

LA ESPORULACION BACTERIANAI. LA ESPORULACION COMO MODELO DE DIFERENCIACION CELULAR

J. Edgardo Escamilla Marván
Depto. de Bioquímica
Facultad de Medicina e
Instituto de Biología
U N A M

Introducción

El rápido avance reciente en la genética, bioquímica y biología molecular ha dependido en gran parte del uso de microorganismos como sistemas experimentales. Evolutivamente se presume que solo un tipo celular ancestral, el mejor adaptado, aquel con mayor capacidad de supervivencia, dió origen a todas las especies existentes, así los mecanismos básicos como: la codificación, transcripción, traducción y los caminos centrales del metabolismo son extraordinariamente similares, aunque existen caminos y enzimas alternativos lo que conduce a cierta variación entre las especies.

Con respecto a la diferenciación celular, tal concepto unificado no es usualmente expresado, quizás debido a que los tejidos diferenciados de distintos órganos lucen tan diferentes. Indudablemente que las etapas finales de la diferenciación para formar tejidos altamente especializados, requieren de reacciones enzimáticas muy específicas las cuales se encuentran solo en tipos celulares particulares. Sin embargo es posible que las características esenciales de las reacciones iniciales que convierten células en crecimiento a células diferenciadas, pudieran ser bastante similares en micro y macroorganismos.

Después de la fertilización del huevo, 2 tipos de desarrollo son esenciales.

(i) Determinación:

En diferentes tiempos, diferentes grupos celulares se desarrollan a tipos

determinados. Las células determinadas no exhiben cambio estructural o funcional y continúan multiplicándose, sin embargo, ellas retienen su estado determinado indefinidamente. La célula determinada tiene un potencial restringido en su diferenciación ulterior y en el caso extremo, solo se podrán desarrollar hacia un solo tipo celular.

(ii) Compromiso:

En un momento dado, las células determinadas llevan a cabo la última división y quedan comprometidas a terminar la secuencia de eventos que las llevará a diferenciarse en un tejido especializado.

Mientras que el proceso de determinación no es usualmente observado en plantas y microorganismos (4), el compromiso es observado en todos los sistemas de diferenciación.

Aunque diferentes microorganismos se diferencian hacia formas latentes muy distintas, todas finalmente, están diseñadas para brindar protección al protoplasma de condiciones ambientales adversas. El estímulo para su diferenciación es similar, por ejemplo, la deficiencia de nutrientes de rápida utilización.

No se sabe de que manera las células de organismos superiores quedan comprometidas e inician la secuencia de eventos que las llevan a diferenciarse, sin embargo es posible que cambios en el estado nutricional de la célula probablemente provocados por sustancias tipo hormona restrinjan sus capacidades metabólicas.

Los Microorganismos como Modelo de Diferenciación:

Desde el punto de vista experimental, la utilización de microorganismos como modelo de diferenciación tiene varias ventajas:

- a). Se les puede cultivar en medios relativamente simples de composición conocida.
- b). Bajo condiciones especiales es posible inducir la morfogénesis de una manera sincrónica y con un rendimiento mayor al 90% de la población.
- c). No hay, o cuando menos no se ha demostrado que exista interacción célula-célula.
- d). Se pueden obtener cantidades en exceso para el análisis morfológico, bioquímico y fisiológico.
- e). Es posible obtener mutantes en diferentes estados del desarrollo y así manipular la información necesaria para el proceso morfogenético.

Las características anteriores se cumplen íntegramente cuando menos para el caso de la esporulación bacteriana, problema en el que nuestro grupo de trabajo está interesado directamente y del que se hablará exclusivamente a continuación.

La Esporogénesis Bacteriana:

La esporulación bacteriana se lleva a cabo en bacterias gram positivo de los generos bacilares Bacillus y Clostridium y los cocos del género Sporosarcina, en ambos casos se presenta como un fenómeno adaptativo en respuesta al agotamiento de la fuente de carbono de utilización rápida, la fuente de nitrógeno y en algunos casos la fuente de fosfato (9).

Cambios morfológicos asociados a la Esporogénesis:

El proceso se lleva a cabo bajo condiciones óptimas, en 8 a 10 horas. La secuencia de eventos morfogenéticos ha sido dividida por Fitz-James en 7 estados. Como se muestra en la figura 1, el proceso se inicia con el arreglo del DNA - en un filamento axial de cromatina, parte del cual será destinado a la espora. En el estado II se invagina la membrana formando el septo esporangial, el cual

