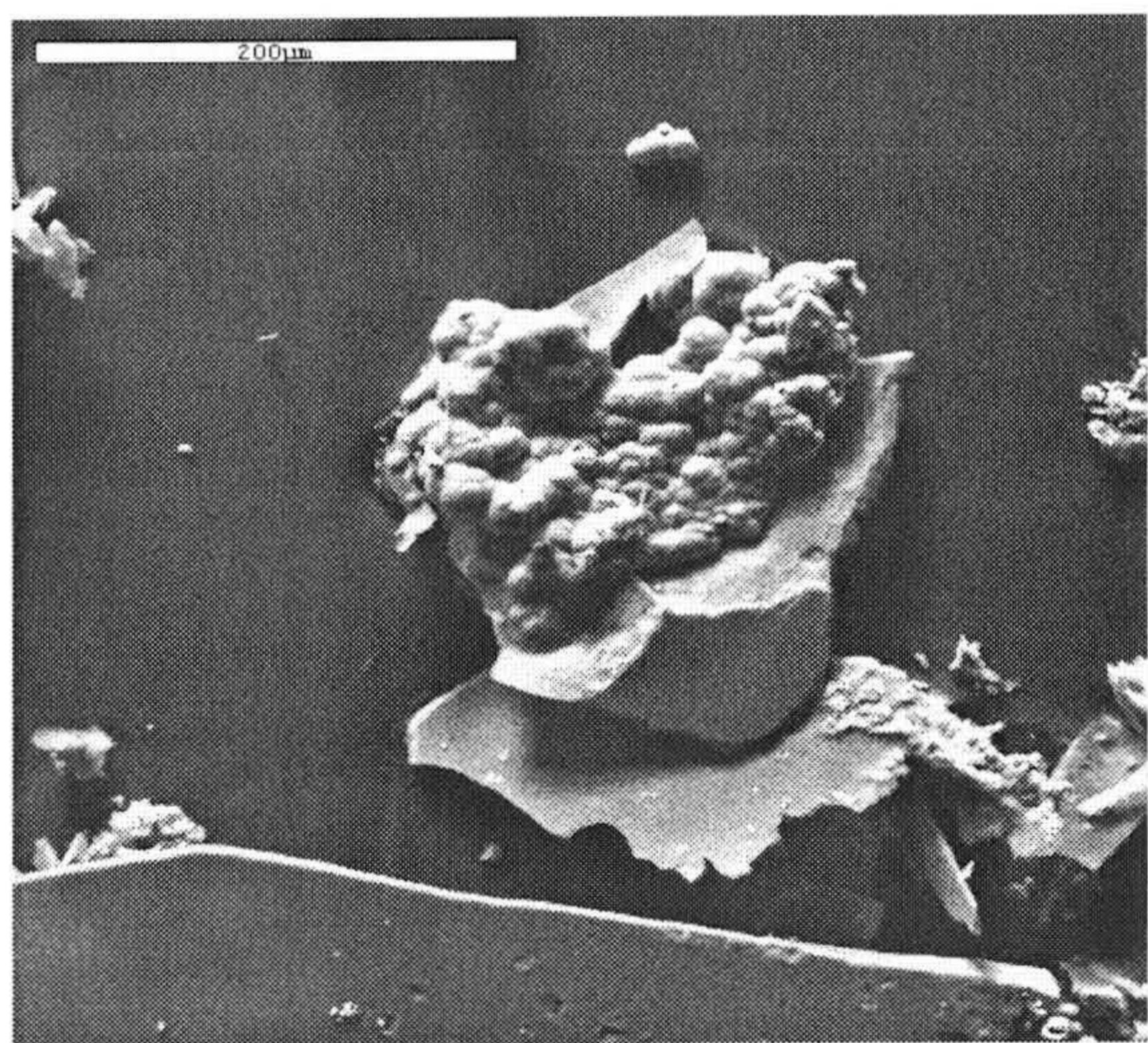


Figura 35: Cristales de vaterita producida por la cepa mutante en medio M-3 sólido. Microanálisis y diagrama de DRX.

Los experimentos de comparación de ambas cepas en medio M-3 líquido y reposo volvieron a poner de manifiesto la misma diferencia de comportamiento. Mientras la cepa 422 producía vaterita, calcita y weddelita (figuras 32 y 33), la cepa mutante sólo producía vaterita (figura 34). Además, en el caso de la cepa 422 es posible detectar células calcificadas (figura 32). Estas células presentan una morfología que parece indicar que estén en una fase intermedia entre células vegetativas típicas de estas bacterias y el estado de mixósporas. Este es un medio de cultivo en el que las mixobacterias utilizadas en este trabajo no se lisan y permanecen viables tras periodos de incubación de al menos 3 meses.

El aspecto de la vaterita producida por la cepa mutante es menos interesante, y no se pueden apreciar células calcificadas.

2.3. Producción de minerales en el medio M-9

Este medio se diferencia de los dos anteriores en que lleva una fuente adicional de fósforo, (ver tabla 3 en Material y Métodos), y según los datos previos, sólo se había ensayado con la cepa 422 en forma sólida. En estas condiciones, la cepa mencionada, producía calcita de excelente cristalinidad, dando cristales que presentaban tendencia al desarrollo de formas escalonohédricas como de “dientes de perro”.

Para esta memoria se ha ensayado la cepa mutante igualmente sólo en medio sólido. El crecimiento de los cristales se detectó al mes de incubación, y con la cepa 422 su aparición se había descrito tan sólo a los 3 días. Se recogieron tras 2 meses de incubación, mediante las técnicas descritas en Material y Métodos, y se identificaron mediante MEB, microanálisis por EDX y difracción de rayos X. Los resultados obtenidos se pueden ver en la figura 36, y ponen de manifiesto que en el caso de la cepa mutante se produce calcita y vaterita, pero la cristalinidad obtenida es peor que la descrita para la calcita producida en las mismas condiciones por la cepa 422; y no es posible detectar cristales de calcita con la morfología escalonohédrica mencionada.

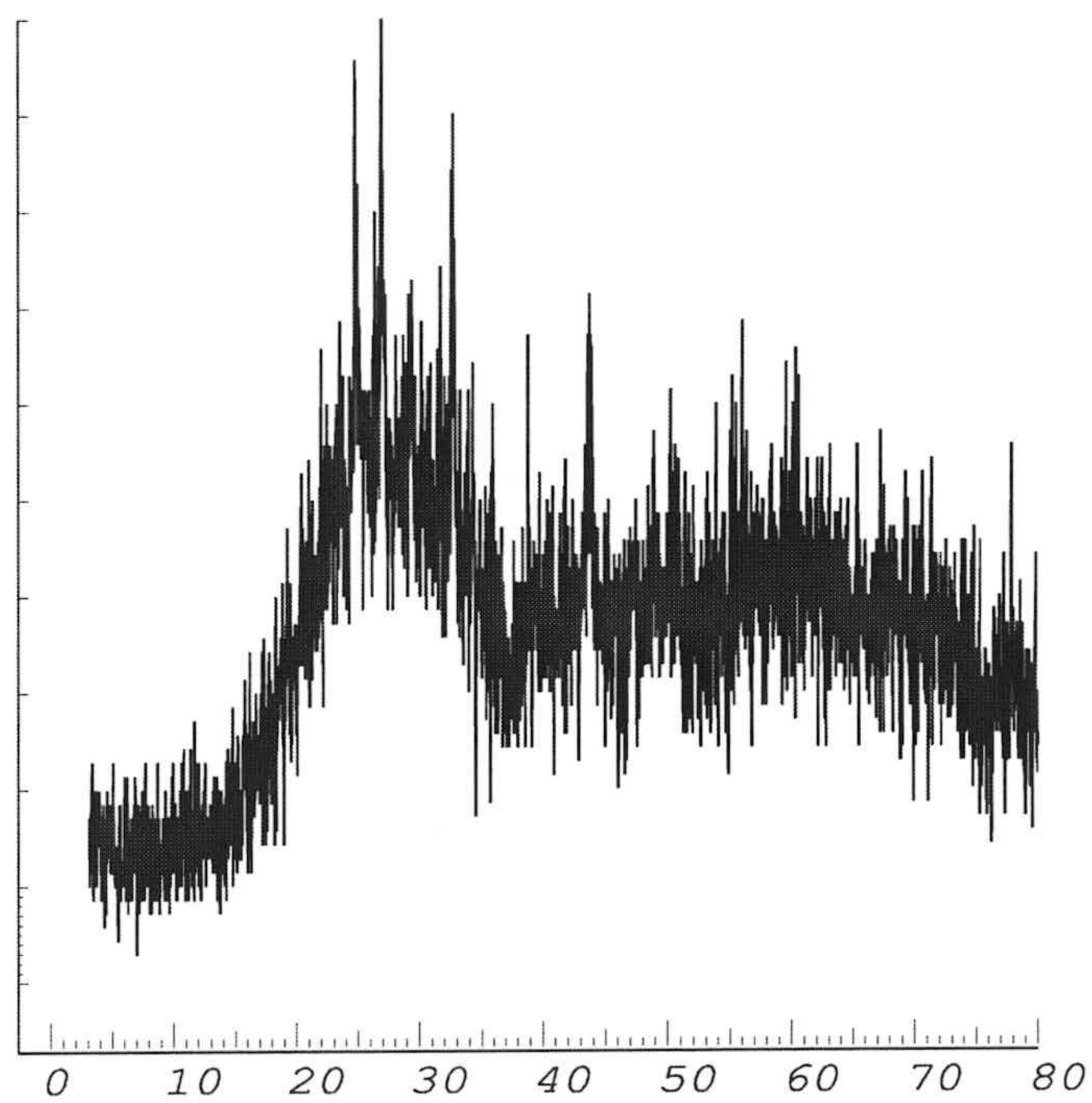
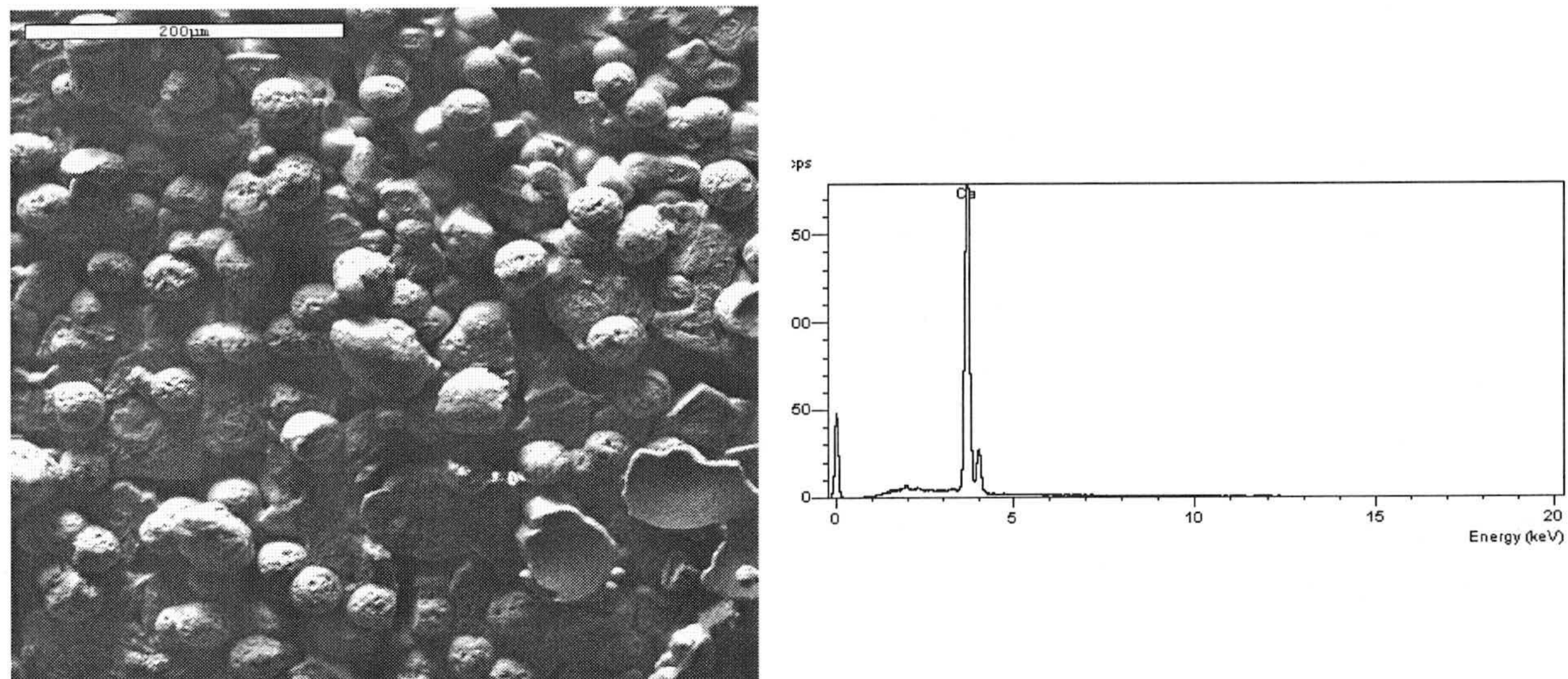


Figura 36: Vaterita y calcita producidas por la cepa mutante en medio M-9 sólido. Microanálisis y difractograma correspondientes.

2.4. Producción de carbonatos en medio CC

El medio CC había sido utilizado en estudios previos a este trabajo con la cepa 422 en forma sólida, dando lugar a la producción de vaterita y calcita en proporciones del 50% cada una (Ben Chekroun, 2000). Para este trabajo se ensayó el comportamiento de la cepa mutante en medio sólido y se realizó, además, el estudio comparativo de ambas cepas en medio líquido en reposo.

En medio sólido los cristales comenzaron a aparecer al cabo de 5 días de incubación, en lugar de a los 2 días, comportamiento descrito por la cepa 422. La identificación de estos cristales se llevó a cabo nuevamente mediante MEB, microanálisis por EDX y difracción de rayos X, mostrándose en la figura 39 los resultados obtenidos. Estos resultados ponen de manifiesto que se trata también de calcita y vaterita, pero con menor cristalinidad que los descritos por la cepa 422. No obstante, la diferencia más significativa está en el hecho de que con la cepa mutante no ha sido posible detectar la presencia de células calcificadas, cosa que ocurría de manera notable con la cepa 422 (Ben Chekroun, 2000).

La investigación llevada a cabo usando medio líquido arroja los siguientes resultados: en reposo ambas cepas dan origen a la producción de vaterita de buena cristalinidad (figuras 37 y 38) y con morfología lenticular muy similar en ambos casos, si bien estas lenticulas aparecen más compactadas en el producto de la cepa mutante (figura 37). Existe, además, una diferencia entre ambas. Esta diferencia consiste en que la cepa 422 produce junto con la vaterita una pequeña cantidad de calcita, como se deduce del difractograma de rayos X (figura 38).

A la vista de estos resultados se ensayó el comportamiento de la cepa mutante en medio líquido con agitación para ver la posible influencia de la modalidad de cultivo sobre las sorprendentes morfologías producidas. Los resultados obtenidos se dan en la figura 39, donde puede observarse que, efectivamente, ocurre esta influencia. Por una parte aparece calcita y vaterita, en proporciones estimadas del 20% y 80% respectivamente; y por otro lado, no se producen morfologías lenticulares, sino más bien esferoidales.

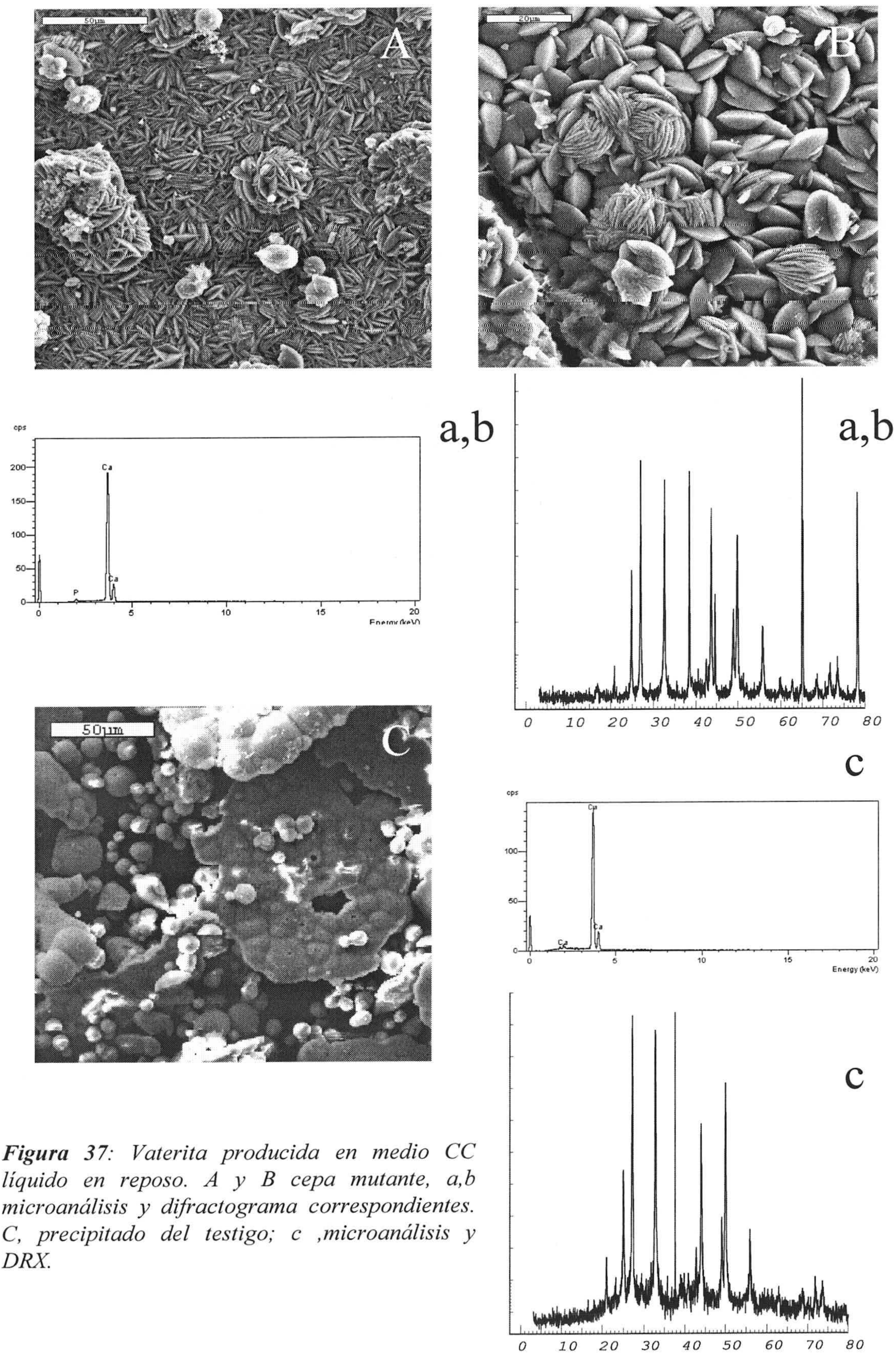


Figura 37: *Vaterita* producida en medio CC líquido en reposo. A y B cepa mutante, a,b microanálisis y difractograma correspondientes. C, precipitado del testigo; c ,microanálisis y DRX.

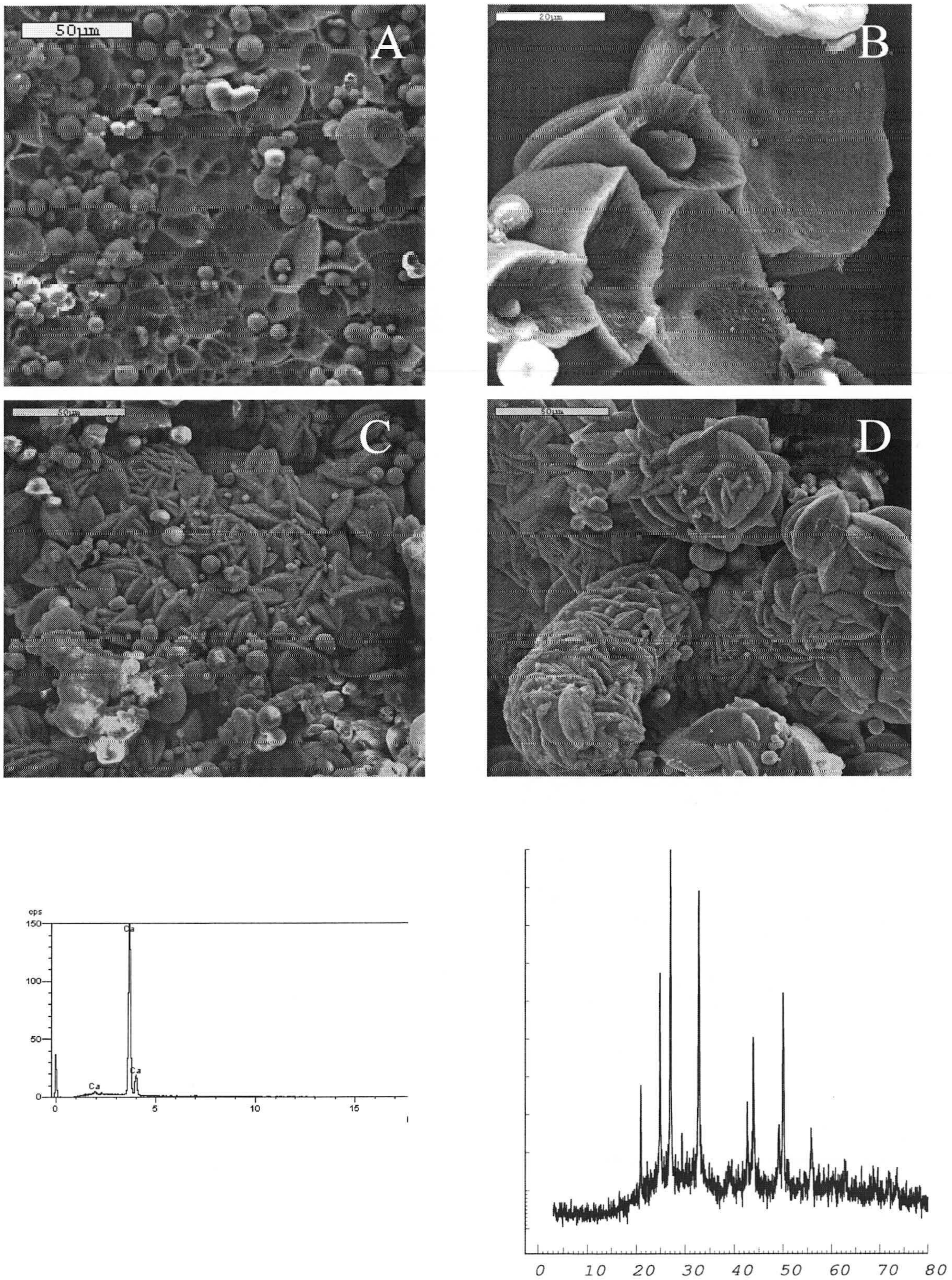


Figura 38: Vaterita y calcita producidas por la cepa 422 en el medio CC líquido en reposo. Microanálisis y diagrama de DRX.

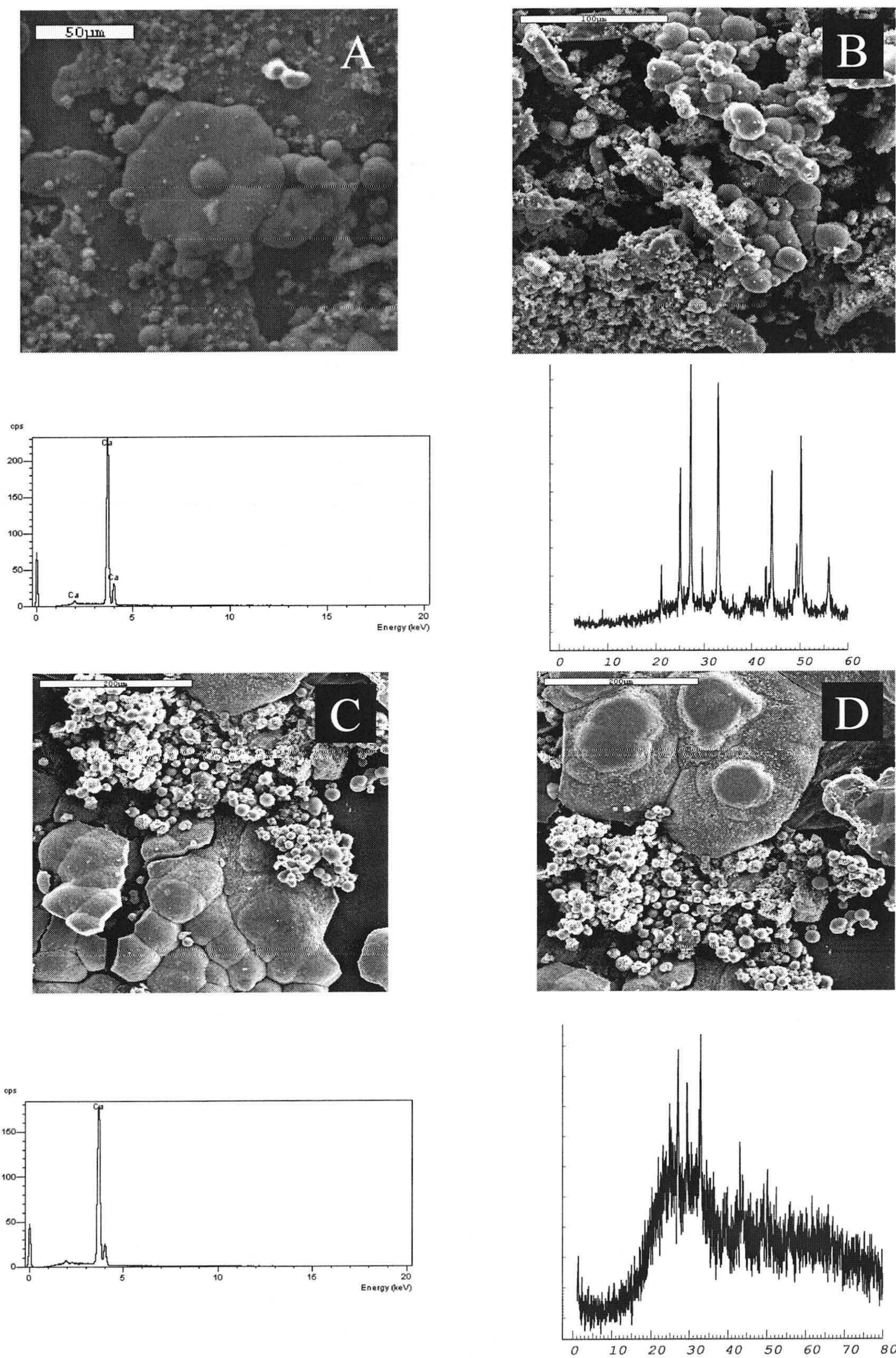


Figura 39: Calcita y vaterita producidas por la cepa mutante en medio CC líquido agitación (A y B) y sólido(C y D). Diagramas de microanálisis y DRX respectivos.

Hay que hacer notar en este caso que en los matraces control en reposo se produjo una ligera cantidad de precipitado, cuya difracción de rayos X demostró la presencia de vaterita aunque de menor cristalinidad que la producida en presencia de bacterias, y con un aspecto morfológico que nada tiene que ver con la producida en presencia de bacterias (figura 37).

2.5. Producción de minerales en medios de cultivo con diferentes cationes

Teniendo en cuenta la capacidad de producción de carbonatos descrita para *M. xanthus*, se decidió, como se indicó en los objetivos de esta memoria, ensayar la posibilidad de obtener carbonatos diferentes de la calcita y la vaterita. Con este propósito se utilizaron los medios: CMBa, CMMg, CMMn, CMZn, CMCo y CMFe, cuya composición se puede ver en Material y Métodos, tabla 3. Todos ellos derivan del medio CM (0.18% CaCl₂ y 0.4% de extracto de levadura; pH 8), en el que la cepa 422 había demostrado la capacidad de producción de calcita. Debido a la simplicidad de la composición pareció adecuado para emplearlo como base para otros medios con diferentes cationes, de modo que se evitara la formación de precipitados. Todos ellos, salvo el medio al que se le ha añadido bario, llevan 0.1% de Cl₂Ca y 1mM de la sal de catión correspondiente. El medio con bario lleva, como se indicó en Material y Métodos, lleva 2mM de bario. En todos los casos los ensayos se han realizado en medios sólidos.

2.5.1. Medio CMFe

En este medio, que, como se indicó al inicio de este apartado, se utilizó para un ensayo previo de capacidad biomineralizadora de la cepa DZF1, se han ensayado las tres cepas utilizadas a lo largo de esta memoria.

En este medio, las colonias aparecían con coloración marrón-amarilla, formándose cristales al cabo de los 40 días aproximadamente, identificándose a continuación como en los casos anteriores. Los resultados obtenidos pueden verse en las figuras 40, 41, 42 y 43. Como puede observarse, el comportamiento de las tres cepas es diferente en este medio.

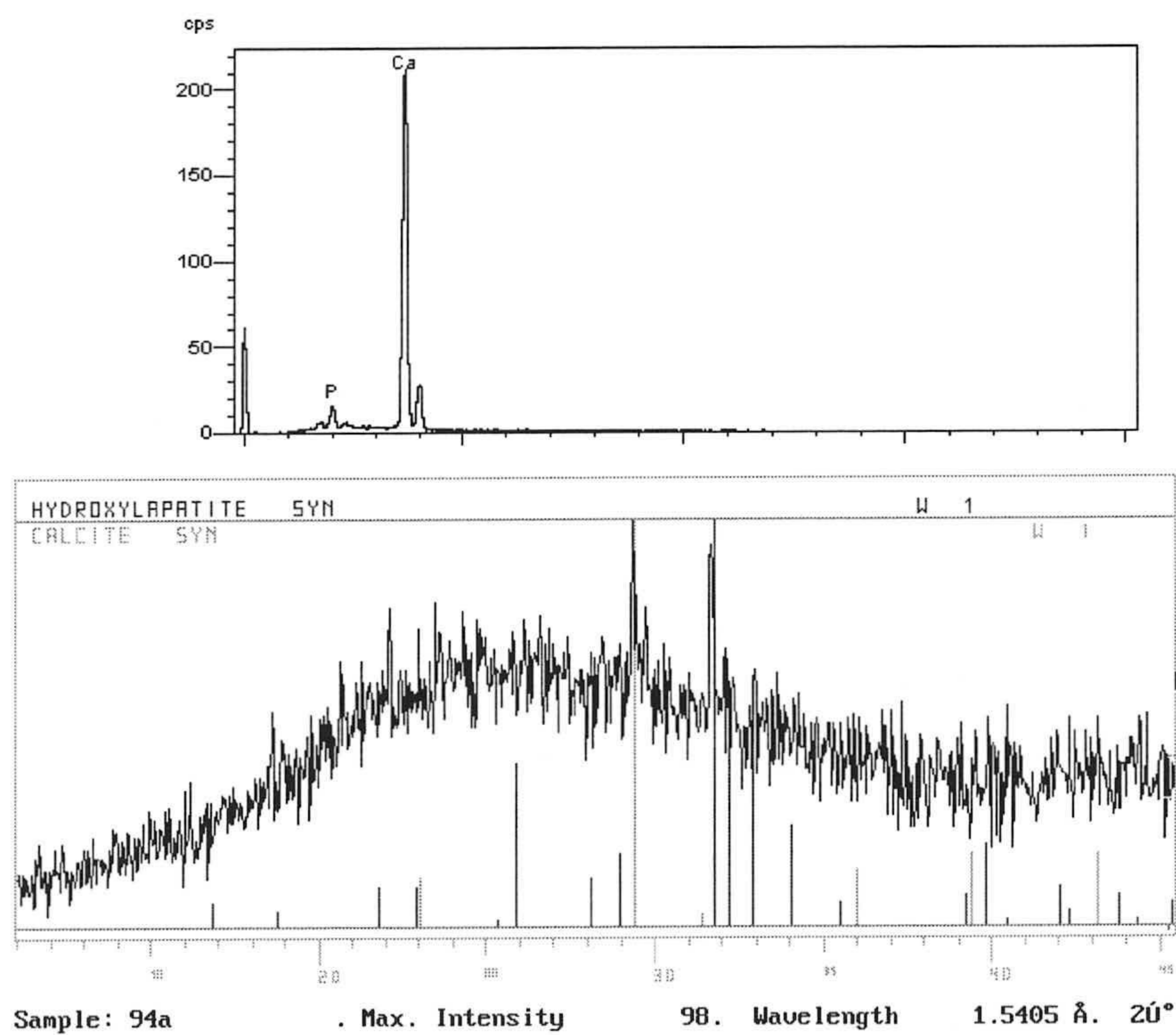
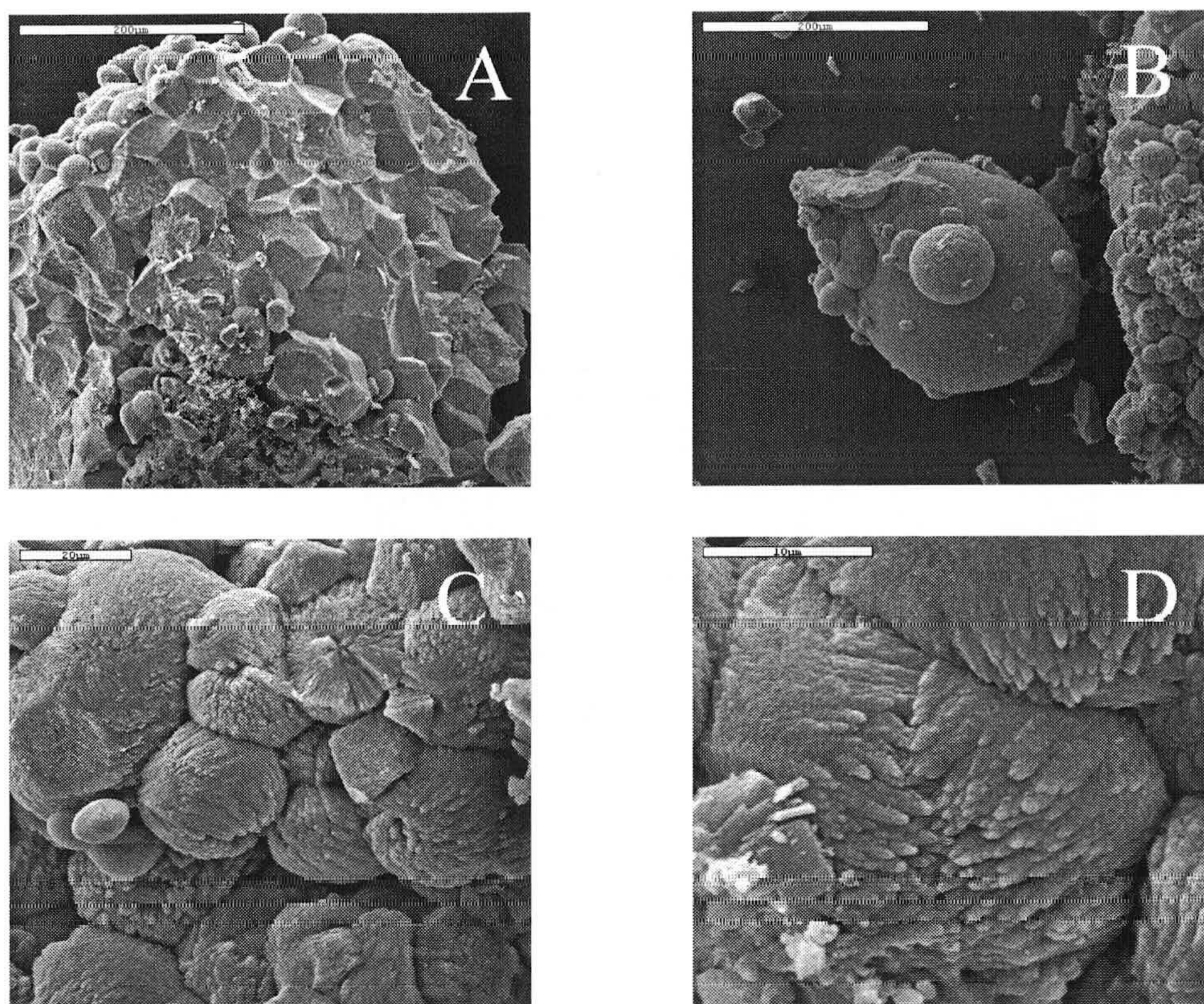


Figura 40: minerales producidos por la cepa 422 en medio CMFe. Microanálisis y difractograma correspondientes. D: detalle de C.

