

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE QUIMICA



EL FENOMENO DE ESPORULACION

EN EL GENERO *Bacillus*.



DEPARTAMENTO DE ANÁLISIS Y
EXPERIMENTOS QUÍMICOS
FACULTAD DE QUÍMICA

JESUS CORTES BARGALLO

Q U I M I C O

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

I N D I C E

Introducción	1
Generalidades	9
Exosporio	14
Cubierta de la espora	18
Corteza	20
Eventos Morfológicos de la Esporulación	26
Eventos Bioquímicos de la Esporulación	33
Modificación de Proteínas	34
Modificación del RNA	38
Modificación del RNA mensajero	41
Modificación del RNA de transferencia	42
Modificación del RNA ribosomal	42
Enzimas propias de las esporas	42
Genética de la esporulación	48
Regulación de la esporulación	55
Control de la iniciación de la esporulación	56
Ciclo de los ácidos tricarbóxicos, Represión Catabólica y esporulación	59
Glutamina Sintetasa	61
Control de la transcripción	62
Regulación por RNA polimerasa	64
Mutantes de la RNA polimerasa	66
RNA polimerasa y su restablecimiento por fagos	67
Control de la Transcripción durante el crecimiento de la espora	68
Control de la traducción	69
RNA mensajero estable	70
RNA de transferencia	71

tRNA sintetetasas	72
Factores de iniciación	73
Ribosomas	74
Control Post-traducciona	75
Conclusiones	77
Bibliografía	87

I N T R O D U C C I O N

Los grandes avances en la Genética, Bioquímica y Biología Molecular se deben, en gran parte, al empleo de los microorganismos como sistemas experimentales o modelos biológicos de estudio, a través de los cuales, se ha intentado establecer un sinnúmero de correlaciones con los fenómenos que se presentan en los organismos macroscópicos. Este planteamiento se justifica, si consideramos que las estructuras bioquímicas básicas y los mecanismos necesarios para la replicación celular han evolucionado a partir de un estado unicelular. De hecho, los mecanismos que codifican para los fenómenos de transcripción y traducción, así como los de varias rutas biosintéticas y degradativas son muy parecidos, aunque en algunas rutas alternas y complejos enzimáticos se producen ciertas variaciones.

Tratándose del fenómeno de diferenciación, no es utilizado usualmente el concepto anterior de unificación, quizá debido a que los tejidos diferenciados que constituyen los órganos de las especies superiores presentan apariencias completamente distintas. Indudablemente, la diferenciación en los tejidos "altamente diferenciados" requiere de eventos bioquímicos muy específicos, los cuales se presentan en determinados grupos celulares. Sin embargo, los sistemas de regulación de las reacciones iniciales, que convierten a una célula en crecimiento a

célula diferenciada, pueden ser iguales en macroorganismos y en microorganismos, por lo que es factible el uso de estos últimos en el estudio de la diferenciación. Entre los microorganismos - mas sencillos que cumplen con este postulado se encuentran las bacterias, que son sin duda, los sistemas experimentales mas empleados actualmente. Presentan varias ventajas sobre los orga - nismos macroscópicos, entre las que podemos mencionar: tiempo - de generación reducido, alta frecuencia de potencial mutagénico durante la exposición a agentes mutágenos, facilidad de conser - vación de cepas, habilidad de crecer en medios de cultivo sencíllos, etc., y como consecuencia de estas ventajas, la Bioquímica, Fisiología y Genética de estos microorganismos son mas cono cidas y por lo tanto, en ellos es posible regular y manejar ma - yor número de variables que influyan sobre la obtención de al - gún resultado.

Entre las bacterias existe un proceso de diferencia - ción llamado esporulación, como su nombre lo dice, la célula ve getativa se transforma en espora. No todas las bacterias son ca paces de llevar a cabo este fenómeno, sólo existen dos géneros que lo realizan, éstos son *Bacillus* y *Clostridium* además de al - gunas especies aisladas de *Sporosarcina*.

La espora es la estructura mas compleja formada por u - na bacteria, es un caso especial de adaptación celular a los -- cambios periódicos que se presentan en un medio ambiente. No es

un evento necesario en el ciclo de desarrollo de la bacteria y su formación ocurre normalmente después de la fase de crecimiento logarítmico, es decir, cuando el tiempo de generación se prolonga debido a la limitación de algún nutriente del medio de crecimiento (51), ésto puede ocurrir incluso, durante la fase de crecimiento logarítmico, pero la probabilidad de esporulación es inversamente proporcional a la velocidad de crecimiento, así que este fenómeno se presenta en cultivos forzados a crecer lentamente.

En la actualidad no se sabe con certeza la función de la spora. Debido a que un organismo bacteriano forma sólo una spora y ésta a su vez se convertirá en una célula vegetativa, no se puede considerar que se trate de una forma de multiplicación de la especie, caso contrario el de los hongos y plantas superiores, donde la esporulación es un fenómeno de reproducción (7:). En hipótesis más recientes se ha tratado de asignarle a la spora un papel en la distribución aérea de las especies (132);-sin embargo, las evidencias que apoyan este punto de vista son completamente especulativas, ya que las especies formadoras de esporas, tanto aerobias como anaerobias, no crecen expuestas directamente a la atmósfera en todos los casos, así la oportunidad que tienen de ser transportadas por corrientes de aire es azarosa, además se ha visto que las células vegetativas también pueden ser transportadas por el aire fácilmente.

La opinión mas aceptada sobre la función de las esporas bacterianas es la de considerarlas como formas de resistencia y consecuentemente de sobrevivencia, pues soportan condiciones adversas de temperatura, presión osmótica, radiaciones y humedad. Estas propiedades las convierten en un factor que requiere de especial cuidado durante los procesos de esterilización (27); así la mayoría de los procesos cinéticos de la esterilización se han hecho con esporas de *Bacillus stearothermophilus* que son las formas de vida mas resistentes a la temperatura que se conocen a la fecha.

La esporulación presenta una gran importancia en el área de la microbiología aplicada, ya que se le ha relacionado con la producción de algunos antibióticos cuya utilidad médica es de un valor incalculable. Este es el caso de las bacitracinas, gramicidinas, tirocidinas, que son antibiótico de utilidad para combatir microorganismos Gram positivos y el de las colistinas y polimixinas que actúan contra Gram negativos (ver la Tabla I). Diversas enzimas microbianas involucradas en la esporulación han adquirido una importancia creciente en la industria alimenticia, en la medicina, etc. Entre las enzimas de mayor utilidad práctica podemos citar a las amilasas, ampliamente utilizadas en la industria de los cereales, producción de jarabes, modificación de almidón, etc.; se han encontrado las actividades de diversas proteasas útiles en la fabricación

de detergentes, desmanchadores, ablandadores de carne, antiinflamatorios, etc., así como penicilinasas, pectinasas, ribonucleasas (ver la Tabla II) que presentan grán interes en las áreas básica y aplicada.

También en la microbiología de alimentos las bacterias esporulantes han sido ampliamente estudiadas, ésto se debe a que algunas de ellas, el género *Clostridium*, son toxigénicas, característica que adquieren durante la formación de esporas.

En el presente trabajo, sólo se incluirá la descripción del fenómeno en el género *Bacillus* por ser en el que existen mayor cantidad de logros a la fecha y consecuentemente presenta un panorama mas completo del fenómeno, además de considerarlo como un proceso diferente del que sucede en el género *Clostridium* pues el metabolismo de ambos es diferente, sus requerimientos nutricionales también y así los eventos y efectos de la esporulación pueden ser diferentes.