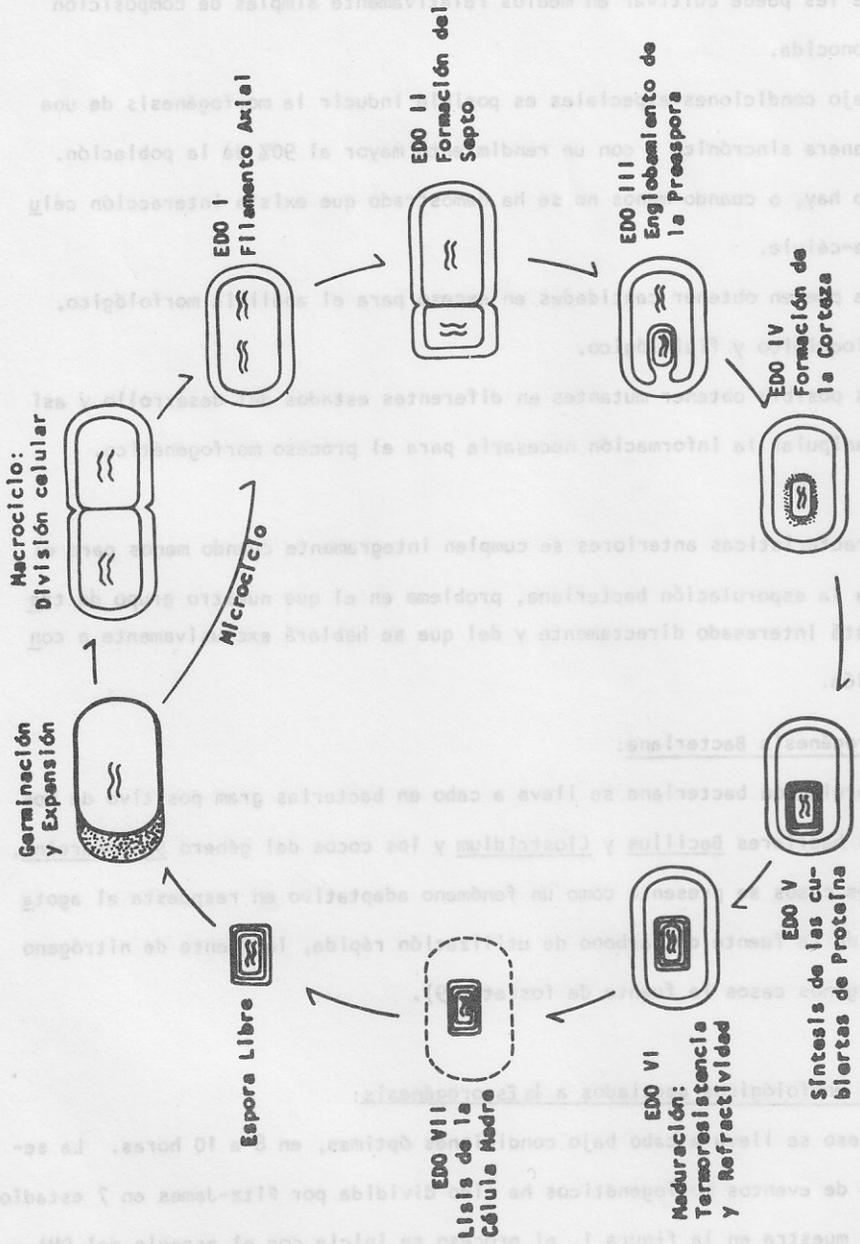


FIGURA 1. Ciclo de vida de bacterias esporulantes y sus estados morfológicos. (tomado de A. Kornberg et al, 1968).

se localiza asimétricamente dando lugar a 2 compartimentos: el grande, la célula madre y el chico, la pre-espora. De la misma manera el DNA es compartimentalizado. En el estado III el continuado crecimiento de la membrana de la célula madre, obliga a la preespora a desplazarse hacia el interior de esta membrana en crecimiento, la cual finalmente, forma una segunda capa de polaridad invertida sobre el protoplasto de la preespora. El estado IV marca la iniciación en la formación de la corteza entre las 2 membranas de la preespora, la síntesis del ácido diaminopimélico (componente de la corteza) y de cisteína, constituyente de las cubiertas de proteína que se depositarán sobre la membrana externa. Este estado es seguido por la terminación de las cubiertas de proteínas, acumulación de ácido dipicolínico, incorporación e inmovilización de calcio y la finalización de la síntesis de la corteza (estado V). La maduración de la preespora culmina con la refractividad y termoresistencia que determinan el estado VI. Finalmente la célula madre es lisada liberando a la espora (estado VII). El punto de no retorno en la esporulación o la etapa donde las células quedan comprometidas a terminar el proceso, varía de especie a especie pero, generalmente coincide con la terminación del estado III.

Eventos Bioquímicos Asociados a la Esporogénesis.

Paralelos a los cambios morfológicos anteriores se llevan a cabo una serie de eventos bioquímicos los cuales tienen diferente significancia y relevancia para la esporulación. P.J. Piggot y J. G. Coote (6) los ha dividido en varias categorías funcionales en un intento por clasificarlos:

- a). Aparición de componentes que no existen durante el crecimiento y se les encuentra solo durante la esporulación y son necesarios aparentemente - para la formación de la espora. Ejemplos pueden ser el peptido-glicano

de la corteza (que difiere estructuralmente de la pared celular). Otro caso serían las proteínas de la cubierta.

- b). Cambios en funciones vegetativas que son necesarias para la esporulación. Un ejemplo podría ser el incremento de las actividades del ciclo de Krebs, y de la cadena respiratoria, que son necesarios para mantener un nivel adecuado de ATP.
- c). Eventos colaterales que son disparados por la secuencia de eventos primarios durante la esporulación, pero que no juegan en sí mismos un papel definido. A menos de que mutantes adecuados sean aislados, será difícil distinguir entre cambios de este tipo y aquellos del tipo a. El incremento de metalo-proteasa durante los estadios tempranos de la esporulación es un ejemplo de esta clase, ya que mutantes metaloproteasa (-) son todavía capaces de esporular con igual eficiencia que el tipo silvestre.
- d). Cambios que resultan de la baja de nutrientes, condición en la que se induce la esporulación, pero que no están conectados en sí mismos con la esporulación. Ejemplos son la elevación de α amilasa y arginasa.
- e). Aparición de componentes que pueden ser requeridos durante la siguiente germinación pero que no tienen otro papel en la formación de la espora. Un ejemplo es la síntesis de alanina deshidrogenasa durante esporulación y que será indispensable durante la germinación.

El estudio de mutantes ha servido para poner cada evento en alguna de las categorías anteriores. Mutaciones en eventos no necesarios, no deben afectar la esporulación; Mutaciones en eventos necesarios deben afectarla y cuando el evento es específico de esporulación no debe afectar el crecimiento vegetativo.

La Regulación Enzimática Asociada a Esporogénesis:

Durante la morfogénesis se observa profundos cambios en los niveles de actividad de varias enzimas. Estos cambios reflejan modificaciones en las velocidades y sentido de flujo del carbono, nitrógeno y fosfato. Bernlohr y Leitzmann (2) han sistematizado los cambios que ocurren en los niveles de actividad enzimática durante la esporulación y que se ilustra en la figura no. 2. Los cambios que ocurren una vez que ha terminado el crecimiento logarítmico son de 2 tipos:

- a). Aparición de actividades enzimáticas que no son detectables en la fase vegetativa (inducción) o simplemente elevación de las ya existentes.
- b). Desaparición o disminución de actividades enzimáticas que tienen su máxima actividad durante la etapa vegetativa. De acuerdo con la cinética de desaparición (pendiente), esta puede ser atribuida a degradación proteolítica o cuando la velocidad de desaparición es grande, entonces la desaparición de actividad puede ser atribuida a un mecanismo de inactivación o transición alostérica.

De acuerdo con la etapa de esporulación en que sucedan los cambios en las actividades enzimáticas, éstos pueden ser tempranos y tardíos.

A continuación se muestra una lista (tabla I) de algunas de las enzimas que se incrementan y componentes que se sintetizan durante la fase esporulante (a y b). Del mismo modo se enlistan algunos componentes que son específicos de esporas maduras (c) y finalmente componentes no detectables en el mismo estado final (d).