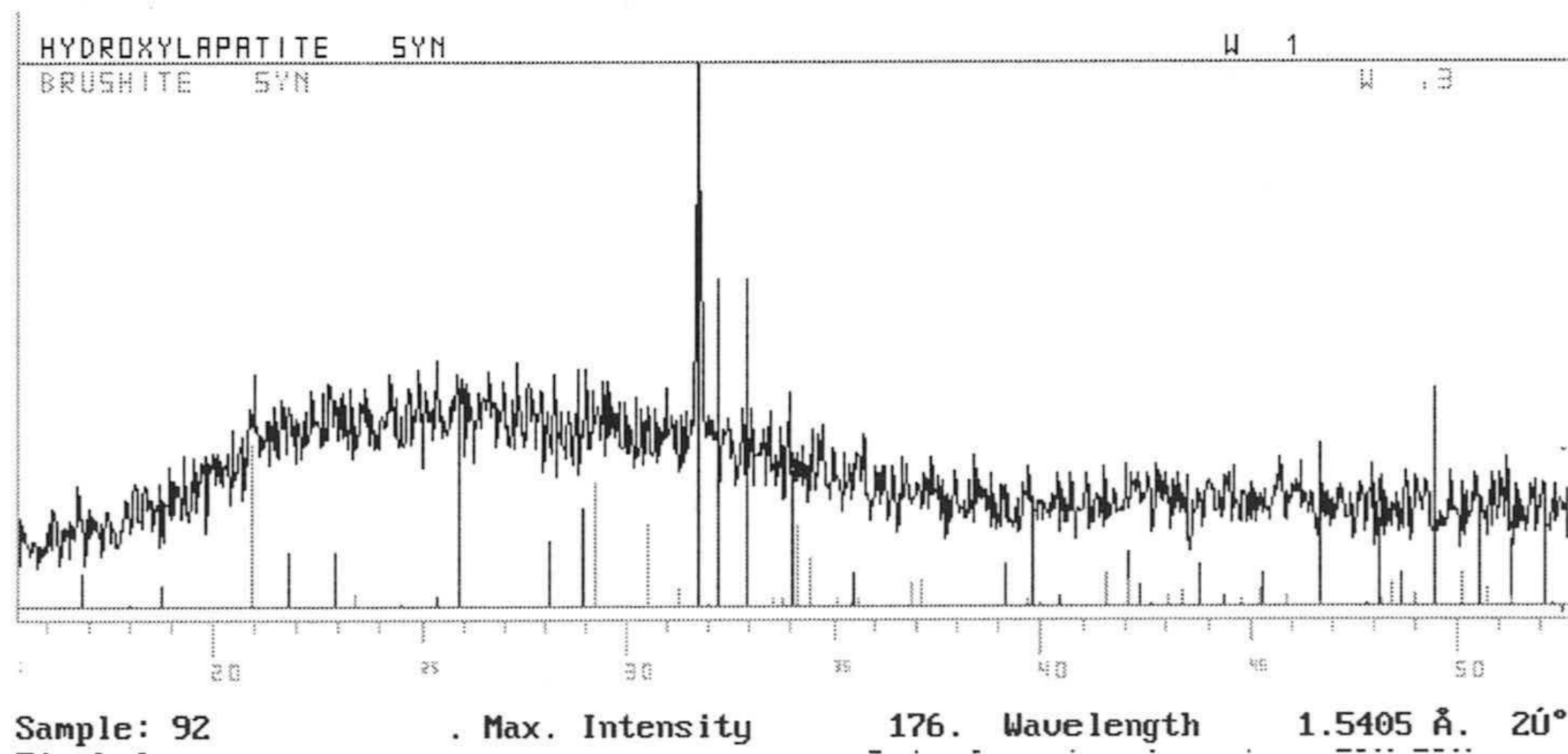
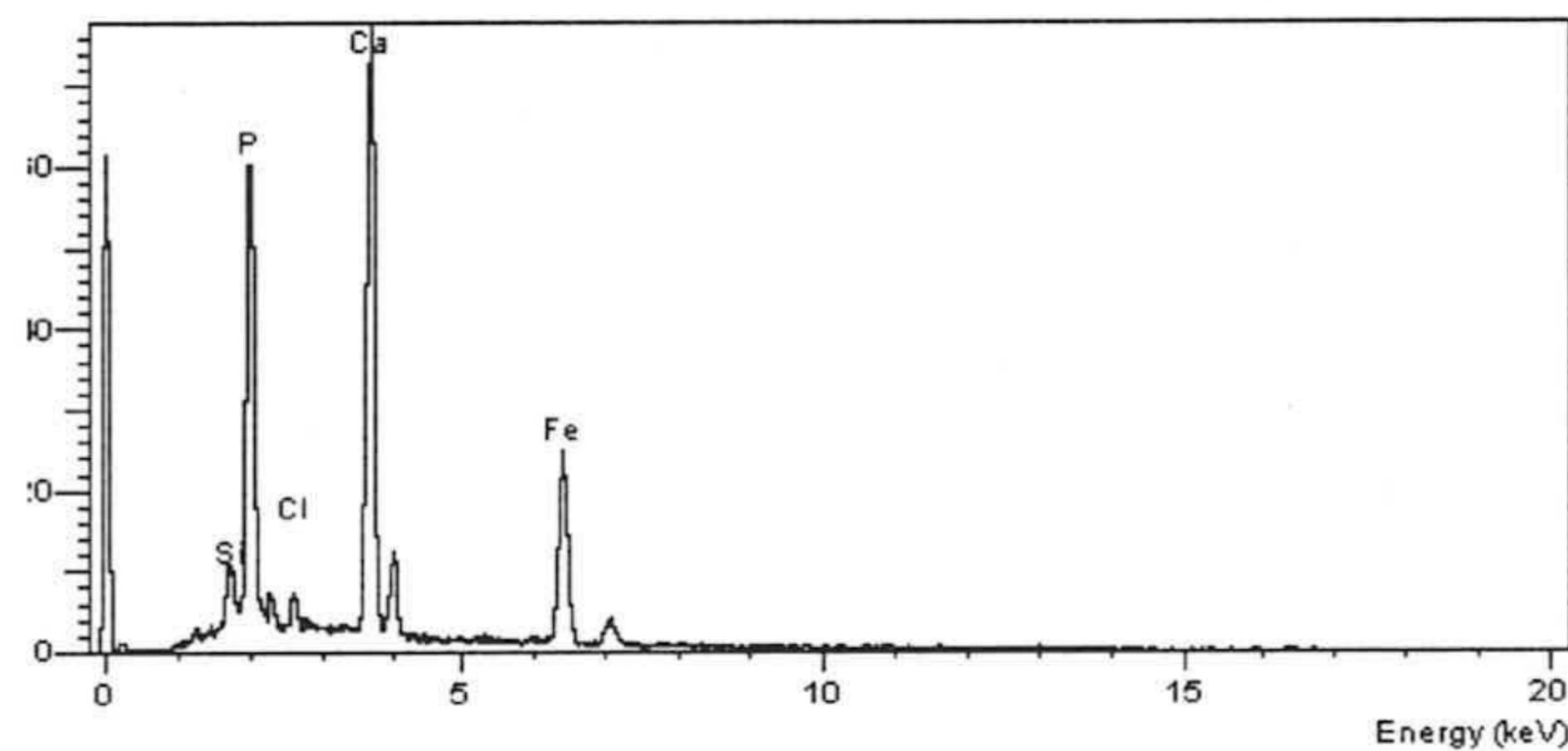
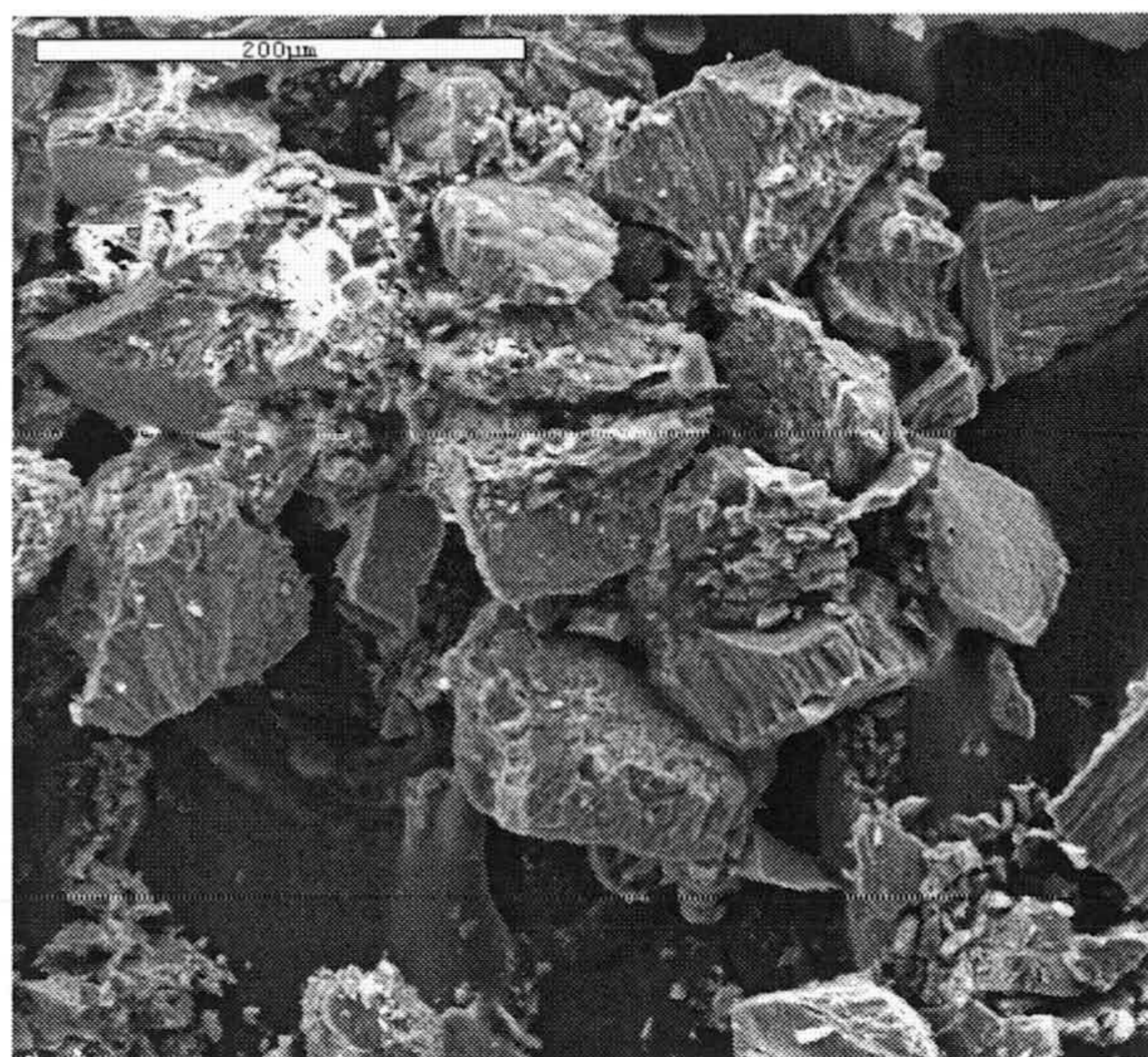


Figura 41: Minerales (apatito y brushita) producidos por la cepa mutante en medio CMFe. Microanálisis y difractograma correspondientes.

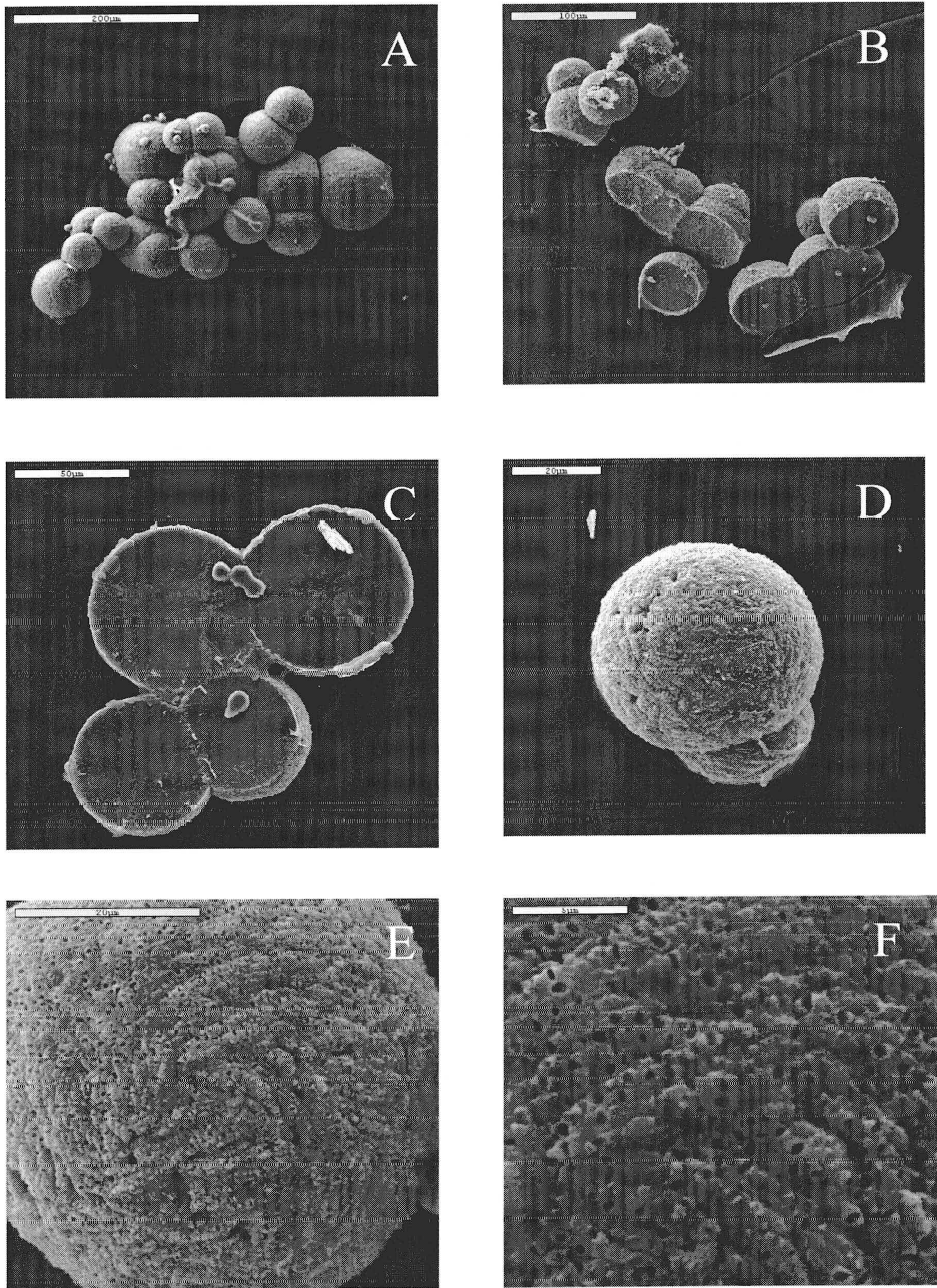


Figura 42: Minerales (calcita, vaterita, hidroxilapatito y weddelita) producidos por la cepa DZF1 en medio CMFe. E, detalle de D. F, detalle de E.

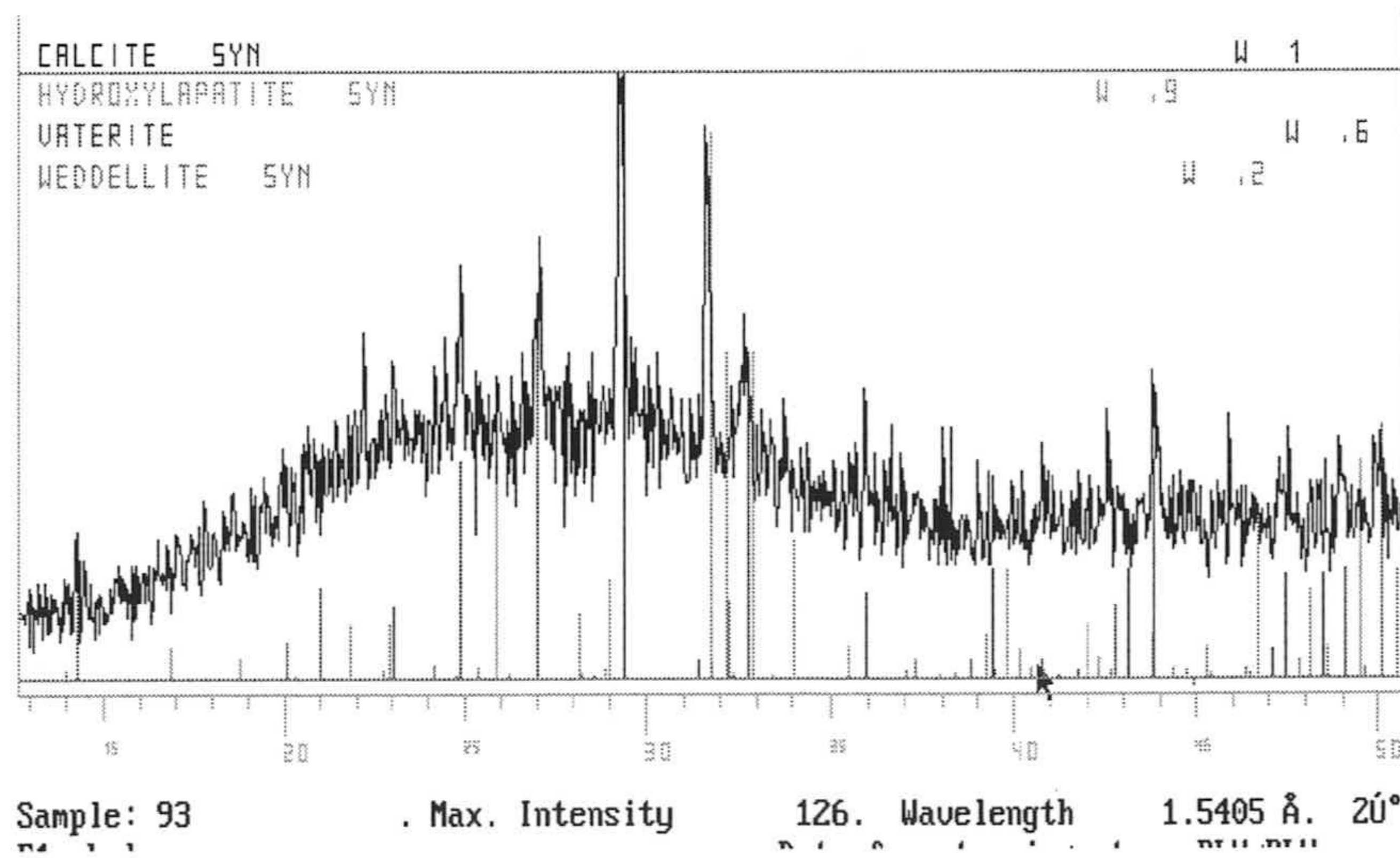
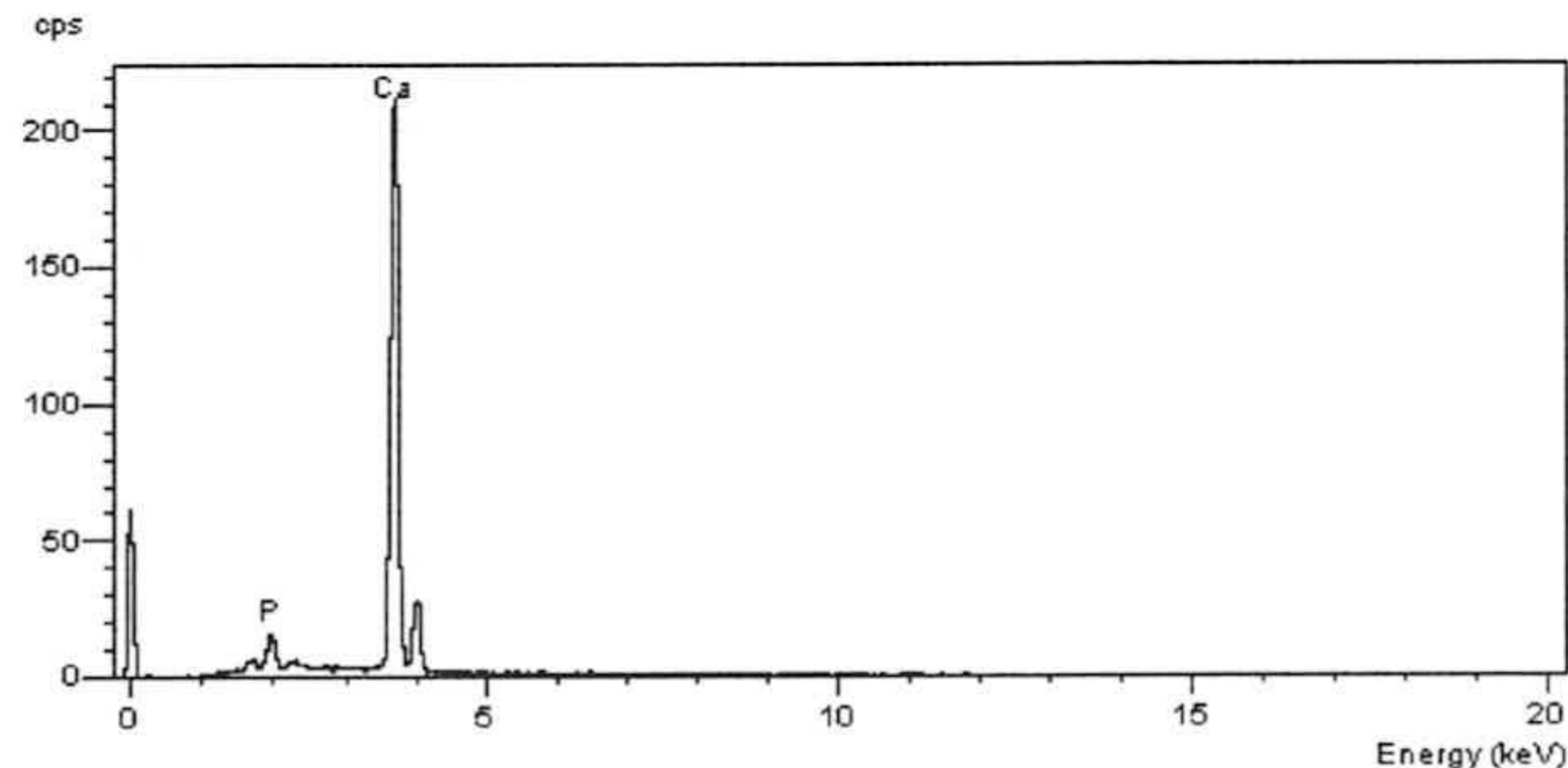
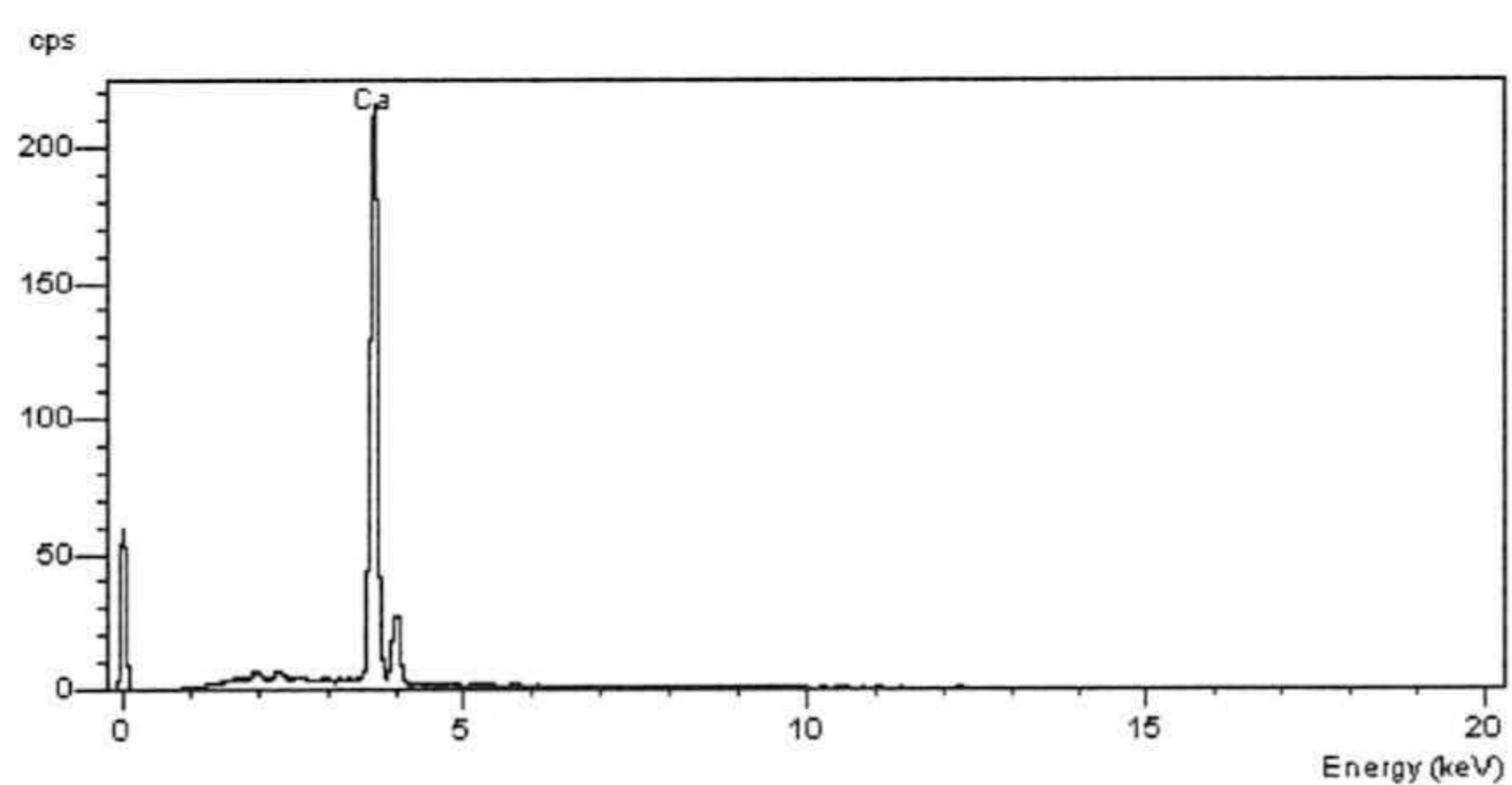
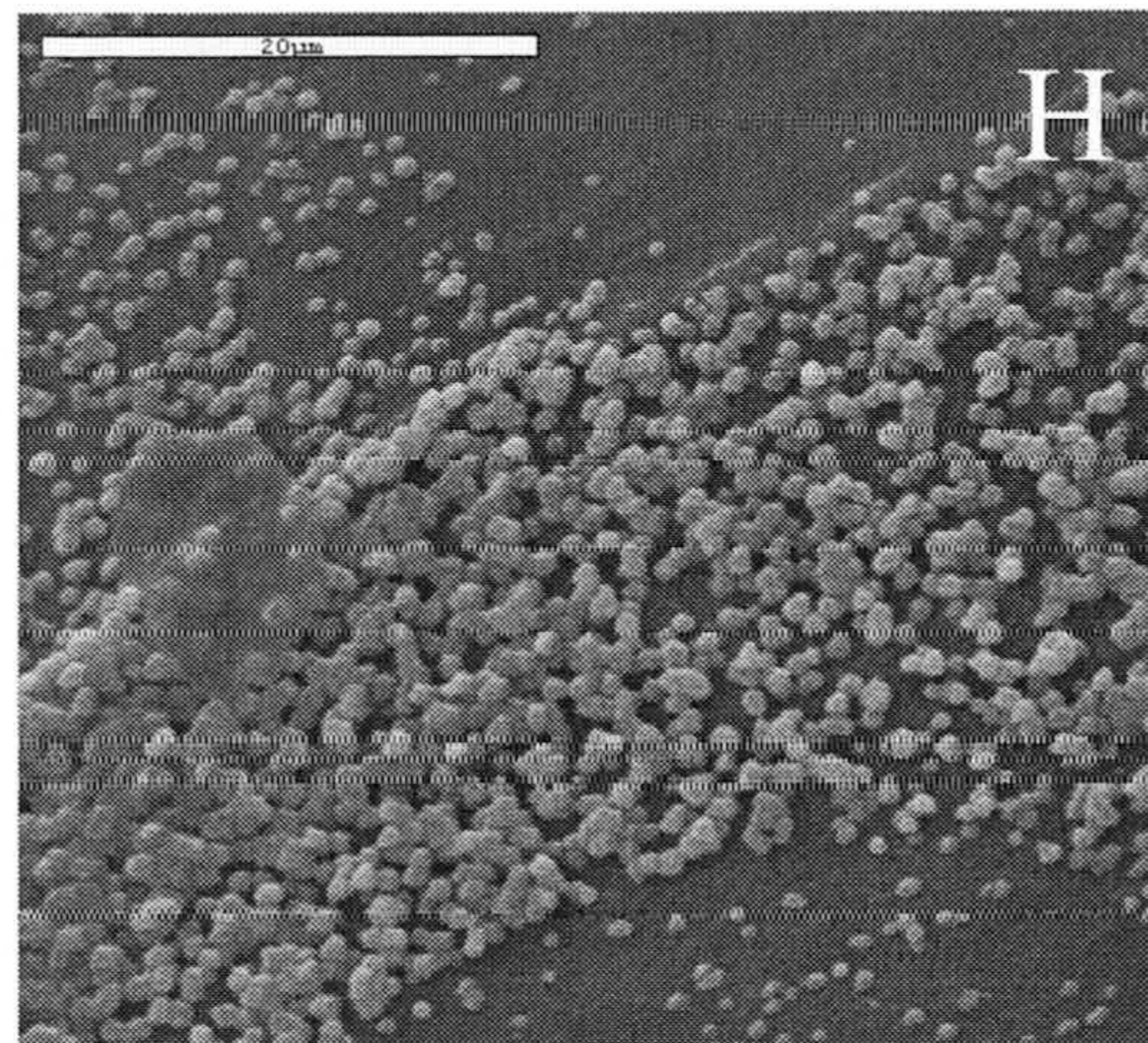
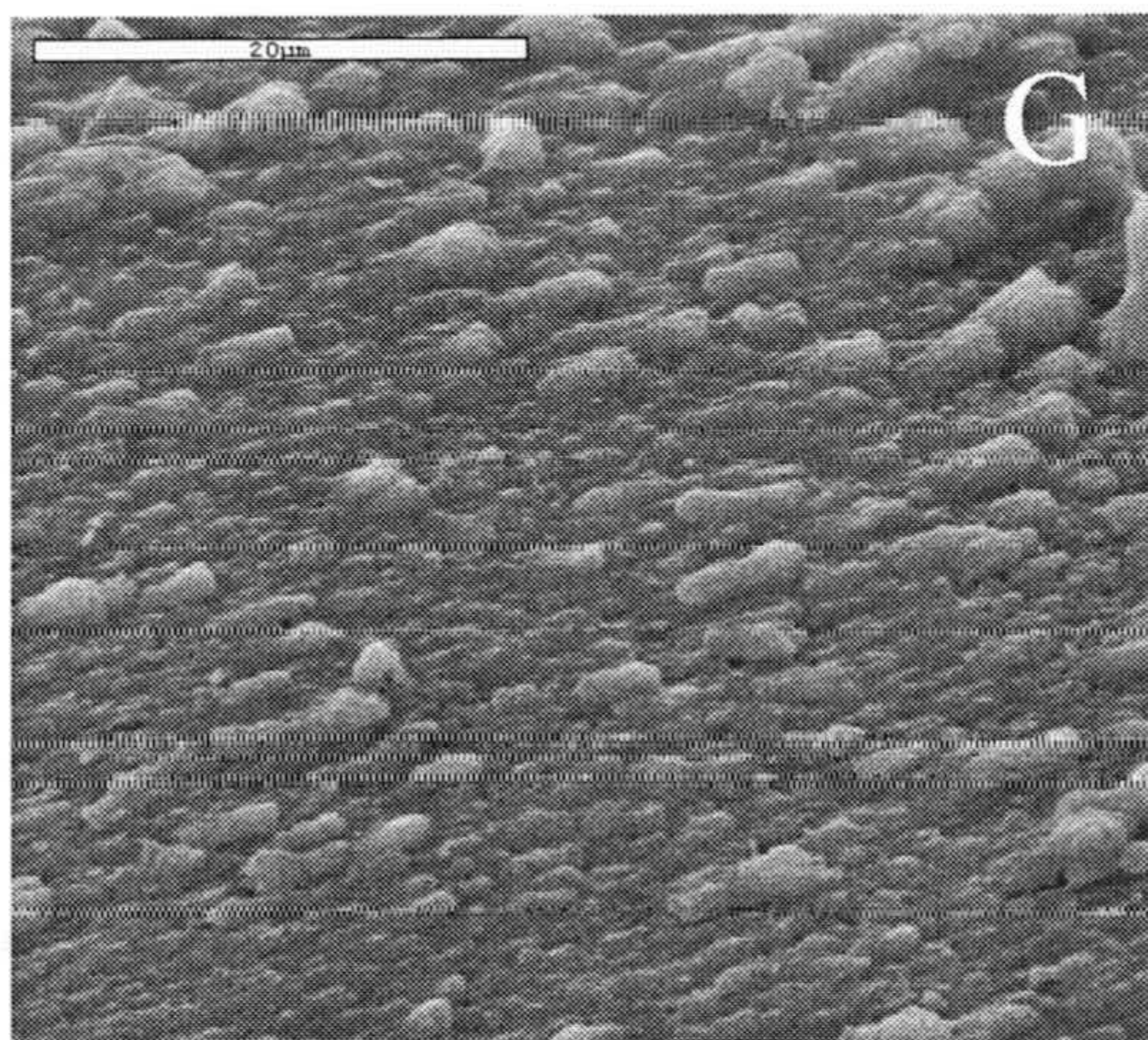


Figura 43 (continuación de la figura 42): G y H, otras morfologías encontradas. Microanálisis y difractograma.