Tabla I

Antibiótico	Microorganismo	Actividad
Bacitracinas (10 conocidas)	<i>B. licheniformis</i> <i>B. subtilis</i> <i>B. cereus</i>	Bactericida contra Gram positivos.
Glistinas	<i>B. colistinus</i>	Bactericida contra Gram negativos.
Gramicidinas lineales	<i>B. brevis</i>	Bacteriostático <u>con</u> tra Gram negativos.
Polimixinas (9 conocidas)	<i>B. polymyxa</i> <i>B. circulans</i>	Bactericida contra Gram negativos.
Tirocidinas	<i>B. brevis</i>	Bactericida contra Gram positivos y <u>al</u> gunos Gram negativos.
Tirotrícinas	<i>B. brevis</i>	Bacteriostático a <u>ba</u> jas concentraciones y Bactericida a alta contra Gram positivo y negativo, activo también contra hongos.

Principales antibióticos que aparecen durante la espoulación, por lo que se les ha atribuido funciones en ella como posibles reguladores, a la fecha no hay nada demostrado.

Tabla II

Enzima	Microorganismo	Aplicación
Amilasas	<i>B. amilolyticus</i>	Hidrólisis de cereales <u>u</u> tiles en fermentaciones alcohólicas, producción de jarabes para alimento. modificación de almidón en la industria de papel.
	<i>B. caldolyticus</i>	
	<i>B. coagulans</i>	
	<i>B. licheniformis</i>	
	<i>B. macerans</i>	
	<i>B. stearothermophilus</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. cereus</i>	
	<i>B. megaterium</i>	
<i>B. polymyxa</i>		
Proteasas	<i>B. licheniformis</i>	Detergentes, desmanchado res, elaboración de pro- ductos fáciles de fermen- tar, aumento de sabor, a- blandador de carnes, en - juagues bucales, antiin- flamatorios, recupera - ción de plata en fotogra- fía.
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. amiloliquefaciens</i>	
	<i>B. cereus</i>	
	<i>B. megaterium</i>	
	<i>B. thuringiensis</i>	
<i>B. pumilus</i>		
Penicilinasas	<i>B. anthracis</i>	Destrucción e identifica- ción de penicilina, tra- tamiento contra alergia a penicilina, modifica - ción de penicilina para síntesis de derivados.
	<i>B. cereus</i>	
	<i>B. licheniformis</i>	
	<i>B. megaterium</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
Ectinasas	<i>B. circulans</i>	Manufactura de cáñamo y de hilo. Fabricación de jugos.
	<i>B. polymyxa</i>	
	<i>B. pumilus</i>	
	<i>B. sphaericus</i>	
	<i>B. stearothermophilus</i>	
<i>B. subtilis</i>		
β -glucanasas	<i>B. circulans</i>	Ayuda en la utilización de cereales no malteados en cervecera.
	<i>B. polymyxa</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
Ribonucleasas	<i>B. amiloliquefaciens</i>	Producción de nucleóti- dos como saborizantes, disminución del conteni- do de RNA en alimentos de origen microbiano.
	<i>B. cereus</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. pumilus</i>	
Desoxirribo- nucleasas	<i>B. amiloliquefaciens</i>	Herramientas de investi- gación en Bioquímica y - Genética.
	<i>B. cereus</i>	
	<i>B. subtilis</i>	
	<i>B. pumilus</i>	

GENERALIDADES

El género *Bacillus* está constituido por bacilos grandes Gram positivos, formadores de esporas y con crecimiento óptimo en condiciones aerobias. La mayor parte de las especies son saprofitas y se encuentran abundantemente distribuidas en la vegetación, suelo, agua y aire. La única especie francamente patógena para el hombre es *Bacillus anthracis*, productor del antrax.

Las especies saprofitas encontradas con mayor frecuencia son *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium* y *Bacillus cereus*. Estas especies se encuentran en abundancia en infusiones de heno, por lo que comúnmente se les conoce como bacilos del heno. Por ser formadores de esporas termorresistentes, frecuentemente aparecen como testimonios molestos de una esterilización insuficiente.

Pertenecen, junto con el género *Clostridium* a la familia *Bacillaceae* que son por lo general bacilos rectos y móviles debido a la presencia de flagelos peritricos. Algunas especies como *Bacillus subtilis*, *Bacillus mesenteroides* y *Bacillus anthracis* presentan una estructura capsular compuesta por poli-D-glutámico, aminoácido no presente en las proteínas, se ordenan por lo general 400 residuos monoméricos formando cadenas de 50 a 100 α -péptidos unidos por pequeñas cadenas de γ -péptidos.

La pared celular está compuesta por cuatro fracciones predominantes:

- 1) Un polipéptido que consta de 3 a 8 residuos de aminoácidos.
- 2) El aminoazúcar N-acetil glucosamina y su derivado 3-carboxietílico, el ácido N-acetil murámico generalmente unido por enlaces $\beta(1-4)$ ó $\beta(1-6)$ y en algunos casos galactosamina.
- 3) Diversas cantidades de polisacáridos.
- 4) Polímeros de ribitol o de glicerol fosfato llamados ácidos teicoicos.

Por los estudios en el microscopio electrónico (63), se han identificado varias capas componentes de la pared celular, generalmente presentan una capa externa compuesta por partículas globulares, salvo los casos de *Bacillus macroides*, *Bacillus fastidiosus* y *Bacillus stearothermophilus* donde se han observado estructuras en forma de redes. Bajo las estructuras globulares mencionadas, se ha visto la presencia de multicapas morfológicamente similares a la exterior que se encuentran limitadas interiormente por una capa de estructura uniforme.

Bajo la pared celular, se encuentra la membrana plasmática, separada de ésta por un espacio de material soluble -- (50) interrumpido por estrechos conductos que parecen ser extensiones de esta membrana. La membrana plasmática está forma-

da por dos capas, la externa que tiene un grosor considerablemente mayor a el de la interna pero aparentemente constituidas por el mismo material. Su estructura es irregular y ondulada - para todo el género *Bacillus* a excepción de *Bacillus subtilis* donde la membrana plasmática es uniforme y se localiza paralelamente dispuesta con respecto a la pared celular. En algunas regiones se han observado capas periféricas en el citoplasma, probablemente formadas por proliferaciones defectuosas de la membrana.

El citoplasma de las especies de *Bacillus* es de consistencia granular, existen evidencias de la presencia de elementos membranosos y fibrilares dispuestos en posición periférica que en algunos casos presentan continuidad con la membrana plasmática (50).

El material nuclear ocupa la región central de bacilo presentando estructuras fibrilares compuestas por material cromático orientadas al azar, aunque en algunas ocasiones se han visto orientadas en forma paralela y se les ha involucrado en el arreglo del genoma para la división celular, esto no se ha demostrado. Se ha observado que pequeñas regiones de material membranoso similares al del citoplasma, en ocasiones se encuentran estrechamente asociados a este material fibrilar, sin embargo, no se han detectado cambios considerables en la naturaleza de este material durante el proceso de división.

La estructura esporal es mas compleja como se ve en la Figura 1 presenta una gran cantidad de estructuras distribuidas en un volumen menor, el tiempo de formación de la espora puede tomar varias veces el tiempo de generación de la célula vegetativa pues por lo general dura de 6 a 8 horas.

A continuación se describen los principales componentes de la espora.

Figura 1

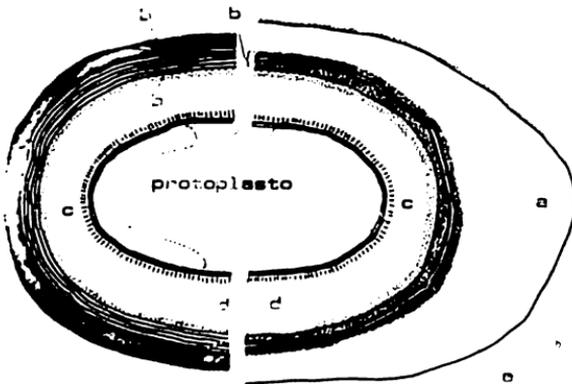


Diagrama de un corte de una espora mostrando las principales estructuras como el exosporio (a), la cubierta de la espora (b), la corteza (c), la pared celular (d) y el material nuclear (e).