Se puede apreciar que los cambios que ocurren en la maquinaria enzimática durante la transición de célula vegetativa a espóra son profundos e involucran enzi-

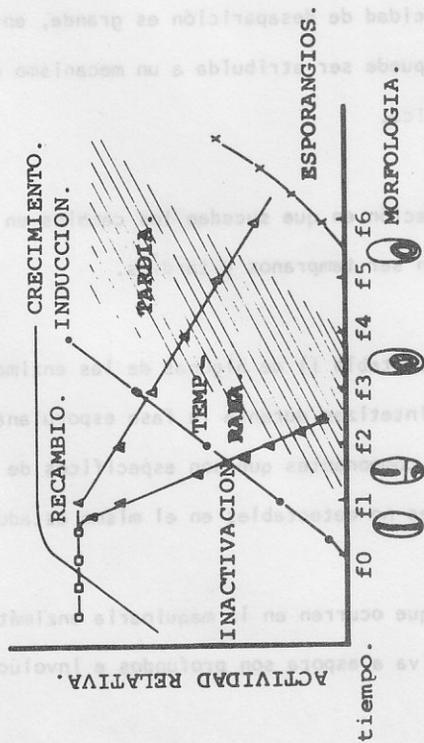


FIGURA 2. Modelo Hipotético sobre los cambios en los niveles de enzimas durante la esporulación. -- Los símbolos representan: enzimas inactivadas (\blacktriangle); enzimas inducidas (0); perfil de la pérdida de actividad enzimática debido recambio (Δ) y esporangios termoresistentes (X). Los eventos bioquímicos son correlacionados con los estados morfológicos dibujados al pie de la gráfica. El área sombreada representa el espectro completo de actividades enzimáticas incrementándose en forma paralela con las actividades inducidas (0) pero de 1 a 2 1/2 hrs. más tarde (temprana) ó 2 1/2 - hrs. más tarde (tardía) tomado de Bernihr y Leitzmann, 1969).

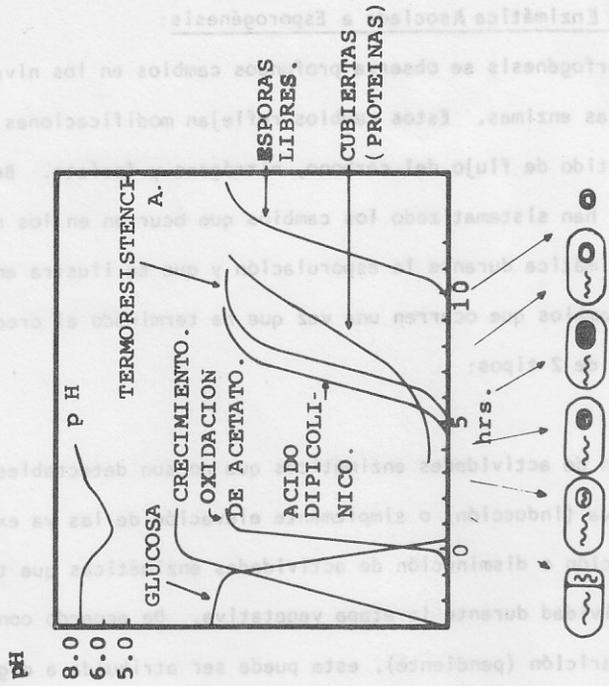


FIGURA 3. Secuencia de eventos metabólicos durante la esporulación en Bacillus (Aerobícos). (Tomado de Mandelstam y McQuillen, 1973).

TABLA I. Componentes característicos de las células esporulantes y esporas (tomado de Mandelstam y MacQuillen, 1973).

a). Actividades enzimáticas que se incrementan en las células esporulantes:

NADH₂ oxidasa (particulada)
 Enzima condensante del citrato
 Succinato deshidrogenasa
 Adenosina deaminasa
 Racemasa alcalina
 Fosfatasa alcalina
 Transaminasa glutámico-pirúvica (GPT)
 Transaminasa glutámico-oxaloacética (GDT)
 Ornitina transcarbamilasa
 Purina nucleósido fosforilasa

- * Glucosa deshidrogenasa
- * Acetoacetyl-CoA reductasa
- * Ribosidasa
- * Sintasa del ácido dipicolínico (DPA)
- * Proteasas extracelulares
- * Sintasa del ácido dihidrodipicolínico

b). Componentes específicos sintetizados por células esporulantes:

Toxinas
 Antibióticos
 Ácido N-succinil-L-glutámico

c). Componentes específicos de la espora:

Antígenos
 DPA-Ca²⁺
 Cristal paraesporal (B. Thuringiensis)
 Corteza (Péptido-glicano)
 Ácido murámico
 Ácido Sulfoacético (B. subtilis)

d). Componentes no detectables o presentes en cantidades muy pequeñas en esporas:

Deshidrogenasa isocítrica
 Deshidrogenasa málica
 NADH₂-oxidasa (particulada)
 Transcarbamilasa aspártica
 Citocromos
 Succinato citocromo c reductasa

* No detectable en células vegetativas.

mas importantes de las vías centrales del metabolismo, estos cambios van a capacitar a la célula para el aprovechamiento de nuevas fuentes de carbón de lenta utilización (acetato y piruvato). Así mismo, aparecen una serie de enzimas involucradas en las vías de síntesis de los componentes específicos de esporulación (ej. el ácido dipicolínico y la corteza) y componentes que capacitan a la espora para germinar cuando las condiciones sean adecuadas (ej. la síntesis de alanina deshidrogenasa y fosfoglicerato).

Cambios Metabólicos Asociados a la Esporogénesis:

Del análisis sobre las fluctuaciones de actividades enzimáticas, el tamaño de las pozas metabólicas y productos finales se puede llegar a conclusiones sobre los cambios metabólicos que son necesarios para el proceso morfogenético.

Así vemos en la figura 3 que durante el crecimiento logarítmico la fuente de carbono que se utiliza es la glucosa y, debido a que no existe un ciclo de Krebs funcional se acumulan los productos finales de la glicólisis: acetato y piruvato, los cuales van a ser expulsados al medio trayendo como consecuencia una caída en el pH, que llega a su punto mínimo hacia el final del crecimiento. La intensidad del metabolismo anaeróbico durante la etapa vegetativa se ve reflejada en los niveles de las actividades enzimáticas de la vía glicolítica, en cambio en esta misma etapa, las enzimas del ciclo de Krebs se encuentran en niveles muy bajos o no son detectables como en el caso de la aconitasa.