La cepa 422 produce hidroxilapatito y calcita. La cepa DZF1 da origen a la formación de calcita, vaterita, hidroxilapatito y weddelita. Finalmente, la cepa mutante produce apatito y brushita ($[\text{PO}_4\text{HCa} \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$). Además de la diferencia en cuanto a los minerales producidos, también son dignos de destacar algunos aspectos relativos a la morfología. Mientras que los minerales producidos por la cepa mutante no muestra nada significativo, la cepa DZF1 da lugar a la formación de unas esferitas (figura 42), con una porosidad característica y llamativa. Estos poros parecen ser las huellas dejadas por las bacterias que hubieran mineralizado su estructura externa (posiblemente pared y/o membrana citoplasmática). Por su parte, la cepa 422 da lugar a diversas morfologías como puede apreciarse en la figura 40, destacando entre ellas las agupaciones fibrosoradiales de la figura 40 C y D.

2.5.2 Medio CMMg

En este medio las colonias presentaban un color amarillento en el caso de la cepa 422, mientras que las colonias de la cepa mutante tenían un color marrón. Los cristales comenzaron a crecer a partir de un mes de incubación.

EL comportamiento en este medio es verdaderamente llamativo en lo que se refiere a Biomineralización. Como puede deducirse de los análisis efectuados, (ver figura 44), la cepa 422 produce weddelita formando agregados completamente orientados, según [011].

La cepa mutante da lugar a la formación de estanfieldita y fosforroesslerita. La estanfieldita es un fosfato cálcico con magnesio, hierro y manganeso $[\text{Ca}_4(\text{Mg,Fe,Mn})(\text{PO}_4)_6]$. La fosforroesslerita es un fosfato ácido de magnesio con 7 moléculas de agua $[\text{MgH}(\text{PO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O}]$, pero debido a la pobre definición del difractograma, la afirmación de la producción de estos dos minerales hay que decirlo con reserva. Según los microanálisis correspondientes, podría pensarse en la presencia de estruvita, aún sin descartar estos dos minerales. En cualquier caso, la figura 45 A podría corresponder a cristales de fosforroesslerita. La identificación de estas fases minerales fue verdaderamente costosa. Se muestran los difractogramas correspondientes en la figura 45.

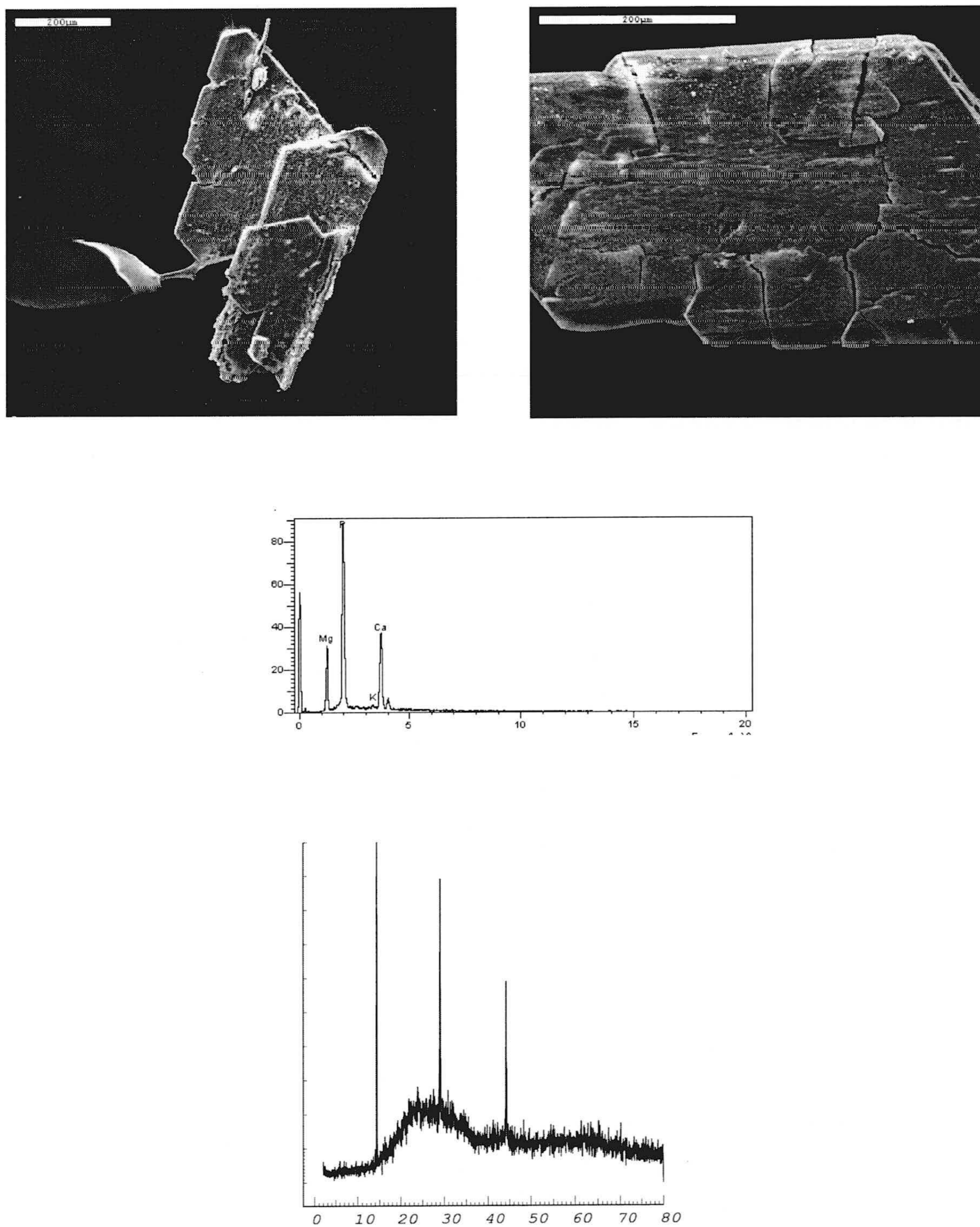


Figura 44: Minerales producidos en el medio CMMg por la cepa 422 . Microanálisis y difractograma correspondientes.

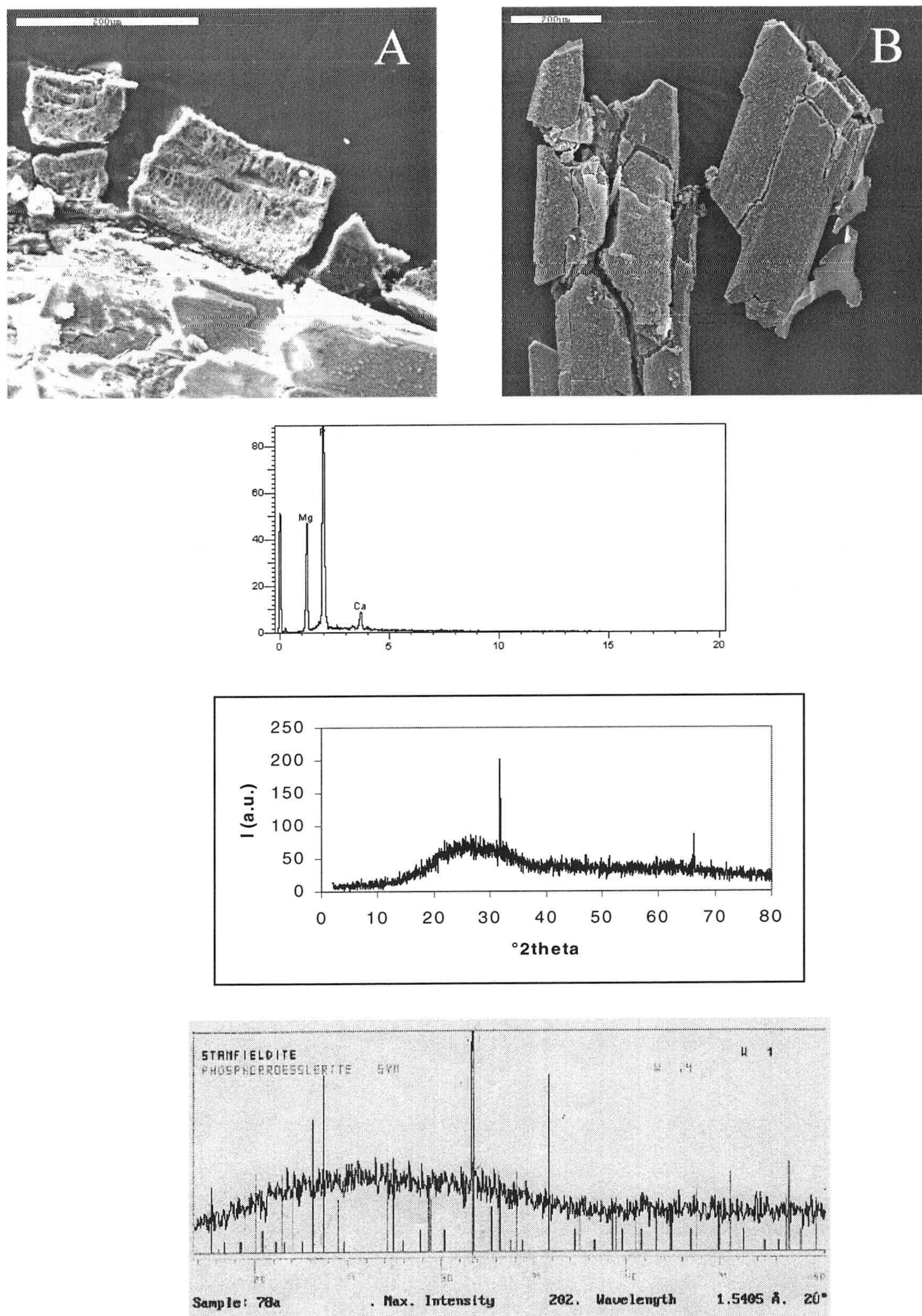


Figura 45: Minerales producidos por la cepa mutante en el medio CMMg. Microanálisis y difractogramas correspondientes.

2.5.3 Medio CMMn

Los cristales comenzaron a observarse a partir del un mes de incubación. Las colonias pertenecientes a la cepa 422 presentaban un color amarillo, mientras que las de la cepa mutante eran marrón claro. Los cristales se recogieron tras un periodo de incubación de 2 meses. La identificación (figura 46) indica que la cepa 422 produce calcita e hidroxilapatito, y la cepa mutante sólo hidroxilapatito (figura 47). Además de esta diferencia, es notable la diferencia en relación a las morfologías. Como puede apreciarse en ambas figuras, mientras el aspecto del producto de la cepa mutante es amorfizado, la cepa 422 origina morfologías más cristalinas.

2.5.4 Medio CMCo

En este medio, tras poco más de un mes de incubación comenzaron a aparecer los cristales. La coloración de las colonias era amarilla en el caso de la cepa 422, y marrón en el de la cepa mutante. Tras recoger los cristales, se procedió a la identificación de los mismos (figura 48) poniéndose de manifiesto que la cepa 422 originaba la producción de hidroxilapatito y weddelita, mientras que la cepa mutante producía fluoroapatito y weddelita. Por tanto, el comportamiento biomineralizador de ambas cepas en este medio de cultivo es muy similar. Llama la atención la porosidad de los minerales producidos por la cepa 422 particularmente (ver figura 48 A).

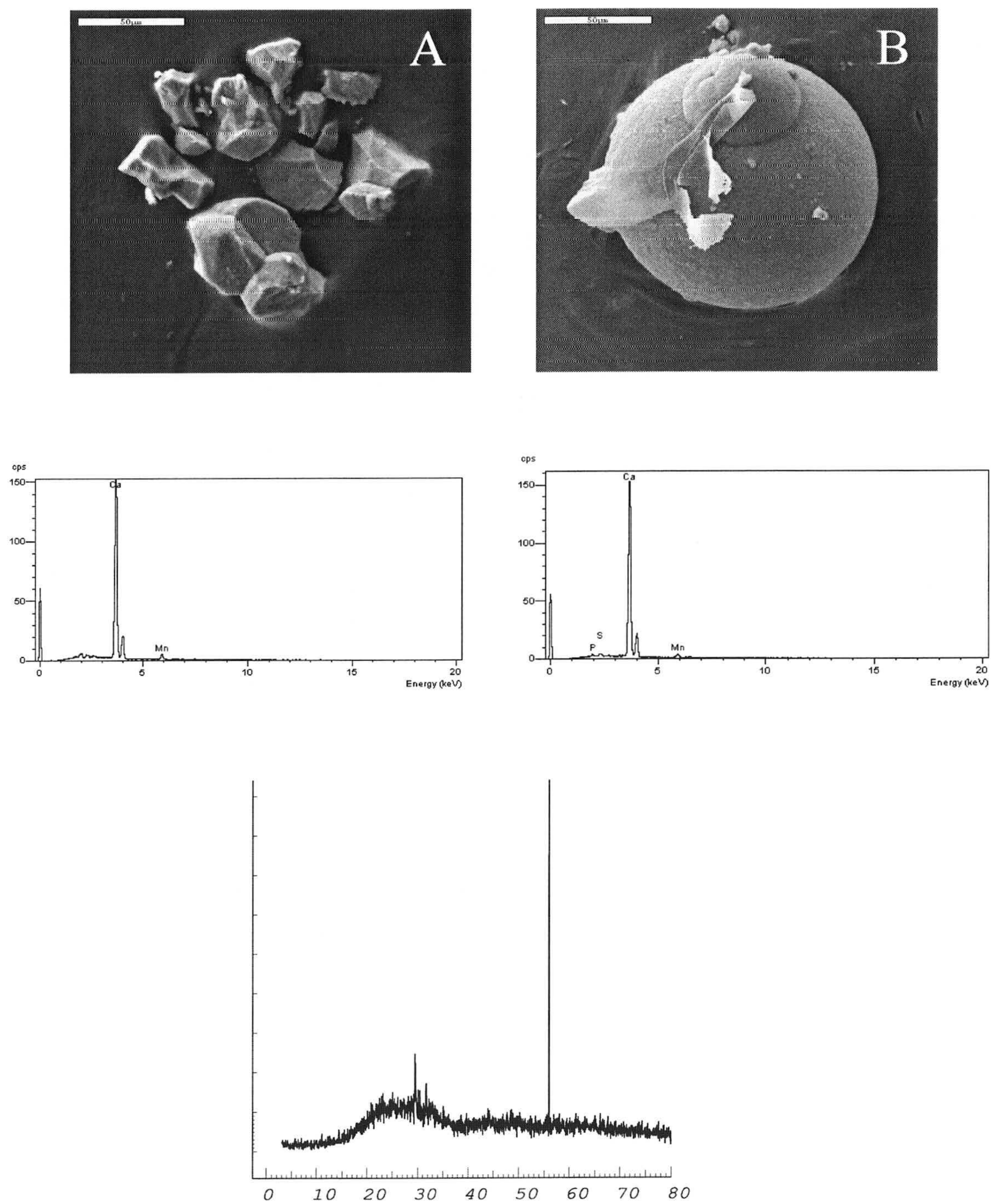


Figura 46: Producción de minerales producidos en el medio CMMn por la cepa 422. A: posiblemente calcita; B: posiblemente hidroxilapatito. Microanálisis y difractograma correspondientes.

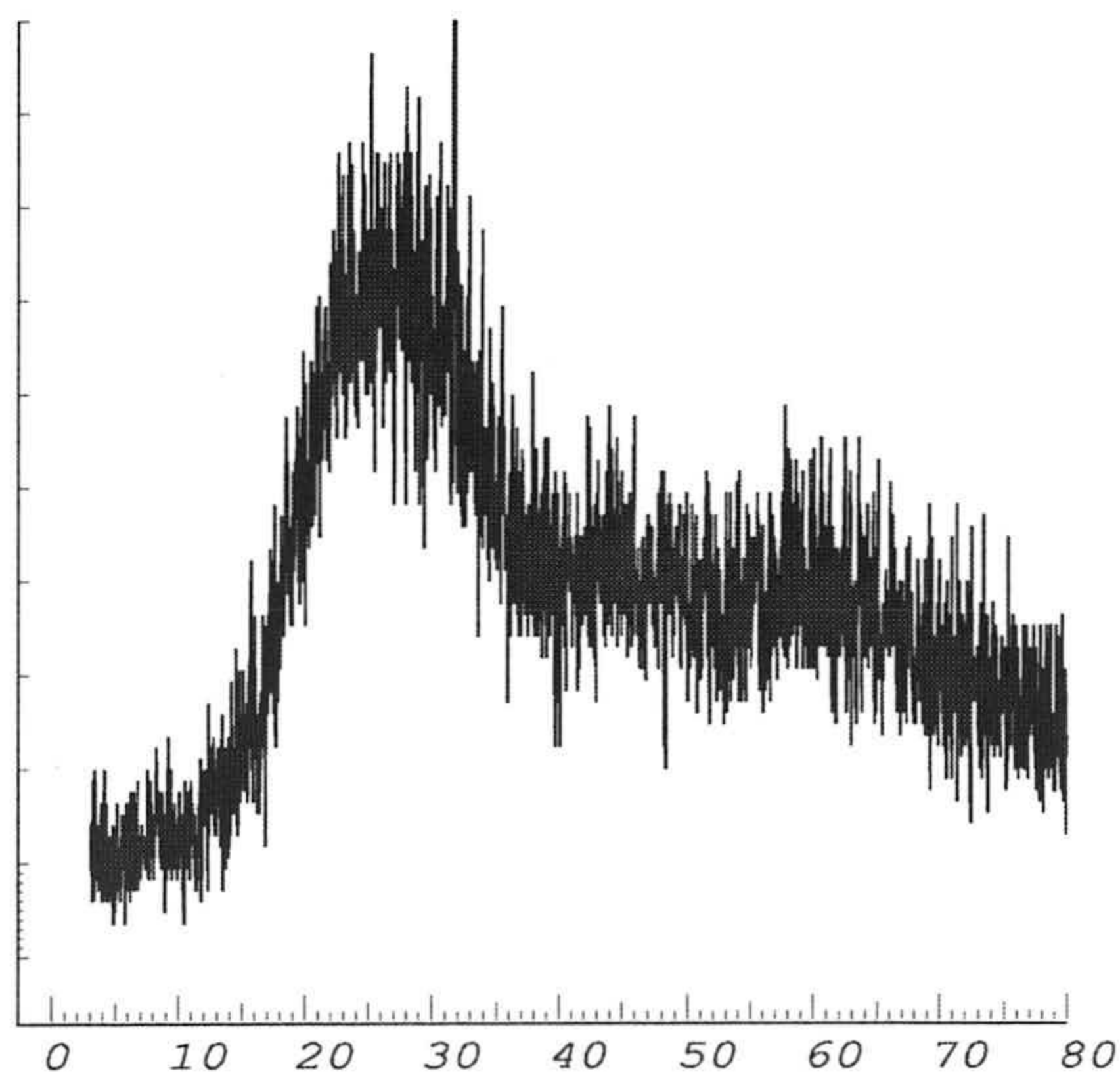
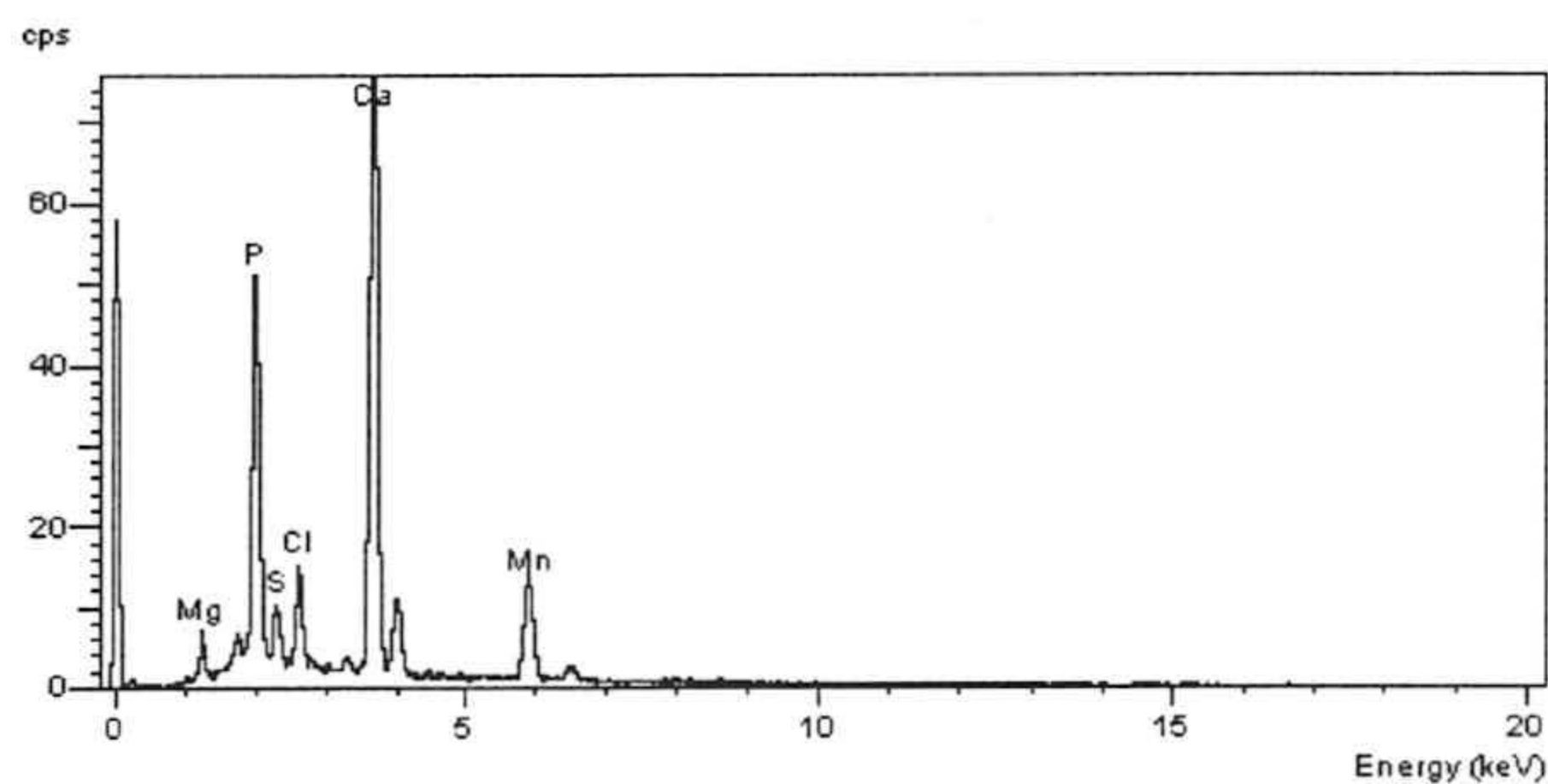
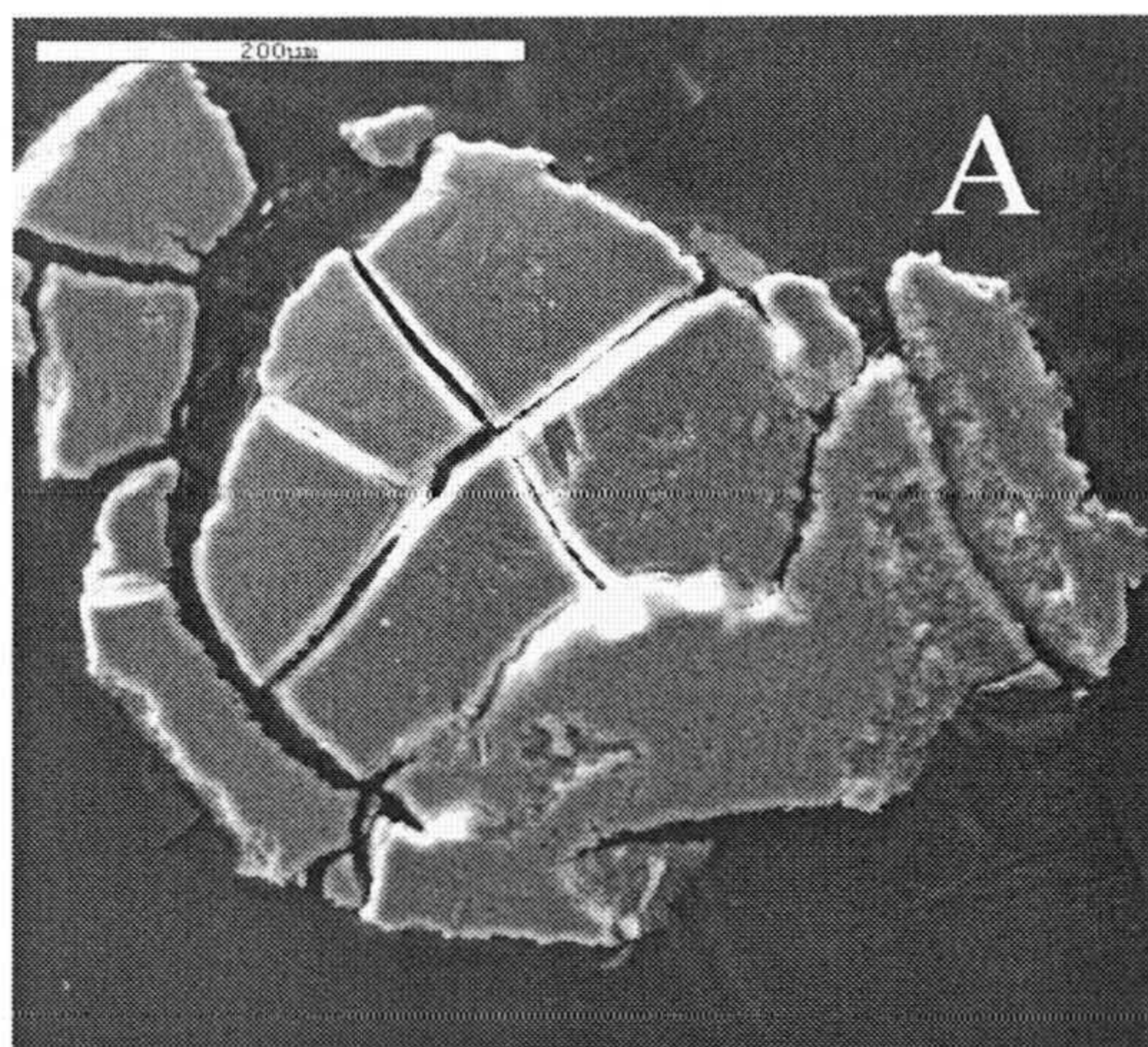


Figura 47: Cristales producidos por cepa mutante en medio CMMn. Microanálisis y diagrama de DRX respectivos.