EXOSPORIO

El exosporio es una membrana delgada y flexible que cubre a algunas esporas de especies bacterianas, considerándolo la primera barrera fisiológica entre la spora y el medio ambiente, se le han atribuido funciones de resistencia contra diversos tipos de enzimas hidrolíticas (24).

Se origina en el extremo no polar de la preespora y gradualmente rodea a la spora sin encontrarse asociado a membranas esporales ni a membranas de la célula madre (95). Es una estructura dispensable para la spora (49) difícil de distinguir en un microscopio de luz o en uno de contraste de fases, sin embargo, con el uso del microscopio electrónico se ha podido conocer con más detalle la estructura de esta membrana (49). Se han observado diferentes exosporios, uno formado por una estructura irregular similar a una cápsula y el otro formada por fracciones laminadas compuestas por secciones estriadas descrita para *Bacillus sphaericus*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus anthracis* y *Bacillus cereus* (3). Esta consta de una membrana basal y una zona periférica pilosa, llegándose a presentar en algunos casos, un exosporio doble (73).

Algunas cepas de *Bacillus megaterium* presentan inclusiones planares que distienden al exosporio angularmente, estas inclusiones se encuentran unidas a la membrana basal pare-

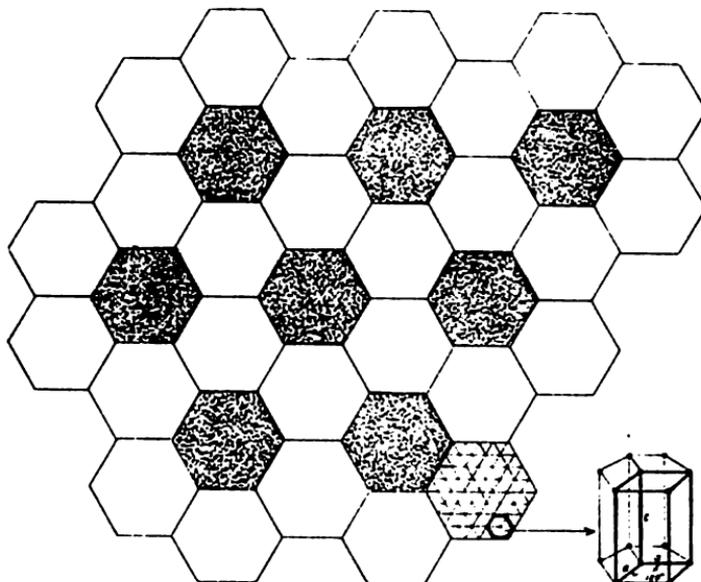
ciendo que ahí se originan.

En observaciones al microscopio electrónico, el exosporio presenta una periodicidad hexagonal donde las inclusiones son fácilmente diferenciables (8). Se ha construido un modelo hipotético para explicar los patrones de tinción de la membrana basal del exosporio cuando ésta se observa en el microscopio electrónico y se analiza por Rayos X (49) en donde se observa también la presencia de unidades hexagonales como se muestra en la figura 2.

Se han hecho medidas de permeabilidad del exosporio en esporas intactas, indicando que se trata de una superficie heteroporosa con orificios distribuidos al azar que permiten el paso de moléculas con diámetro de difusión de 180 Å (48), resultados que no concuerdan con los mencionados anteriormente por lo que quizá estos últimos se deban a rupturas ocasionadas durante la manipulación y lavado de las esporas.

La composición química del exosporio es variable según la especie, cualitativamente es similar a la de la pared celular de la célula vegetativa. Así la composición química del exosporio de *Bacillus cereus* es como se presenta en la Tabla III.

Figura 2



Interpretación diagramática de la ultraestructura de la membrana basal del exosporio. Los hexágonos oscuros representan orificios cuyos centros distan $68\text{Å}-86\text{Å}$ entre sí. Cada unidad hexagonal está compuesta de 48 fracciones con forma de paralelepípedo cuyas aristas mayores miden $11.8\text{Å}-12.0\text{Å}$ (c) y las aristas menores $7.5\text{Å}-7.8\text{Å}$ (a) Referencia (19).

TABLA III

Componentes	Cantidad (medida en $\mu\text{g/ml}$)
15 aminoácidos	373
glucosamina	113
carbohidratos	104
lípidos	174
ácidos teicoicos	20
ácidos orgánicos	21
ácido dipicolínico	2
ácidos nucleicos	12
no hidrolizables	180
Recuperación Total	987

C omposición química del exosporio de *Bacillus cereus*. Referen
 cia (132).

CUBIERTA DE LA ESPORA.

Bajo el exosporio se encuentra la cubierta de la espora que llega a ocupar el 50% del volumen de la espora constituyendo hasta el 40%-60% del peso de la misma (95), es la que confiere la apariencia a la espora. Por lo general se compone de tres capas sobrepuestas fácilmente visibles en el microscopio electrónico (63).

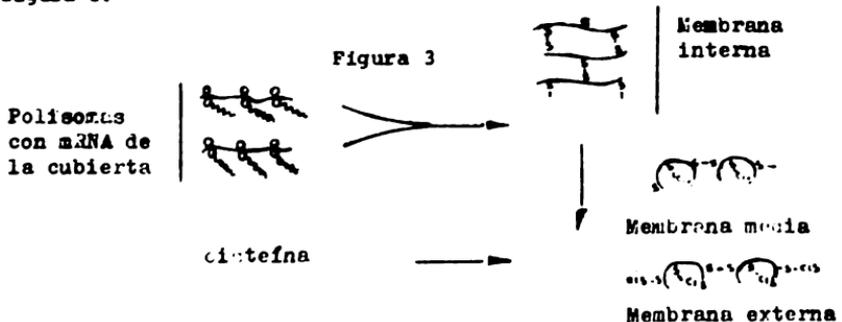
La capa externa está constituida de un material fibroso producto de la unión de fracciones laminares cada una de las cuales se forma por fibras yuxtapuestas ordenadas linealmente. Está compuesta por polipéptidos homogéneos a los que se les han insertado restos de cisteína en diferentes posiciones permitiendo variedad en las características estructurales de las capas que forman esta cubierta (4), existen reportes que indican la presencia de diversos polipéptidos (61,77), esto quizá se deba a que durante los procesos de extracción, se produzcan rupturas inespecíficas que den lugar a polipéptidos de tamaño variable.

La capa intermedia presenta composición similar a la externa pero su estructura es diferente, no tiene fracciones laminares y está interrumpida por orificios que constituyen el 40% de la superficie de ésta (4), se cree que los cambios en la conformación de esta membrana se deben a la diferencia del

contenido de cisteína que permite un estado de agregación diferente.

La capa interna es homogénea y delgada, en algunos casos no se encuentra, cuando está presente, es fácil de confundirla con estructuras de la corteza (A).

Se ha postulado un modelo de ensamble de la cubierta de la espora en el que se relaciona la incorporación de cisteína según sea la estructura que se forme, en este modelo la cisteína no se incorpora para formar la capa interna, únicamente lo hace para la capa media y exterior, como se indica en la figura 3.



Modelo para la formación de las diferentes capas de la cubierta de la espora en *Bacillus cereus*.

La composición de la corteza ha sido analizada para varias especies de *Bacillus* mostrando una composición muy parecida (Tabla IV).