Con el agotamiento de la glucosa hay una caída brusca en la concentración de intermediarios de la glicólisis, los cuales actúan como represores catabólicos de las enzimas del ciclo de Krebs, concomitantemente se observa la inactivación

de la Fructosa-1, 6-difosfato cinasa, enzima clave de la glicólisis. Al cesar la represión catabólica, las enzimas del ciclo de Krebs son inducidas haciendo funcional el ciclo y permitiendo la utilización de acetato para la obtención de intermediarios y energía (ATP) necesarios para el proceso morfogénético.

Que un ciclo de Krebs funcional sea indispensable para la esporulación, es confirmado por los estudios con mutantes deficientes en varias de las enzimas del ciclo y por ejemplo, mutantes aconitasa⁽⁻⁾ son incapaces de esporular y en cambio crecen eficientemente en la presencia de glutamato. Durante la esporulación ocurre también un incremento de varias veces en la actividad de NADH₂ oxidasa particulada sobre el nivel característico del estado vegetativo. Mutantes que son incapaces de elevar la actividad de NADH₂ oxidasa lo son también de esporular. Transformación de estos mutantes por DNA de tipo silvestre resulta en la readquisición de ambas capacidades (Mandelstam y Mc Quillen, 1973).

Control Genético de la Esporogénesis:

Es claro que los eventos morfológicos y bioquímicos que conducen a la formación de una espora madura se hayan bajo control genético. *Bacillus subtilis* (cepa Marburg) ha sido preferentemente usado en estudios genéticos que tratan de determinar el número de genes que controlan la esporogénesis y en que forma se encuentran distribuidos sobre el cromosoma (dispersos o agrupados en unas cuantas regiones bajo el control de unos pocos genes reguladores).

Se ha aislado 2 tipos de mutantes, inducidos por tratamientos con calor, luz ultravioleta y diversos mutágenos químicos: Mutantes asporógenos (Sp⁻) que son incapaces de producir esporas latentes y los mutantes oligoesporógenos

(0sp) los cuales producen esporas a muy bajas frecuencias (ej. 10^{-5}) bajo las condiciones normales de esporulación. Es posible obtener mutantes de los 2 tipos bloqueados en cualquier estado de esporulación.

La capacidad para esporular se puede restaurar en cualquiera de los 2 tipos de mutantes mediante las técnicas de transformación o la de transducción, empleando el fago PBS-1. Este tipo de análisis genético ha indicado que los genes que afectan la esporulación están localizados en los cuatro grupos de encadenamiento en que ha sido dividido el cromosoma de B. subtilis.

De acuerdo con estos resultados los genes de esporulación están dispersos por todo el cromosoma, no existiendo así una área definida del genoma que contenga toda la información necesaria para la esporulación, separada del genoma necesario para el crecimiento vegetativo (Piggot y Coote, 1977).

A pesar de los progresos hechos en el estudio de la genética de la esporulación, los datos disponibles no proveen indicación de cual pudiera ser el locus primario para la iniciación o el número de genes regulatorios involucrados en el control de las esporogénesis. Han sido reportadas mutaciones en más de 30 genes diferentes de B. subtilis, que afectan al desarrollo de la espora sin afectar el crecimiento vegetativo pero en ningún caso, se ha podido establecer su función en esporulación o identificado su producto.

El análisis de los productos de la expresión génica apoyan la idea de que un buen número de genes (específicos de esporulación) participan en la formación de la espora. La esporogénesis esta acompañada de una extensiva degradación y resíntesis de RNA y proteínas y en ambos casos, la síntesis es "de novo".

Si durante las etapas tempranas de la esporulación se añade inhibidores de la síntesis de proteínas (e.g. cloroanfénicol) o inhibidores de la síntesis de RNA (e.g. actinomicina) la formación de la espora es inhibida.

II Regulación de la Succinato Deshidrogenasa, durante la Esporulación de 'Bacillus cereus'

Desde hace algún tiempo estamos interesados en el estudio de la succinato deshidrogenasa, (SD) enzima de gran importancia por su doble papel en el metabolismo:

a). Alimentar al ciclo de Krebs con fumarato y b). Proveer de electrones a la cadena respiratoria. Dada la importancia de éstas 2 vías metabólicas para la esporulación consideramos de gran relevancia el estudio de la regulación de la enzima antes mencionada durante el crecimiento vegetativo y la esporulación de Bacillus cereus.

Reportes previos a nuestra investigación (7-9) se limitan a describir la elevación de la actividad de succinato oxidasa en la etapa esporulante, como sucede con el resto de las actividades del ciclo de Krebs y cadena respiratoria (10-13).

Por otro lado Carls y Hanson (14) aislaron mutantes de Bacillus subtilis deficientes en SD que eran incapaces de esporular, característica que se observa para casi todos los mutantes del ciclo (15).

En 1972 Lang et al (16) reportaron que en Bacillus cereus la actividad de SD medida como DCPIP (diclorofenol-indofenol) aceptor oxidorreductasa de la etapa

esporulante, podía ser detectada, solo cuando se incluía cianuro (CN^-) en el ensayo de actividad, en cambio, la misma actividad, medida en la etapa vegetativa no era dependiente de CN^- y su inclusión no afectaba mayormente la actividad de la enzima. Los resultados de éstos autores sugerían que la enzima del estado esporulante se encontraba fuertemente acoplada a la cadena respiratoria y por tanto, fuera necesario inhibir a la citocromo oxidasa con CN^- para lograr desviar los electrones hacia el acarreador y aceptor artificiales (fenazina metosulfato y DCPIP) utilizados en el ensayo. Por otro lado, la enzima del estado vegetativo no estaría totalmente acoplada a la cadena respiratoria y podría así, reducir a la fenazina metosulfato (PMS) en ausencia del CN^- .

La explicación anterior era altamente probable pues había sido comprobado que durante la etapa vegetativa el ciclo de Krebs no era funcional debido a la ausencia de algunas de las enzimas del ciclo. Así mismo, durante ésta etapa el significado funcional de la cadena respiratoria no es claro debido a que el ATP es obtenido casi en su totalidad de la degradación de glucosa por la vía de Embden y Meyerhoff. Al iniciarse la esporulación el ciclo de Krebs se hace funcional, la concentración de citocromos en la cadena se elevan significativamente (17) y el ATP es casi exclusivamente generado por esta vía. Así la necesidad de una SD fuertemente acoplada a la cadena respiratoria durante la fase vegetativa, no es indispensable. Por otro lado el efecto inhibitorio del CN^- sobre la citocromo oxidasa es un fenómeno bien caracterizado y considerado como específico para todos los sistemas probados (18).