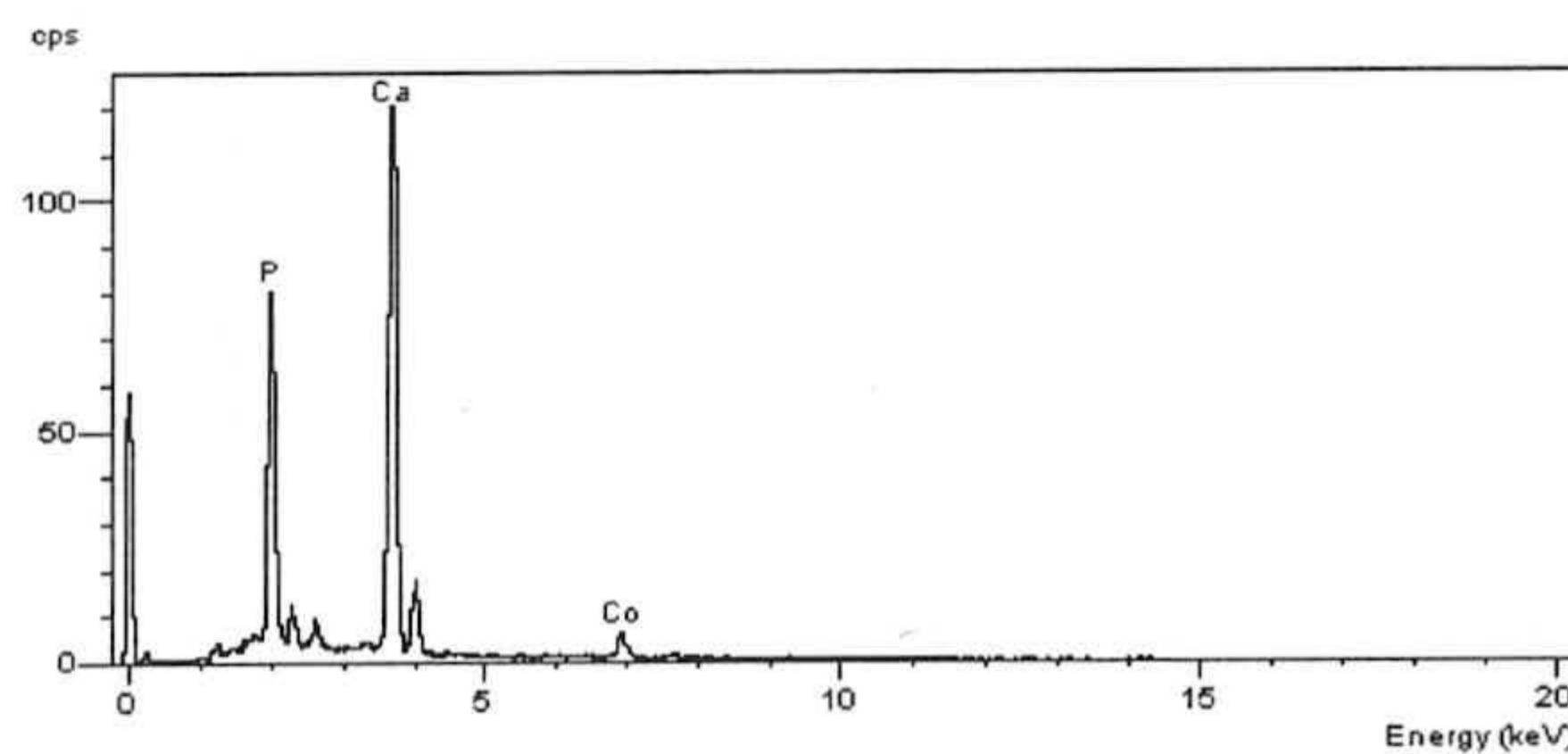
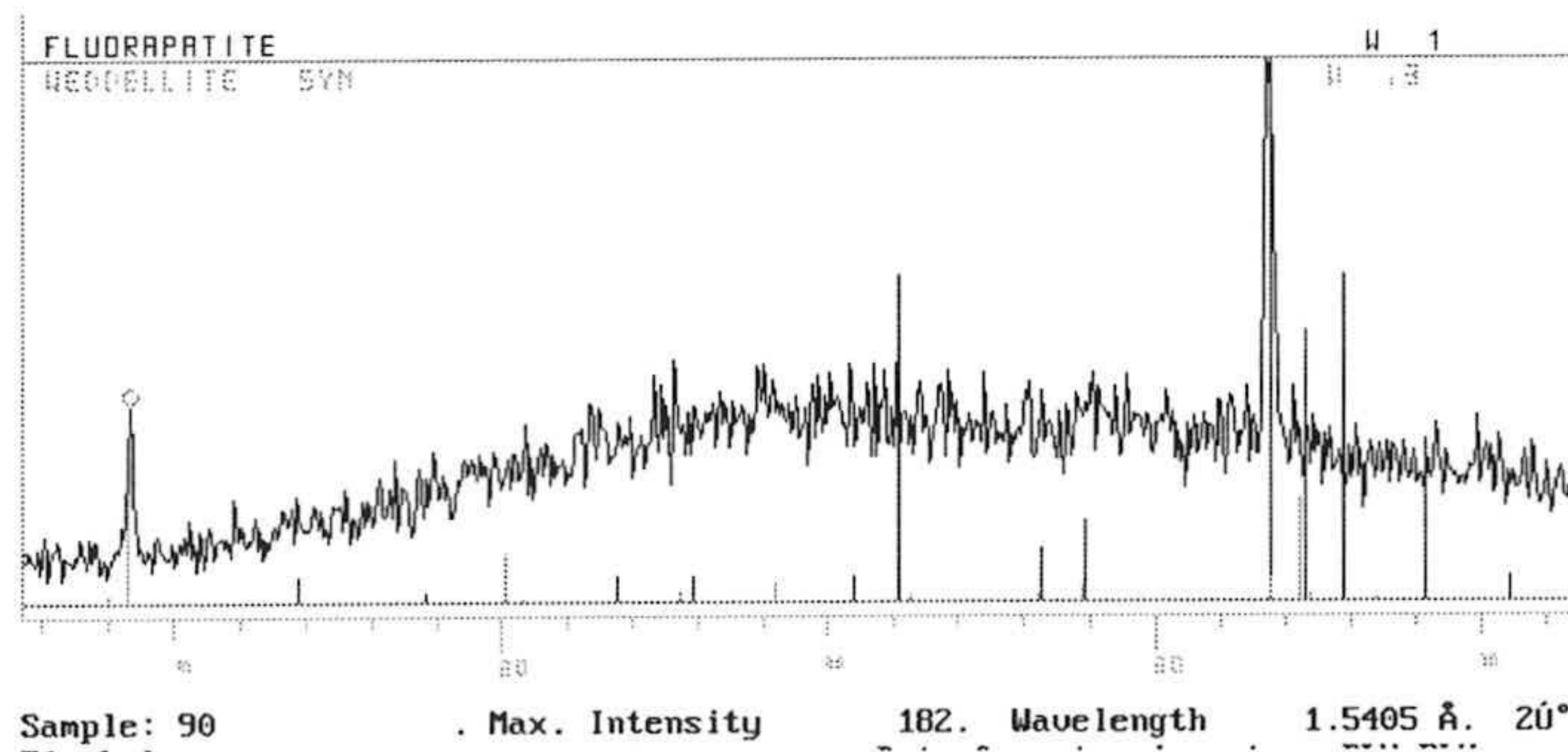
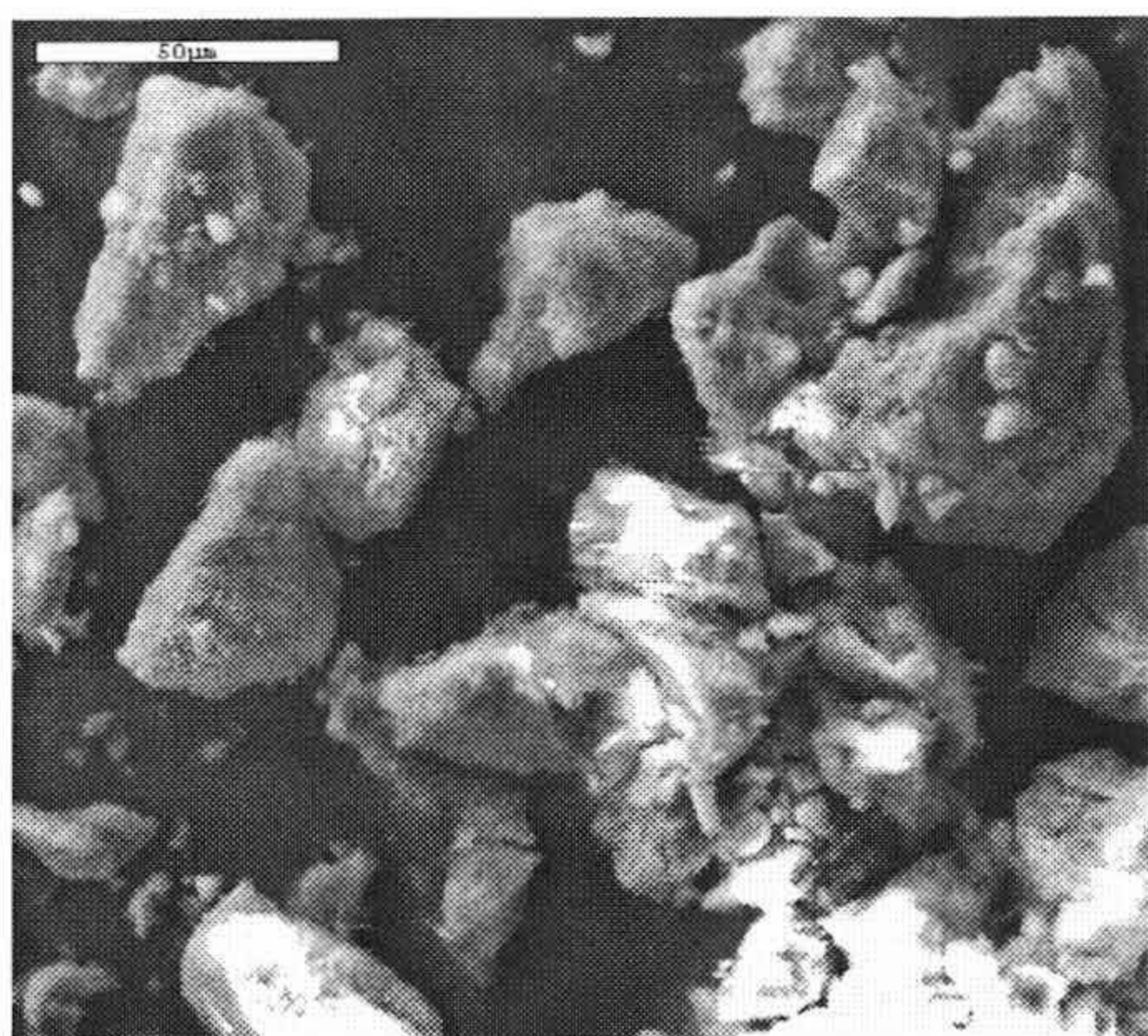
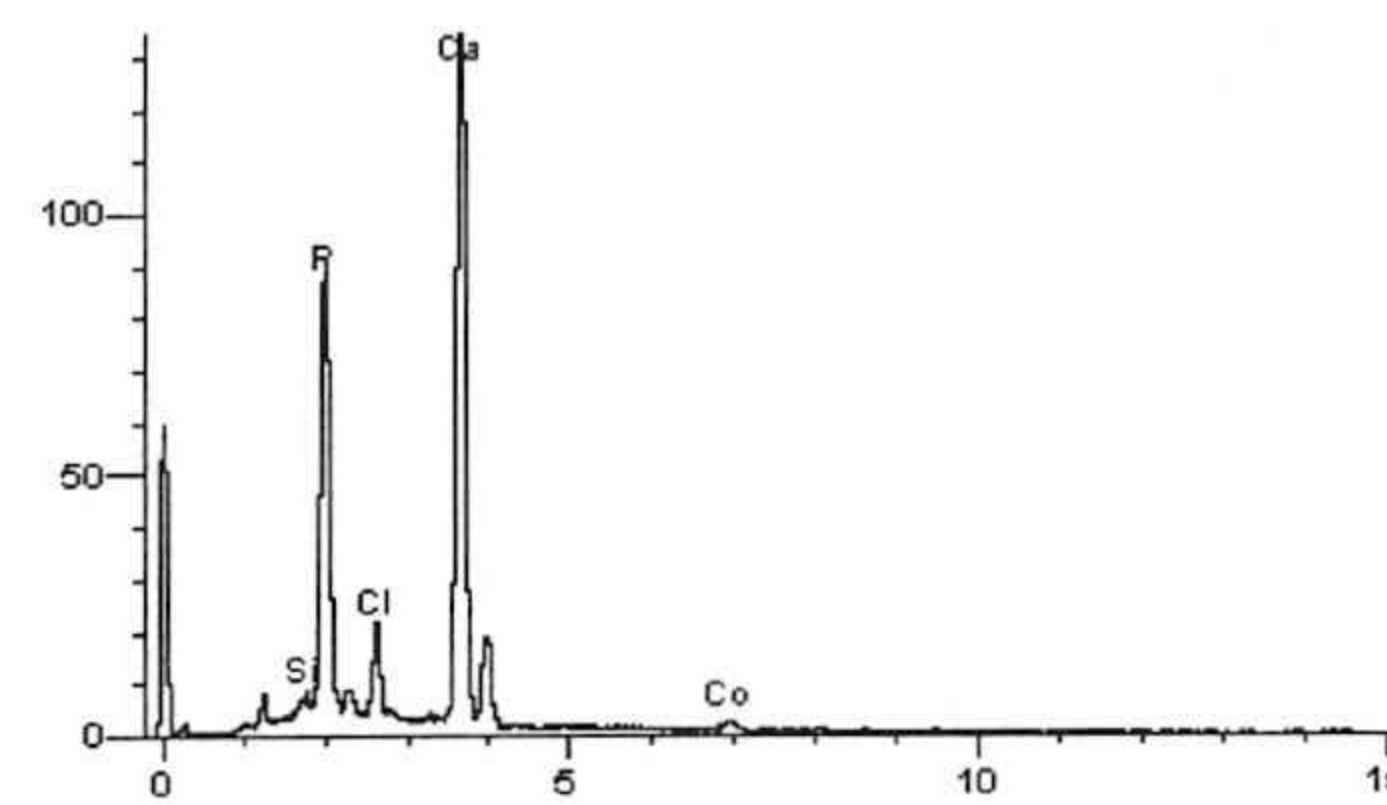
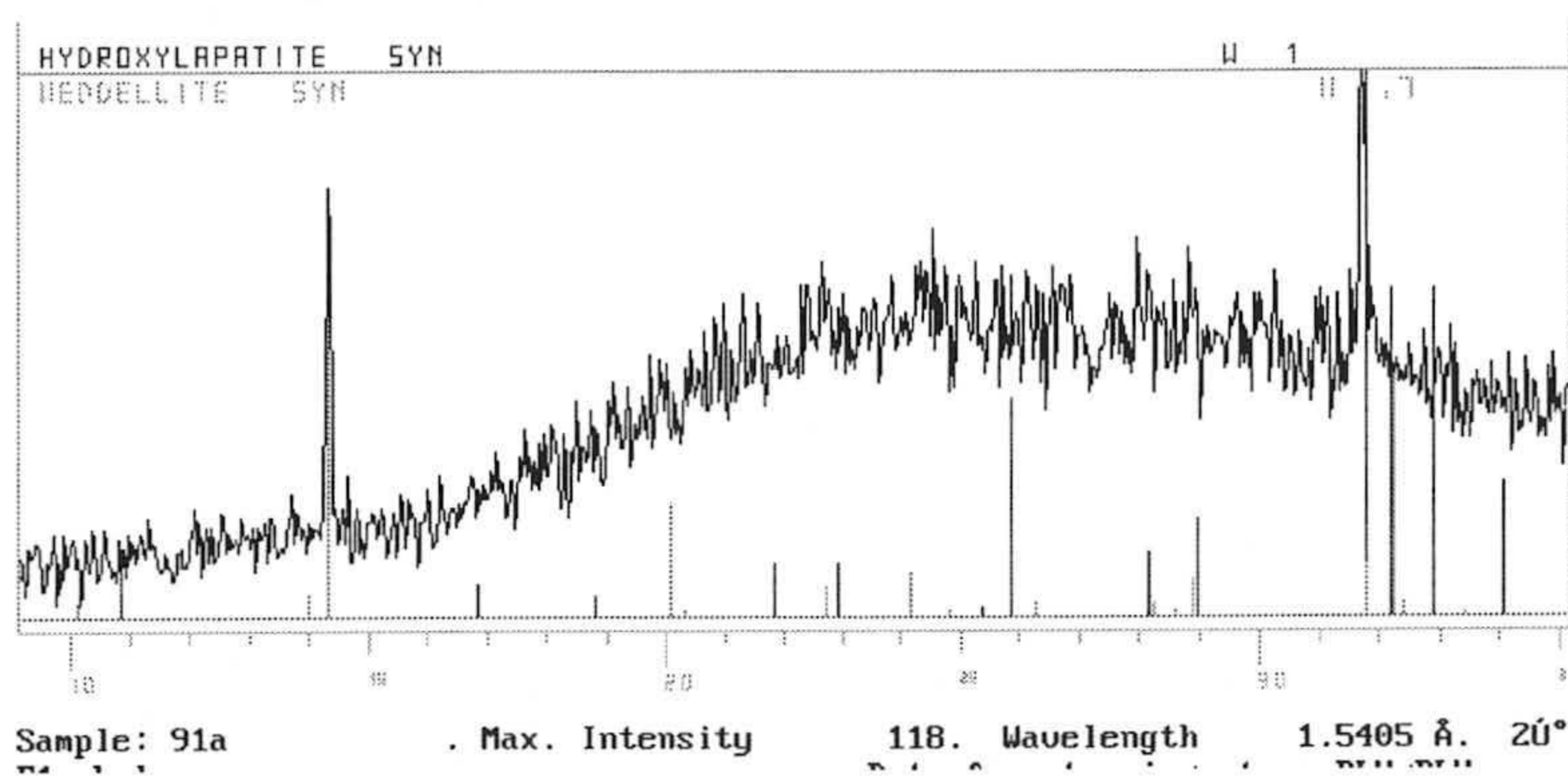
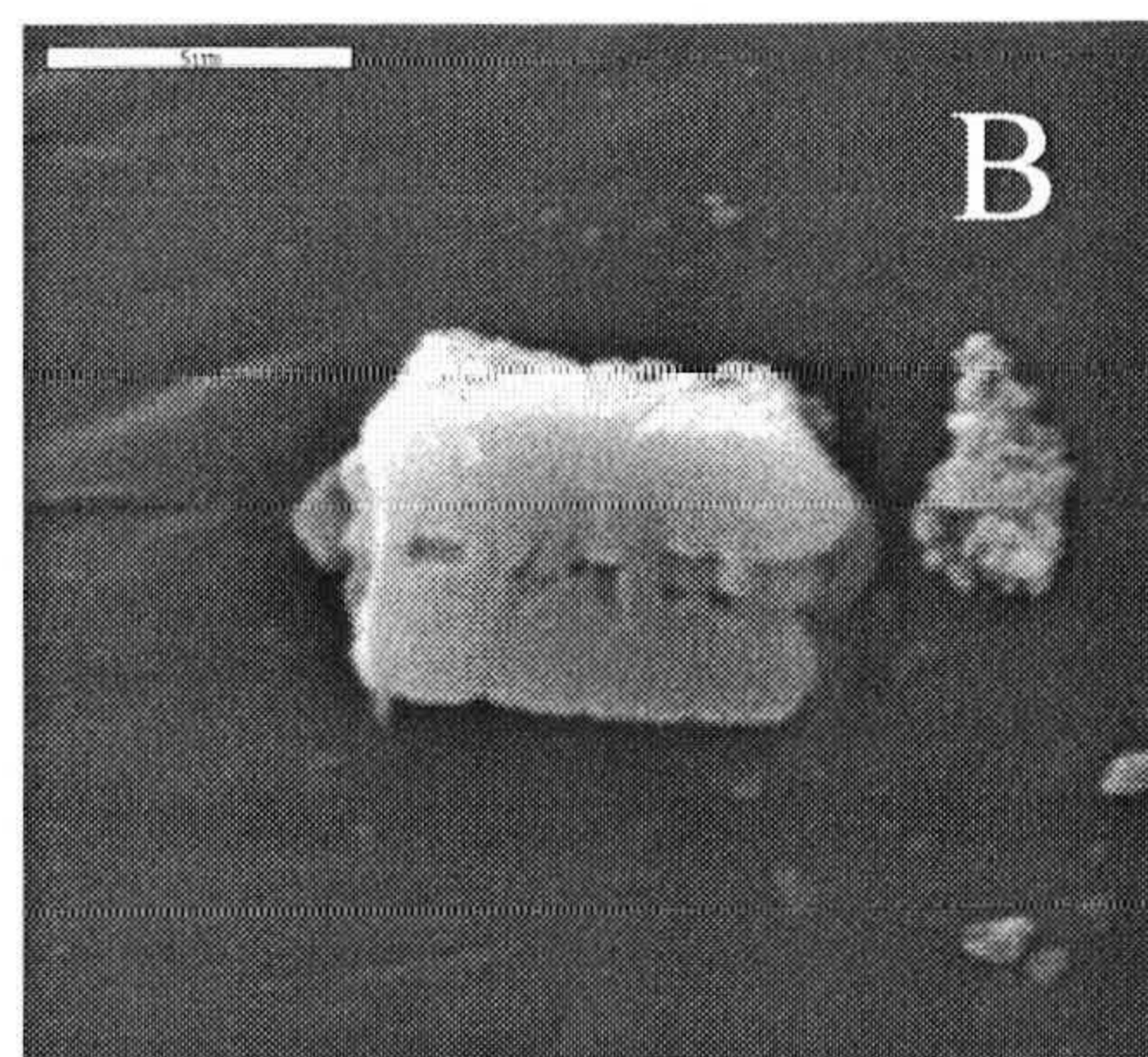
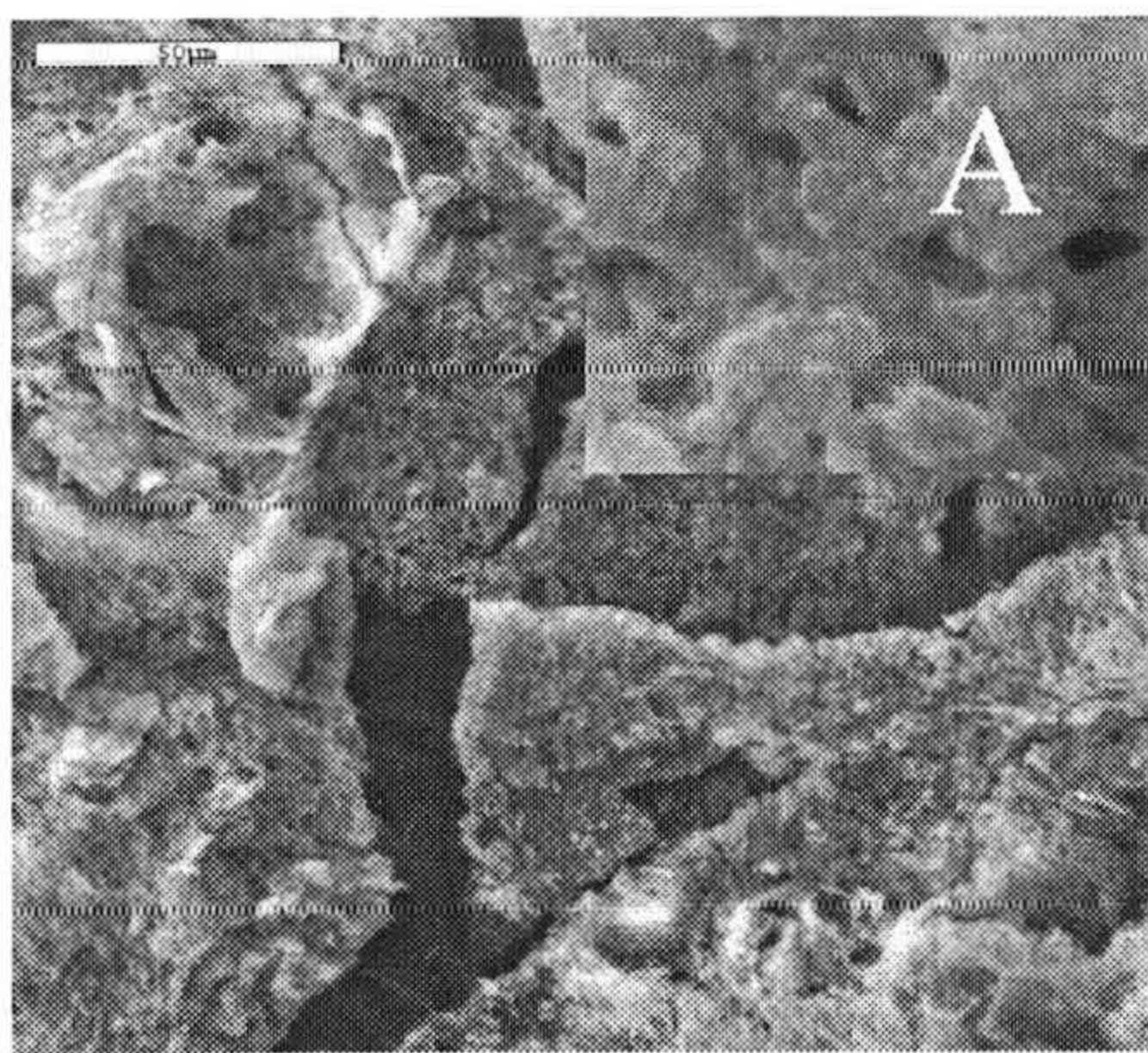


Figura 48: *Minerales producidos en el medio CMCo. A y B, hidroxilapatito y wedellita producidos por la cepa 422. C, fluorapatito y weddelita producidos por la cepa mutante. Microanálisis y difractogramas respectivos.*

2.5.5. Medio CMBa

En este caso ambas cepas produjeron una escasísima cantidad de cristales, que aparecieron al cabo de 20 días, pero no aumentaron con el tiempo de incubación. Al tratarse de tan poca cantidad, no fue posible llevar a cabo difracción de rayos X, por lo que, a la observación y análisis en MEB, se añadió un estudio complementario de microscopía electrónica de transmisión. En las figuras 49, 50, 51 y 52 se presentan las microfotografías de los cortes finos realizados y los diagramas de difracción de electrones y microanálisis por EDX realizados con MET.

Teniendo en cuenta todos los datos analíticos obtenidos se puede pensar razonablemente que se produce barita (sulfato de bario), y además, un fosfato de bario. En el caso de la cepa 422 sólo se observaron pequeñas esferitas, mientras que con la cepa mutante, además de esferitas se encontraron formas tabulares, de morfología típica de la barita. Los resultados de MET ponen de manifiesto que las esferitas, o al menos algunas de ellas, son de fosfato de bario, mientras que los cristales con morfología tabular lo son de sulfato de bario, posiblemente barita como se ha indicado más arriba.

2.6. Producción de fosfatos en medio A-4.

Este medio, utilizado sólo en forma líquida y con agitación, se ha empleado porque en él, la cepa 422 producía, aunque en pequeña cantidad, apatito (Ben Chekroun, 2000). En el caso de la cepa mutante, los cristales se recogieron tras un mes de incubación, y el mineral encontrado ha sido natrofosfato ($\text{Na}_7(\text{PO}_4)_2\text{F}\cdot 19\text{H}_2\text{O}$), como puede deducirse de las pruebas analíticas llevadas a cabo. Las fotografías de MEB y los diagramas de microanálisis de DRX pueden verse en la figura 53. En este caso ha habido una mayor productividad por esta última que la descrita para la cepa 422, ya que para la identificación de los cristales producidos fue necesario acudir a la difracción de electrones en microscopía electrónica de transmisión, dada la escasísima cantidad originada (Ben Chekroun, 2000).

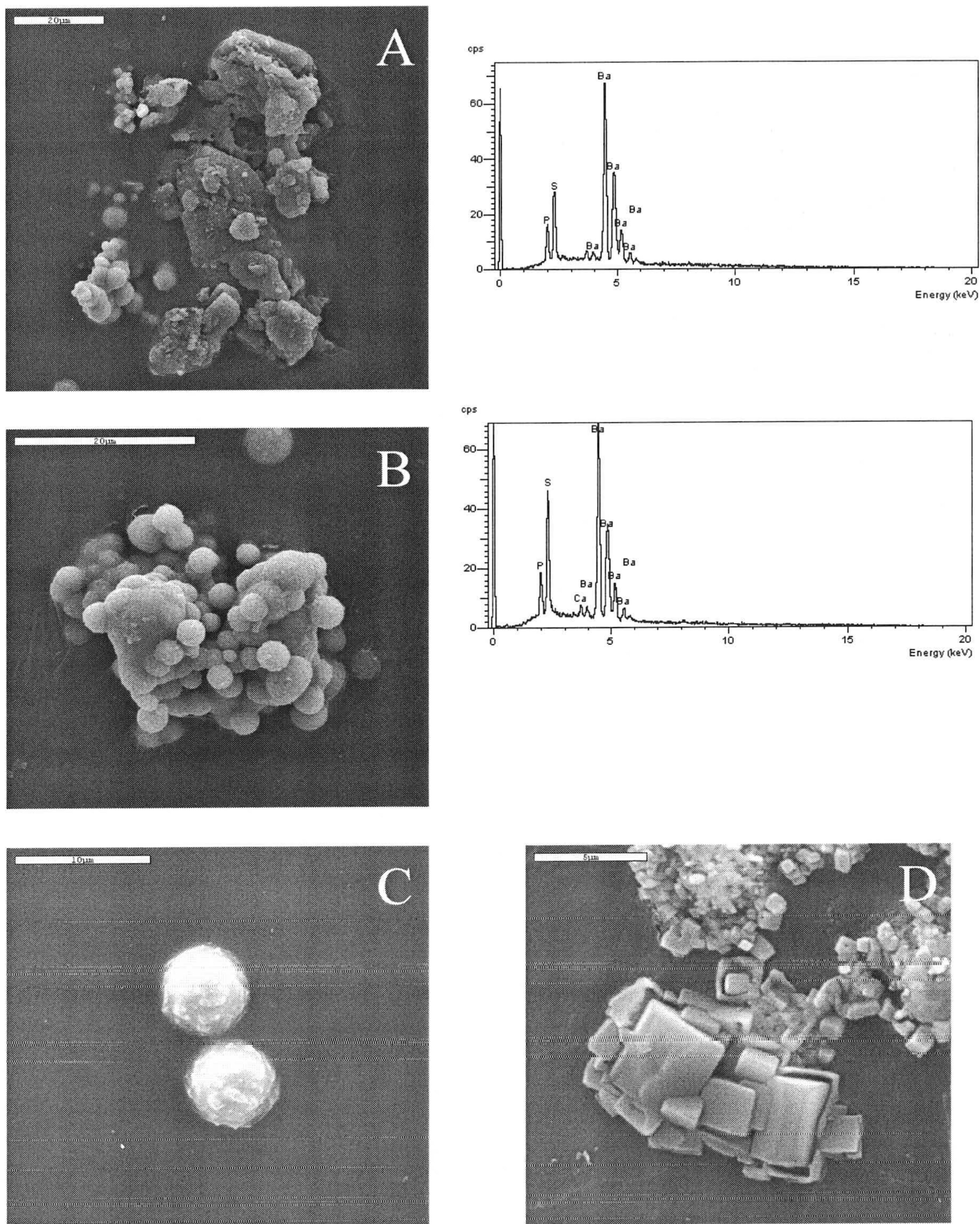


Figura 49: Minerales producidos por las cepas 422 (A) y mutante (B,C yD) en medio CMBa. Microanálisis correspondientes

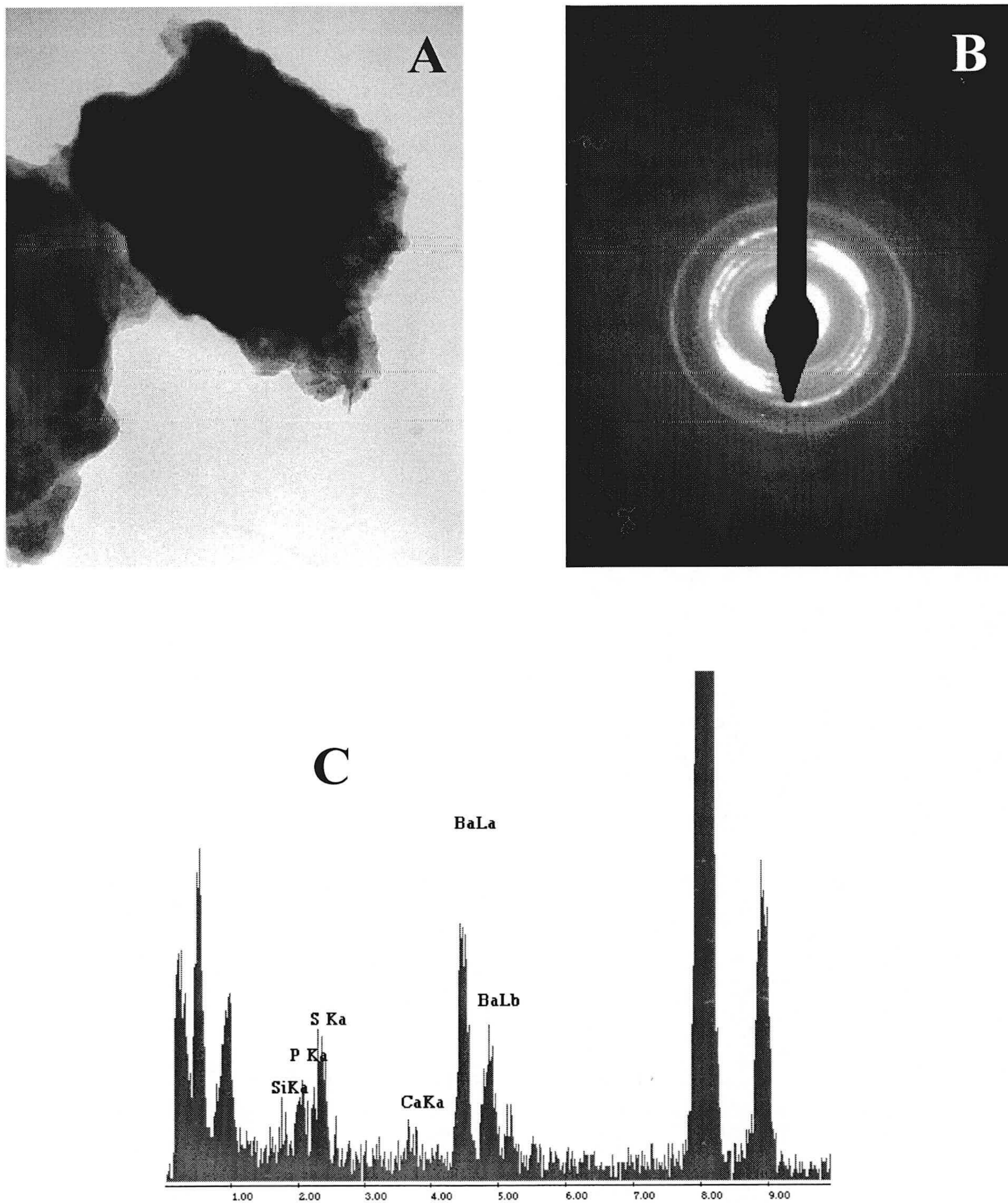


Figura 50: Cristales de barita producidos en medio CMBa por la cepa mutante. A, cristales observados en TEM (x50000); B, difractograma de electrones; C, Microanálisis por EDX.

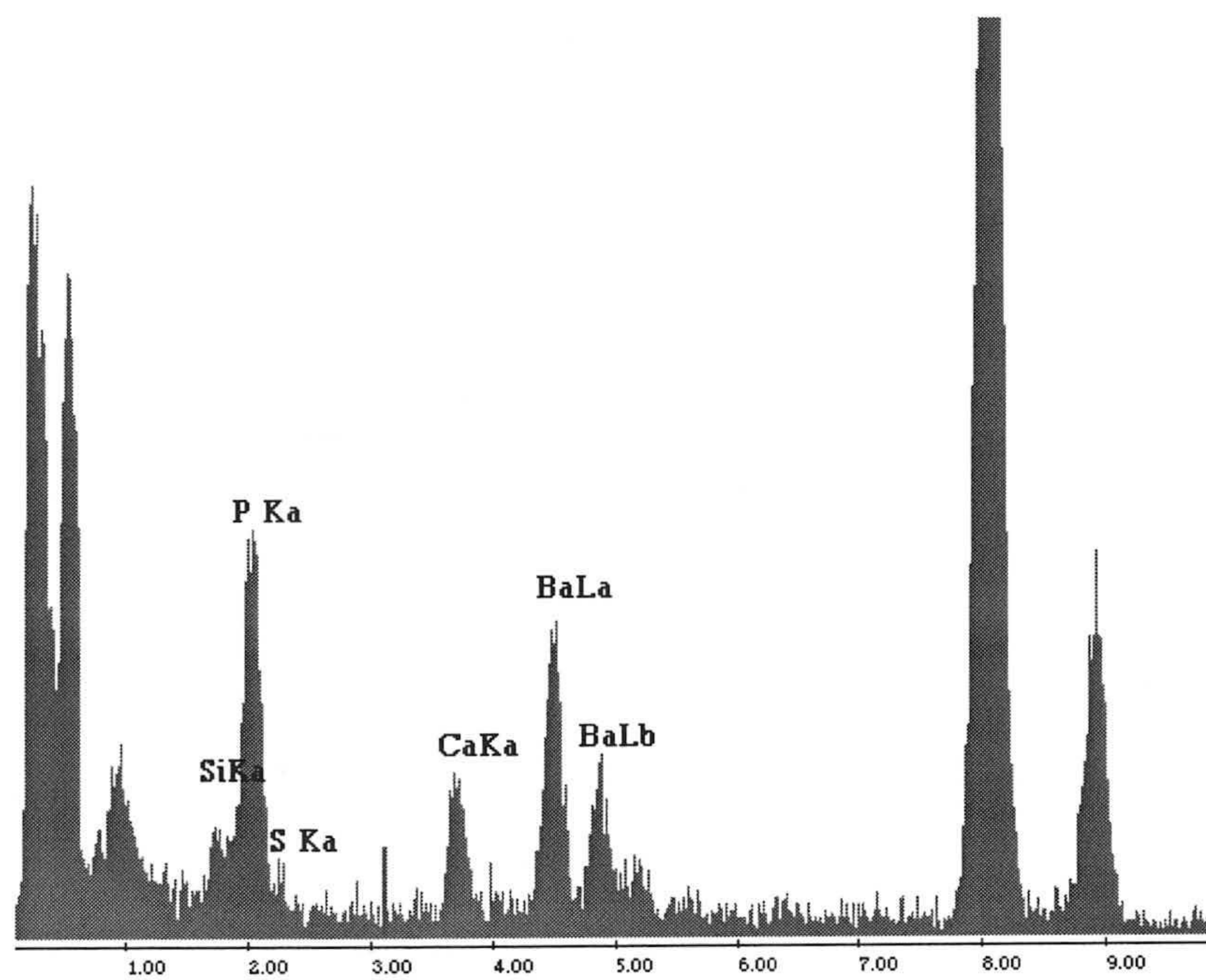
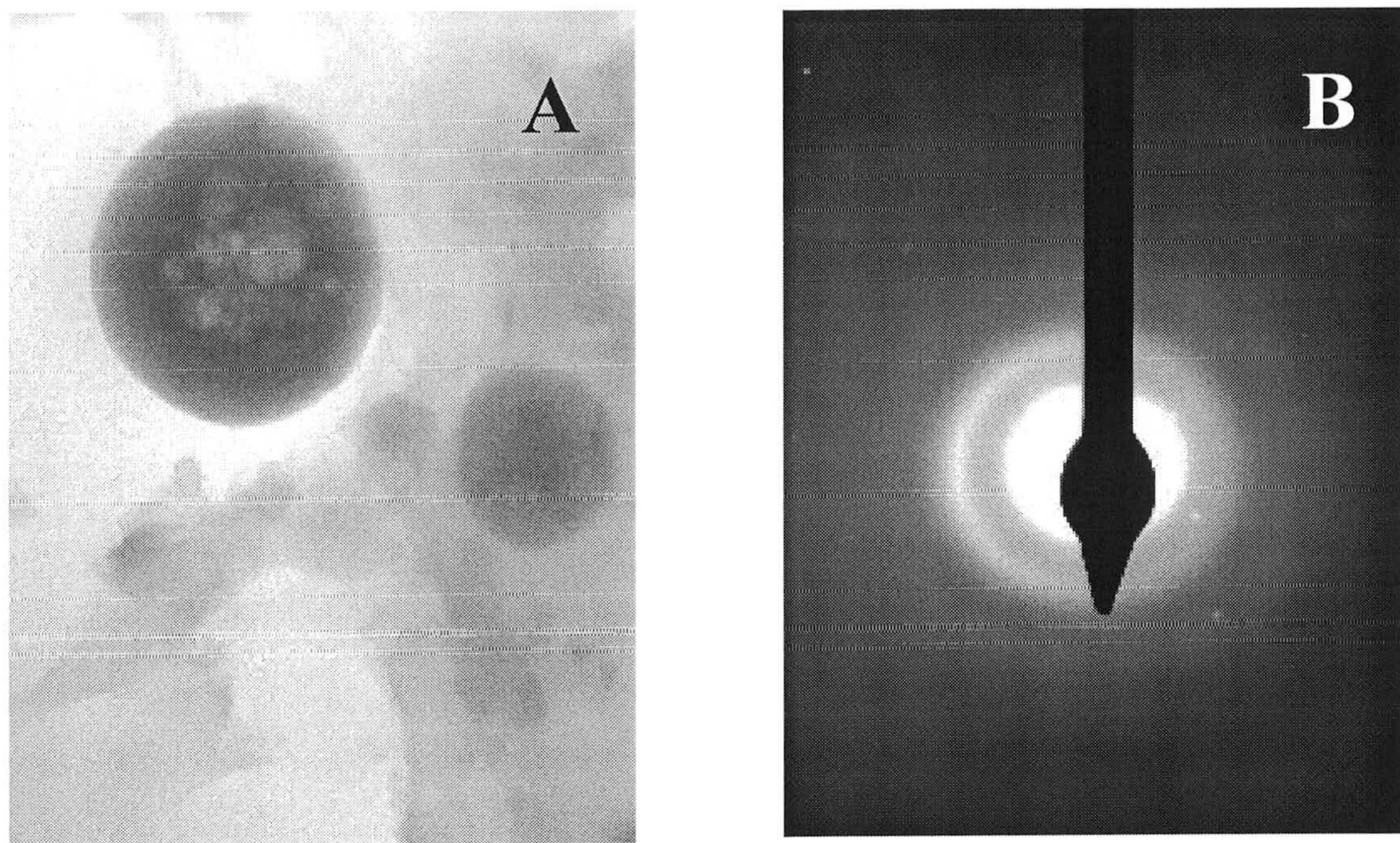


Figura 51: Cristales de fosfato producidos por la cepa mutante en medio CMBa. A, cristales observados en TEM (x136000); B, difractograma de electrones; C, microanálisis correspondiente.