Componente	<i>B. megaterium</i>	<i>B. subtilis</i>	<i>B. coagulans</i>	<i>B. stearothermophilus</i>
α, ϵ -diaminopimélico	1.00	1.00	1.00	1.00
DL-glutamato	1.18	1.00	0.98	0.82
DL-alanina	2.20	2.40	2.50	2.60
hexosamina	2.10	2.50	4.70	1.90
glicina	0.20	0.26	0.03	0.08
aspartato	0.17	0.21	0.03	0.07

Tabla IV

Composición del glicopéptido de la corteza de diferentes especies de *Bacillus* con las cantidades expresadas en relación a la cantidad molar de ácido α, ϵ -diaminopimélico, componente característico de esta estructura.

Parece ser que estas estructuras, así como modificaciones propias de los componentes celulares tienen un papel importante en la termorresistencia de la espora. Cualquier hipótesis tendiente a explicar esta termorresistencia, debe ser compatible con la diferencia en resistencia encontrada para distintas especies y con las tres consideraciones siguientes:

Algunas enzimas de esporas son resistentes cuando se extraen de la espora y se calientan (54), pero la mayoría parecen ser idénticas a las de las células vegetativas. (23, 46) Así la termorresistencia no se puede explicar con base en la formación de componentes enzimáticos diferentes.

Por análisis físicos la cantidad de agua en las esporas debe ser poca, es decir, aproximadamente el 10% (109).

La gravedad específica de las esporas determinada por centrifugación con gradientes de sacarosa, sugiere que se trata de una estructura condensada, es decir, que tiene un contenido de agua anormalmente bajo comparado con el de una célula vegetativa (82).

Estas consideraciones hacen pensar que las esporas son organismos deshidratados y que esto es importante en el mantenimiento de la termorresistencia y dormancia. Se ha pensado que el mantenimiento de un estado deshidratado y la impermeabilidad al agua no son compatibles con los materiales biológicos por lo que se ha involucrado la hipótesis que establece

que la corteza esporal se contrae durante la formación de la -
espora, eliminando el agua por presión mecánica. Esta hipóte -
sis es aceptable pues no implica la impermeabilidad y es com -
patible con el hecho de que la espora es capaz de intercambiar
agua deuterada con los alrededores (99).

Otros autores han encontrado que el contenido total -
de agua en la espora es de 65% a 80% (12). Esta cantidad de
agua es incompatible con los resultados de gravedad específica
sin embargo, si se considera que el agua está distribuida hete -
rogeneamente, podría presentar las propiedades mencionadas an -
teriormente sin involucrar contenidos bajos de agua.

Si se examina el contenido del péptidoglicano en las -
esporas y el volumen que éste ocupa en la corteza (52). Pare -
ce ser que se encuentra diluido en agua y rodeado por una capa
deshidratada. Esto sería compatible con las propiedades físicas
de la espora y los análisis de humedad. Aquí la pregunta sería
¿Cuál es el mecanismo que asegura la distribución heterogénea
de agua y el mantenimiento de ésta? Se cree que el mecanismo -
responsable es simple ósmosis (53). La corteza que contiene -
péptidoglicano electronegativo, normalmente contiene iones car -
gados positivamente, la cubierta debe estar en un equilibrio -
osmótico con la corteza, y los iones que presenta son por lo -
general de peso molecular elevado por lo que su relación carga -
masa es baja y son pobres contribuyentes al equilibrio osmótico,

así para lograr el equilibrio el agua fluirá a la corteza (51). Se han hecho experimentos adicionando cationes multivalentes, que reducirían la actividad osmótica de la corteza y por lo tanto también reducirían la deshidratación de la cubierta y se ha visto que las esporas se hacen termosensibles (53).

Por mucho tiempo se pensó que el ácido dipicolínico, metabolito propio de la espora, tenía un papel central en la termorresistencia, pero la presencia de cepas mutantes termorresistentes, carentes de este ácido elimina esta posibilidad (145, 57), e incluso también involucrar al calcio en la termorresistencia, pues el contenido de calcio en estas mutantes es bajo.

Este modelo difiere del tradicional que consideraba a la espora como una célula condensada, deshidratada y cubierta por una capa impermeable, convirtiendo a la espora en una forma flexible, capaz de responder a los cambios externos, sobre todo a aquellos que modifiquen sus propiedades osmorreguladoras. Así uno puede predecir que las esporas con mayor termorresistencia sean aquellas que tengan mayor concentración de grupos carboxilo en sus cortezas. Hecho que se ha observado, pues la corteza con mayor cantidad de ácido diamino pimélico suele pertenecer a esporas con mayor termorresistencia (96).

EVENTOS
MORFOLÓGICOS
DE
LA
ESPORULACION

Por conveniencia, el principio de la esporulación ha sido definido como el final de la fase de crecimiento logarítmico (11, 27). Los cambios citológicos que ocurren durante la esporulación fueron descritos inicialmente en *Bacillus cereus* (13) y posteriormente se observaron cambios similares en otras especies (15, 35, 40). Estos cambios citológicos han sido divididos en siete estados con base en observaciones hechas - en el microscopio electrónico (10).

El final de la fase de crecimiento logarítmico (estado 0) es rápidamente seguido por la formación de un filamento de cromatina condensada dispuesto axialmente (estado I) como se muestra en la secuencia general de la esporulación en la figura 5, este filamento es contrastante con los cuerpos nucleares dispersos característicos de las células en crecimiento. Las condiciones en las cuales el cromosoma se hace filamentososo parecen no involucrar la síntesis de DNA o de proteínas (87) - lo que hace pensar que este cambio es provocado por determinadas condiciones físicas propias del estado final del crecimiento. Un hecho que apoya lo anterior es el que no se tengan mutantes incapaces de formar este filamento axial, lo que indica que no es un evento dirigido directamente por la maquinaria celular, se ha propuesto que la pérdida de cationes en el interior de la célula produzca este arreglo cromatínico, sin embargo, la adición de cationes no modifica esta estructura (87).

A continuación se inicia la formación de un septum - cerca de uno de los polos de la célula. El estado II consiste en la formación del septum que origina la segregación del material nuclear en dos compartimientos llamados célula madre y unidad citoplásmica esporal. Esta unidad ocupa un volumen equivalente a el 20% de la célula vegetativa aproximadamente - ('26).

Para la formación del septum asimétrico de la espora existen dos modelos que intentan explicarla. El primero supone la migración de uno de los mesosomas preexistentes en la parte central de la célula a uno de los polos. Esto parece poco probable por dos razones: la primera es que los mesosomas de las esporas son, por lo menos al principio de la esporulación, muy pequeños si se les compara con los de células en crecimiento y la segunda razón es que se han visto mesosomas recién formados encontrándose presentes los de la célula en crecimiento en sus posiciones características. El segundo modelo sugiere que el mesosoma de la espora es formado *de novo* y su posición en la célula es consecuencia de la expansión del cromosoma en un filamento, lo que concuerda con el hecho de que los nuevos mesosomas suelen ser vistos cerca de los extremos del filamento nuclear.

Así el inicio de la esporulación se puede resumir - con la siguiente secuencia:

- 1) La reducción de la generación de energía y viabi-

lidad del ATP ocasiona un cambio en la concentración de cationes en el interior de la célula.

2) Las cargas negativas del DNA no pueden ser neutralizadas y se repelen entre sí ocasionando que el cromosoma se expanda de una forma compacta a un filamento.

3) Durante esta expansión que ocurre rápidamente, la unión del cromosoma con el mesosoma desaparece.

4) Los nuevos mesosomas son inducidos quizá por algún grupo del DNA que se encuentra en el extremo del filamento, en lugar de estar en el centro de la célula como es el caso de la célula vegetativa en donde el DNA se encuentra en forma compacta central.