Decidimos ampliar los estudios iniciados por Lang et al. y nos pareció que lo primero que había que averiguar era en qué etapa del proceso morfogénico aparecía el requerimiento por CN^- y como se relacionaba esto con los -

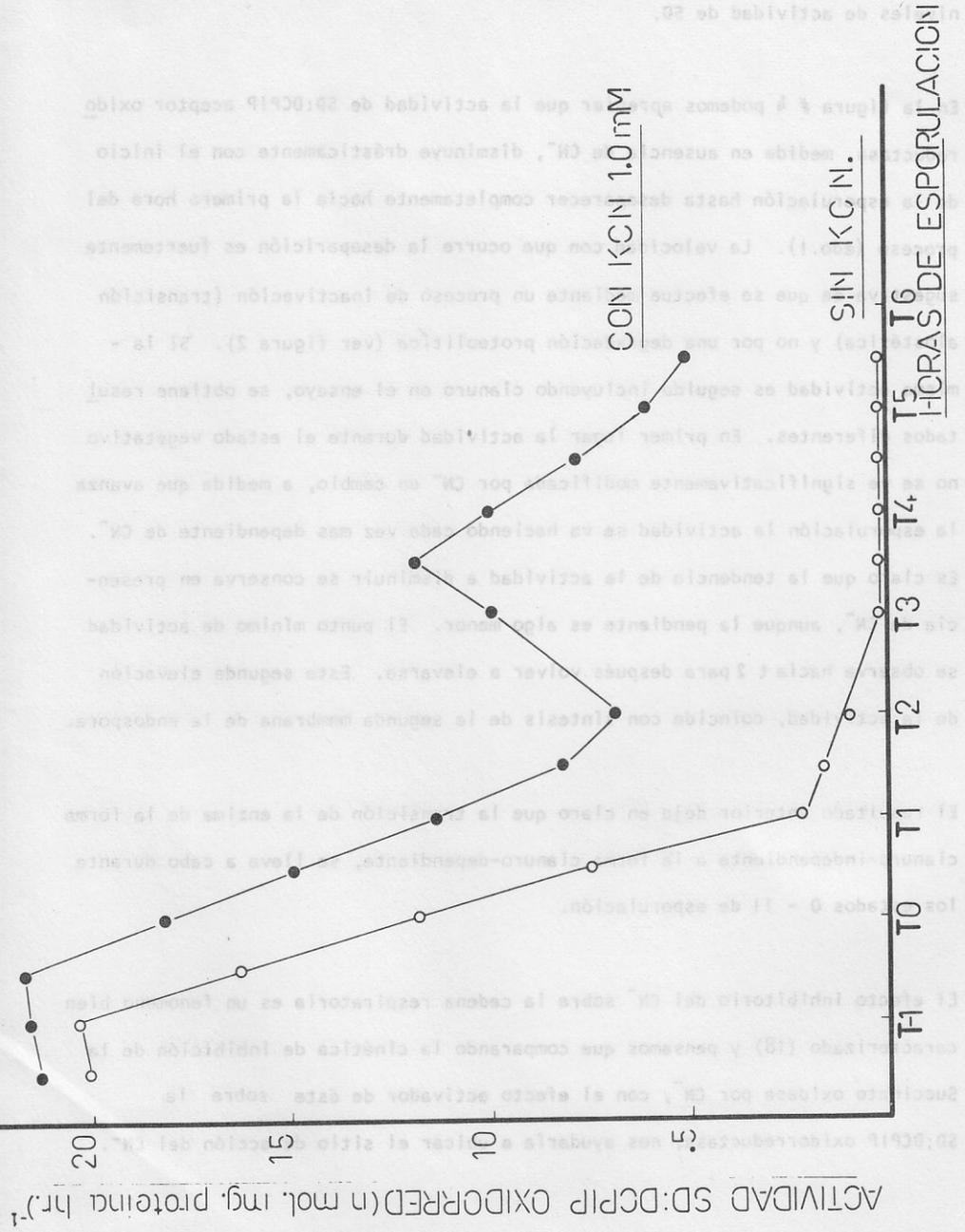


FIGURA 4. Regulación de la actividad de succinato deshidrogenasa (DCPIP-ACEPTOR) durante la fase logarítmica y esporulante de *Bacillus cereus*. La actividad fue medida en la fracción membranal (140,000 xg) de acuerdo con Lang et al. (16) en ausencia de KCN (0) y en presencia de KCN 1.0 mM (0).

niveles de actividad de SD.

En la figura # 4 podemos apreciar que la actividad de SD:DCPIP acceptor oxidoreductasa, medida en ausencia de CN^- , disminuye drásticamente con el inicio de la esporulación hasta desaparecer completamente hacia la primera hora del proceso (edo. I). La velocidad con que ocurre la desaparición es fuertemente sugestiva de que se efectúe mediante un proceso de inactivación (transición alostérica) y no por una degradación proteolítica (ver figura 2). Si la misma actividad es seguida incluyendo cianuro en el ensayo, se obtiene resultados diferentes. En primer lugar la actividad durante el estado vegetativo no se ve significativamente modificada por CN^- en cambio, a medida que avanza la esporulación la actividad se va haciendo cada vez mas dependiente de CN^- . Es claro que la tendencia de la actividad a disminuir se conserva en presencia de CN^- , aunque la pendiente es algo menor. El punto mínimo de actividad se observa hacia t 2 para después volver a elevarse. Esta segunda elevación de la actividad, coincide con síntesis de la segunda membrana de la endospora.

El resultado anterior deja en claro que la transición de la enzima de la forma cianuro-independiente a la forma cianuro-dependiente, se lleva a cabo durante los estados 0 - II de esporulación.

El efecto inhibitorio del CN^- sobre la cadena respiratoria es un fenómeno bien caracterizado (18) y pensamos que comparando la cinética de inhibición de la Succinato oxidasa por CN^- , con el efecto activador de éste sobre la SD:DCPIP oxidoreductasa, nos ayudaría a ubicar el sitio de acción del CN^- .