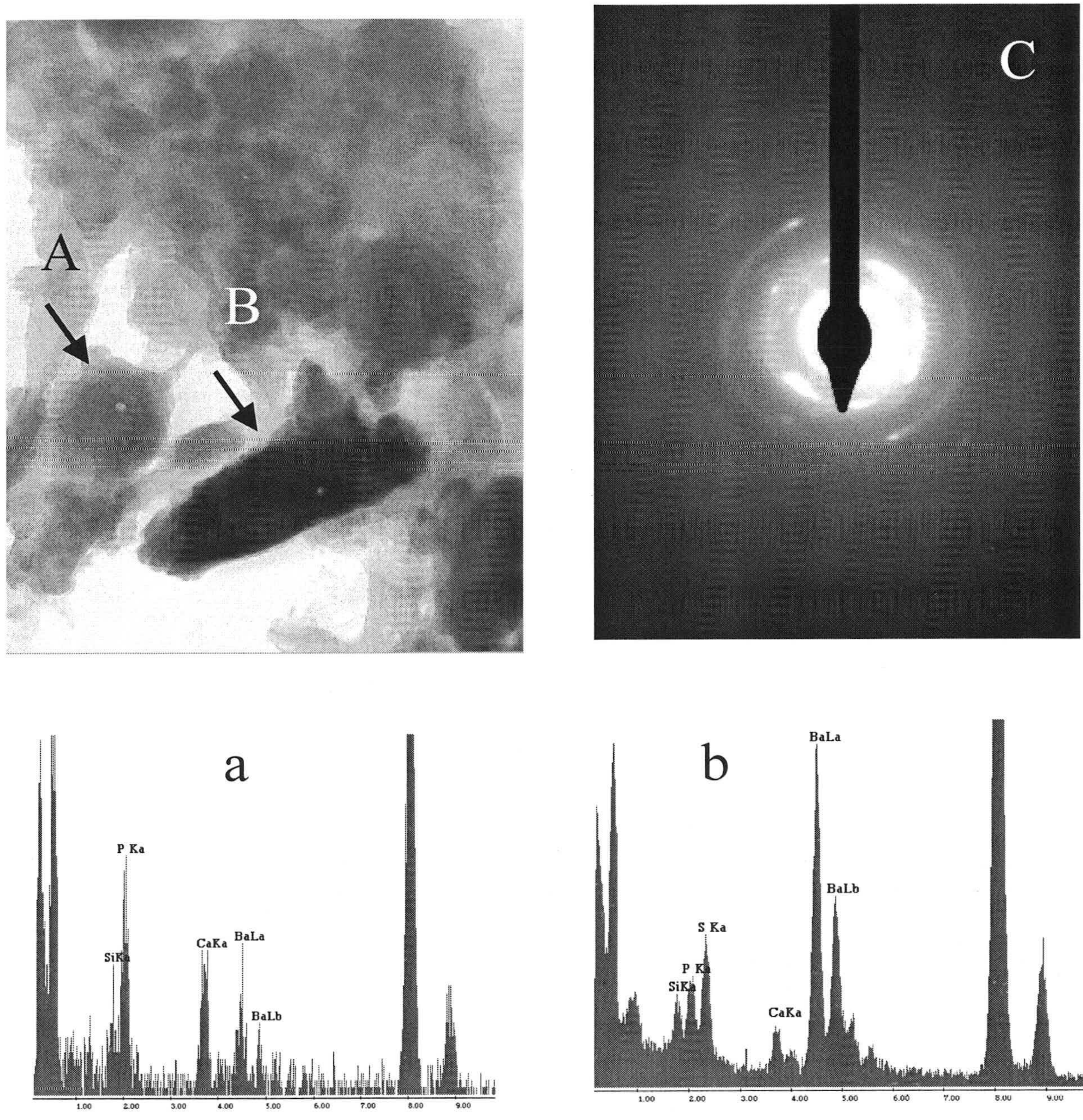


Figura 52: Microfotografía de los cristales de barita producidos en medio CMBa por la cepa mutante (x83000). Se observan dos tipos de morfologías: A y B (marcadas con flechas); a y b microanálisis correspondientes. C, difractograma de electrones.

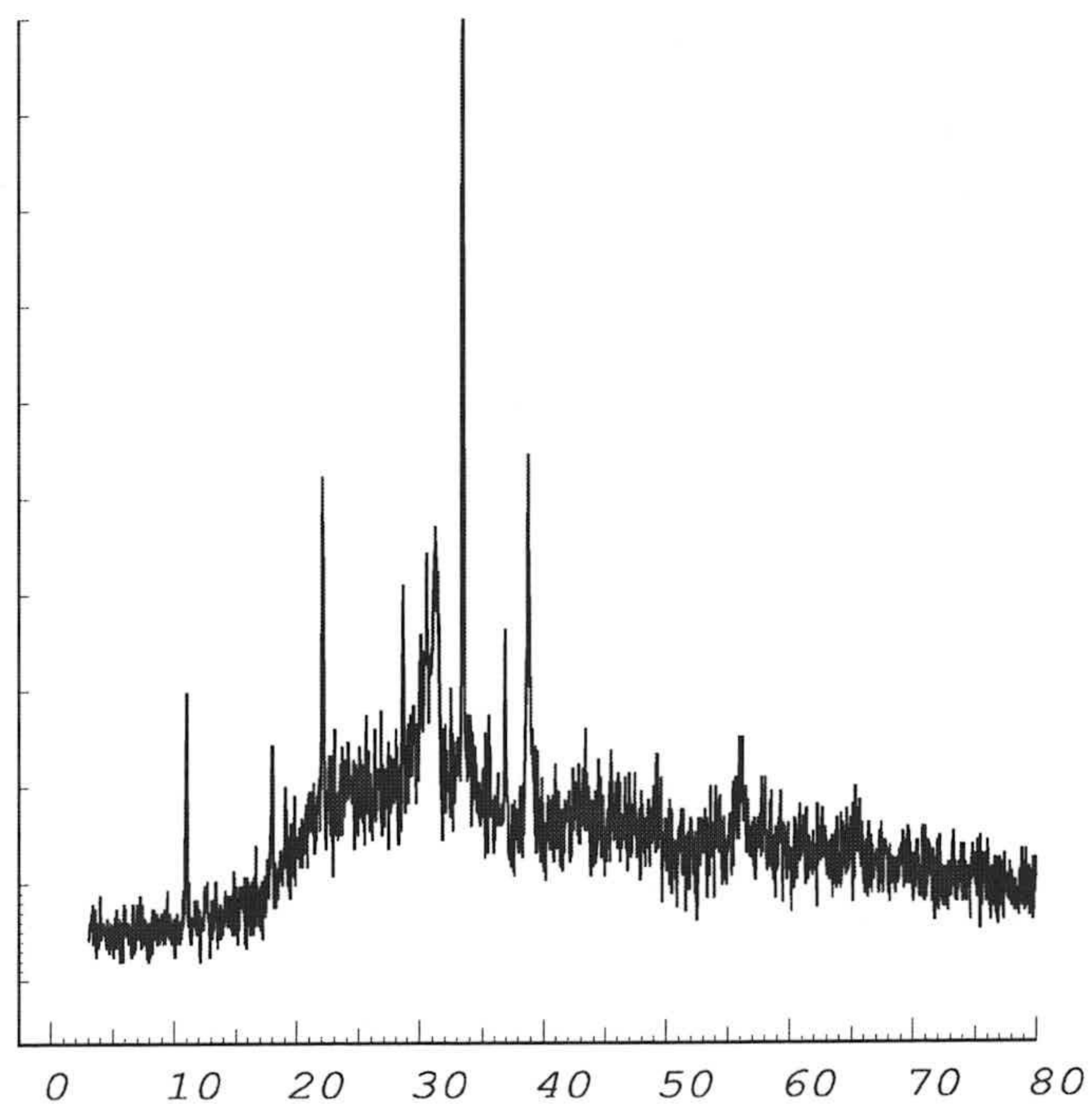
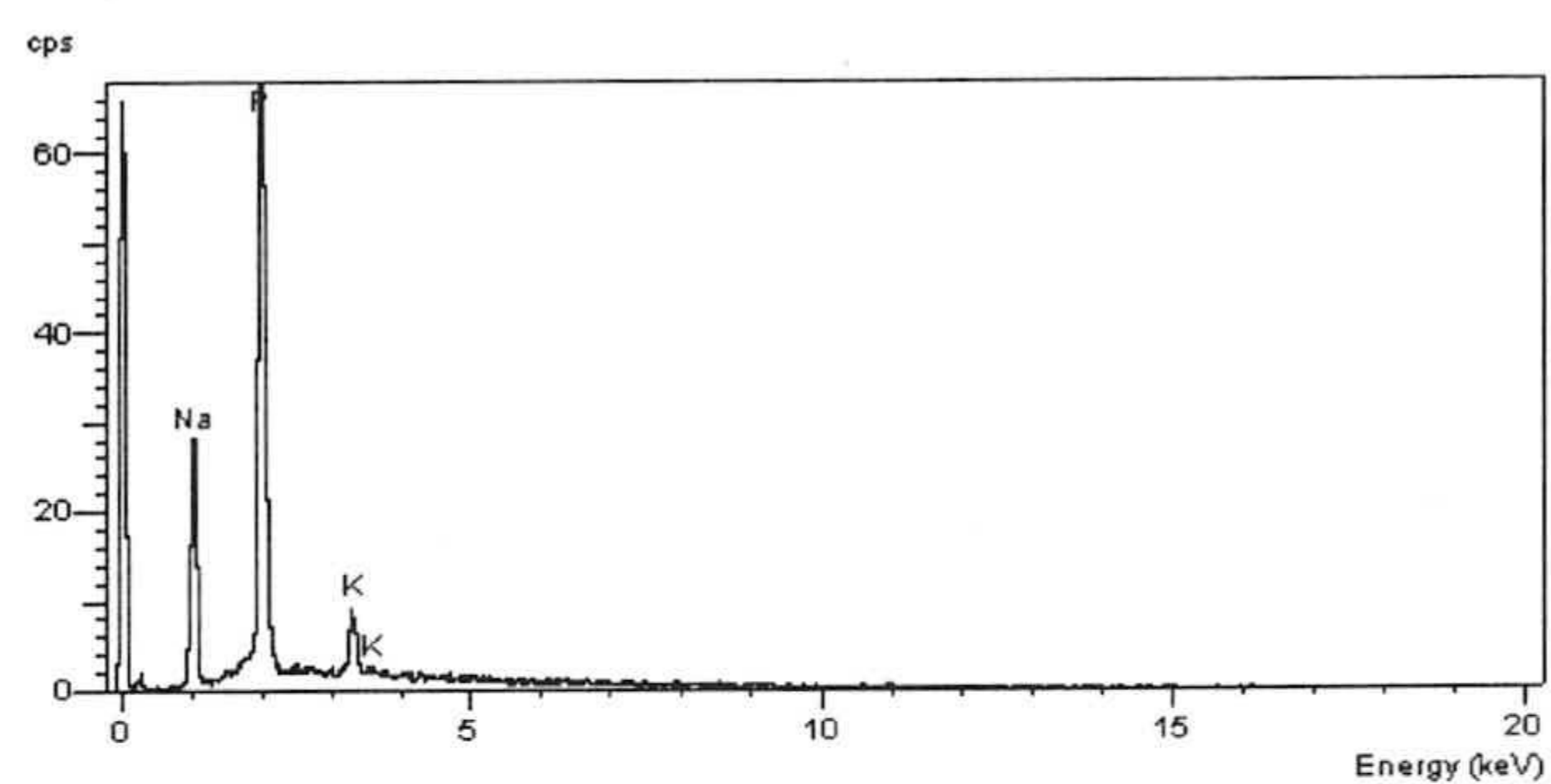
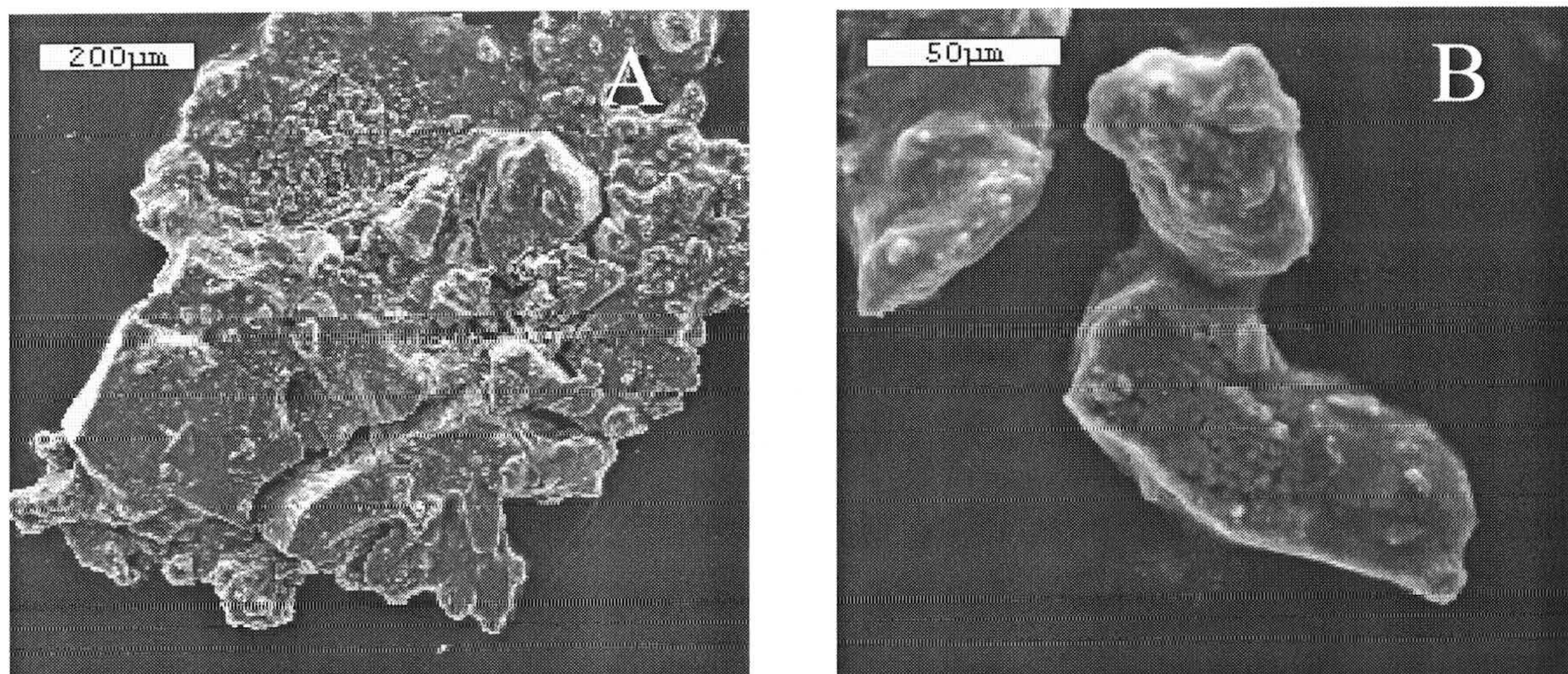


Figura 53: Cristales de Netrofosfato producidos por la cepa mutante en medio líquido A-4 con agitación. Microanálisis y difractograma correspondientes.



V. DISCUSIÓN

Este capítulo de discusión incluye dos apartados relativos a los dos aspectos bien diferenciados que constituyen el núcleo de esta memoria.. El primero está dedicado al estudio del fenotipo del mutante de membrana DZF1 Δ oar, y caracterizar su capacidad de agregación con respecto a su cepa salvaje DZF1 de *M. xanthus*. En el segundo aspecto, se trata el comportamiento de la cepa mutante en cuanto a sus características relativas a la capacidad de biomineralización. Este comportamiento se compara con el de la cepa 422 de *M. xanthus*, previamente ensañada y conocida en este terreno. Se completa el estudio con una investigación adicional sobre esta cepa en condiciones que previamente no había sido estudiada.

Myxococcus xanthus es un bacilo Gram-negativo con un complicado sistema social que le permite comportamientos tan sofisticados como la depredación de otros microorganismos o la diferenciación en varios tipos celulares con objeto de lograr estructuras tridimensionales con finalidad tanto de resistencia como de diseminación.

Para realizar todas estas funciones, *M. xanthus* necesita un complejo sistema de señales intercelulares intacto que le permita coordinarse perfectamente en todo momento y tomar decisiones adecuadas que vendrán determinadas por el resultado final de un delicado equilibrio entre las condiciones ambientales y las de la propia colonia (ciclo de vida, densidad, etc...). Paralelamente a este sistema de señales e imbricado con él, el mecanismo que produce el movimiento por deslizamiento es también totalmente indispensable para que la población bacteriana pueda completar con éxito todas estas actividades. Un tipo de movimiento defectuoso, en cualquiera de sus aspectos, dará lugar a una agregación-esporulación más o menos dañada.

Es por ello que la mayor parte de la investigación actual sobre *M. xanthus* se centra en estos dos aspectos: señales intercelulares y movimiento (Spormann 1999; Shimkets 1999). Desde los años 70, numerosos mutantes espontáneos u obtenidos por ingeniería genética, han ido dando pequeñas parcelas aisladas de información. En los últimos años, muchos de estos datos individuales han encajado entre sí como piezas de un puzzle que, unidas, dejan entrever una escena global. Sin embargo, aún

muchos mutantes se mantienen como piezas aisladas cuya posición en el puzzle se desconoce.

En este sentido podemos considerar el estudio del fenotipo de *Myxococcus xanthus* DZF1 Δ oar. Este mutante se obtuvo al deleccionar una proteína de 115 kDa que se fraccionaba junto a la membrana interna al separar las envueltas de la cepa salvaje. La proteína fue originariamente aislada mediante un método utilizado para purificar cuerpos basales de *Caulobacter crescentus* mientras se pretendía encontrar un orgánulo perteneciente al mecanismo responsable del deslizamiento, que en aquel momento era prácticamente desconocido. Sin embargo, a primera vista, el mutante presentaba el mismo tipo de deslizamiento y avanzaba al mismo ritmo que la correspondiente cepa salvaje, por lo que la atención se centró en otros aspectos de la biología de *M. xanthus*, principalmente el proceso de agregación y morfogenesis, donde presentaba un defecto claro y ostensible (Martinez-Canamero *et al.*, 1993). En este sentido hay que aclarar que la cepa madre a partir de la cual se obtuvo el mutante, presenta de por sí ciertas peculiaridades que se discutirán más adelante.

Como se explicó en la sección de resultados, los primeros estudios realizados en esta memoria de doctorado iban encaminados a comprobar, bajo las condiciones de nuestro laboratorio, el fenotipo previamente publicado del mutante Δ oar (Martinez-Canamero *et al.*, 1993). De esta manera, se estudió la curva de crecimiento, el movimiento tanto en placa como en porta, la producción de cuerpos fructificantes y el número de esporas. Estos estudios no solo nos sirvieron para confirmar que el mutante se seguía comportando igual, sino que nos dio mucha información nueva que no había sido publicada anteriormente. Así por ejemplo, las curvas de crecimiento del mutante y el salvaje son básicamente iguales pero nos sirvieron para tomar conciencia de una serie de peculiaridades, como es la mayor densidad óptica que consistentemente alcanza siempre el mutante y que es debida, ni más ni menos, a su menor adherencia al matraz, o la formación de formas redondas, similares a esporas pero no refráctiles, que también aparecen de forma repetida al final de la lisis del mutante. Este no es un caso aislado, ya que Rosenbluh y Rosenberg (1989) ya habían comunicado este fenómeno cuando la cepa salvaje *M.*

xanthus DK1622 crecía en un medio líquido de composición nutricional pobre. Estos mismos autores admiten que la disminución en turbidez al final de la fase estacionaria no sólo es debida a la lisis celular, sino que la formación de agregados macroscópicos, que son muy evidentes en DK1622 y menos evidentes en DZF1, pueden tener una importancia alta en esta disminución.

Con respecto al movimiento, ya se sabía que el mutante Δoar no presentaba diferencia alguna con la cepa madre DZF1. Y en efecto, esto es lo que pudimos comprobar. Ambas cepas presentan deslizamiento de las células tanto individualmente (movimiento aventurero) como en grupos (movimiento social). Sin embargo, hemos de hacer ciertas consideraciones en este campo. Como se explicará más adelante, la cepa DZF1 no es en sí una cepa salvaje sino que presenta una mutación ligera en el sistema social que le permite crecer dispersa en el medio líquido pero no merma sus posibilidades en el ciclo de desarrollo (Dworkin, 1962). Eso la ha convertido en una cepa ideal para su manejo en el laboratorio. A pesar del defecto que presentaba en el sistema social, el movimiento en grupo de DZF1 es completamente normal y sólo se pone de manifiesto cuando esta mutación se transduce a otra cepa A^- , por lo que se crea una cepa A^-S^- que es totalmente inmóvil a menos que se le añada 2mM de $ClCa_2$. Tras añadir este compuesto, la cepa DZF1 muestra un movimiento social residual que la diferencia de una mutación completa en el sistema S (Wall et al. 1999). Con esto queremos decir que la medida en Δoar de un sistema social dañado en diferente proporción al de la cepa madre es difícil. En todo caso, habría que transducir la mutación en una cepa de base A^- y estudiar el movimiento en diferentes condiciones y preferiblemente con tecnología de microscopía de video-lapse. Y aún así, en caso de resultado negativo, nunca habría seguridad de si esta falta de diferencias es debida a que el posible defecto en Δoar se superpone al ya existente en DZF1. Por ello, es difícil descartar, con la tecnología de que disponemos actualmente, la existencia de un defecto en el movimiento social producido por esta mutación.

En la producción de cuerpos fructificantes y la formación de esporas es donde observamos el defecto más evidente de Δoar . Nuestro estudio confirmó también los

datos publicados en el sentido de que en la gran mayoría de las ocasiones, el mutante nunca llegaba a formar agregados, ni mucho menos cuerpos fructificantes maduros. Tan sólo en muy pocas ocasiones, tras varios días de incubación en medio CF se comenzaba a adivinar un intento de agregación que nunca llegaba a completarse. Probablemente esto era debido a diferencias imponderables en el experimento, como mejor estado de las células de que partíamos o ligeras diferencias en la densidad inicial o la temperatura de incubación. El estudio de la agregación fue continuado con otras técnicas que se discutirán más adelante.

Con respecto a las esporas, el mutante nunca presentó, ni en las mejores condiciones, una esporulación superior al 50% a partir de las 168 h. Esto coincidía con los experimentos en que había un cierto intento de agregación. En el resto de ocasiones, hasta las 100 horas no contabilizábamos más de un 20% de la producción salvaje. Las esporas se estudiaron con microscopio electrónico de barrido y de transmisión. No se detectaron diferencias apreciables en la estructura de las esporas. A microscopio electrónico, las esporas mutantes presentaban las mismas capas y grosor que las salvajes. Sí que observamos algo que ya nos había llamado la atención al microscopio óptico: un gran número de esporas en el mutante presentaban una forma ligeramente ovalada. Esto también sucede en la cepa salvaje pero en una proporción mucho menor. Por último, algo también muy esclarecedor fue el hecho de la poca adherencia que presentaban las esporas entre sí, lo que nos llevaba a perderlas una y otra vez en los lavados previos a la fijación. Todo esto, junto con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento, nos dirigía más y más hacia un defecto en la capacidad de adherencia de las células entre sí.

La única diferencia realmente apreciable entre las esporas fue observada a nivel de PAGE de membranas. Se trata de la desaparición de una proteína de bajo peso molecular (16-18kDa) integrante de las membranas de las esporas. Esta proteína llegaba a aparecer en cultivos viejos donde había habido una cierta agregación, siempre con un retraso muy apreciable con respecto a la cepa salvaje. El tamaño de esta proteína la hacía diferente de las dos proteínas que producen los genes *oar* y *mlpA* (115 y 33 kDa respectivamente), por lo que, si hay alguna relación entre ellas

es de forma indirecta. Hasta el día de hoy se han estudiado diversas proteínas que se sintetizan de novo o cobran más importancia a partir del proceso de agregación (Orndorff y Dworkin, 1982), tanto en bacilos periféricos como en esporas (O'Connor y Zusman, 1991b). De las conocidas en profundidad, nos llamó primero la atención la hemaglutinina mixobacteriana (MBHA) (Cumsky y Zusman, 1979) debido sobre todo a la capacidad de esta proteína de producir agregación (Cumsky y Zusman, 1981). Sin embargo, esta proteína tiene un peso molecular de 28 kDa y posteriormente se comprobó que aparecía sobre todo en los bacilos periféricos y no en las esporas (sólo en la fracción soluble de éstas y a 20°C) (O'Connor y Zusman, 1991a), además su importancia en la agregación fue relativizada posteriormente a su descubrimiento (Romeo y Zusman, 1987). Otras proteínas propias de esporas, como las proteínas S y S1 (Teintze *et al.* 1985), proteína C (McCleary *et al.* 1991) o proteína U (Gollop *et al.* 1991), no coinciden en peso molecular ni parecen tener relación alguna.

Cuando las mixósporas de *M. xanthus* se exponen de nuevo a condiciones ricas en nutrientes entran en un proceso de germinación para convertirse de nuevo en células vegetativas. Durante este proceso, la desaparición gradual de las características específicas de las esporas se lleva a cabo en el siguiente orden: primero desaparece la resistencia al calor, posteriormente la resistencia al SDS, sigue la pérdida de la refractibilidad y finalmente desaparece la forma esférica (Elías y Murillo, 1991). La síntesis de ARN activo comienza dos horas tras la iniciación de la germinación y se necesita iones calcio y una o varias serine-proteasas (Otani *et al.*, 1995). Los resultados expuestos en esta memoria de doctorado indican que nuestro mutante de *M. xanthus* produce hasta un 80% menos de esporas que la cepa salvaje de la que proviene, pero sin embargo los niveles de germinación de estas esporas son comparables a los de las esporas salvajes. *M. xanthus* Δoar produce menos esporas pero su capacidad de formar esporas completamente normales y funcionales se mantiene intacta. Esto nos refuerza más en la creencia de que no hay un defecto intrínseco en la esporulación en sí, sino que los efectos observados son consecuencia de otro defecto más directamente relacionado con la mutación, como se discutirá más adelante.

Llegados a este punto, la característica que más evidente se nos hacía y más consistentemente se presentaba bajo diversas formas en los distintos experimentos era la baja capacidad de adherencia de nuestro mutante. Se había puesto de manifiesto durante el estudio de las curvas de crecimiento, durante el estudio de las esporas y muy probablemente estaba involucrada en la incapacidad del mutante de formar agregados y cuerpos fructificantes maduros. Para comprobar esto empezamos el estudio de la agregación desde diferentes ángulos. Primero quisimos saber el alcance de esta falta de agregación de la cepa: cuando realmente se paraba el proceso de desarrollo, es decir, cuando divergía el comportamiento del mutante y la cepa salvaje bajo condiciones de agregación. En 1989, O'Connor y Zusman estudiaron la agregación y formación de agregados celulares durante el desarrollo de *Myxococcus xanthus*. Los estudios se realizaron mediante microscopio electrónico de scanning y microscopio óptico y descubrieron patrones complejos de asociaciones multicelulares. Estos patrones eran repetitivos e indicaban que existían interacciones celulares muy organizadas a nivel espacial. En sus estudios pusieron de manifiesto que en las primeras horas de falta de nutrientes, los bacilos comienzan a migrar formando círculos concéntricos en cuyo interior van sufriendo una morfogénesis hacia la formación de esporas. Posteriormente, este movimiento circular en un plano, pasa a ser espiral y a nivel tridimensional y se van formando los agregados y montículos celulares. También pusieron en evidencia la existencia de bacilos periféricos que no entraban a formar parte de los cuerpos fructificantes sino que tenían un papel de soporte de éstos (O'Connor y Zusman 1991 a, b, c). O'Connor y Zusman propusieron que estas formaciones multicelulares en espiral durante la diferenciación en medio sólido jugaban un papel principal en el desarrollo de *Myxococcus xanthus* (O'Connor y Zusman, 1989). Esto fue confirmado de una forma muy elegante casi una década después por Julien *et al.* (2000). Estos autores crearon fusiones transcripcionales de distintos genes regulados durante el desarrollo con el gen *gfp* que codifica una proteína fluorescente verde que puede ser visualizada distintamente mediante un microscopio de fluorescencia. Observaron que los genes regulados al principio del desarrollo se expresaban tanto en bacilos periféricos como en las células que se encontraban en el interior de los cuerpos fructificantes

nacientes. Por el contrario, los genes del final del desarrollo solo se expresaban en células en el interior de los cuerpos fructificantes. Es decir, las células periféricas empiezan a desarrollar pero son incapaces de expresar genes que son activados después de las seis horas del comienzo del desarrollo. Los autores propusieron que la expresión de ciertos genes se limita al interior de los cuerpos fructificantes porque las células de éstos presentan una alta densidad celular y una distribución espacial que permite una transmisión creciente de la señal C, que se transmite por contacto celular “cabeza con cola”. Sin embargo, las células periféricas tienen una distribución espacial diferente y están a una densidad celular baja, lo que les impide recibir señal C y expresar los genes tardíos del desarrollo. De hecho, ya Dworkin y Gibson (1964) demostraron que todas las células de *Myxococcus xanthus* tienen la capacidad innata de llegar a ser esporas. Todos estos autores con posterioridad mantienen que lo que diferencia a unas células con respecto a otras es su diferente localización espacial.

Con todas estas ideas en mente comenzamos el estudio a nivel de microscopio óptico de la agregación. Tras comprobar que no se producían agregados en la cepa salvaje, pasamos a comprobar en qué momento se paraba este proceso de agregación. Nuestra tecnología no nos permitía observar la migración en espirales tridimensionales de los bacilos, pero si que pudimos observarlo en un solo plano. En efecto, tanto mutante como salvaje comenzaron a producir corrientes de bacilos que dejaban en su interior un conjunto de células más compactadas. Sin embargo, al mutante le costó más tiempo realizar esto y de hecho no pasa de esta etapa. Se podría decir que el mutante conoce la ruta a seguir pero algo le impide pasar más allá y llegar a la fase tridimensional compactada. La células de *M. xanthus* Δoar sólo llegan a ser, en su mayoría, bacilos periféricos. Quizás la no continuación con este proceso impide también la falta de lisis celular que es evidente, sin embargo, en la cepa salvaje.

Una vez que habíamos confirmado que el proceso de formación de agregados se detenía, quisimos cuantificar la proporción de agregación que se llevaba a cabo. Para ello realizamos la medida de los cuerpos agregados mediante el peso seco y mediante la medida de la proteína de ambas fases. Aún cuando la medida de la

cantidad de proteínas nos da una proporción de agregación que dobla la obtenida midiendo el peso seco, ésta no sobrepasa un 20% de la agregación del tipo salvaje, lo cual corrobora claramente nuestra tesis. La diferencia obtenida es probablemente debida al procedimiento utilizado para la medida. En cualquier caso nos habla de una clara correlación entre la presencia de agregados y el número de esporas alcanzado. El caso en que la proporción esporulación/agregación fuera superior a 1 tampoco debe resultarnos extraño, ya que el método de medida de los agregados mediante el peso seco puede que dejara sin precipitar algunas esporas de la periferia de los cuerpos. Quizás, en este sentido, sean más fiables los resultados obtenidos mediante la medida de proteínas. En cualquier caso, este resultado nos vuelve a hacer pensar que el defecto o defectos en esporulación son consecuencia, y no al contrario, de una deficiente agregación.

La capacidad de adherencia de *Myxococcus xanthus* ha sido muy estudiada por su importancia tanto en el movimiento social como en el proceso de desarrollo. Muchas moléculas han sido relacionadas con la adhesión. Así, ya hemos nombrado la hemoaglutinina y los pili o fimbrias, a los que volveremos con posterioridad. Por otra parte, desde el comienzo de los 70 se sabe que existen también otra serie de apéndices que han sido relacionados con la capacidad de adhesión de las células entre sí y con el sustrato inerte. Se trata de las fibrillas. Al mismo tiempo, Shimkets, estudiando un mutante que crecía en medio disperso y no presentaba movimiento social ni desarrollo (*dsp*), describió un ensayo que medía la cohesión intercelular y lo correlacionaba con otro ensayo que medía la inhibición de esta cohesión por el colorante rojo-Congo, indicando que éste colorante se unía a los receptores implicados en esta adhesión (Arnold y Shimkets, 1988 a,b). También por esta época, Marty Dworkin había comenzado a utilizar anticuerpos monoclonales dirigidos contra la superficie de *M. xanthus* para determinar cuáles de ellos inhibían el desarrollo (Gill y Dworkin, 1986, 1988; Gill *et al.*, 1987). Posteriormente, todos estos factores se unificaron al demostrarse que estaban relacionados con las fibrillas (Chang y Dworkin, 1994, 1996; Clemans *et al.* 1991) y el papel de éstas en la cohesión celular (Behmlander y Dworkin, 1991). Esto abrió una línea de investigación que permitió vislumbrar la composición y estructura de las fibrillas

(Behmlander y Dworkin, 1994 a, b) que resultaron ser un eje de polisacáridos y proteínas en proporción cercana al 50%.

Por todo esto, una de las primeras razones posibles que explicaran la falta de adhesión era un defecto en las fibrillas. Por ello comenzamos diferentes estudios que incluían la medida de la cohesión de Shimkets mediante su ensayo de cohesión y la capacidad de secuestro del colorante rojo Congo. Como se puede observar en la sección de resultados, no encontramos diferencias entre el mutante y la cepa DZF1. El ensayo de cohesión dio lugar a una aglutinación mínima, como ya era conocido que ocurre con la cepa DZF1. Sin embargo, el ensayo con el rojo-Congo demostró que ambas cepas son capaces de secuestrar la mayor parte del colorante en los primeros 10 minutos, y retirarlo en su práctica totalidad al cabo de media hora. Con estos resultados en mano, pasamos a estudiar la producción de fibrillas en ambas cepas al microscopio electrónico de barrido. Observamos células tanto en ciclo vegetativo como al comienzo del ciclo de desarrollo. En todos los casos el mutante producía fibrillas como era de esperar. Es cierto que quizás la cantidad de fibrillas era menor que en la cepa salvaje, pero esto es difícil de cuantificar en este experimento, y en todo caso, la disminución del número de fibrillas no puede ser consecuencia directa de la falta de Oar-Spa, ya que éstas han desaparecido por completo de la cepa mutante, lo que no ocurre con las fibrillas. Más bien nos inclinamos de nuevo a pensar que se trata de un efecto indirecto al no estar las células suficientemente compactadas entre sí. Finalmente, estos resultados los confirmamos mediante el uso de anticuerpos monoclonales anti-fibrillas que nos indicaron que ciertamente existía reacción positiva con todos los anticuerpos probados, por lo que las fibrillas no parecen ser tampoco defectuosas en ninguna de las proteínas que las constituyen.

El último enfoque en este capítulo de esta tesis doctoral consistió en comprobar si el defecto de nuestro mutante podía consistir en la falta de alguna señal extracelular complementable. El primer paso que se dio para estudiar esta señales intercelulares fue en el laboratorio de Dale Kaiser en los años 70. Consistió en aislar diferentes mutantes de *M. xanthus* que eran incapaces de formar cuerpos

fructificantes maduros por sí solos pero que sí que lo hacían al ser mezclados con la cepa salvaje o con cualquier otro mutante que perteneciera a un grupo de complementación diferente (Hagen et al., 1978). De esta manera, agrupando los mutantes en un mismo grupo si no eran capaces de complementarse, se hicieron cuatro grupos de complementación: A, B, C, D, (Kroos y Kaiser, 1984) a los que posteriormente se unió otro más denominado E (Downard, J. Y Toal, D, 1995). De todas estas señales, la señal A y C son las más estudiadas. Como se ha explicado en la introducción, la falta de aminoácidos iniciaría la señal de estrés nutricional provocando la actuación de ciertas proteasas que darían lugar a una mezcla de aminoácidos (Kuspa *et al.* 1992a) que actuarían como un *quorum-sensing* (Kuspa *et al.* 1992b) activando los genes relacionados con la señal C. Según los últimos modelos, la señal C, que necesita el contacto célula-célula y la alineación espacial ordenada para su transmisión, tendría un efecto retroalimentario, que por una parte aumentaría sus propios niveles de producción, y por otro dirigiría el comportamiento de las células a alinearse y a contactarse. Un nivel bajo de señal C produce el típico *rippling*, un nivel más alto indica la agregación y por último un nivel superior produce la esporulación (Kruse *et al.* 2001). Es por ello que sólo las células que están compactadas y ordenadas pasan a agregarse, y de éstas, solo las que se compactan aún más y aumentan más su producción de señal C pasan a esporular, como ya se ha indicado anteriormente.