5) El septum de la espora se empieza a desarrollar en uno de los extremos de la célula hasta producir una división total entre la célula madre y la unidad citoplásmica esporal.

Cuando el septum está completamente formado por la fusión de la membrana plasmática, se considera concluido el estado II de la esporulación.

A continuación se realiza un recubrimiento de la unidad citoplásmica esporal, también llamada protoplasto esporal este recubrimiento lo realiza la misma membrana plasmática debido al crecimiento direccional de ésta ocasionando la deposición de una segunda membrana en el protoplasto esporal como se muestra en la figura 6.

Figura 6



Invaginación de la membrana plasmática debido al cre
cimiento direccional de ésta sobre la superficie esporal.

Esta membrana depositada tiene la característica de ser invertida, es decir, la parte que normalmente es interna en la célula madre será externa en la espora. Esto significa que cualquier mecanismo membranal tendiente a la deposición de componentes de la pared celular que normalmente se excretan, quedarán atrapados entre estas dos membranas. Esto ocurre y se ve de visto que material proporcionado por la célula madre y por la espora se encuentra depositado, incluso se ha postulado que la pared de la espora está constituida por las excreciones del protoplasto esporal y la corteza de la espora por las de la célula madre (95).

El crecimiento direccional de esta membrana produce la invaginación del protoplasto esporal hasta que se fusionan los extremos crecientes de la membrana y el protoplasto se so
para de la membrana de la célula madre quedando libre dentro

de la célula madre, esta serie de fenómenos es lo que constituye el estado III de la esporulación.

El estado IV consiste en la formación de la corteza - de la spora que es el producto de la unión de compuestos excretados por ambas membranas como se mencionó anteriormente. Debido a que la spora se encuentra rodeada por una membrana - de polaridad invertida, los nutrientes celulares que requieren de un sistema específico de transporte tendrán dificultad para entrar a la spora, así la spora se encuentra aislada y su de sarrollo futuro dependerá exclusivamente del metabolismo endógeno.

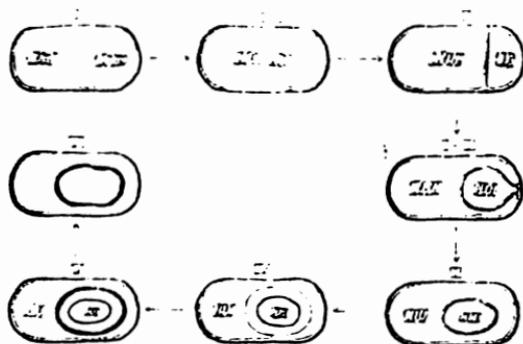
Durante el estado V tiene lugar la formación de la cu bierta de la spora y del exosporio. Durante esta etapa hay - gran incorporación de cisteína que es la que confiere la estruc tura a la cubierta, se cree que los polipéptidos que constituyen la cubierta se encuentran desde el estado III pero la in - corporación de cisteína es el evento determinante para el en - samble de dichos polipéptidos para dar origen a las estructu - ras mencionadas anteriormente (57).

Durante el estado VI ocurre la maduración de la spora que consiste en la aparición de la termorresistencia, quimio rresistencia y refractilidad, que están acompañados por la in - corporación de calcio y ácido dipicolínico.

El estado VII consiste en la liberación de la spora

madura debido a la autólisis de la célula madre. Parece ser que una enzima lítica es sintetizada o activada subsecuentemente a la maduración de la espora para liberar a ésta del esporangio (1944).

Figura 5



Esquema general de la esporulación mostrando los diferentes estados de ella.

EVENTOS
BIOQUIMICOS
DE
LA
ESPORULACION

La esporulación se inicia en una célula al final de la fase exponencial de crecimiento. Durante este periodo, llamado fase estacionaria debido a que las cantidades de proteína y ácidos nucleicos son constantes, la célula está muy distante de una verdadera fase estática. Ocurren modificaciones de proteínas y ácidos ribonucleicos con frecuencia y a velocidades muy elevadas (72), es decir, se encuentra en un estado de equilibrio que se caracteriza por la presencia de tres actividades celulares diferentes: Modificación de proteínas, modificación de ácidos ribonucleicos y aparición de enzimas propias de la espora.

Modificación de Proteínas

La observación de que en una célula, después del estado I pueda esporular en un medio sin nutrientes, ha hecho pensar que los aminoácidos necesarios para la síntesis de nuevas proteínas pueden provenir del rompimiento de proteínas celulares preexistentes (71). Esto originó una serie de investigaciones enfocadas a caracterizar con más detalle este fenómeno, así Monroe, R. E. en 1961 (92), con el uso de radioisótopos determinó que la proteína degradada en *Bacillus thuringiensis* era del 67%, donde también había un 52% de síntesis proteica. Resultados similares se han obtenido para *Bacillus subtilis* (73). Así uno se podría preguntar si es necesaria -

una gran actividad de modificación proteica para que se realice la esporulación. Como lo indica la Tabla V la mayoría de las especies de *Bacillus* presentan una alta velocidad de modificación proteica durante la esporulación. Una excepción a esta regla se ha encontrado en *Bacillus brevis* donde la modificación proteica es poca y no se ha detectado la producción de enzimas proteolíticas extracelulares. Estos resultados indican que una alta velocidad de modificación proteica no es absolutamente necesaria para que se lleve a cabo la esporulación, sin embargo, este bajo porcentaje de modificación encontrado en *Bacillus brevis* quizá juegue un papel importante en la esporulación.

Tabla V

Microorganismo	% de degradación por hora	Referencia
<i>Bacillus brevis</i>	1,6	125
<i>Bacillus cereus</i>	7.0	135
<i>Bacillus cereus</i>	6.0	3
<i>Bacillus licheniformis</i>	20.0	12
<i>Bacillus subtilis</i>	8.0 - 10.0	11
<i>Bacillus subtilis</i>	10.0	127
<i>Bacillus thuringiensis</i>	10.0	62

Velocidad de modificación proteica durante la esporulación en distintas especies de *Bacillus*.

La degradación de las proteínas celulares es producida por enzimas proteolíticas que pueden ser extracelulares o intracelulares cuya producción ocurre durante las etapas tempranas de la esporulación. Las más conocidas a la fecha son las extracelulares debido a su gran utilidad práctica antes mencionada. Las principales proteasas extracelulares producidas durante la esporulación se presentan en la Tabla VI.

Tabla VI

Microorganismo	Tipo de proteasa extracelular
<i>Bacillus subtilis</i>	Serina Proteasa Alcalina Metal Proteasa Neutra Serina Esterasa Serina Proteasa Acida
<i>Bacillus megaterium</i>	Metal Proteasa Neutra
<i>Bacillus cereus</i>	Metal Proteasa Neutra
<i>Bacillus licheniformis</i>	Metal Proteasa Neutra Serina Proteasa Alcalina

Diversos tipos de proteasas extracelulares producidas por especies del género *Bacillus* durante las primeras etapas de la esporulación.

Referencia (7).

Las proteasas extracelulares no parecen tener un papel significativo en la esporulación, ya que se han obtenido algunas mutantes de varias especies que no producen estas enzimas y sin embargo son capaces de esporular (3, 20), ésto no quiere decir que la función intracelular de estas enzimas no sea esencial, ya que se ha observado que bajas cantidades de ellas se encuentran dentro de estas mutantes.

Existen también proteasas intracelulares a las que últimamente se les ha dado mayor importancia en la esporulación, ésto es debido a que las enzimas extracelulares no actúan directamente sobre las estructuras internas de una célula, así podríamos esperar que las enzimas directamente responsables de la modificación proteica fueran las intracelulares, pero hay que considerar que las enzimas extracelulares provienen del interior de la célula y en su trayecto al exterior, realizan funciones similares a las de las enzimas intracelulares.