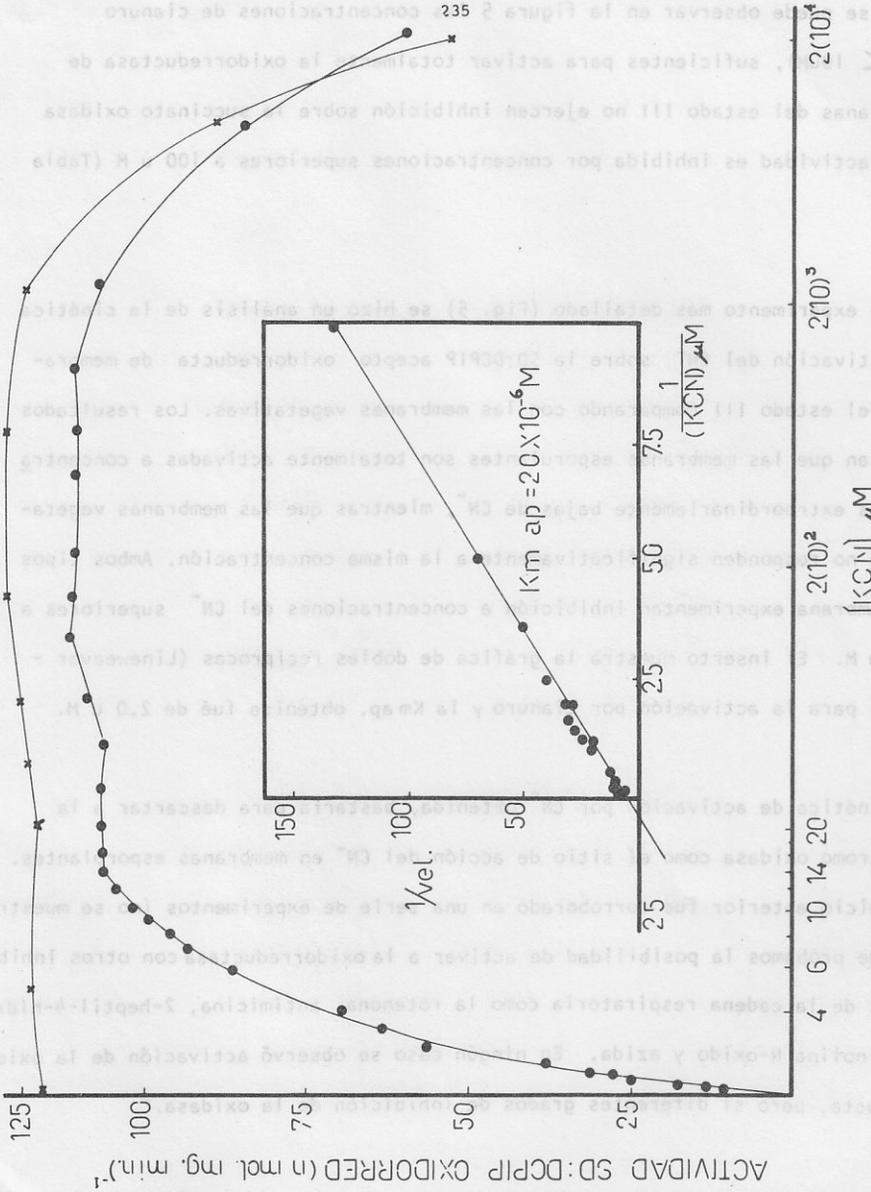


FIGURA 5. Efecto de la concentración de KCN sobre la actividad de succinato deshidrogenasa (DCPIP-ACEPTOR). Membranas de células vegetativas logaríficas (la actividad específica de las membranas vegetativas fue dividida entre 2) (X - X) y células esporulantes, EDO III (O - O). El inserto muestra la grafica de dobles recíprocos para la curva obtenida con membranas esporulantes.

Como se puede observar en la figura 5 las concentraciones de cianuro ($< 10\mu\text{M}$), suficientes para activar totalmente la oxidorreductasa de membranas del estado III no ejercen inhibición sobre la succinato oxidasa cuya actividad es inhibida por concentraciones superiores a $100\ \mu\text{M}$ (Tabla II).

En un experimento más detallado (Fig. 5) se hizo un análisis de la cinética de activación del CN^- sobre la SD:DCPIP acepto oxidorreducta de membranas del estado III comparando con las membranas vegetativas. Los resultados indican que las membranas esporulantes son totalmente activadas a concentraciones extraordinariamente bajas de CN^- , mientras que las membranas vegetativas no responden significativamente a la misma concentración. Ambos tipos de membrana experimentan inhibición a concentraciones del CN^- superiores a $2.0\ \text{mM}$. El inserto muestra la gráfica de dobles recíprocas (Lineweaver - Burk) para la activación por cianuro y la K_{map} obtenida fué de $2.0\ \mu\text{M}$.

La cinética de activación por CN^- obtenida, bastaría para descartar a la citocromo oxidasa como el sitio de acción del CN^- en membranas esporulantes. El juicio anterior fué corroborado en una serie de experimentos (no se muestran) en que probamos la posibilidad de activar a la oxidorreductasa con otros inhibidores de la cadena respiratoria como la rotenona, antimicina, 2-heptil-4-hidroxiquinolina N-óxido y azida. En ningún caso se observó activación de la oxidorreducta, pero sí diferentes grados de inhibición de la oxidasa.

En la figura 6 se muestra el efecto de la concentración de CN^- sobre la actividad de SD:DCPIP-aceptor oxidorreducta de membranas obtenida de células en diferentes estados de desarrollo. Se puede observar que en todos los casos, la

TABLA II. Efecto de la concentración de KCN sobre la succinato oxidasa de membranas vegetativas y esporulantes:

ADICION	ACTIVIDAD DE SUCCINATO OXIDASA ^a EN MEMBRANAS (ACTIVIDAD RELATIVA) ^b	
	VEGETATIVAS (LOG)	ESPORULANTES (EDO.III)
NINGUNA	1	1
KCN:		
0.005 mM	1	1
0.01 "	1	1
0.0 "	1	1
0.10 "	0.9	0.95
1.0 "	0.7	0.7
10.0 "	0.40	0.40

a La actividad de succinato oxidasa fue medida polarográficamente, de acuerdo con Lang et al (16).

b La actividad está expresada como el cociente de la actividad en presencia de la concentración señalada de KCN sobre la actividad en ausencia de KCN. La actividad específica fue de 48 y 12 natom O₂ (mg. min)⁻¹ en membranas vegetativas y esporulantes respectivamente.