Lo primero que estudiamos fue si existía alguna señal difusible de la cepa salvaje que pudiera rescatar su fenotipo en nuestro mutante. Como se ha explicado en la sección anterior, el resultado de este experimento fue múltiple. El primer resultado obvio fue que, ciertamente, no existía ninguna complementación debida a una señal difusible. Sin embargo sí que existía complementación cuando ambas cepas llegaban a estar en contacto directo. Otro resultado fue observar que, aunque anteriormente habíamos visto que no había diferencias entre ambas cepas a nivel de movimiento, sin embargo la cepa salvaje era capaz de avanzar mucho más e incluso invadir el terreno presuntamente colonizado por DZF1 Δ *oar*, pero nunca ocurría lo contrario, lo que indicaría que de alguna manera, el movimiento social en la cepa salvaje tiene una ventaja competitiva frente a la mutante. Además, existe un cierto rechazo entre

ambas cepas, lo que lleva a la cepa salvaje a no reconocer como congénere a la mutante (a pesar de que son genéticamente idénticas a excepción de un locus) y a intentar rodearla antes que mezclarse con ella. De todas formas, cuando finalmente ambas se ponen en contacto sí que existe complementación y se forman cuerpos fructificantes maduros. Todo esto nos habla de nuevo de algún tipo de defecto no detectado anteriormente en el movimiento social.

Para estudiar en más profundidad estos resultados pasamos a realizar estudios de complementación mezclando varias proporciones de cepa mutante y salvaje. El resultado fue que la complementación fue completa hasta incluso cuando la cepa salvaje se encuentra presente tan solo en una cuarta parte. La complementación se extendía al número de esporas producido pero no se extendía al origen de las esporas. Es decir, en cualquiera de los casos en que hay mezcla de ambas cepas, la casi totalidad de las esporas son esporas procedentes de la cepa salvaje. La cepa mutante no participa genéticamente en la formación de esporas. Esto es, la complementación es sólo superficial, la cepa mutante sigue comportándose como lo hace cuando está sola: sus células actúan como bacilos periféricos, nunca llegan a estar en el interior de los cuerpos agregados con una alineación y en una densidad tal como para recibir y traspasar la señal C. Podríamos entonces decir que existe un defecto a nivel de la señal C (que no es difusible, como hemos visto). Sin embargo es esencial deducir si esta falta es el origen del comportamiento anómalo de DZF1 Δ oar o por el contrario es una consecuencia de la mutación. El hecho de que la cepa mutante presenta menos agregación que la cepa madre incluso en condiciones donde no hay formación de señal C (como durante el crecimiento líquido en matraces) y el hecho de mostrar probablemente un movimiento social anormal, lo que es un requisito para la alineación de las células y la transferencia de la señal C, nos hace pensar que es el defecto en agregación observado y por tanto, la falta de un movimiento social completo, lo que impide la normal formación de señal C. En este sentido habría que indicar que los mutantes S⁻ también pueden ser complementados por la cepa salvaje pero nunca contribuyen a la formación de esporas, que son en su totalidad de origen salvaje (Shimkets, 1986; Li y Shimkets, 1993).

Todos estos resultados nos dirigen de una forma circunstancial, por tanto, hacia un defecto en la agregación que daría lugar a un movimiento social anormal y a una no transmisión de la señal C que provocaría la interrupción del proceso de desarrollo. El defecto en la agregación no está originado por la falta o malfuncionamiento de las fibrillas, sino que tenemos que buscar otros candidatos para esto. Ciertamente, existen muchas posibles moléculas del tipo adhesina conocidas en otras bacterias que podrían ser las responsables de este defecto. De hecho, Oar es una glucoproteína de gran tamaño de la membrana externa que podría muy bien tener esta función. Esta posibilidad no tiene porque ser independiente de otra opción que aún no se ha estudiado por las razones que se indicarán a continuación. Se trata de la formación y funcionalidad de pilis o fimbrias, que tienen también un papel fundamental en el movimiento social y por tanto la agregación (Kaiser, 1979). De hecho, se ha propuesto que las fibrillas se ocuparían de contactar las células entre sí y los pili, gracias a su refracción, las acercarían y alinearían y a la vez, producirían translocación (Sun *et al.* 2000). Vamos a discutir esta posibilidad.

Como ya se ha apuntado al principio de esta discusión, *Myxococcus xanthus* DZF1 no es en sí una cepa salvaje. Proviene originariamente de un mutante espontáneo que se aisló porque crecía disperso en medio líquido pero mantenía intacta su capacidad de formar cuerpos fructificantes maduros (Dworkin, 1962). Este tipo de mutante era muy conveniente para el estudio en laboratorios ya que el fenotipo salvaje crece con dificultad en medio líquido, formando agregados y biofilms, por lo que su manipulación es más difícil. Como consecuencia, la mayoría de las cepas usadas hoy en día en los laboratorios provienen de esta cepa, llamada FB. Posteriormente se vio que esta mutación estaba en un gen del grupo de deslizamiento social, llamada *sglA*. Como otros mutantes de este tipo, *sglA*⁻ retenía una cierta motilidad social y expresaba pilis a niveles reducidos (Kaiser, 1979) pero no se conocía la razón genética y estructural de este defecto. Años después (tras el estudio original del mutante *oar*⁻) se evidenció que algunos genes en el locus *sgl* presentaban secuencias aminoacídicas con gran similitud a los componentes de la ruta biosintética de los pili de tipo IV de *Pseudomonas aeruginosa* (locus *pil*) (Wu y Kaiser, 1995). Finalmente, en 1999, el gen *sglA* fue aislado y secuenciado y se

encontró que mapeaba en el locus *pil* y codificaba para una secretina con alta homología con la proteína PilQ de *Pseudomonas aeruginosa* y *Neisseria gonorrhoeae* (Wall et al. 1999). Una delección en este locus demostró que *pilQ* (el nuevo nombre del gen *sglA*) era esencial para la biogénesis de los pili, el movimiento social y la formación de cuerpos fructificantes. Aguas abajo 39 pb se encuentra otro marco abierto de lectura. Curiosamente, este locus presenta muchas similitudes con *oar-mlpA*. Estos dos genes también están separados por 37 pb. El primero presenta un proteína de alto tamaño molecular (1061 aminoácidos) con un péptido señal para su localización en la membrana externa. El segundo es una proteína de 236 aminoácidos que también presenta un péptido señal. De igual manera, los dos genes del locus *pilQ* son de 901 y 220 aminoácidos respectivamente con sendos péptidos señales. De igual manera, en ambos casos, las dos proteínas se transcriben juntas en un mismo ARN mensajero, que viene marcado por una secuencia de Shine-Dalgarno al comienzo y una secuencia palindrómica al final.

Cuando el fenotipo de Δoar se estudió, no se observó la presencia o no de pilis porque ya se sabía que la propia cepa madre presentaba un defecto en este sentido (Kaiser, 1979). Hoy día sabemos que el defecto existente en DZF1 no es absoluto, sino que se trata de una mutación hipomórfica, por lo que podía ocurrir un defecto acumulativo al añadir la mutación Δoar . Podríamos decir que existe una diferencia esencial en estos dos mutantes: el mutante $\Delta pilQ$ no presenta movimiento social, mientras que Δoar presenta un movimiento igual a la cepa madre. Sin embargo, es cierto que el estudio del efecto de $\Delta pilQ$ sobre el movimiento social se ha hecho en un doble mutante $A^- pilQ^-$ y en este background genético, la mutación original presente en DZF1 tampoco presenta movimiento de ningún tipo (solo presenta un ligero movimiento residual al añadirle 2 mM de $CaCl_2$). Por ello, el comportamiento de nuestro mutante en este mutante A^- tampoco daría una gran información. Obviamente, el locus *oar-mlpA* no es el locus *pilQ-orfL* ni probablemente ninguno de los locus *pil*, que ya están prácticamente secuenciados en una gran proporción. Sin embargo, existen otras mutaciones del movimiento que no mapean en este locus pero pertenecen al sistema social. La similitud estructural y funcional de ambos locus (ambos afectan principalmente a un tipo de adherencia que

es diferente a la cohesión producida por las fibrillas y ambos tienen mayor o menor similitud con proteínas relacionadas con la cohesión intercelular (Martínez Cañamero, comunicación personal) hacen interesante un estudio en mayor profundidad de la presencia, calidad y cantidad de pilis de tipo IV en el mutante Δoar con mayor interés del que se ha puesto hasta ahora. Esto, junto con estudios a nivel de microscopía electrónica de la localización celular de la proteína, sería el paso a seguir en investigaciones futuras.

BIOMINERALIZACIÓN

Uno de los campos donde el uso de la biomineralización producida por bacterias puede traer mayores beneficios es en la restauración de monumentos donde las inclemencias del tiempo y la contaminación propios de la intemperie han conducido a pérdidas de material calcáreo. En estos casos, la capacidad de las bacterias para precipitar cristales de calcita *in situ* puede llevar a la regeneración de las zonas deterioradas (Tiano *et al.*, 1999). Sin embargo, el aporte de materia viva también puede traer efectos colaterales negativos, por lo que un estudio en profundidad de los mecanismos bacterianos implicados en el proceso puede ser esencial a la hora de conseguir dicha mineralización sin necesidad de utilizar células vivas.

Con este objetivo, Perito *et al.* (2000) construyeron diversos mutantes de inserción en una cepa de *Bacillus subtilis*. Para ello, utilizaron un plásmido capaz de insertarse específicamente en determinados genes, inactivándolos y por tanto anulando su función. Entre todos los mutantes obtenidos, los autores seleccionaron aquellos que presentaban un fenotipo que afectaba su capacidad de mineralización y los dividieron entre aquellos que disminuían la formación de cristales y aquellos que aumentaban la velocidad de cristalización. De esta forma aislaron seis cepas mutantes incapaces de formar cristales de calcita y seis cepas que formaban calcita más rápidamente que el salvaje.

Una vez localizados los genes inactivados, las secuencias respectivas fueron comparadas en una base de datos. La información más notable que se obtuvo de esta comparación fue que, a pesar de tener homología con genes de funciones muy diversas, todos compartían el hecho de ser proteínas asociadas a membranas. En concreto, la mayoría de los mutantes deficientes tenían homología a proteínas involucradas en la beta-oxidación de los ácidos grasos. Más interesante aún, entre los mutantes que biomineralizaban más rápido, había uno cuyo gen inactivado presentaba homología con una proteína involucrada en la agregación, mientras que otro presentaba similitud con una proteína de adhesión.

Estos resultados junto con otros resultados previos de nuestro laboratorio, en los que se había puesto de manifiesto que las membranas de *M. xanthus* 422 podían actuar como núcleos heterogéneos de cristalización para calcita y estruvita, (González *et al.*, 1995, Ben Chekroun, 2000), fueron los que nos animaron a estudiar la capacidad de biomineralización del mutante *DZF1Δoar*, carente de una proteína de membrana, que además parece estar involucrada en la agregación y adhesión celular, tal como se ha demostrado y discutido en esta memoria.

Con esta finalidad y teniendo en cuenta de una parte, que el interés de hoy día en relación a los procesos de biomineralización bacteriana se centran de manera especial en la carbonatogénesis y, de otra, que en este sentido se había realizado un estudio casi exhaustivo con la cepa salvaje de *M. xanthus* 422 (Ben Chekroun, 2000; González Muñoz *et al.*, 1995), se decidió hacer un estudio comparativo de la cepa mutante con esta cepa de *M. xanthus* que, al igual que la cepa DZF1, presenta crecimiento disperso en medios líquidos. Además, para que este estudio fuese más significativo, se investigó el comportamiento de ambas cepas en condiciones en las que no se había estudiado a la cepa 422. De ahí que, teniendo en cuenta los resultados obtenidos con la cepa 422, se llevara a cabo una selección de medios de cultivo para ensayar el comportamiento de la cepa mutante.

Los medios seleccionados fueron: M-2, M-3, M-9, CC y A-4, cuya composición se muestra en la tabla 3 de material y métodos, en base a los criterios

que se indican a continuación. Los medios M-2 y M-3, en primer lugar por llevar como fuente de nitrógeno Bacto-casitone, que es la fuente de elección para los medio de cultivo de estas myxobacterias; y en segundo lugar, por no llevar fuente añadida (o específica) de fósforo, a fin de evitar la producción de fosfatos, particularmente de estruvita (González *et al.*, 1993, 1994, 1995; Ben Omar *et al.*, 1994, 1995, 1996, 1998); en tercer lugar, por llevar una fuente de carbonato y otra de calcio; y finalmente porque en ambos medios, la cepa 422 había mostrado excelente capacidad de carbonatogénesis (Ben Chekroun, 2000). La diferencia entre ambos medios radica en que M-2 lleva una fuente adicional de magnesio. Esta particularidad hizo que en el caso de la cepa 422, los carbonatos producidos fuesen calcita y calcita magnésica (González *et al.*, 2000).

El medio M-9, es similar al M-3, pero con una fuente añadida de fósforo. En este medio se había descrito la producción de calcita por la cepa 422, sin que pareciera afectarse por la presencia de un fosfato (Ben Chekroun, 2000).

El medio CC es notablemente diferente de los anteriores. En este medio, la cantidad de bacto casitone se ha reducido a menos de un tercio, adicionando en su lugar extracto de levadura, que, además de fuente de nitrógeno puede ser usado por la bacteria como fuente de fósforo entre otros. La fuente de carbonato es diferente, y la de calcio, es en parte la misma, y en parte otra. En este medio, la cepa 422 había producido calcita y vaterita al 50% (Ben Chekroun, 2000).

Además de todo lo dicho, en estos tres medios se había detectado, con la cepa 422, la presencia de células bacterianas calcificadas (Ben Chekroun, 2000).

Los medios con diversos cationes añadidos (CMFe, CMMg, CMCo, CMMn y CMBa), se diseñaron especialmente para la investigación de esta memoria. La finalidad era ensayar la posibilidad de la producción de otros carbonatos, diferentes a los del calcio, al mismo tiempo que se comparaba el comportamiento de ambas cepas bacterianas. Como medio base se eligió el medio CM (Ben Chekroun, 2000), por su gran simplicidad, a fin de evitar la posible precipitación de sales de los

cationes utilizados, y porque en este medio, la cepa 422 había producido calcita (Ben Chekroun, 2000). En el caso del hierro, cobalto, y manganeso, debido a la toxicidad de estos metales para las mixobacterias, las sales correspondientes se adicionaron a una concentración 1mM y la sal de calcio (componente del medio CM original), al 0.1%.

En el medio con magnesio (CMMg), aunque este catión no es tóxico para la bacteria a esas concentraciones, se decidió seguir la misma pauta, ya que en el medio M-2 se habían ensayado concentraciones de magnesio superiores. Para el medio CMBa se utilizó sólo la sal de bario a la concentración 2mM, debido a que a esta concentración el bario no es tóxico para la bacteria. Con ello se pretendía probar la producción de carbonato de bario (witherita), caso de que estas bacterias tuviesen esa habilidad. Los datos de toxicidad mencionados fueron comunicación personal de González-Muñoz.

Como un apéndice se decidió elegir también el medio A-4, para ampliar los ensayos a condiciones en que la cepa 422 había producido un fosfato, el apatito (Ben Chekroun, 2000). Este medio es totalmente diferente de los anteriores, sobre todo por la ausencia de calcio añadido y por llevar una fuente de fosfato, y flúor.

A la hora de iniciar la investigación sobre la capacidad biomineralizadora de la cepa mutante, lo primero que se hizo, y como ensayo previo, fue probar si su cepa progenitora, la cepa DZF1, poseía esta capacidad, ya que está descrito que algunas cepas de ciertas especies bacterianas la poseen mientras que otras no (Perito *et al.* 2000).

Era fundamental asegurar esta capacidad de la cepa DZF1 para garantizar que si la cepa mutante no la poseía era debido a la mutación sufrida. Con esta finalidad se utilizó el medio CMFe ya que como se ha dicho la cepa 422 había producido calcita en el medio original CM.

Como comentario general y adicional que justifique la elección de los medios utilizados cabe añadir lo siguiente: los diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos elegidos permiten el crecimiento del microorganismo y aportan una serie de variantes de interés. En algunos se aporta una fuente de CO_3^{2-} como sal sódica (medio A-4) o potásica (medios M-2, M-3 y M-9), intentando simular aquellas condiciones ambientales en que la bacteria pudiera disponer de una fuente de ión carbonato procedente del medio ambiente o del metabolismo de otros microorganismos. Otros, sin el aporte de este anión (medios CC y CM), para ensayar las condiciones en que la bacteria tuviera que aportarlo como producto de su propio metabolismo. Además, entre los medios usados, los hay unos con fuente directa de fosfato (M-9 y A-4) y otros sin ella. Estas variantes se introdujeron teniendo en cuenta que algunos autores, como Rivadeneyra *et al.* (1985 a y b), afirmaron que el fosfato inhibe la formación bacteriana de carbonatos. Con la misma finalidad se han usado medios de cultivo con adición de Mg^{2+} (M-2 y CMMg). El magnesio, según diferentes autores, también inhibe la producción de carbonatos cuando está a altas concentraciones (Rivadeneyra *et al.* 1991, 1993, 1997, Buckynski y Chafetz, 1991, Kropp, 1997). No obstante, y puesto que la magnesita y la calcita magnésica son carbonatos con Mg^{2+} , se decidió ensayar estos medios.

En la tabla 10 de resultados se puede comprobar la capacidad biomineralizadora de ambas cepas de *M. xanthus*. Como ya se indicó en el capítulo de resultados, en esta tabla se han introducido en rojo los datos ya conocidos relativos a la cepa 422 (Ben Chekroun, 2000, González *et al.*, 2000). Para facilitar la lectura y comprensión de esta discusión se ha decidido elaborarla atendiendo a los distintos grupos de minerales encontrados y a los medios utilizados.

Producción de carbonatos

Como puede verse en los resultados, ambas cepas han puesto de manifiesto una extraordinaria capacidad de producción de carbonatos. Así, hemos encontrado producción de los polimorfos calcita y vaterita, producción de calcita magnésica y de un carbonato de calcio, potasio y magnesio. Además de esta diversidad de

minerales, es de destacar la variedad de morfologías encontradas y el papel desempeñado, en algunos casos, por la presencia o ausencia de agar-agar en el medio de cultivo.

Pasando al estudio comparativo de ambas cepas, hay que destacar que las colonias de la cepa mutante son, en general, más extendidas que la de la cepa 422, siguiendo en general la pauta que se muestra en las imágenes de la página 79. Además, la aparición de los cristales en los medios sólidos sufren un ligero retraso, de entre 1 y 3 días en el caso de la cepa mutante en comparación con la 422. Este retraso posiblemente sea debido precisamente a la distinta velocidad con que se van extendiendo las colonias en uno y otro caso. En efecto, para que se de la cristalización hace falta un grado de sobresaturación determinado y, además, en el caso de nucleación heterogénea (González *et al.*, 1992; 1996; Ben Chekroun, 2000), será preciso la presencia adecuada de esos núcleos, que en nuestro caso serán aportados por las células bacterianas. En el caso de la cepa 422, en que las células aparecen en las colonias con un mayor grado de concentración, tanto la producción de iones originados por el metabolismo microbiano como el aporte de núcleos heterogéneos de cristalización darán lugar a concentraciones de ambos más elevadas en un tiempo más corto que cuando las colonias crecen más dispersas. Este mismo hecho puede dar lugar a que los fenómenos de reconocimiento molecular que deben ocurrir en la nucleación heterogénea puedan tener variantes en el caso de una y otra cepa, lo que podría influir en el desarrollo de unas fases minerales u otras y/ o de morfologías diferentes dentro de una misma fase.

En cuanto a la producción de los diferentes carbonatos encontrados, en el medio M-2, ambas cepas producen calcita magnésica, si bien, existen diferencias que consideramos notables. En primer lugar, la cepa 422 produce calcita magnésica en medios sólido (Ben Chekroun, 2000) y líquido-reposo (ver figura 30), mientras que la cepa mutante lo hace en sólido y líquido-agitación, (figura 31), produciendo en líquido-reposo calcita y un carbonato de calcio, potasio y magnesio aún innominado (figura 30), cuya producción no se ha detectado con la cepa 422. En segundo lugar también merecen comentario las morfologías. En general, en todas las condiciones

ensayadas, hay mayor riqueza de morfologías en los carbonatos producidos por la cepa 422 que por la mutante. En sólido se ha descrito que la cepa 422 produce una notable variedad de formas (bastoncillos, esferulitas, formas de badajo, formas de diablo o semidiablo, etc. (González Muñoz *et al.* 2000; Ben Chekroun, 2000), mientras que la cepa mutante (figura 31), da origen sólo a cristales rombohédricos más o menos deformados con tendencia a formas prismáticas. En condiciones de medio líquido-reposo (figura 30A), la cepa 422, da origen a cristales en su mayoría con aspecto rombohédrico y algunos escalenohédricos, mientras que los carbonatos producidos por la cepa mutante presentan un aspecto en el que no es posible destacar morfología típica cristalina alguna (figura 30B).

Las morfologías de la calcita magnésica producidas por la cepa mutante en líquido-agitación, como puede verse en la figura 31A, son pequeños bastoncillos bien calibrados (casi todos con tamaños similares), que aparecen formados por cristales en haces, mientras que para la cepa 422 está descrita la producción de calcita en masas de apariencia amorfizada (Ben Chekroun, 2000).

Esta disparidad de comportamiento parece revelar, en principio, que ocurre un incremento en el gradiente de concentración de los iones aportados por el metabolismo bacteriano de manera más rápida en el momento de alcanzar la sobresaturación (momento que puede ocurrir antes o después en el tiempo, según los casos) en los cultivos de la cepa mutante que en los de la cepa 422, tanto en sólido como en líquido-reposo y, de otra parte, que debe de haber un comportamiento de reconocimiento molecular a la hora del inicio de la cristalización que podría contribuir al desarrollo de unas u otras morfologías, como se ha indicado más arriba.

En el caso del medio CMMg, a pesar del aporte de magnesio no se ha producido calcita magnésica por ninguna de las dos cepas. Posiblemente las concentraciones de sales en este medio, muy diferentes de las de M-2, no son adecuadas para la producción de carbonatos. Otros aspectos relativos a este medio se discutirán más adelante.

La producción de vaterita con o sin la producción simultánea de calcita por la cepa mutante merece especial atención. En el medio M-3, ambas cepas producen principalmente vaterita, pero mientras que la cepa 422 produce, además, calcita y weddelita en medio líquido (figura 32 y 33), la cepa mutante sólo produce vaterita en todas las condiciones ensayadas (figura 35).

En la figura 32B y F pueden apreciarse cristales bipiramidales tetragonales, posiblemente de weddelita. Con la cepa 422, tanto en sólido (Ben Chekroun, 2000), como en líquido-reposo, es posible apreciar la presencia de células calcificadas, cosa que no parece ocurrir con la cepa mutante. En este sentido véanse las figuras 32D, E y F así como la 34A. En ésta última, y marcada con una flecha, aparece lo que podría ser una célula bacteriana, si bien no se encontró ninguna otra en todo el campo visual observado. Las células que aparecen en la figura 32 presentan una morfología que parece indicar que estarían a mitad de camino entre células vegetativas y mixósporas; y una agrupación que parecería indicar cierta agregación hacia la formación de cuerpos fructificantes. Estos resultados concuerdan con el comportamiento citado más arriba relativo al comportamiento de *M. xanthus* en medios de cultivo en que comienzan a escasear los nutrientes (O'Connor y Zusman, 1989). Tanto las células como la matriz en que aparecen inmersas están mineralizadas. Este comportamiento no se ha podido observar con la cepa mutante, posiblemente debido a la forma en que la mutación interfiere en la agregación. Por otro lado, el aspecto más amorfo de los carbonatos producidos por ésta última cepa podría indicar, como se ha discutido para el medio M-2, un aporte más rápido de iones que provocarían formas más esqueléticas, más amorfas.

En medio M-9, de nuevo presenta la cepa mutante mayor tendencia a producir vaterita, y, además produce calcita, mientras que la cepa 422 sólo produce calcita (Ben Chekroun, 2000).

En el medio CC el comportamiento de ambas cepas es más parecido, si bien en líquido-reposo la cepa mutante sólo produce vaterita. Esta capacidad de la cepa mutante merece ser destacada. Teniendo en cuenta la escasez de referencias sobre la

producción de este mineral por microorganismos, nuestros resultados son de gran interés. Hay algunos trabajos como el de Mann *et al.* (1988), y el de Gower y Tirell (1998) en los que se habla de la formación de vaterita en condiciones controladas. Con esta finalidad Mann *et al.* utilizaron monocapas de ácido esteárico y Gower y Tirell polipéptidos cargados, particularmente poliaspartato. Estos últimos autores proponen que el polímero causa la deposición de películas de CaCO_3 , que parecen actuar como sustratos membranosos que promueven el desarrollo de vaterita y calcita.

Teniendo en cuenta que se considera a la vaterita una fase inestable (Katsifaras y Spanos, 1999; Kralj y Vdovic, 2000), llama poderosamente la atención la tendencia de la cepa mutante a dar origen precisamente a esta fase inestable. Ben Chekroun, describió que en los casos de producción de vaterita y calcita por *M. xanthus* 422 con el paso del tiempo había tendencia a incrementarse la proporción de calcita en detrimento de la de vaterita. Pero esta tendencia no se ha encontrado con la cepa mutante. Por otra parte es muy notable la morfología, sobre todo lenticular, mostrada por la vaterita producida por ambas cepas en el medio CC líquido-reposo (figuras 37A y B, 38C y D). Pero hay también diferencias. Como en todos los casos, la diversidad de morfologías producidas por la cepa 422 es mayor (véase figura 38). Además las formas lenticulares producidas por la cepa mutante son de menor tamaño y aparecen más compactadas (figura 37A). Esto podría indicar que en el caso de la cepa mutante ocurre una saturación del medio con mayor rapidez. Esta forma lenticular para la vaterita, fue descrita por Mann *et al.* (1988), en un sistema abiogénico. Estos autores, como se ha mencionado más arriba, conseguían una cristalización controlada de CO_3Ca en forma de vaterita bajo monocapas de ácido esteárico. Los cristales, muy similares a los encontrados en nuestro trabajo, se desarrollaban anisotrópicamente a lo largo de la monocapa de ácido esteárico con la forma de discos lenticulares, con un tamaño en el eje mayor de unos $2.5\mu\text{m}$. En el caso de estos autores el desarrollo posterior de los cristales originaba unos complejos cristalinos de morfología pseudo-hexagonal, a los que llaman “en desarrollo floral”. En nuestro caso, las formas lenticulares incrementaban notablemente su tamaño, llegando a alcanzar, algunas de las producidas por la cepa 422, casi $50\mu\text{m}$ y en torno

a 20µm las producidas por la cepa mutante. Además las agrupaciones que originan recuerdan a las formas evaporíticas del yeso (rosa del desierto). En este caso, el testigo en reposo dio lugar a una pequeña cantidad de precipitado que fue identificado como vaterita (figura 37C). Como puede observarse, en él no aparecen las formas lenticulares. Ello indica el papel bacteriano en la inducción de las morfologías.

Teniendo en cuenta los experimentos mencionados de Mann *et al.* (1988) y estos resultados, podemos inclinarnos hacia el papel de las bacterias como núcleos heterogéneos de cristalización que permiten un reconocimiento molecular condicionante del desarrollo de ciertas morfologías. La cepa 422 provoca además las morfologías recogidas en las figuras 38A y B, que recuerdan el desarrollo floral de los experimentos de los autores mencionados.

Posiblemente la mutación presentada por la cepa DZF1Δoar origina que el reconocimiento molecular tenga algunas variaciones que, en algunos casos como este, dan origen a la formación de morfologías diferentes por ambas cepas. También podría deberse a la diferente velocidad de desarrollo de los cristales, hecho éste que ocurre sin duda si tenemos en cuenta el tamaño y cantidad de formas lenticulares originadas en uno y otro caso.

La presencia de una pequeña cantidad de vaterita en el testigo podría deberse a la pequeñas irregularidades en la superficie del matraz que actuarían como núcleos heterogéneos de cristalización para este mineral.

De todo lo dicho hasta aquí, referente a la producción de carbonatos, no cabe duda de la mayor tendencia de la cepa mutante a la producción del polimorfo vaterita, si bien en algunos casos se originan ambos polimorfos, calcita y vaterita. La cepa 422 tiene una mayor tendencia a la producción de calcita. Son interesantes estos datos, y debemos analizarlos a la luz de los resultados obtenidos por otros autores. Un aspecto importante es que, al estudiar el crecimiento cristalino en medios de cultivo hay que tener en cuenta que la sobresaturación no es constante. Este hecho,

debido a la producción de metabolitos y a las variaciones en el pH, como consecuencia del metabolismo bacteriano, conduce al desarrollo de un gradiente de sobresaturación que no es considerado por la teoría clásica de nucleación. Este gradiente afecta considerablemente al valor real de sobresaturación para la nucleación (Prieto *et al.*, 1990, 1994; Putnis *et al.*, 1995). En un sistema que evoluciona, la cinética de nucleación depende de la velocidad a la que el sistema se aleja de las condiciones de equilibrio; por ejemplo, la velocidad a la que ocurre la sobresaturación. Nuestros estudios con células proliferantes de *M. xanthus* pueden incluirse en este tipo de procesos.

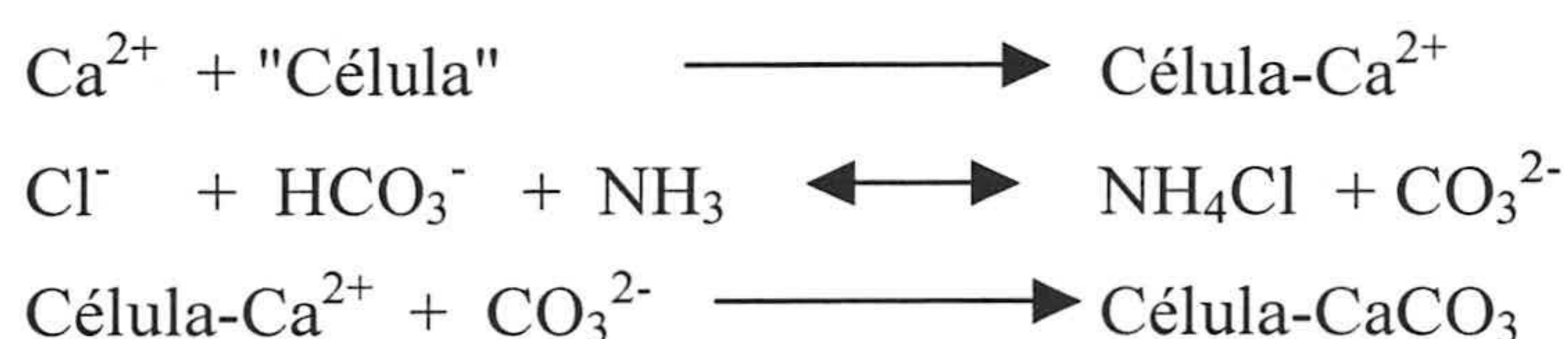
En gran medida, el particular interés de los sistemas de carbonato cálcico se debe al polimorfismo de este material, que junto a las sales hidratadas se puede encontrar como vaterita, aragonito y calcita, en orden de solubilidad decrecientes y de estabilidad termodinámica creciente. Los tres polimorfos tienen características fisicoquímicas notablemente diferentes, y a menudo se encuentra que los polimorfos menos estables son estabilizados cinéticamente y/o bioquímicamente (por ejemplo, el aragonito de las conchas de los moluscos) (Xyla y Koutsoukos, 1987; Spanos y Koutsoukos, 1998). Las investigaciones de la transformación de los polimorfos menos estables en calcita, más estable termodinámicamente, se enfrentan con frecuencia al problema de la sobresaturación que cambia con rapidez durante el curso de la precipitación de carbonato cálcico (Katsifaras y Spanos, 1999). Este problema se ha evitado llevando a cabo los experimentos de precipitación de carbonato cálcico en condiciones de sobresaturación constante, (Katsifaras, 1999), encontraron que la transformación de la vaterita, inicialmente formada, a calcita en condiciones de sobresaturación constante, tiene lugar mediante la disolución de los cristales de la vaterita más soluble, seguida de la cristalización de los cristales de calcita, menos solubles. Estos autores pusieron también de manifiesto que a niveles de sobresaturación relativamente bajos (1,2 -1,5), la velocidad de transformación de vaterita a calcita es independiente de la concentración de sobresaturación, mientras a niveles de sobresaturación relativamente altos (1,5-1,9), la velocidad de transformación disminuía. Sugirieron, además, que el mecanismo de transformación de vaterita a calcita es el mismo en presencia y en ausencia de fosfato. De acuerdo

con este mecanismo, los cristales de vaterita más solubles, se disuelven, mientras que los cristales de calcita más estables nuclean y crecen, lo que ocurre a mayor o menor velocidad según las condiciones. Destacan, por otra parte, que la transformación en estado sólido puede ser excluida de antemano como una posible ruta de transformación, porque la vaterita después del desecado no se transforma en otra fase a menos que transcurra un largo periodo de tiempo (varios meses). Por lo tanto, el único mecanismo posible de transformación de vaterita a calcita, de acuerdo con estos autores es que al aumentar la sobresaturación la velocidad de la disolución de la vaterita es un proceso muy lento comparado con la cristalización de la calcita. Por tanto, es posible que la disolución de la vaterita controle la transformación de vaterita en calcita de acuerdo con Katsifaras, 1999, y la velocidad de transformación iguale a la de disolución. Estos autores, no obstante, encuentran una diferencia con los anteriores en relación al papel del fosfato. Según ellos, el fosfato causa retardo en la velocidad de precipitación espontánea y provoca una estabilización de la vaterita formada inicialmente, disminuyendo drásticamente la transformación a la forma más estable termodinámicamente, la calcita.

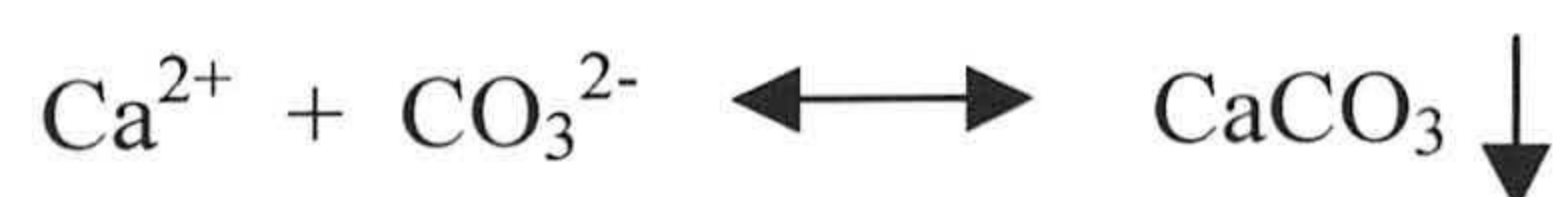
Nuestros resultados, a la luz de todos estos estudios, parecen indicar, como ya se ha dicho, que en los cultivos de la cepa mutante debe darse una sobresaturación mayor o más rápida, aunque esta ocurra más tardíamente que el caso de los cultivos de la cepa 422. Además, hay que tener en cuenta que la precipitación del CaCO_3 inducida por acción microbiana es un proceso más complejo que la precipitación química (Stocks-Fischer *et al.*, 1999). La superficie de las células bacterianas, debido a la diversidad de iones que presenta, puede inducir de forma no específica (actuando como núcleos heterogéneos de cristalización, por ejemplo, mediante reconocimientos moleculares) a la deposición mineral al proveer de niveles de concentración adecuados (Ferris *et al.*, 1986, 1987), especialmente el Ca^{2+} , que no es utilizado específicamente por el metabolismo microbiano y que se acumula en el exterior de la célula (Silver *et al.*, 1975). En los medios de cultivo (como puede ocurrir en medios naturales), es posible que la producción del NH_4^+ como resultado del metabolismo microbiano provoque un microambiente especial alrededor de las células. Esto hará que se origine un elevado pH, inicialmente en estas áreas

localizadas sin un significativo aumento del pH en todo el medio, dando lugar aparentemente al comienzo del crecimiento de cristales de CaCO₃ alrededor de la célula. El hecho de que en nuestros resultados aparezcan en unas ocasiones células calcificadas y en otras no podría deberse a fenómenos de este tipo. Así, según la velocidad a que se libere el amoníaco y la saturación local del mismo que se produzca, con el consiguiente incremento de pH, podría originar el crecimiento de carbonato cálcico en torno a las células. Sin duda, si las células tienen facilidad para agregarse, estos niveles localizados se alcanzarán con más facilidad que si las células están separadas. De ahí que se encuentre con relativa frecuencia la presencia de estas estructuras cuando se trabaja con la cepa 422 y no se hayan podido detectar con la cepa mutante. Este hecho, véase figura 42E y F, también se ha detectado con la cepa DZF1 en el medio CMFe. De otra parte, este comportamiento de las células de la cepa mutante puede ser el responsable de que, llegado un determinado momento del crecimiento del cultivo y con una determinada concentración celular, se provoque de forma muy rápida un incremento de la sobresaturación de forma generalizada en el medio de cultivo al que se ha hecho alusión más arriba como responsable de la preferente precipitación de vaterita.