En *Bacillus subtilis* se han aislado varias enzimas proteolíticas intracelulares (1^o, 105) que han sido caracterizadas según los sustratos sobre los que actúan, pesos moleculares, inhibidores, etc., pero ésto no ha podido correlacionarse en forma precisa con las modificaciones proteicas de la esporulación, sin embargo, el estudio de estas enzimas puede contribuir considerablemente al entendimiento de la modificación proteica, pues conociendo los sustratos, inhibidores y

demás efectores que pueden actuar sobre estas enzimas, se pueden predecir cambios en proteínas presentes de estructuras conocidas,

Durante la esporulación se ha observado la formación de una inclusión proteica de forma bipiramidal regular que presenta patogenicidad contra algunas larvas de insectos. A estas inclusiones proteicas se les ha llamado "cristales", compuestos de proteína, carentes completamente de ácidos nucleicos y de carbohidratos. Estos cristales no se han podido observar en células vegetativas y sin embargo, no se forman en ausencia de aminoácidos, lo que sugiere que provienen de la modificación proteica antes mencionada, o bien que durante dicha modificación se producen aminoácidos que pueden formar estas nuevas estructuras (92).

Modificación del RNA

Algunos cambios entre las cantidades y tipos de RNA se realizan durante la esporulación. Se ha observado que la síntesis total de RNA disminuye considerablemente durante la fase estacionaria de crecimiento y el inicio de la esporulación (125), esto es parte del metabolismo normal del RNA al final de la fase de crecimiento, como producto de los rearrreglos nucleares que preceden a la esporulación. La gran disminución del contenido de RNA durante la esporulación puede resultar por la desnatura-

lización y ruptura de polisomas 100 S y RNA mensajeros de la célula madre (95).

A pesar de que el contenido total de RNA disminuye, algunas fracciones de RNA son modificadas o resintetizadas; se ha visto que el RNA marcado idotópicamente de un organismo esporulante, pierde esta marca cuando es cambiado a un medio sin isótopos (105). Experimentos con precursores del RNA radiactivos, han mostrado también que nuevos RNAs son sintetizados a partir de éstos (59) y a partir de la degradación de productos preexistentes (5).

La cantidad de RNA presente en la etapa de crecimiento logarítmico disminuye hasta hacerse una fracción minoritaria respecto al RNA formado en fase estacionaria. La velocidad relativa de síntesis de los tres tipos de RNA existentes, es igual durante la esporulación que durante el crecimiento vegetativo (9); la degradación preferencial del RNA ribosomal produce un enriquecimiento del RNA de transferencia, esta degradación se ha calculado del orden del 20% por hora.

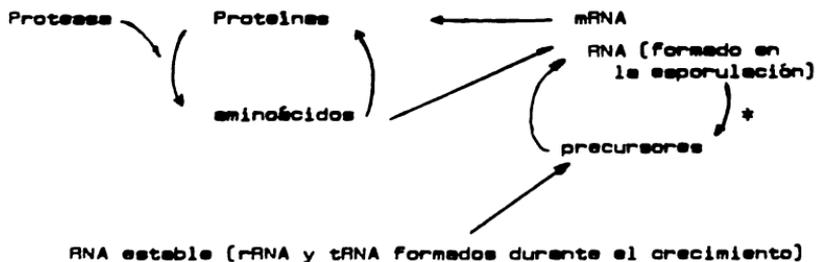
En cepas silvestres de *Bacillus subtilis*, la síntesis del RNA durante la esporulación depende de la presencia de aminoácidos, por lo que la síntesis del RNA puede depender de la acción indirecta de las enzimas proteolíticas.

El antibiótico cloramfenicol produce un aumento en la síntesis del RNA, medido por incorporación de uracilo radiac-

tivo (7 , 6), ésto indica que los aminoácidos son inductores de esta síntesis durante la esporulación, pues este antibiótico no permite la síntesis de proteínas y consecuentemente provoca un aumento en las pozas de aminoácidos.

El RNA mensajero formado durante la esporulación es modificado parcialmente (5 , 6), las partes modificadas de este RNA pueden provenir de las fracciones del RNA ribosomal degradado. Se ha propuesto el esquema representado en la Figura 7 para explicar la interrelación entre la modificación del RNA y las proteínas.

Figura 7



* Control por retroalimentación.

En este modelo la síntesis del RNA sería controlada por la cantidad de aminoácidos libres, producto de la acción de enzimas proteolíticas sobre estructuras dispensables para la espora. La velocidad de la síntesis de proteínas sería de -

pendiente de la cantidad de RNA mensajero formado, que a su vez dependería de la cantidad total de RNA de la espora. La degradación de RNA puede estar controlada por retroalimentación de los productos de degradación de ella. Así, la síntesis de las proteasas puede controlar la velocidad de degradación del RNA y de las proteínas durante la esporulación.

Modificación del RNA mensajero.

Durante la esporulación se forma RNA mensajero para las funciones propias de la espora y también para las funciones vegetativas. Si al inicio de la esporulación se agrega un racilo marcado radiactivamente, existe incorporación de radiactividad en las fracciones 8S y 14S, que son las correspondientes al RNA mensajero (1,2). Si se agrega actinomicina D, inhibidor de la RNA polimerasa dependiente de DNA, única enzima productora de RNA mensajero, se encuentra la presencia de RNA mensajero al final de la esporulación, pero en menor cantidad la mayoría de éstos desaparecen después de 1.5 minutos de la adición del antibiótico, tiempo similar al obtenido para RNA mensajero de células vegetativas (5), se ha dicho que este RNA mensajero remanente que es aproximadamente el 10% del total corresponde a genes específicos de la esporulación, el resto es degradado por eventos inespecíficos de la esporulación.

Modificación del RNA de transferencia

Esta fracción permanece presente a lo largo de la esporulación en la espora madura, la relación tRNA-rRNA aumenta durante la esporulación desde 17% hasta 31% en las esporas (24). En los perfiles cromatográficos de los RNAs de transferencia de las células vegetativas y de las células esporulantes existe una ausencia completa de simetría que sugiere una diferencia cualitativa respecto a estas dos poblaciones, es aquí donde es más notoria la modificación del RNA durante la esporulación.

Modificación del RNA ribosomal

La población total de ribosomas decae en forma constante durante la esporulación. El número de partículas 100S decrece considerablemente, las partículas 70S perduran hasta el final de la esporulación (95). Las células empiezan la formación de esporas ampliamente equipadas de ribosomas, proteínas nacientes son sintetizadas en los ribosomas durante las últimas etapas de la formación de la corteza esporal mostrando la presencia y la actividad de los ribosomas (95).

Enzimas propias de la espora.

Diversas actividades enzimáticas han sido detectadas en las esporas, estas actividades representan a enzimas involu-

cradas en muchos aspectos del metabolismo incluyendo vías biosintéticas y degradativas como se puede ver en la Tabla VII. - La presencia de estas actividades indica que el estado latente de la espora no se debe a la falta de enzimas, sino a la condición de estas enzimas en la espora. Respecto a ésto, es interesante que algunas enzimas como la catalasa (77), alanina racemasa (129), adenosina desaminasa (104) y ribosidasa (104), que son activas en esporas intactas, se sabe que están localizadas en la parte externa de la espora (7).

Tabla VII.