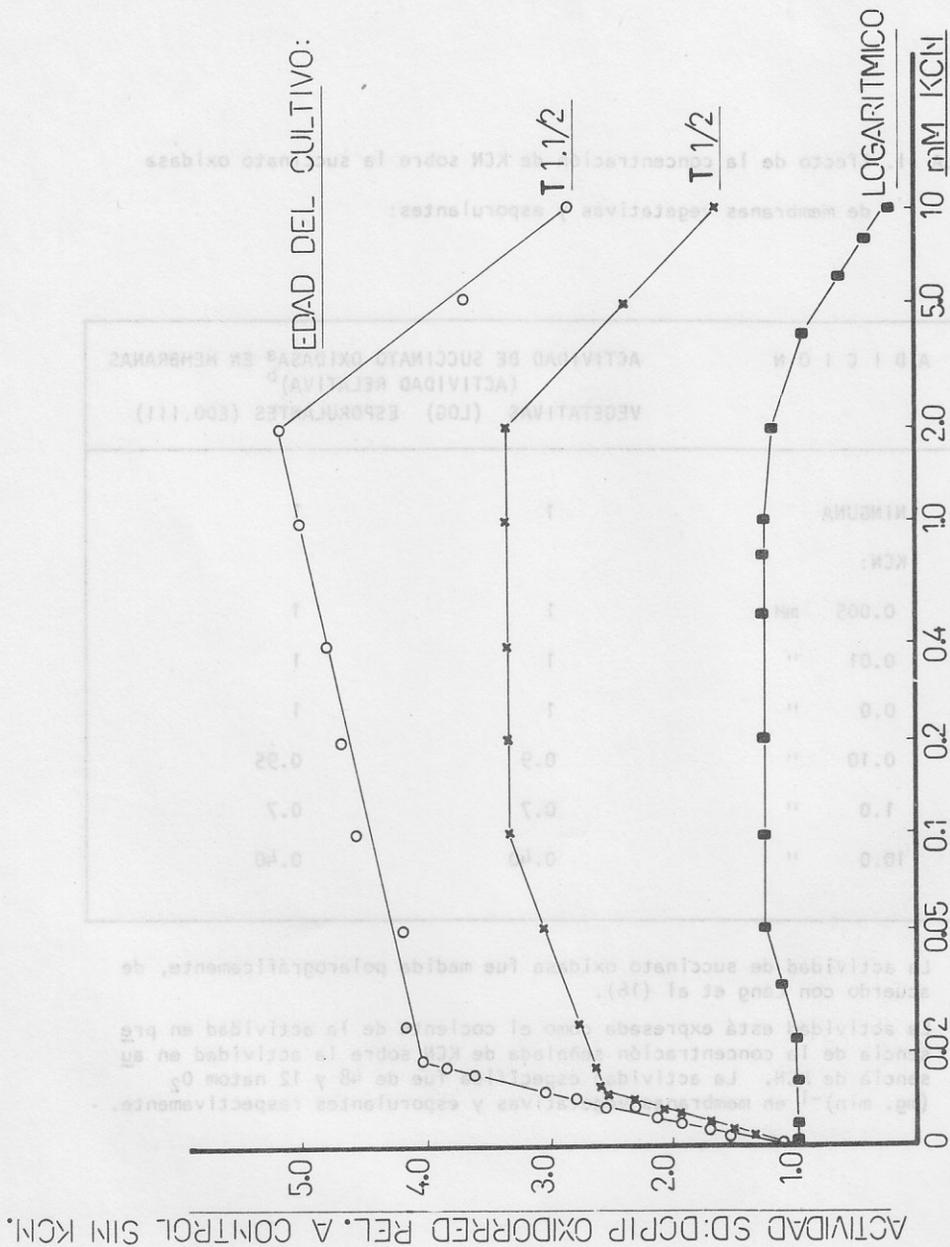


FIGURA 6. Efecto de la concentración de KCN sobre la actividad de succinato deshidrogenasa (DCPIP)-aceptor) en membranas de la etapa vegetativa (\circ), $t_{1/2}$ (\times) $t_{1/2}$ (\circ).

concentración de CN^- necesaria para lograr la total activación de la enzima, es menor a $10 \mu\text{M}$ y que el nivel de activación alcanzando en cada caso aumenta con la edad del cultivo. Esto es indicativo de que la fracción creciente de actividad cianuro-dependiente responde con igual cinética al CN^- .

Además de los inhibidores de cadena respiratoria, se ensayó una larga lista de aniones orgánicos e inorgánicos (resultados no mostrados) y en ningún caso se logró estimular la actividad, en cambio, los detergentes y agentes caotrópicos fueron capaces de producir un efecto activador sobre las membranas esporulantes, parecido a aquél descrito para CN^- .

Wilson y King (19) demostraron que preparaciones Keelin-Hartree de corazón de bovino tratado con CN^- a altas concentraciones ($30\text{-}50 \text{ mM}$) no mostraban actividad de SD. Posteriormente Wu y King (20) anunciaron que el tratamiento con cianuro induce la resolución de la enzima de la membrana. Así en este sistema, el CN^- actúa como un perturbador de la membrana provocando la solubilización de la enzima. Pensamos en la posibilidad de que algo parecido a lo anteriormente descrito, estuviera ocurriendo en nuestro sistema. La tabla III muestra que los perturbadores de membrana perclorato, colato, brij 36T y lauril sulfato son capaces de inducir, con rendimiento creciente, la solubilización de la SD al sobrenadante de alta velocidad ($140,000 \times g$). Por otro lado, el tratamiento con cianuro 1.0 mM no liberó actividad detectable. Estos resultados indican que el efecto activador del CN^- no es debido a una solubilización formal de la enzima y que los perturbadores de membrana activaron a la enzima liberándola de sus interacciones con otros componentes de la membrana.

Descartadas las posibilidades antes descritas (inhibición de citocromo oxidasa y solubilización de la enzima), decidimos comparar las constantes cinéticas de la SD:DCPIP-aceptor oxidorreductasa en ambos tipos de membrana.

TABLE IV. La Km aparente para PMS de la succinato: DCPiP-aceptor oxidoreductasa particulada y solubilizada por Brij 36-T de membranas de la fase vegetativa y esporulante de B. cereus. Efecto del cianuro de potasio^a.

Preparación	Km ^b aparente (mM)			
	Vegetativas		Esporulantes	
	Sin KCN	KCN 0.1 mM	Sin KCN	KCN 0.1 mM
Enzima particulada	0.15	0.15	4.5	0.13
Enzima soluble	0.20	0.18	0.22	0.15

^a El KCN 0.1 mM fue añadido durante el período de incubación.