Las posibles reacciones que ocurren en el medio serían:



En los medios de cultivo, el CO₂ adicional se produce como consecuencia de la respiración microbiana y otros procesos metabólicos. El CO₂ se encuentra en forma de CO₃⁻ o HCO₃⁻; precipita en parte como carbonato cálcico, y también actúa como tampón disminuyendo lentamente el incremento de pH que se origina como consecuencia del NH₄⁺ producido. De otra parte, la solubilidad del CaCO₃ se ve afectada por la fuerza iónica del medio acuoso (Svehla, 1979; Stumm y Morgan, 1981). En efecto, en la precipitación de la calcita, la principal reacción de equilibrio es:



Y ocurre que a 25° C la solubilidad del CaCO₃ se estima que es de 3,8x10⁻⁹ mol l⁻¹ de agua a fuerza iónica cero, solubilidad que se incrementa a 6.3x10⁻⁷ mol l⁻¹ a la fuerza iónica equivalente a la del agua del mar.

Como se observa en todos los experimentos realizados en el curso de esta memoria hay un incremento de pH, salvo en el caso del mutante en los medios CMFe y CMCo donde baja el pH. Esto puede ser debido a que el CO₂ originado en el metabolismo microbiano, al no dar lugar a carbonatos, acidifique el medio.

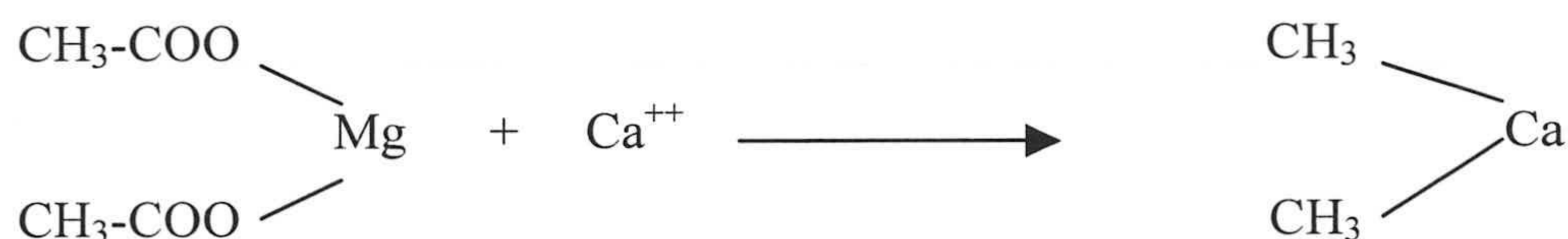
Teniendo en cuenta los datos previos relativos a la cepa 422, que, en medio M-9 (Ben Chekroun, 2000) produce calcita con cristales escalenoédricos con frecuente desarrollo en “dientes de perro”, puede deducirse que el grado de cristalinidad es mucho menor para la calcita y vaterita producida por la cepa mutante en las mismas condiciones (Fig 36). La morfología que se acaba de citar para los cristales producidos por la cepa 422 en medio M-9 sólido es, en cierto modo, similar a la encontrada en este trabajo cuando esta cepa crecía en medio M-2 líquido-reposo.

Producción de otros minerales

Weddelita.

La aparición de weddelita se produjo en el medio M-3 líquido reposo así como en los medios con cationes CMFe, CMMg y CMCo. La aparición de weddelita es un hecho notable. Su producción había sido descrita por Ben Chekroun (2000) en el medio M-3 líquido agitación por la cepa 422, siendo ésta la primera vez que se describió su producción por una mixobacteria. La presencia de oxalatos en cálculos renales cuya formación se ha relacionado con infecciones bacterianas, ha sido descrita por Geider *et al.*, (1996), quienes pusieron de manifiesto que la “siembra de una solución metaestable de oxalato con cristalitos de calcita y vaterita

promovía la iniciación del crecimiento de cristales de oxalato”. Por otra parte, relacionaron la producción de oxalatos en orina con la presencia incrementada de lípidos. Puede ser, por tanto, que la presencia de vaterita promueva la precipitación de weddelita, aunque no sabemos si la cristalización se inicia sobre cristalitas de este mineral o sobre núcleos heterogéneos aportados por *M. xanthus*. Una cuestión en relación con la producción de weddelita a la que no hemos podido responder satisfactoriamente es a la de cómo se origina el oxalato en el medio de cultivo. Pudiera ocurrir la siguiente reacción:



Esto supondría la producción de metano por parte de la bacteria a partir del acetato, extremo éste que no ha podido ser demostrado de forma concluyente en los experimentos realizados. Esta explicación es válida para el medio M-3. Para los medios CMCo, CMMg y CMFe, la presencia se debería a la producción de ácido oxálico por la bacteria, dando lugar al oxalato de calcio.

Apatito y otros fosfatos.

Pasando a considerar los resultados obtenidos en el medio CM adicionado de cationes especiales, lo primero que hay que decir es que la cantidad de minerales producidos ha sido escasa en todos los casos. En el medio CMMg, el comportamiento de las dos cepas es muy similar. La cepa 422 parece producir estruvita ($\text{NH}_4\text{MgPO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$), como se deduce del microanálisis y las morfologías de los cristales obtenidos (figura 44). El difractograma de rayos X es difícil de interpretar. Podría pensarse en weddelita formando agregados completamente orientados según [011], pero no concuerda con el microanálisis ni con las morfologías, por lo que, aún sin descartar la posible presencia de este mineral, nos

inclinamos a identificar el mineral producido mayoritariamente como, según acabamos de decir, como estruvita. La cepa mutante en este medio produjo una pequeña cantidad de mineral que fue muy difícil de identificar (figura 45). De acuerdo con los microanálisis y la difracción de rayos X parece que podría tratarse estanfieldita $[\text{Ca}_4(\text{Mg,Fe,Mn})(\text{PO}_4)_6]$ y fosforroesslerita $(\text{MgH}(\text{PO}_4) \cdot 7\text{H}_2\text{O})$. No obstante, debido a la pobre definición del difractograma no se puede afirmar taxativamente que se trate de estos minerales. Confirmar su producción sería muy interesante ya que no hemos encontrado en la bibliografía referencias a la producción bacteriana de los mismos. En el caso de la estanfieldita, un mineral muy raro (Nriagu y Moore, 1984) una de las escasas referencias sobre el mismo es la de Bondar y Perelygin (2001). En cuanto a la fosforroesslerita, se ha descrito su presencia en minas abandonadas de la zona de Salzburgo (Nriagu y Moore, 1984). Como se indicó en resultados las morfologías de la figura 45 A podrían corresponder a este mineral.

En los medios CMFe, CMCo y CMMn, hay una producción constante de apatito por ambas cepas. Hidroxilapatito en CMFe y CMMn con ambas cepas; hidroxilapatito y fluoroapatito en CMCo por las cepas 422 y la mutante respectivamente. Parece, por tanto, que la presencia de los metales induce a la formación de este fosfato en todos los casos, aunque haya ciertas diferencias en cuanto al apatito producido. No obstante hay también diferencias en otros minerales encontrados. Así, en el caso de CMFe y CMMn, la cepa 422 produce calcita además del hidroxilapatito, mientras que la cepa mutante sólo produce apatito o hidroxilapatito. El comportamiento en CMCo, por el contrario, es similar para ambas cepas. Las dos producen weddelita junto con el apatito.

Mención aparte merece el comportamiento de la cepa DZF1, progenitora de la cepa mutante DZF1 Δ oar, en el medio CMFe, en el que origina una variedad mayor de minerales: calcita, vaterita y weddelita, además de hidroxilapatito. Comparando las morfologías originadas en este medio por las tres cepas (figuras. 40, 41, 42 y 43) puede verse con especial claridad algo que venimos poniendo de manifiesto a lo largo de esta discusión, y es la pobreza de morfologías originadas por la cepa mutante en relación con la cepa silvestre 422, y este caso además, con su

cepa madre DZF1. Además, la inducción de fases minerales diferentes es clara: mientras las tres cepas originan apatito, las dos cepas silvestres tienen la capacidad de inducir la producción de carbonatos (vaterita y calcita en el caso de la cepa DZF1 y calcita con la cepa 422), habilidad que en este medio ha perdido la cepa mutante.

Como se ha dicho, la producción de apatito en estos medios ocurre habitualmente junto con la de calcita, hecho que suele ser común en sedimentos naturales (Schmittner y Giresse, 1999). La ausencia de magnesio, que está considerado como inhibidor de la formación de apatito, (Simpson, 1966; Martens y Harris, 1970), puede haber sido determinante para que *M. xanthus* promueva su formación en estos medios. Según Berner (1974), la precipitación de apatito sólo, o de calcita y apatito, lo que significa variación del equilibrio fosfato cálcico-carbonato cálcico, depende de numerosos factores tales como el incremento del contenido en fosfato y en fluoruro, el incremento de salinidad y el contenido en carbonato cuyas superficies sirven como agentes de nucleación para la precipitación de fosfato disuelto. Por otra parte, algunos autores han encontrado que la formación de hidroxiapatito estaba mediada por los proteolípidos de las membranas bacterianas (Boyan *et al.*, 1984). Si tenemos en cuenta los resultados aportados en esta Memoria, y puesto que en los controles nunca se detectó esta producción, podemos decir que las condiciones de nuestros ensayos entran dentro del equilibrio requerido para la doble precipitación apatito-calcita, y además, que *M. xanthus* aportaría núcleos de cristalización adecuados, hecho ya indicado por Ben Chekroun, (2000) trabajando con la cepa 422.

Habida cuenta, además, de que diversos autores apuntan hacia la importancia de la actividad de la fosfatasa alcalina para la disponibilidad de fosfato en ambientes naturales y en ensayos de laboratorio (Hirscheler *et al.*, 1990) para la producción de apatito, es interesante destacar que la producción de este mineral ha ocurrido usando en el medio de cultivo levadura sin fosfato añadido. En estas condiciones, la bacteria necesita obtener el fosfato a partir o bien de los ácidos nucleicos o bien de los fosfolípidos de las membranas de la levadura, y por tanto precisa de la función de las fosfatasas.

La pérdida de capacidad de producción de carbonatos por la cepa mutante en el medio CMFe, podría estar relacionada directamente con la mutación que presenta y que por motivos que desconocemos afectaría al aporte de núcleos heterogéneos de cristalización para los mismos en presencia de este metal.

Un fosfito producido por la cepa mutante (figura 41), ha sido brushita ($\text{PO}_4\text{HCa}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$), si bien, habida cuenta de la pobre definición del difractograma, sin descartarlo, conviene afirmarlo con precaución.

Las esferitas producidas por la cepa DZF1 en el medio CMFe (figura 42), tienen una porosidad y una textura con un grado de distribución regular que las hace interesantes desde el punto de vista de la ciencia de los biomateriales. Los resultados referidos en esta Memoria, abren perspectivas en el campo teórico y práctico de la biomineralización, pues su aplicación podrían ser estudios de obtención de minerales biomiméticos. Este es un campo de creciente interés en el que se persigue el mejor control de la síntesis de distintos compuestos inorgánicos. En este mismo medio la cepa 422 da origen a formas de crecimiento fibrosoradiales (figura 40C y D). Si se tiene en cuenta que el poder reflectante de la calcita es mayor que el del apatito podría dar la impresión, viendo el difractograma correspondiente (figura 40), de haber más calcita que apatito, no siendo así, y estas morfologías se deberían posiblemente a apatito.

Otro aspecto interesante a destacar en el caso de la utilización de los medios CM con hierro, cobalto, y manganeso, en que como puede verse en los microanálisis de las figuras 41, 46, 47, y 48, se da la presencia de un pico del metal correspondiente. Esto es importante. De hecho no se ha encontrado la producción de los carbonatos que se trató de encontrar, (Siderita, CO_3Fe ; Esferocobaltita, CO_3Co y Dialogita, CO_3Mn), pero como tantas veces ocurre con la investigación, los resultados obtenidos, negativos en relación al objetivo, son positivos e interesantes en otro sentido. Al margen de lo dicho más arriba, una de las áreas de investigación

de gran interés en estos momentos es la de eliminar metales pesados que contaminan las aguas en muchas circunstancias, y una de las formas de eliminarlos es mediante la precipitación microbiana de carbonatos que capturan es su precipitación a los metales. En este sentido hay un interesante trabajo de Warren *et al.*, (2001) en el que estudiaron la captura de Sr, UO₂ y Cu. En nuestro caso ocurre captura de Fe, Co y Mn por los diferentes minerales producidos: en unos casos por calcita y apatito, y en otros por apatito, como puede verse en las figuras 41, 46, 47, y 48. Estos resultados son de enorme interés y abren un campo de aplicación de los procesos de biomineralización de estas bacterias en la eliminación de metales pesados.

Barita

Especial mención merecen los resultados obtenidos en el medio CMBa. Tanto las morfologías (figura 49A, B y C) como los microanálisis inducen a pensar que se trata de barita (sulfato de bario, SO₄Ba). Los difractogramas de rayos X, debido a la pequeña cantidad de minerales producidos, no han permitido comprobarlo. Por ello se intentó confirmarlo mediante difracción de electrones, con microscopio electrónico de transmisión de alta resolución. Los resultados obtenidos con este microscopio se muestran en las figuras 50, 51 y 52. Al hacer este estudio nos encontramos con la sorpresa de que los dos tipos de morfologías tenían un comportamiento distinto. Las esferitas daban en su microanálisis fundamentalmente fósforo y bario (figura 52 A) mientras que las formas tabulares (más típicas de la morfología de la barita), daban mayor cantidad de azufre (figura 52B). Las difracciones de electrones indican un cierto grado de ordenación (figuras 50, 51 y 52), con agrupaciones cristalinas que se orientan según ciertas direcciones. Estos resultados junto con los demás datos (microanálisis e imágenes en MEB) apoyan la hipótesis de la presencia de barita y, además, de un fosfato de bario, aunque esta afirmación se hace con las debidas reservas en tanto no se disponga de suficiente cantidad de mineral para proceder a la realización de difracción de rayos X.

En este caso, la posible producción de barita parece más clara por el mutante que por la cepa salvaje 422. Estos resultados son de gran interés, porque

DISCUSIÓN

confirmarían mediante experimentos de laboratorio lo que ya se viene afirmando desde hace años referente a la biogénesis de barita en medios acuáticos. Un trabajo de interés en esta línea es el de Finlay *et al.*, (1992).

VI. CONCLUSIONES



1^a. El estudio fenotípico comparativo durante el ciclo vegetativo de la cepa salvaje DZF1 y del mutante DZF1 Δ oar de *Myxococcus xanthus* no ha revelado diferencias significativas en cuanto al crecimiento vegetativo, movilidad, cohesión celular y formación de fibrillas extracelulares.

2^a. Por lo que respecta al ciclo de desarrollo, la cepa mutante DZF1 Δ oar no produce los cuerpos fructificantes típicos de la cepa salvaje, tan sólo un ligero intento de agregados celulares, y muy tardíamente.

3^a. La esporulación de la cepa mutante DZF1 Δ oar se encuentra muy disminuida, pudiendo deberse a la falta de agregación celular que muestra este mutante. Las mixósporas mutantes, además de estar en menor número y no agregarse, presentan la mayoría de ellas una morfología ovoidal, sin revelar ningún tipo de inmadurez, y mostrando el mismo comportamiento durante la germinación que la cepa salvaje.

4^a. Los estudios de complementación celular entre DZF1 y DZF1 Δ oar revelaron que no existe ninguna complementación debida a una señal difusible. Sin embargo, si existía complementación superficial cuando ambas cepas llegaban a estar en contacto directo, de manera que la cepa salvaje se sirve de la mutante para asegurar con éxito su ciclo de desarrollo, ya que la cepa mutante se mantiene siempre como bacilos periféricos sin llegar a formar parte del cuerpo fructificante

5^a. La mutación que presenta la cepa DZF1 Δ oar que conlleva la pérdida de una proteína de membrana de elevado peso molecular, afecta a las características biomineralizadoras de este microorganismo, lo que se pone de manifiesto comparando su comportamiento en este sentido con el de la cepa salvaje 422. La forma en que estas características se ven afectadas dependen marcadamente del medio y de las condiciones de cultivo en que se realicen los ensayos. En unos casos parece ser que el efecto es indirecto, a través de la deficiencia en agregación, lo que a su vez provoca un comportamiento distinto del de la cepa 422 en la forma en que los diversos metabolitos originados por el crecimiento bacteriano difunden al medio de

cultivo. Esto desemboca en que los gradientes de concentración de los mismos y los gradientes de pH derivados de su aporte evolucionan de forma diferente en el caso de una y otra cepa, lo cual influye, de una parte, en el tipo de mineral que precipita y, de otra, en las morfologías que se desarrollan para un mismo mineral.

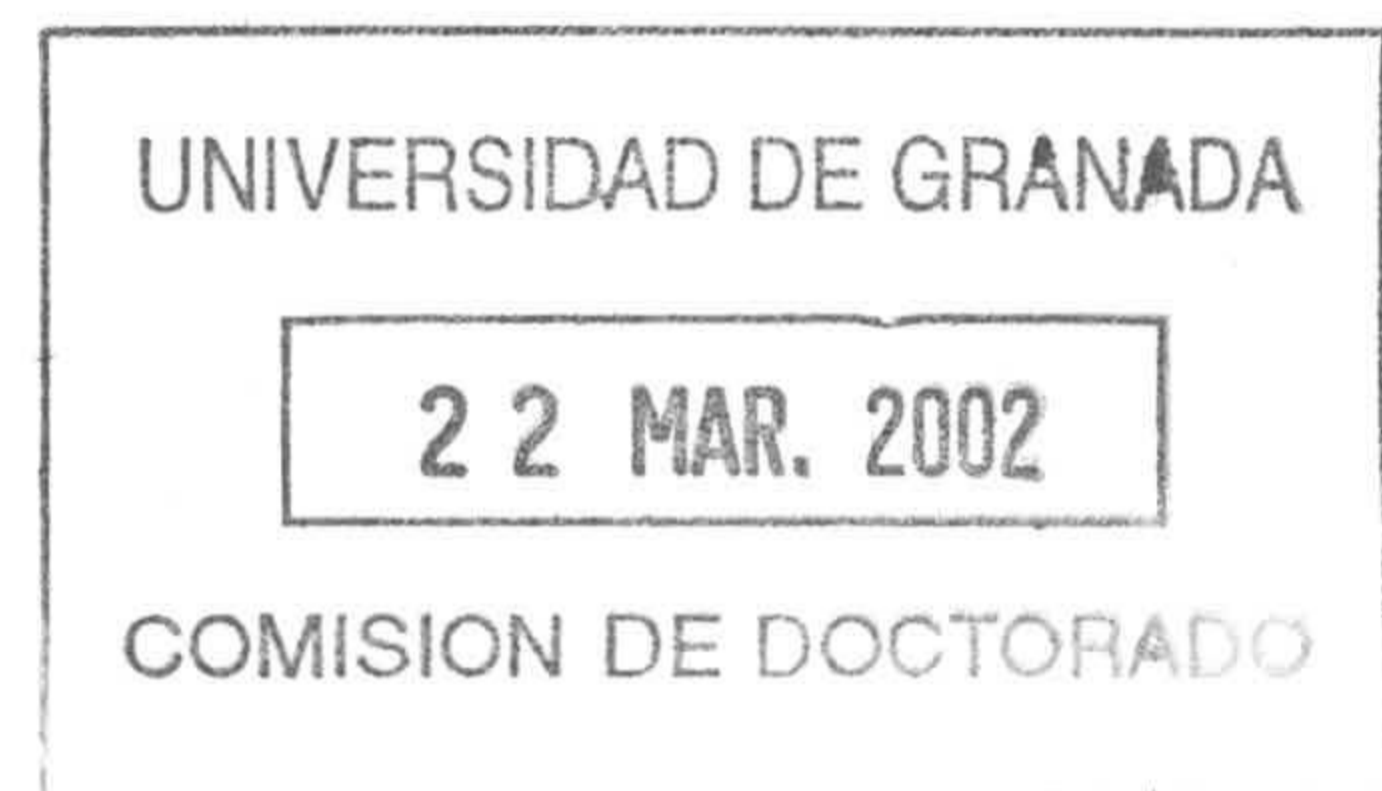
6^a. En el caso del mutante DZF1 Δ *oar* la mutación provoca que los procesos de biomineralización ocurran a mayor velocidad, ocasionando que los minerales originados sean más esqueléticos, más amorfos. El hecho de que la biomineralización ocurra con mayor rapidez supone que el grado de sobresaturación que se alcanza en cada caso sea mayor, lo que en las condiciones de precipitación de carbonatos provoca la formación preferente del polimorfo vaterita.

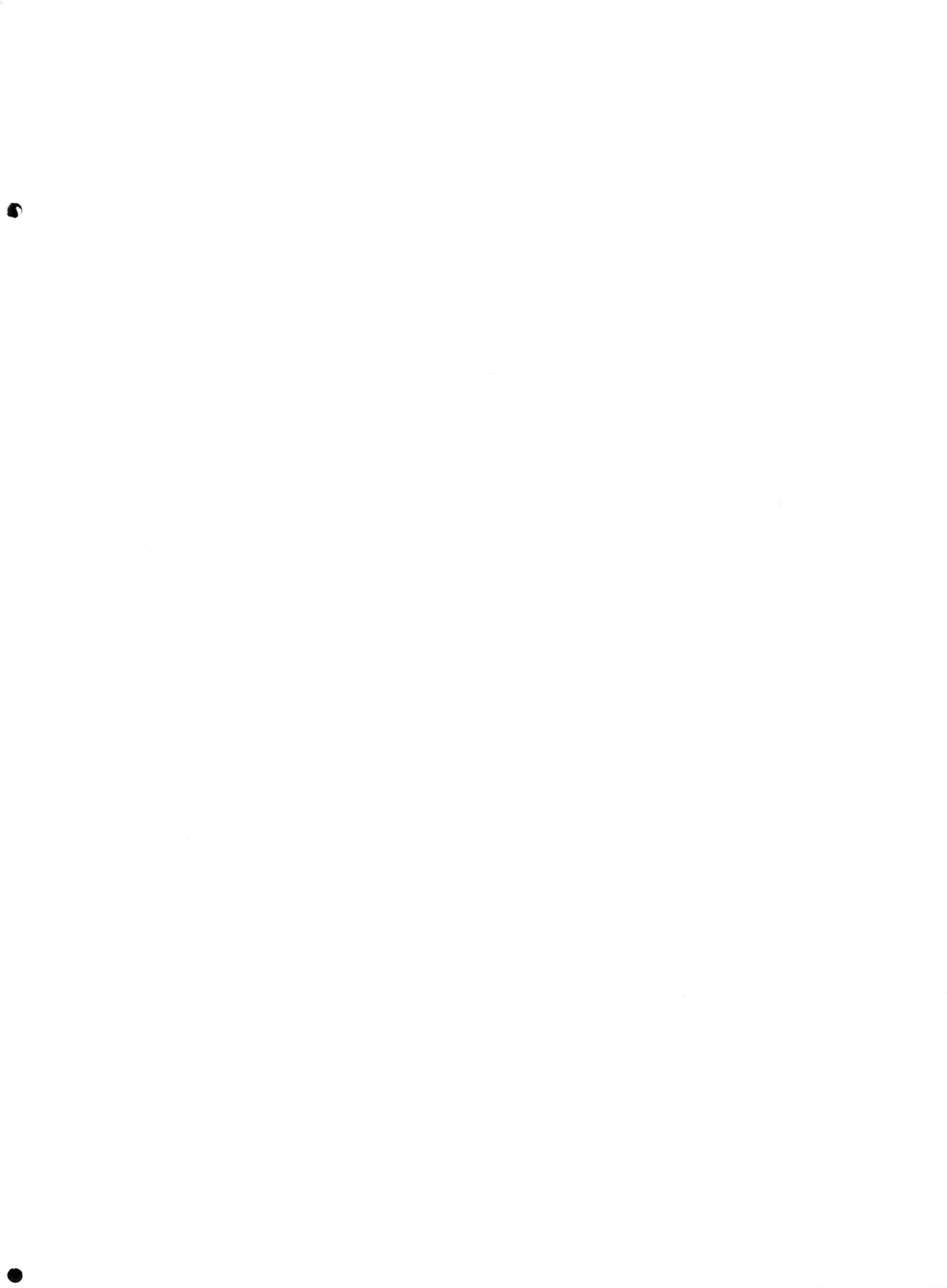
7^a. A diferencia de lo que ocurre con la cepa silvestre 422 y que también se ha observado con la cepa DZF1 en el medio CMFe, con la cepa mutante no se han podido observar formaciones de células calcificadas. Esto puede ser debido a la falta de agregación de la cepa mutante, que evita que se den las condiciones adecuadas de sobresaturación de los diferentes iones necesarios para la producción de carbonatos en el entorno inmediatamente ligado a las envueltas celulares (membrana citoplasmática y pared), y que por el contrario, estas condiciones se dan de forma más rápida en el medio de cultivo de manera generalizada, ocasionando los fenómenos a los que se hace referencia en la conclusión anterior.

8^a. En general, tanto en los diversos medio de cultivo como en las diferentes condiciones ensayadas, la cepa mutante produce menor diversidad de minerales, y en el caso de un mismo mineral, una mayor pobreza de morfologías. Esto podría estar condicionado por los núcleos heterogéneos de cristalización aportados por una y otra cepa, y en los que tendría influencia la ausencia de la proteína de membrana que condiciona la mutación. Si se acepta que en los procesos de cristalización heterogénea debe de existir un reconocimiento molecular, la ausencia de esta proteína podría condicionar el que, según los casos, se dieran o no ciertos minerales, así como el que no se desarrollen determinadas morfologías.

9ª. En los medios de cultivo que llevan como fuente de carbono, nitrógeno y fósforo extracto de levadura y cuentan, además, con la adición de algún metal (hierro, cobalto , manganeso), hay un comportamiento especial de las cepas ensayadas: todas producen algún tipo de apatito, lo que parece indicar que tanto la necesidad de actuación de las fosfatasas bacterianas como la presencia de los metales, condicionan la precipitación de este tipo de fosfato, que en la mayor parte de las veces se ve acompañado de la producción de un carbonato (calcita y vaterita). De otra parte, al producirse estos minerales, secuestran parte de los metales presentes, hecho que es digno de tenerse en cuenta por su potencial utilización para procesos de eliminación de metales pesados en aguas contaminadas por los mismos.

10ª. Es la primera vez que se describe la producción de barita por una mixobacteria. Así mismo es la primera vez en que hay indicios razonables de producción por una bacteria en condiciones de laboratorio de estanfieldita y de fosforroesslerita.





VII. BIBLIOGRAFÍA

Agnihotrudu, V., Barna, G.C.S. y Barna, K.C. 1959. "Ocurrence of *Chondromyces* in the rhizosphere of plants". *Indian Phytopathology* **12**: 158-160.

Arias, J.M. y Montoya, E. 1982. "Influencia de la luz sobre los ciclos de vida de *Myxococcus coralloides* D". *Microbiología española* **35**: 13-20.

Arias, J.M., Fernández-Vivas, A. y Montoya, E. 1983. "Evidence for a activating substance related to autolysis in *Myxococcus coralloides* D". *Arch. Microbiol.* **134**: 164-166.

Arnold, J.W. y Shimkets, L.J. 1988a. "Inhibition of cell-cell interactions in *Myxococcus xanthus* by Congo red". *J. Bacteriol.* **170**: 5765-5770.

Arnold, J.W. y Shimkets, L.J. 1988b. "Cell surface properties correlated with cohesion in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **170**: 5771-5777.

Banfield J.F y Nealson K. H. 1997. Geomicrobiology: Interactions between microbes and minerals. Reviews in Mineralogy. Mineralogical society of America .Vol. **35**.

Beebe, J.M. 1943. "Studies on the myxobacteria. 3. The utilization of carbohydrates". *Iowa State Coll. J. Sci.* **17**: 227-240.

Behlander, R.M. y Dworkin, M. 1991. "Extracellular fibrils and contact-mediated cell interactions in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **173**: 7810-7821.

Ben Chekroun, K. 2000. "Producción de diversos minerales por núcleos heterogéneos de cristalización aportados por *Myxococcus xanthus* y comparación con otros microorganismos". Tesis Doctoral. Universidad de Granada.

Ben Omar, N., Entrena, M., González, M^aT., Arias, J.M. y Huertas, F. 1994. "Effects of pH and Phosphate on the production of struvite by *Myxococcus xanthus*". *Geomicrobiology Journal.* **12**: 81-90

Ben Omar, N., Cañamero, M., González, M^aT., Arias, J.M. y Huertas, F. 1995. "*Myxococcus xanthus* killed cells as inducers of struvite crystallization. Its possible role in the biomineralization processes". *Chemosphere.* **30**:2387-2396.

Ben Omar, N., Entrena, M., González, M^aT., Arias, J.M. y Huertas, F. y Rodríguez-Gallego, M. 1996. "Morphological diversity of struvite crystals produced by *Myxococcus coralloides* and *Myxococcus xanthus*". *Toxicological and Environmental Chemistry, Vol. 53* : 209-217.

Ben Omar, N., Arias, J.M. González, M^aT. 1997. "Extracellular bacterial mineralization within the context of geomicrobiology". Minireview. *Microbiología SEM* **13**: 161-172.

Ben Omar, N., González, M^aT., Arias, J.M. 1998. "Struvite crystallization on *Myxococcus* cells". *Chemosphere.* **36**: 475-481.

Benhamú, C., Arias, J.M. y Montoya, E. 1979. "Efecto de la glucosa sobre el crecimiento de *M. coralloides D*". *Ars pharmaceutica* **3**: 237-246.

Bisalputra, T., Oakley, B.R., Walker, D.C. y Shields, C.M. 1975. "Microtubular complexes in blue-green algae". *Protoplasma* **86**: 19-28.

Blackhart, B.D. y Zusman, D. R. 1985a. "Cloning and complementation analysis of the *frizzy* genes of *Myxococcus xanthus*". *Mol. Gen. Genet.* **198**, 243-254.

Blackhart, B.D. y 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.

Bondar, J.V. y Perelygin, V.P. 2001. "Cosmic history of the Bragin pallasite: evidence from the fission-track analysis. *Radiation Measurements.* **34**:391-396.

Boyan, B.D.; Landis W.J.; Knight, J.; Dereszewski, G.; Zeagler, J.1984. "Microbial hydroxiapatite formation as a model of proteolipid-dependent membrane-mediated calcification. *Scanning Electron Microsc.***4**:1793-1800.

Bretscher, A.P. y Kaiser, D. 1978. "Nutrition of *Myxococcus xanthus*, a fruiting myxobacterium". *J. Bacteriol.* **133**: 763-768.

Brockman, E.R. 1976. "Myxobacters from arid Mexican soils of the Alaskan and Canadian arctic". *J. Bacteriol.* **86**: 605-606.

Brockman, E.R. y Boyd, W.L. 1963. "Myxobacteria from soil of the Alaskan and Canadian arctic". *J. Bacteriol.* **86**: 605-606.

Brown, N.L., Burchard, R.P., Morris D,W., Parish, J.H., Stow, N.D. y Tsopanakis, D. 1976. "Phage and defectives phages of strains of *Myxococcus*". *Arch. Microbiol.* **108**: 271-279.

Buczynski C., Chafetz H.S. 1991. Habit of bacterially induced precipitates of calcium carbonate and the influence of medium viscosity on mineralogy. *J. Sedim. Petrol.* **61**: 226-233.

Burchard, R.P. 1974. "Studies on gliding motility in *Myxococcus xanthus*". *Arch. Microbiol.* **99**: 271-280.

Burchard, A.C., Burchard, R.P. y Kloetzel, J.A. 1977. "Intracellular periodic structures in the gliding bacterium *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **132**: 666-672.

Campos, J.M. y Zusman, D.R. 1975. "Regulation of development in *Myxococcus xanthus*: effect of 3',5' ciclic AMP, ADP and nutrition". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**: 518-522.

Chang, B-Y., Dworkin, M. 1994. Isolated fibrils rescue cohesion and development in the Dsp mutant of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 7190-7196.

Chang, B-Y., Dworkin, M. 1996. Mutants of *Myxococcus xanthus* dsp defective in fibril binding. *J. Bacteriol.* **178**: 697-700.

Chen, H., Keseler, J.M. y Shimkets, L.J. 1990. "Genome size of *Myxococcus xanthus* determined by pulsed-field gel electrophoresis". *J. Bacteriol.* **172**: 4206-4213.

Cheng, Y.L. y Kaiser, D. 1989. "dsg, a gene required for *Myxococcus* development, is necessary for cell viability". *J. Bacteriol.* **171**, 3727-3731.

Cheng, Y.L., Kalman, L.V. y Kaiser, D 1994. "The dsg gene of *Myxococcus xanthus* encodes a protein similar to translation initiation factor IF3". *J. Bacteriol.* **176**, 1427-1433.

Cho, K.Y. y Zusman, D.R. 1999. "AsgD, a new two-component regulator required for A-signalling and nutrient sensing during early development of *Myxococcus xanthus*". *Molecular Microbiology* **34**: 268-281.

Clemans, D.L., Chance, C.M., Dworkin, M. 1991. A development-specific protein in *Myxococcus xanthus* is associated with the extracellular fibrils. *J. Bacteriol.* **173**: 6749-6759.

Cumsky, M.G., Zusman, D.R. 1979. Myxobacterial hemagglutinin: a development-specific lectin of *Myxococcus xanthus*. *PNAS-USA* **76**: 5505-5509.

Cumsky, M.G., Zusman, D.R. 1981. Binding properties of Myxobacterial Hemagglutinin. *The Journal of Biological Chemistry* **256**: 12596-12599.

Dawid, W. 1979. "Vorkommen und verbreitung fruchtkörper-bildender Myxobakterien in Siebengebirge". *Z. Allr. Mikrobiol.* **19**: 705-719.

Dobson, W.J., McCurdy, H.D. y McRae, T.H. 1979. "The function of fimbriae in *Myxococcus xanthus*. II. The role of fimbriae in cell-cell interactions". *Can. J. Microbiol.* **25**: 1359-1372.

Doetsch, R.N. y Hageage, G.J. 1968. "Motility in procariotic organisms: problems, points of view, and perspectives". *Biol. Rev.* **43**: 317-362.

Downard, J., Ramaswamy, S.V. y Kil, K.-S. 1993. "Identification of *esg*, a genetic locus involved in cell-cell signaling during *Myxococcus xanthus* development". *J. Bacteriol.* **175**, 7762-7770.