Acetoacetil CoA reductasa	Fumarasa
Aconitasa	Glucosa deshidrogenasa
Adenosina desaminasa	Transaminasa ala-glu
Alanina racemasa	transaminasa asp-glu
Fosfatasa alcalina	Deshidrogenasa málica
α -Amilasa	Ornitina transaminasa
Arginasa	Ornitina transcarbamilasa
2,3-Butanodiol deshidrogenasa	Fosfodiesterasa
Enzima condensante de citrato	Proteasas
Diacetil reductasa	Purina nucleósido fosfo-
Oxidasa del ác α, ϵ -dicetopimélico	rilasa
Sintetasa del ác. dipicolínico	Pirrolin-5-carboxilato
DPNH deshidrogenasa	deshidrogenasa
DPNH oxidasa	Ribosidasa

Enzimas de rápido aparecimiento y aumento significativo durante la formación de la espora, quizá involucradas en la

Existen también algunos ejemplos como las enzimas involucradas en la oxidación de glucosa, que son detectables en esporas intactas después de activarlas con calor o por tratamientos químicos (55), y que incluso muestran gran actividad en extractos de esporas que han sido previamente calentados. - Estas enzimas están presentes en la espora pero no son accesibles para el sustrato, a menos que las esporas hayan sido activadas.

El gran número de actividades enzimáticas encontradas en las esporas no ha sido comparado con las actividades correspondientes en las células vegetativas, una de las dificultades en hacer ésto es el estado de crecimiento en el que están dichas células, pues se sabe que los niveles enzimáticos cambian en forma notable durante las diferentes fases del crecimiento. Sin embargo, los niveles de varias enzimas de esporas permanecen inalterables durante el inicio de la esporulación e incluso durante la fase logarítmica de crecimiento (72).

Diversas enzimas están presentes en la fase de esporulación en niveles considerablemente mayores que en células en fase de crecimiento logarítmico y sin embargo, son prácticamente indetectables en extractos de esporas ya maduras (Tabla VIII) Estas enzimas incluyen a las involucradas en el transporte de electrones (33), las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (34) y la ornitina transcarbamilase (73).

Tabla VIII

Aconitasa	Fumarasa
Aspartato transcarbamilasa	Isocitrato deshidrogenasa
Citocromos	Malato deshidrogenasa
DPNH citocromo C reductasa	Ornitina transcarbamilasa
DPNH oxidasa	Succinato citocromo C reductasa

Enzimas cuyos niveles son bajos o no existen en las esporas maduras, algunas de estas enzimas aparecen pero sólo durante la formación de la espora, después desaparece su actividad.

Referencia (72).

La ausencia de citocromos y enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos es particularmente interesante, pues indicaría la existencia de una vía alterna para el metabolismo energético aerobio en las esporas.

Durante mucho tiempo se pensó que las enzimas presentes en las esporas eran diferentes de sus equivalentes en las células vegetativas, esto se basaba en las siguientes evidencias: (a) Las enzimas en la espora soportan temperaturas que destruyen a las actividades correspondientes en células vegetativas, (b) Genes específicos son requeridos para la esporulación (c) Extractos de enzimas de esporas tienen propiedades que los hacen fácilmente distinguibles de sus correspondientes activi-

dades en células vegetativas. Estas implicaciones motivaron investigaciones para identificar en forma detallada a las enzimas de las esporas y a hacer reevaluaciones de los trabajos existentes.

Actualmente en la mayoría de los casos, el aumento en la termorresistencia de una enzima esporal puede ser explicado por diversas maneras. La estabilidad a la temperatura de la enzima alanina racemasa de *Bacillus cereus* se mostró que es debido a que se encuentra adherida a partículas que probablemente pertenecan a la pared celular, ya que la liberación de esta enzima de dichas partículas la convierte en una enzima idéntica a la de las células vegetativas (137). Otro mecanismo para explicar la termorresistencia de las enzimas esporales es el que se presenta en el caso de la enzima glucosa deshidrogenasa de *Bacillus cereus*, esta enzima presenta una interconversión monómero-dímero, la especie monomérica presenta un aumento de 260 veces - su termorresistencia respecto a la dímérica, además si se incrementa la concentración de sales en el medio de reacción, la termorresistencia se incrementa un millón de veces (110). Otro ejemplo sobre la influencia de iones en la estabilidad es el de la enzima aldolasa, que en presencia de calcio la enzima se hace termorresistente (112).

Estos resultados sugieren que las actividades enzimáticas en las células vegetativas y en las esporulantes residen en -

proteínas idénticas. Un experimento concluyente sobre esto sería la obtención de cepas mutantes en los genes estructurales de alguna de las enzimas en cuestión y determinar si esta en z i m a desaparece o se modifica en los dos casos.

Con los conceptos antes mencionados y con el conocimiento de la aparición cronológica de las enzimas durante la esporulación se ha tratado de dar un enfoque mas concreto e in te g r a l a los eventos bioquímicos de la esporulación con la apa ri ci ó n de las diversas estructuras que constituyen a la espora

GENETICA
DE
LA
ESPORULACION

La facilidad con que se encuentran las cepas mutantes incapaces de esporular y la viabilidad de técnicas de transducción y transformación en *Bacillus subtilis* han facilitado los estudios genéticos de la esporulación. El método de selección de dichas mutantes ha sido en base a las pigmentaciones de las colonias y a su morfología en general, ya que suelen ser de tamaño mayor, albinas y de apariencia traslúcida. Sin embargo, existen células incapaces de esporular o que esporulan deficientemente (llamadas oligoesporogénicas) y producen pigmentos (62).

Las mutantes incapaces de esporular han sido definidas por el último estado morfológico de la esporulación que son capaces de llevar a cabo, así sus fenotipos son designados como Spo0, SpoI, SpoII, etc., indicando que únicamente alcanzan el estado 0, I, II, etc., de la esporulación. Existen también mutantes para un determinado estado de la esporulación pero afectadas en diferentes funciones, para éstas, sus fenotipos son designados con una letra minúscula después del fenotipo original, por ejemplo: Spo0a, Spo0b, Spo0c, etc., donde a, b, c, indican un fenotipo diferente de una mutantes afectadas en el estado 0.

Estas mutantes se han clasificado en dos tipos la cronología de la afección que presentan, estos dos tipos son los siguientes; Mutantes afectadas en los genes tempranos de la es

porulación y Mutantes afectadas en los genes tardíos de la esporulación.

Mutantes afectadas en los genes tempranos de la esporulación

La complejidad de los estados tempranos de la esporulación está demostrada por el hecho de que se han mapeado muchos de estos estados en nueve loci diferentes (31), que se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma de *Bacillus subtilis* sin un orden aparente en el cromosoma, para estos casos no se han encontrado loci extracromosomales. Las mutaciones Spo0 resultan por lo general en efectos pleiotrópicos tales como la pérdida de la producción de antibióticos y proteasas extracelulares.

La naturaleza pleiotrópica de estas mutantes ha sido ampliamente estudiada (66, 67) indicando que algunas funciones de la membrana pueden estar afectadas por alguna de estas mutaciones. Esto se demostró colocando a las células en presencia de antibióticos o fagos y seleccionando a las resistentes a ellos, el hecho de cambiar ambos patrones de resistencia en una misma mutante se le ha atribuido a modificaciones membranales.

Se han hecho análisis de las proteínas unidas al DNA de células silvestres y de mutantes bloqueadas en los pasos iniciales de la esporulación, en éstos se ha encontrado que la

cantidad de proteínas es mayor en las mutantes que en las células silvestres (16). Además se ha visto que una supresión de la mutación en *spoA* previene el acúmulo de estas proteínas. Esto se ha visto en células vegetativas, lo que indica que los genes *spo0* son funcionales no sólo durante la esporulación, sino a lo largo del crecimiento vegetativo. Como la primera evidencia morfológica de la esporulación es la aparición del septum asimétrico y esto se trata quizá de una modificación del ciclo normal de división celular, sería factible involucrar a estos genes en las funciones normales de la membrana. La naturaleza pleiotrópica de estas mutantes puede explicarse como una consecuencia del desarreglo total de la membrana, sin excluir la posibilidad de que los productos de estos genes sean reguladores que afecten la expresión de genes de aparición posterior cuya presencia sea indispensable para la esporulación.