^b La Km fue calculada usando el método de la gráfica de dobles recíprocos ($1/v$ Vs. $1/|S|$)

La tabla IV muestra que la K_m para succinato no difiere significativamente en ambos tipos de membrana y en su enzima solubilizada por Brij-36T, la inclusión de CN^- en el ensayo no modifica, en ningún caso, la afinidad por el sustrato. Lo mismo sucede para el pH óptimo cuyo valor fue de 8.0 en todos los casos.

En cambio es claro que la K_m para PMS es cuando menos 30 veces mas baja en el caso de las membranas vegetativas. Sorprendentemente, la inclusión de CN^- en el ensayo modifica considerablemente la afinidad para PMS en las membranas - esporulantes, elevandola hasta valores comparables a los determinados en las membranas vegetativas. En todos los casos, con o sin cianuro, la K_m de la enzima soluble tiene valores parecidos a las membranas vegetativas, ésto es, con la sulubilización, la SD de membranas esporulantes exhibe actividad independiente de CN^- y alta afinidad por PMS.

CONCLUSIONES

Los resultados descritos en este trabajo nos permiten proponer que durante las etapas iniciales de la esporulación la actividad de SD:DCPIP aceptor oxidoreductasa es inactivada mediante un mecanismo de transición alostérica que involucrarían cambios conformacionales de la enzima. Esto haría cineticamente diferente a la enzima del estado esporulante (baja afinidad por PMS). En el mecanismo de transición alosterica podría estar involucrados uno o mas efectos que aparecerían durante ésta etapa del desarrollo. La transición podría ser explicada también, como resultado de cambios en la arquitectura de la membrana que operarían obligando a la enzima a cambiar su conformación.

La activación por cianuro puede ser explicada si se considera que la SD de otras fuentes biológicas son capaces de interaccionar, con alta afinidad, con cianuro a través de sus grupos prostéticos de Fe^{++} no hem. (21).

La interacción entre el CN^- con los grupos Fe^{++} no hem, causaría la reversión al estado conformacional vegetativo que es el de alta afinidad para PMS. La enzima esporulante soluble no mostraría la dependencia al CN^- debido posiblemente a que su resolución de la membrana causaría automáticamente su reversión al estado conformacional activo. Todo indicaría que la enzima particulada esporulante ha sufrido "cambios" en su sitio reductor que la acopla a la cadena respiratoria y no en el sitio oxidativo o sitio del succinato.

El autor desea expresar su gratitud a las Srtes. Margarita Jafar Luna y el Señor José María Cruz García, por su valiosa colaboración en la mecanografía e ilustración respectivamente del presente trabajo.

Así mismo, hacer una dedicatoria especial a la memoria del Dr. Jorge Soría Díaz-Infante.

La interacción entre el CH⁺ con los grupos Fe⁺⁺ no han causado la reversión
al estado conformacional vegetativo que es el de alta afinidad para PMS. La
enzima espontánea soluble no mostraría la dependencia al CH⁺ debido posiblemente
mente a que su resolución de la membrana causaría automáticamente su reversión
al estado conformacional activo. Todo indicaría que la enzima particulada
espontánea ha sufrido "cambios" en su sitio reductor que la acopla a la cadena
respiratoria y no en el sitio oxidativo o sitio del succinato.

AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su gratitud a la Srta. Margarita Islas Luna y al Señor José María Cruz García, por su valiosa colaboración en la mecanografía e ilustración respectivamente del presente trabajo.

Así mismo, hacer una dedicatoria especial a la memoria del Dr. Jorge Soria Díaz-Infante.

R E F E R E N C I A S

Para aspectos generales de la Esporulación se recomienda la consulta de los siguientes artículos (1 - 9):

1. Fitz-James, P. y Young, E. (1969). The bacterial spore. Edit: G. W. Gould y A. Hurts Academic Press, London, pag. 183-213.
2. Kornberg, A., Spudich, J. A., Nelson, D. L. y Deutscher, M. P. (1968). Ann. Rev. Biochem. 37:51-78.
3. Hanson, R. S., Peterson, J. A. y Yousten A. A. (1970). Ann. Rev. Microbiol. 24:53-90.
4. Freese, E. (1972). Current Top Dev. Biol. 7:85-124.
5. Mandelstam, J. (1976). Proc. R. Soc. London B. 193:89-106.
6. Piggot, P. J. y Coote J. E. (1977). Bacteriol. Reviews 40:908-962.
7. Mandelstam, J. y McQuillen K. (1973). Biochemistry of Bacterial Growth. 2a. edi. Blackwell Scientific Pub. pag. 494-511.
8. Bernlohr, R. y Leitzmann, C. (1969). The Bacterial spore. Edit. G. W. Gould y A. Hurts. Academic Press, London, pag. 183-213.
9. Vinter, V. (1969). The bacterial spore. Edit: G. W. Gould y A. Hurts, Academic Press, London, pag. 73-123.
10. Hanson, R. S. y MacKehnie (1969). Spore IV. Edit: L. Leon Campell, Amer. Soc. for Mycobiol., pag. 196-211.
11. Ohne Margareta (1974). Jour. Bacteriol. 117:1295-1305.
12. Hanson, R. S., Brinivarsan, V. R. y Halvorson, H. O. (1963). Jour. Bacteriol. 85:451-460.
13. Tanaka, N. y Hanson R. S. (1975). Jour. Bacteriol. 122:215-223.
14. Carls, R. A. y Hanson R. S. (1971). Jour. Bacteriol. 106:848-855.
15. Fortnagel, P. y Freese, E. (1968). Jour. Bacteriol. 45:1431-1438.

16. Lang, D. R., Felix, J. y Lundgren, D. G. (1972). *Jour. Bacteriol.* 109:968-977.
17. Felix, J. A. y Lundgren, D. G. (1973). *Jour. Bacteriol.* 115:552-559.
18. Slater, E. C. (1967). *Methods in Ezymology*, Vol. X. Academic Press, New York, pag. 48-53.
19. Wilson, D. F. y King, T. E. (1964). *Biochim. Biophys. Acta* 92:173-175.
20. Wu, J. T. y King, T. E. (1967). *Fed. Proc.* 26:2654.
21. Singer, T. P., Kearney, E. B. and Kenney, W. C. (1973). *Adv. in Enzymol.* 37:189-272.