Downard, J. y Toal, D. 1995. "Branched-chain fatty acids: the case for a novel form of cell-cell signalling during *Myxococcus xanthus* development". *Mol. Microbiol.* **16**, 171-175.

Dunmire, V., Tatar, L.D. y Plamann, L. 1999. "Genetic supresion analysis of an *asfA* missense mutation in *Myxococcus xanthus*" *Microbiology-UK* . 145: 1299-1306.

Dworkin, M. 1962. Nutritional requirements for vegetative growth of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **84**: 250.

Dworkin, M., Gibson, S. 1964. *Science* **146**: 243-244.

Dworkin M. 1972. The Myxobacteria: New directions in studies of procariotic developement. *C.R.C. Crit. Rev. In. Microbiol.* **1**: 435-452.

Dworkin M., Keller K.H., Weisberg D. 1983. Experimental observations consistent with a surface tension model of gliding motility of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **155**: 1367-1371.

Ehrlich H.1990. Geomicrobiology. Segunda Edición. 646 páginas.1°

Elias, M., Murillo, F.J. 1991. Induction of germination in *Myxococcus xanrhus* fruiting body spores. *J. Gen. Microbiol.* **137**: 381-388.

Fárez-Vidal, E., Fernández Vivas, A. y Arias, J.M. 1990. "Amylase programming during the life cycle of *Myxococcus coralloides D*". *J. Appl. Bacteriol.* **69**: 119-124.

Fárez-Vidal, E., Arias, J.M. y Fernández-Vivas, A. 1992. "Production of α -amilase by *Myxococcus coralloides D*". *J. A. Bacteriol.* **73**: 148-156.

Fautz, E., Rosenfelder, G. y Grotjahn, L. 1979. "Iso-branched-2-and3-hydroxy fatty acids as characteristics constituents of some gliding bacteria". *J. Bacteriol.* **140**: 852-858.

Fernández-Vivas, A., Arias, J.M. y Montoya, E. 1983. "Autolysis in *Myxococcus coralloides D*". *FEMS Microbiol. Letters* **20**: 97-101.

Ferris, F.G.; Beveridge, T.J.; Fyfe, W.S. 1986."Iron-silica crystallite nucleation by bacteria in a geothermal sediment.. *Natura*, **320**: 609-611.

Ferris, F.G.; Fyfe, W.S.; Beveridge, T.J. 1987. "Bacteria as nucleation sites for authigenic minerals in a metal-contaminated lake sediment. *Chemical Geology.* **63**: 225-232.

Filer, D., Rosenberg, E. y Kindler, S.H. 1973. "Aspartokinase of *Myxococcus xanthus*: Feedback stimulation by required aminoacids". *J. Bacteriol.* **115**: 745-750.

Finck, G. 1950. "Biologische und stoffwechselphysiologische studien aus *Myxococcaceae*". *Arch. Mikrobiol.* **15**: 358-388.

Findlay, R.H. 1992. "Colonization of freshly deposited barite and silica sediments by marine microorganisms in a laboratory flume flow". *Marine Ecology.***90**: 73-88.

- Geider S., Dussol B., Nitshe S., Veesler S., Berthezene P., Dupuy P., Astier J.P., Biostelle R., Berland Y., Dagorn J.C., Verdier J.M.** 1996. "Calcium-carbonate crystals promote calcium-oxalate crystalization by heterogeneous or epitaxial nucleation- possible involvement in the control of urinary lithogenesis". *Calcified Tissue International* **59**: 33-37.
- Geitler, L.** 1925. "Uber *Polyangyrum parasiticum* n. sp. eine submerse, parasitische *Myxobacteriaceae*". *Arch. Protistenkunde* **50**: 879.
- Gill, J.S. , Dworkin, M.** 1986. "Cell surface antigens during submerged development of *Myxococcus xanthus* examined with monoclonal antibodies". *J. Bacteriol.* **168**: 505-511.
- Gill, J.S. & Dworkin, M.** 1988 . "Isolation of additional monoclonal antibodies directed against cell surface antigens of *Myxococcus xanthus* cells undergoing submerged development". *J. Bacteriol* **170**: 5953-5955.
- Gill, J.S. Jarvis, B.W. y Dworkin, M.** 1987. "Inhibition of development in *Myxococcus xanthus* by monoclonal antibody 1604". *Proc. Natl. Acad.Sci. USA* **84**: 4505-4508.
- Gill, R. E., Karlok, M. y Benton, D.** 1993. *Myxococcus xanthus* encodes an ATP-dependent protease which is required for developmental gene transcription and intercellular signaling." *J. Bacteriol.* **175**, 4538-4544.
- Gollop, R., Inouye, M. e Inouye, S.** 1991. Protein U, a late-developmental spore protein of *Myxococcus xanthus*, is a secretory protein. *J. Bacteriol.* **173**: 3591-3600.
- González, F., Arias, J.M. y Montoya, E.** 1987. "Phosphatases activities in the life cycle of *Myxococcus coralloides D*". *Gen. Microbiol.* **133**: 2327-2332.
- González, F., Muñoz, J., Arias, J.M. y Montoya, E.** 1989. "Polyphosphate and orthophosphates content during the life cycle of *Myxococcus coralloides D*". *FEMS Microbiol. Lett.* **65**: 105-108.
- González, M^aT. Montoya, E., Arias, J.M. y Rodriguez-Gallego, M.** 1992. "An electron-microscope study of crystals generated by a myxobacterium". *Electron microscopy.* Vol.3. EUREM 92.
- González, M^aT. ,Arias, J.M., Montoya, E y Rodriguez-Gallego, M.** 1993."Struvite production by *Myxococcus coralloides D*". *Chemosphere.* **29**:1881-1887.
- González, M^aT., Entrena, M. Ben Omar., N.,Huertas, F., y Arias, J.M.** 1994. "Production of Syngenetic Minerals with struvite by *Myxococcus coralloides D*".*Geomicrobiology Journal.***12**:279-283.

González, M^aT., Ben Omar, N. Cañamero, M. Rodríguez-Gallego, M., Muñoz, Lopez A. y Arias, J.M. 1995. "Struvite and calcite crystallization induced by cellular membranes of *Myxococcus xanthus*". *Journal of Crystal Growth*. **163**:434-439.

González, F., Ben Omar, N., y Arias, J.M. .1996. Biomineralización: revisión de algunos de sus aspectos más destacados. ARS pharmaceutica. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada. Tomo **37**. Núm. 3.

González, M^aT., Ben Chekroun, K., Ben Aboud, A., Arias, J.M. y M. Rodríguez-Gallego, M. 2000. "Bacterially induced Mg-calcite formation: role of Mg²⁺ in development of crystal morphology". *Journal of Sedimentary Research*. **70**:559-564.

Gower L.A., Tirrell D.A. 1998. Calcium-carbonate films and helices grown in solutions of poly (Aspartate). *J. Crystal growth* **191**: 153-160.

Gronewold, A.M., Thomas y Kaiser, D. 2001. "The act operon controls the level and time of C-signal production for *M. xanthus* development". *Molecular microbiology*. **40** (3): 744-756.

Hagen, D.C., Bretscher, A.P. y Kaiser, D. 1978. "Synergism between morphogenetic mutants in *Myxococcus xanthus*" *Dev. Biol.* **64**, 284-296.

Hagen, D.C. y Shimkets, L.J. 1990. "Nucleotide sequence and transcriptional products of the csg locus of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **172**, 15-23.

Halfen, L.N. 1973. "Gliding motility of *Oscillatoria*: ultrastructural and chemical characterization of the fibrillar layer". *J. Phycology* **9**: 248-253.

Halfen, L.N. y Castenholz, R.W. 1971. "Gliding motility in the blue-green alga *Oscillatoria princeps*". *J. Phycology* **7**: 133-145.

Hanlon, W.A., Martínez-Canamero, M., Inouye, M., Inouye, S. 1995. MlpA, a lipoprotein required for normal development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**: 7150-7154.

Hahnenberg, K.M., Shapiro, L. 1987. Identification of a gene cluster involved in flagella basal body biogenesis in *Caulobacter crescentus*. *J. Mol. Biol.* **194**: 91-103.

Harcke, E., Huttermann, A. y 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., Hutterman, A. y Kuhlewin, H. 1972. "Studies on lytic activities of *Chondrococcus coralloides* (*Myxobacterales*) II. Identification of the bacteriolytic enzima as a muramidase". *Arc. Microbiol.* **85**: 6-12.

Hart, B.A. y Zahler, S.A. 1966. "Lytic enzyme produced by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **92**: 1632-1637.

- Hartzell, P. y Kaiser, D.** 1991a. "Function of MglA, a 22-kilodalton protein essential for gliding in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **173**, 7615-7624.
- Hartzell, P. y Kaiser, D.** 1991b. "Upstream gene of the *mgl* operon controls the level of MglA protein in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **173**, 7625-7635.
- Haska, G. y Stahl, S.** 1971. "Variants of *Myxococcus virescens* exhibiting dispersed growth. Growth and production of extracellular enzymes and slime". *Physiol. Plant* **24**: 136-142.
- Haska, G.** 1974. "Extracellular lytic enzymes of *Mixococcus virescens*, IV. Purification and characterization of a D-alanyl-ε-N-lysine endopeptidase". *Physiol. Plant* **31**: 251-256.
- Henrichsen, J.** 1972. "Bacterial surface translocation: a survey and a classification". *Bacterio. Rev.* **36**: 478-503.
- Hirsch, H.J.** 1977. "Bacteriocins from *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*)". *Arch. Microbiol.* **115**: 45-49.
- Hirscheler H., Lucas J., Hubert J.C.** 1990. "Bacterial involvement in apatite genesis". *FEMS Microbiol. Ecol.* **73**: 211-220.
- Hook, L.A.** 1977. "Distribution of mixobacters in aquatics habitats in an alkaline bog". *Appl. Env. Microbiol.* **34**: 333-335.
- Humphrey, B.A., Dickson, M.R. y Marshall, K.C.** 1979. "Physicochemical and in situ observations on the adhesion of gliding bacteria to surfaces". *Arch. Microbiol.* **120**: 231-238.
- Inouye, M., Halegoua, S.** 1980. Secretion and membrane localization of proteins in *Escherichia coli*. *Crit. Rev. Biochem.* **7**: 339-371.
- Inouye, S., M. Y.Hsu, S.Eagle, and M. Inouye.** 1989. Reverse transcriptase associated with the biosynthesis of the branched RNA-linked msDNA in *Myxococcus xanthus*. *Cell* **56**:709-717.
- Irshik, H. y Reichenbach, H.** 1985. "An unusual pattern of carbohydrate utilization in *Coralloccoccus (Myxococcus) coralloides (Myxobacterales)*". *Arch. Microbiol.* **142**: 40-44.
- Jahn, E.** 1924. "Beiträge zur Botanischen Protistologie. I. Die. Polyangiden". Gebr. Borntraeger. Leipzig. p. 107.
- Jeffers, E.E.** 1964. "Myxobacters of a freshwater lake and its environs". *Int. Bull. Bacterial Nomenclature Taxonomy* **14**: 115-136.

Jelsbak, L. y Sogaardandersen, L. 1999. The cell surface-associated intercellular C-signal induces behavioral changes in individual *Myxococcus xanthus* cells during fruiting body morphogenesis". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**: 5031-5036.

Kaiser, D. 1979. "Social gliding is correlated with the presence of pili in *Myxococcus xanthus*". *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5952-5956.

Kaiser, D., Manoil, C. y Dworkin, M. 1979. "Myxobacteria: cell interactions, genetic and development". *Ann. Rev. Microbiol.* **33**: 595-639.

Kalman, L. V., Cheng, Y. L. y Kaiser, D. 1994. "The *Myxococcus xanthus* *dsg* gene product performs functions of translation initiation factor IF3 in vivo". *J. Bacteriol.* **176**: 1434-1442.

Katsifaras, A. y Spanos, N. 1999. "Effect of inorganic phosphate ions on the spontaneous precipitation of vaterita and on the transformation of vaterita to calcite". *J. Growth* **204**: 183-190.

Katz, W. y Stominger, 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.

Katznelson, H.K., Gillespie, D.C. y Cook, F.D. 1964. "Studies on the relationships between nematodes and other soil microorganisms. III. Lytic action of soil myxobacters on certain species of nematodes". *Can. J. Microbiol.* **10**: 699-704.

Keller, K.H., Grady, M. y Dworkin, M. 1983. "Surface tension gradients: Feasible model for gliding motility in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **155**: 1358-1366.

Kim, S.K. y Kaiser, D. 1990a. "C-factor: a cell-cell signaling protein required for fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*". *Cell* **61**, 19-26.

Kim, S.K. y Kaiser, D. 1990b. "Cell alignment required in differentiation of *Myxococcus xanthus*". *Science* **249**, 926-928.

Kim, S.K. y Kaiser, D. 1990c. "Cell motility is required for the transmission of C-factor, an intercellular signal that coordinates fruiting body morphogenesis of *Myxococcus xanthus*". *Genes. Dev.* **4**, 896-905.

Kleinig, H., Reichenbach, H. y Achenbach, H. 1970. "Carotenoid pigments of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales). II. Acylated carotenoid glucosides". *Arch. Mikrobiol.* **74**: 223-234.

Kralj, D. y Vdovic, N. 2000. "The influence of some naturally occurring minerals on the precipitation of calcium carbonate polymorphs". *Wat. Res.* **34**:179-184.

Kropp J., Block A., von Bloh W., Klenke T., Schellhuber H.J. 1997. Multifractal characterization of microbially induced magnesian calcite formation in recent tidal flat sediments. *Sedim. Geol.* **109**: 37-51.

- Kroos, L., Kaiser, D.** 1984. Construction of Tn5 *lac*, a transposon that fuses *lacZ* expression to exogenous promoters, and its introduction into *Myxococcus xanthus* PNAS-USA **81**: 5816-5820.
- Kruse, T., Lobendanz, S., Berthelsen, N.M.S., Søgaard-Andersen, L.** 2001. C-signal: a cell surface-associated morphogen that induces and co-ordinates multicellular fruiting body morphogenesis and sporulation in *Myxococcus xanthus*. Mol. Microbiol. **40**: 156-168.
- Krzemieniewska, H y Krzemieniewski, S.** 1927a. "Über die verbreitung der Myxobakterien in Boden". Acta Soc. Bot. Pol. **5**: 102-139
- Krzemieniewska, H. y Krzemieniewski, S.** 1927b. "Die Myxobakterien von Polen, Anhang". Acta. Soc. Bot. Pol. **5**: 102-139.
- Kühlwein H.** 1950. Zur Systematik und Verbreitung der Myxobakterien. Zentralbl. Bakteriol. Abt. **113**: 480-490.
- Kühlwein, H.** 1960. "Zur Systematik und Verbreitung der Myxobakterien". Zentralbl. Bakteriol. Abt. 2 **113**: 480-490.
- Kuspa, A., Plamann, L. y Kaiser, D.** 1992a. "Identification of heat stable A-factor from *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **174**, 3319-3326.
- Kuspa, A., Plamann, L., Kaiser, D.** 1992b. A-signalling and the cell density requirement for *Myxococcus xanthus* development. *J. Bacteriol* **174**: 7360-7369.
- LaRossa, R., Kuner, J., Hagen, D., Manoil, C. y Kaiser, D.** 1983. "Developmental cell interactions of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants". *J. Bacteriol.* **153**: 1394-1404.
- Loebeck, M.E. y Klein, H.P.** 1956. "Substrates for *Myxococcus virescens* with special reference to eubacterial fractions". *J. Gen. Microbiol.* **14**: 281-289.
- McCleary, W., Esmon, B., Zusman** 1991. Protein C is a major spore surface protein from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**: 2141-2145.
- McCurdy, H.D.** 1969. "Studies on the taxonomy of the *Myxobacterales*". I. Record of Canadian isolates and survey of methods. *Can. J. Microbiol.* **15**: 1453-1461.
- McCurdy, H.D. y MacRae, T.M.** 1974. "Xanthacin, a bacteriocin of *Myxococcus xanthus* fb". *Can. J. Microbiol.* **20**: 131-135.
- MacRae, T.H. y McCurdy, H.D.** 1975. "Ultrastructural studies of *Chondromyces crocatus* vegetative cells". *Can. J. Microbiol.* **21**: 1815-1826.

MacRae, T.H. y McCurdy, H.D. 1976. "The isolation and characterization of gliding motility mutants in *Myxococcus xanthus*". *Can. J. Microbiol.* **22**: 1282-1292.

Mann S., Heywood B.R., Rajam S., Birchall J.D. 1988. "Controlled crystallization of CaCO₃ under stearic acid monolayers". *Nature.* **334**: 692-695.

Manoil, C. y Kaiser, D. 1980a. "Accumulation of guanosine tetraphosphate and guanosine pentaphosphate in *Myxococcus xanthus* during starvation and mixospore formation". *J. Bacteriol.* **141**: 297-304.

Manoil, C. y Kaiser, D. 1980b. "Guanosine pentaphosphate and guanosine tetraphosphate accumulation and induction of *Myxococcus xanthus* fruiting body development". *J. Bacteriol.* **141**: 305-315.

Manoil, C. y Kaiser, D. 1980c. "Purine-containing compounds, including cyclic adenosine 3' 5'-monophosphate, induced fruiting of *Myxococcus xanthus* by nutritional imbalance". *J. Bacteriol.* **141**: 374-377.

Martens C.S., Harris R. 1970. "Inhibition of apatite precipitation in the marine environment by magnesium ions". *Geochim. Cosmochim. Acta* **34**: 621-625.

Martinez-Canamero, M., Muñoz-Dorado, J., Farez-Vidal, E., Inouye, M., Inouye, S. (1993). Oar, a 115-kilodalton membrane protein required for development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **175**: 4756-4763.

Mason, O.J. y Powelson, D. 1958. "Lysis of *Myxococcus xanthus*". *J. Gen. Microbiol.* **19**: 65-70.

Mayer, H. y Reichenbach, H. 1978. "Restriction endonucleases: General survey procedure and survey of gliding bacteria". *J. Bacteriol.* **136**: 708-713.

Motley, ST., Lory S. . 1999. " Functional characterization of a serine/threonine protein kinase of *Pseudomonas aeruginosa*". *Infect Immun.* **67**(10):5386-94.

Muñoz, J., Arias, J.M. y Montoya, E. 1984. "Production and properties of a bacteriocin from *Myxococcus coralloides D*". *J. Appl. Bacteriol.* **57**: 69-74.

Muñoz, J., González, F., Martínez-Cañamero, M.M., Goicoechea, A.M., Extremera, A.L. y Arias, J.M. 1989. "Deoxyribonuclease and phosphatase activity in myxobacteria". *Microbios* **58**: 43-47.

Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. e Inouye, M. 1990 a. "Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*: I. Cloning and sequencing of the gene". *J. Biol.Chem.* **265**, 2702-2706.

- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. e Inouye, M.** 1990 b. "Nucleoside diphosphate kinase from *Myxococcus xanthus*: II. Biochemical characterization". *J. Biol.Chem.* **265**, 2707-2712.
- Muñoz-Dorado, J., Inouye, S. y Inouye, M.** 1991. "A gene encoding a protein serine/threonine kinase is required for normal development of *Myxococcus xanthus*, a gram-negative bacterium". *Cell* **67**:995-1006.
- Nicaud, J.M., Breton, A., Younes, G. y 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.
- Noren, B.** 1952. "Further notes on the distribution of myxobacteria in swedish soils". *Su. Bot. Tidskr.* **46**: 446-453.
- Noren, B.** 1955. "Studies on myxobacteria. III. Organic factors in nutrition". *Startryck Bot. Notiser.* **108**: 81-134.
- Nriagu, J.O. y Moore, P.B.,** 1984. "Phosphate minerals, springer- Verlag, Berlín".
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R.** 1989. Patterns of Cellular Interactions during Fruiting-Body formation in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **171**: 6013-6024.
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R.** 1991. Development in *Myxococcus xanthus* involves differentiation into two cell types, peripheral rods and spores. *J. Bacteriol.* **173**: 3318-3333.
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R.** 1991. Analysis of *Myxococcus xanthus* cell types by two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Bacteriol.* **173**: 3334-3341.
- O'Connor, K.A. y Zusman, D.R.** 1991. Behavior of peripheral rods and their role in the life cycle of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **173**: 3342-3355.
- Orndorff, P.E. y Dworkin, M.** 1980. "Separation and proprieties 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.
- Otani, M., Inouye, M., Inouye, S.** 1995. Germination of Myxospores from the fruiting bodies of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **177**: 4261-4265.
- Oyaizu, H. y Woese C.R.** 1985. "Phylogenetic relationships among the sulfate respiring bacteria, myxobacteria and purple bacteria". *Syst. Appl. Microbiol.* **6**: 257-263.

Passador, L. y McCurdy, H.D. 1985. "Cyclic nucleotides and development of *Myxococcus xanthus*: analysis of mutants". *Curr. Microbiol.* **12**: 289-297.

Perito, B., Biaaggiotti, L., Daly, S., Galizzi, A., Tiano, P. y Mastromei, G. 2000. "Bacterial genes involved in calcite crystal precipitation". In: *Of Microbes and Art. The role of microbial communities in the degradation and Protection of Cultural Heritage* Editado por Ciferri, O., Tiano, P., y Mastromei, G. Kluwer Academic. Plenum Publishers. pp :219-230.

Peterson, J.E. 1959. "New species of myxobacteria from the bark of living trees". *Mycologia* **51**: 163-172.

Plamann, L., Kuspa, A. y Kaiser, D. 1992. "Proteins that rescue A-signal defective mutants of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **174**, 3311-3318.

Prieto M., Putnis A., Fernández-Díaz L. 1990. "Factors controlling the kinetics of crystallization: supersaturation evolution in a porous medium. Application to barite crystallization". *Geological Magazine* **127**: 485-495.

Prieto M., Putnis A., Fernández-Díaz L., López-Ándres S. 1994. "Metastability in diffusing- reacting systems". *J. Crystal Growth* **142**: 225-235.

Putnis A., Prieto M., Fernández-Díaz L. 1995. "Fluid supersaturation and crystallization in porous media". *Geological Magazine* **132**: 1-13

Qualls, G.T. y White, D. 1982. "Development cell cohesion in *Stigmatella aurantiaca*". *Arch. Microbiol.* **131**: 334-337.

Reichenbach, H. 1984. "Myxobacteria: a most peculiar group of social prokaryotes". En *Myxobacteria: Development and cell interactions* (Rosenberg, E. ed.). Springer-Verlag, New York.

Reichenbach, H. 1986. "The myxobacteria: common organisms with an uncommon behavior". *Microbiol. Sci.* **3**: 268-274.

Reichenbach, H. 1993. "Biology of the Myxobacteria: Ecology and Taxonomy": In *Myxobacteria II*. Ed. Dworkin, M. and Kaiser, D. Ann. Soc. Microbiol. Washington, D.C.

Reichenbach, H. y Dworkin, M. 1969. "Studies on *Stigmatella aurantiaca* (*Myxobacterales*)". *J. Gen. Microbiol.* **58**: 3-14.

Reichenbach, H. y Kleinig, H. 1971. "The carotenoids of *Myxococcus fulvus* (*Myxobacterales*)". *Arch. Mikrobiol.* **76**: 364-380.

Ridgeway, H.F. y Laewin, R.A. 1973. "Globletshaped subunits from the wall of a marine gliding microbe". *J. Gen. Microbiol.* **79**: 119-128.

Rivadeneira M.A., González López, J., Ramos-Cormenzana, A. 1985a. Influence of ammonium ions on calcite and struvite formation by *Azotobacter* in chemically defined media. *Folia microbiol.* **30**: 55-57.

Rivadeneira, M.A., Pérez-García, I., Salmerón, V., Ramos-Cormenzana, A. 1985 b. Bacterial precipitation of calcium carbonate in presence of phosphate. *Soil. Biol. Biochem.* **17**: 171-172.

Rivadeneira M.A., Delgado R., Quesada E., Ramos-Cormenzana A. 1991. Precipitation of calcium carbonate by *Deleya halophila* in media containing NaCl as sole salt. *Curr. Microbiol.* **22**: 185-190.

Rivadeneira, M.A., Pérez-García., Ramos-Cormenzana. A. 1993. The effect of incubation temperature on struvite formation by bacteria. *Folia Microbiol.* **38**: 5-9.

Rivadeneira M.A., Delgado G., Ramos-Cormenzana A., Delgado R. 1997. Precipitation of carbonates by *Deleya halophila* in liquid media: pedological implications in saline soils. *Arid Soil Research and Rehabilitation* **11**: 35-47.

Romeo, J. M. y Zusman, D.R. 1987. Cloning of the gene for myxobacterial hemagglutinin and isolation and Analysis of structural gene mutations. *J. Bacteriol.* **169**: 3801-3808.

Rosenberg, E., Filer, D., Zafriti, D. y Kindler, S.M. 1973. "Aspartokinase activity and the development cycle of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **115**: 29-34.

Rosenberg, E. y Varon, M. 1984. "Antibiotics and lytic enzymes". En: *Myxobacteria: Development and cell interactions* (Rosenberg, E. ed.) Springer-Verlag, New York.

Rosenbluh, A., Rosenberg, E. 1989. Sporulation of *Myxococcus xanthus* in liquid shake flask cultures *J. Bacteriol.* **171**: 4521-4524.

Rosenfelder, G., Luderitz, O. y Wetsphal, O. 1974. "Composition of lipopolysacharides from *Myxococcus fulvus* and other fruiting and no-fruiting myxobacteria". *Eur. J. Biochem.* **44**: 411-420.

Rosenbluh, A. y Eisenbach, M. 1992. "The effect of mechanical removal of pili on gliding motility in *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **174**: 5406-5413.

Rückert, G. 1973. "Biogeographische Untersuchungen über die Verbreitung Fruchtkörperbildender Myxobakterien in Island". *Acta Bot.* **2**:56-63

Rückert, G. 1978. "Myxobakterien in substraten aus ariden gebieten unter besonderer berucksichtigung Südwestafrikas". *Namib und Meer* **8**: 53-66.

- Rückert, G.** 1979. "Myxobakterien-artenspektren von böden in abhängigkeit von bodenbildenden faktoren unter besonderer berücksichtigungder bodenreaktion". Z. Pflanzenernährung Bodenkunde **142**: 330-343.
- Ruiz-Rodríguez, C.** 1980. "Enzimas lipásicos de *Myxococcus xanthus* MD4". Memoria de licenciatura. Facultad de Farmacia. Universidad de Granada.
- Sabados-Sarié, A.** 1957. "Istrazivanja o miksobakterijama u thina Jugoslavije (Myxobacteria in different types of soils in Yugoslavia)". Jugos. Akademija Znanosti Umjetnosti. Zagreb **312**: 5-29.
- Salser, W.** 1977 Globin mRNA sequences: analysis of base pairing and evolutionary implication. Cold Spring Harbor. Symp. Quant. Biol. **13**: 985-1002.
- Schmid-Lorenz, W. y Kuhlwein, H.** 1968. "Intracelluläre Bewegungsorganellen der Myxobakterien". *Arch. Microbiol.* **60**: 95-98.
- Schmittlner K.E., Giresse P.** 1999. "Micro-environmental controls on biomineralization: superficial processes of apatite and calcite precipitation in Quaternary soils, Roussillon, France". *Sedimentology* **46**: 463-476.
- Schröder, J. y Reichenbach, H.** 1970. "The fatty acid composition of vegetative cells and myxospores of *Stigmatella aurantiaca* (Myxobacterales)". *Erch. Mikrobiol.* **71**: 384-390.
- Shabtai, Y., Rosenberg, E. y Kindler, S.H.** 1975. "Aspartokinase isoenzymes of the fruiting myxobacterium *Myxococcus xanthus*". *Biochem Biophys. Acta* **403**: 345-354.
- Shimkets, L.J.** 1984. Nutrition, metabolism and the initiation of development. En: Myxobacteria: Development and cell interactions. (Rosenberg, E. ed.). Springer-Verlag. New York..
- Shimkets, L.J.** 1986. Role of cell cohesion in *Myxococcus xanthus* fruiting body formation. *J. Bacteriol.* **166**: 842-848.
- Shimkets L.J.** 1990. Social and developmental biology of the myxobacteria. *Microbiol. Rev.* **54**: 473-501.
- Shimkets, L.J.** 1999. Intercellular signaling during fruiting-body development of *Myxococcus xanthus*. *Ann. Rev. Microbiol.* **53**: 525-549.
- Shimkets L.J., Dworkin M.** 1981. Excreted adenosine is a cell density signal for the theinitiation of fruiting body formation in *Myxococcus xanthus*. *Dev. Biol.* **84**: 51-60.
- Shimkets, L.J., Kaiser, D.** 1982 a. Murein components rescue developmental sporulation of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **152**: 462-470.

- Shimkets, L.J., Kaiser, D.** 1982 b. Induction of coordinate cell movement in *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **152**: 451-461.
- Shimkets L.J., Woese C.** 1992. A phylogenetic analysis of the myxobacteria: basis of their clasification. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **89**: 9459-9463.
- Silver, S.; Toth, K.; Scribner, H.** 1975."Facilitated transport of calcium by cells and subcellular membranes of *Bacillus subtilis* and *Escherichia coli*". *J. of Bacteriology.* **12**: 880-885.
- Simpson D.R.** 1966. Effects of magnesium on the formation of apatite. *Amer. Min* **51**: 205-209.
- Singh, B.N.** 1947. "Myxobacteria in soils and composts; their distribution, number and lytic action on bacteria". *J. Gen. Microbiol.* **1**: 1-10.
- Singh, B.N. y Singh, N.B.** 1971. "Distribution of fruiting myxobacteria in Indian soils bark of trees and dung of herbivorous animals". *Indian J. Microbiol.* **11**: 47-92.
- Stephens, K. y Kaiser, D.** 1987 "Genetics of gliding motility in *Myxococcus xanthus*: molecular cloning of the *mgl* locus". *Mol. Gen. Genet.* **207**, 256-266.
- Spormann, A.M. y Kaiser, D.** 1999. "Gliding mutantnts of *Myxococcus xanthus* with high reversal frecuencies and small displacements". *J. Bacteriol.* **181**: 2593-2601.
- Stephens, K., Hartzell, P. y Kaiser, D.** 1989. "Gliding motility in *Myxococcus xanthus*: *mgl* locus, RNA, and predicted protein products". *J. Bacteriol.* **171**, 819-830.
- Solntseva, L.I.** 1940. "La biología de las mixobacterias. I. *Mixococcus*". *Mikrobiologiya* **9**: 217-231.
- Solntseva, L.I.** 1941. "La biología de las mixobacterias. II. Géneros *Mellitangium* y *Chondromyces*". *Mikrobiologiya* **10**: 505-512.
- Spanos, N. y Koutsoukos, P.G.** 1998. "Kinetics of precipitation of calcium-carbonate in alkaline pH at constant supersaturation - spontaneous and seeded growth". *J. of physical chem.* **102**: 6679-6684.
- Spormann, A.M., Kaiser, D.** 1999. Gliding mutantnts of *Myxococcus xanthus* with high reversal frecuencies and small displacements. *J. Bacteriol.* **181**: 2593-2601.
- Stocks-Fisher, S. ; Galinat, J.K, Bang, S.S.** 1999. "Microbiological precipitation of CaCO₃" *Soil and Biochemistry*, **31**: 1563-1571.
- Sudo, S.Z. y Dworkin, M.** 1972. "Bacteriolytic enzymes produced by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **110**: 236-245.

Sun, H.; Zusman, R. y Shi, W. 2000. Type IV pilus of *Myxococcus xanthus* is a motility apparatus controlled by the *frz* chemosensory system. *Current microbiology* 10: 1143-1146.

Sutherland, I.W. 1979. "Polysaccharides produced by *Cystobacter*, *Archangium*, *Sorangium* and *Stigmatella* species". *J. Gen. Microbiol.* 74: 259-266.

Sutherland, I.W. y Smith, M.L. 1973. "The lipopolysaccharides of fruiting and non-fruiting myxobacteria". *J. Gen. Microbiol.* 74: 259-266.

Stumm, W.; Morgan, J.J. 1981. "Aquatic Chemistry. John Wiley, New York.

Svehla, G. 1979. "Vogel's Qualitative Inorganic Analysis". 6th ed. John Wiley, New York.

Teintze, M., Thomas, R., Furuichi, T., Inouye, M. y Inouye, S. 1985. Two homologous genes coding for spore-specific proteins are expressed at different times during development of *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* 163: 121-125.

Tiano, P.; Biagiotti, L. y Mastromei, G. 1999. "Bacterial bio-mediated calcite precipitation for monumental stones conservation: methods of evaluation". *J. of Microbiological Methods.* 36: 139-145.

Till M. 1982. Das vorkommen von Myxobakterien im darminhalt von fischen. pp. 84-86. 23. Arbeitstagung des IAD, Vienna.

Tipper, D.J., Stominger, J.L. y 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.

Toal, D. R., Clifton, S. W., Roe, B. A., y Downard, J. 1995. The *esg* locus of *Myxococcus xanthus* encodes the E1 α and E1 β subunits of a branched-chain keto acid dehydrogenase". *Mol. Microbiol.* 16, 177-189.

Tsai, T.S., Whitaker, D.R., Jurasek, K. y Gillespie, D.C. 1965. "Lytic enzymes of *Sorangium sp.* Action of the α and β -lytic proteases on two bacterial mucopeptides". *Ca. J. Biochem.* 43: 1971-1983.

Umbaguer, H.E. 1978. "Aminoacid biosynthesis and its regulation". *Annu. Rev. Biochem.* 47: 533-606.

Wall, D. y Kaiser, D. 1999. "Type IV pili and cell motility". *Mol. Microbiol.* 32: 1-10.

Ware, J.C. y Dworkin, M. 1973. "Fatty acids of *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* 115: 253-261.

Warren, L.A.; Maurice, P.A.; Parmar, N. y Ferris, F.G. 2001. "Microbially mediated calcium carbonate precipitation: Implications for interpreting calcite

precipitation and for solid-phase capture of inorganic contaminants". *Geomicrobiology Journal*. **18**: 93-115.

Wireman, J.W. y Dworkin, M. 1975. "Morphogenesis and developmental interactions in myxobacteria". *Science* **189**: 516-523.

Wireman, J.W. y Dworkin, M. 1977. "Developmentally induced autolysis during fruiting body formation by *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **129**: 796-802.

White, D. Dworkin, M. y Tipper, D.J. 1968. "Peptidoglycan of *Myxococcus xanthus*: structure and relation to morphogenesis". *J. Bacteriol.* **95**: 2186-2197.

Xyla, A.G., Koutsoukos, P.G. 1987. "Effect of diphosphonates on the precipitation of calcium carbonate in aqueous solutions". *J. Chem Soc. Fard. Trans. I.* **183**: 1477-1484.

Yang, C. y Kaplan H.B. 1997. "Myxococcus xanthus *sasS* encodes a sensor histidine kinase required for early developmental gene expression". *J. Bacteriol.* **179**: 7759-7767.

Yee, T. e Inouye, M. 1984. "Genome of *Myxococcus xanthus*". En: "Myxobacteria": Development and cell interactions (Rosenberg, E. ed.) Springer-Verlag. New York.

Zhang, W., Muñoz-Dorado, J., Inouye, M. e Inouye, S. 1992. "Identificación de a putative eukaryotic-like protein kinase family in the developmental bacterium *Myxococcus xanthus*". *J. Bacteriol.* **174**, 5450-5453.

Zusman D.R. 1984. Developmental program of *Myxococcus xanthus*. En : Myxobacteria: Developmental and Cell Interactions (Rosenberg, E.ed) Springer-Verlag. New York.



Biblioteca Universitaria de Granada



01053039