Mutantes afectadas en los genes tardíos de la esporulación

En el transcurso de tiempo entre el estado II y el V ocurren diversos eventos bioquímicos y morfológicos que pueden ser utilizados para determinar el fenotipo de las mutantes que se obtengan. Estos marcadores pueden ser la síntesis de las enzimas fosfatasa alcalina, glucosa deshidrogenasa, y la aparición del ácido dipicolínico, así como la resistencia a productos químicos y al calor (17,18). Los marcadores citológicos pueden ser la invaginación de la membrana, la formación de

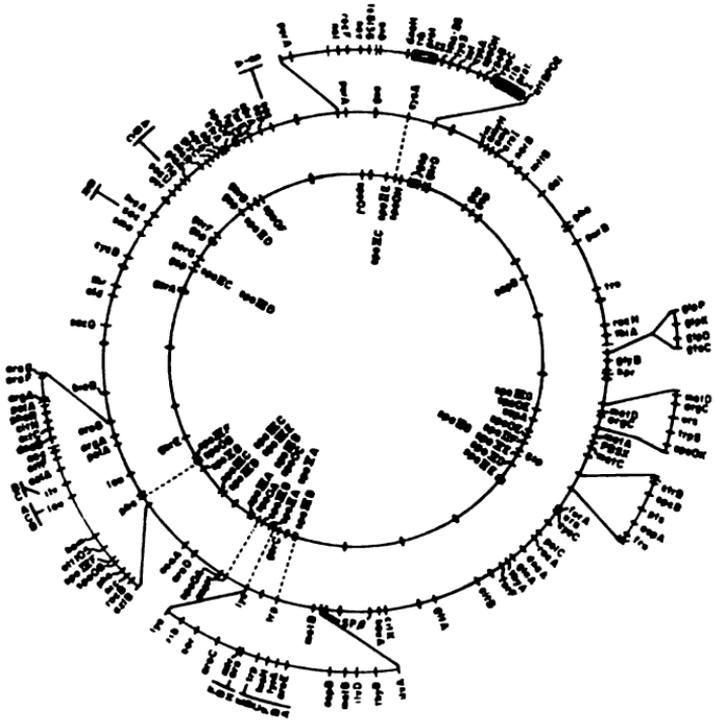
la corteza, etc.

Existen varios loci para los diferentes estados de la esporulación, se conocen por lo menos siete para el estado II, cinco para el estado III, siete para el estado IV y cinco para el estado V (103). Estos se encuentran distribuidos a lo largo del cromosoma, sin embargo, hay un conjunto particularmente largo localizado entre el segmento comprendido entre los genes *phe* y *lys* como se muestra en la figura 8, y otro conjunto ligeramente menor entre los genes *metD* y *ura*. Un análisis de la secuencia de estos genes en el mapa no presenta relación entre la proximidad al origen de replicación y la secuencia de aparición de ellos. En el caso de estas mutaciones la variabilidad respecto a la naturaleza pleiotrópica es muy grande, existen cepas incapaces de formar ácido dipicolínico y sin embargo forman esporas termorresistentes (145), lo que indicaría que en los genes tardíos de la esporulación ya no parece ser determinante la aparición secuencial de eventos.

Se ha sugerido que la agrupación de genes pueda estar funcionalmente relacionada con la estructura del nucleóide bacteriano. Esta estructura es tal que las áreas de alta densidad génica son más accesibles a los mecanismos de transcripción de la célula. Una agrupación específica de genes de esporulación en una región diferente de donde se encuentran funciones esenciales para el crecimiento de la célula puede ser interpretado

como una evidencia de que la estructura del nucleóide es dinámica y la facilidad de modificar su configuración le confiere una versatilidad que puede estar involucrada en algún papel - regulador.

Figura 8



Mapa genético del cromosoma de *Bacillus subtilis*, el mapa interno comprende las funciones relacionadas con la esporulación.

REGULACION
DE
LA
ESPORULACION

Control de la iniciación de la esporulación.

Es razonable esperar que compuestos que proporcionen energía o amonio en forma ineficiente sean pobres inhibidores de la esporulación. Esto concuerda con el fenómeno de represión catabólica reportado para el operón de lactosa en *Escherichia coli* y el operón *hut* de *Klebsiella aerogenes*. Sin embargo, la ausencia de AMP cíclico y de adenilato ciclasa en el género *Bacillus* (319), elimina a estos operones como modelos para explicar el efecto de glucosa y fuentes de carbono. Similarmente el hecho de que la enzima glutamina sintetasa de *Bacillus* no presenta las alteraciones de estructura y actividad que determinan su función y modelo regulatorio en Gram negativas, significa que el control de la esporulación por compuestos que tienen nitrógeno, no es comparativo con el modelo tradicional de la regulación nitrogenada.

Dada la variedad de condiciones que ocasionan la esporulación y la gran variación de las pozas de metabolitos bajo condiciones diferentes de esporulación (35), parece poco probable que un solo compuesto sea el efector de la represión de la esporulación. En *Bacillus megaterium*, glutamina o un derivado de ella puede ser el efector de nitrógeno, pues en una mutante auxótrofa de glutamina no se reprime la esporulación

por amonio (37). La represión se presenta por la adición de glutamina y no por glutamato, lo que indica que un inhibidor de la esporulación debe ser convertido a glutamina o a un derivado de ella para ser el efector verdadero. Las cepas mutantes que requieren glutamina que escapan a la represión por glutamina, están bloqueadas para la producción de 5-amino imidazol ribonucleótido, que es un precursor de la biosíntesis de purinas. Debido a que la represión en las cepas mutantes $gln^- pur^-$ fue restablecida sólo por la adición de glutamina y de purinas se puede sugerir que derivados de glutamina y de purinas se requieren simultáneamente como efectores catabólicos.

Las purinas y pirimidinas en general, pueden servir simultáneamente como controladores de carbono, nitrógeno y fósforo, esto se ha comprobado, ya que cultivos en donde se limita la producción de purinas y pirimidinas en *Bacillus subtilis* mediante el uso de cepas mutantes o por el empleo de inhibidores de la biosíntesis de éstas, se induce la esporulación durante la fase de crecimiento (122). Además se ha visto que mutantes de *Bacillus cereus* que esporulan en presencia de glucosa, son cepas que requieren de purinas y pirimidinas para su crecimiento (), otro hecho que implicaría la presencia de purinas y pirimidinas en la regulación de la esporulación, sería la observación de que cambios en los niveles de ATP y carga energética, se sabe que acompañan al proceso de esporulación (64).

Buscando efectores para carbono, se ha encontrado que el malato y compuestos relacionados inhiben fuertemente la esporulación (98), sin embargo, cepas mutantes que carecen de la enzima malato deshidrogenasa, aunque son reprimidas por glucosa, no se reprimen por malato (98), sugiriendo que el oxalacetato producido intracelularmente es una fuente de represor. Una cepa mutante, resistente a la represión por malato, se encontró que no es deficiente en las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (99), aquí sería importante ver si esta cepa presenta la enzima fosfoenol piruvato carboxiquinasa en forma normal y si la inactivación de esta enzima previene la represión, esta enzima está sujeta a represión por glucosa y representa la vía principal para la gluconeogénesis(29).

Hasta ahora sólo se ha considerado que los posibles inhibidores de la esporulación actúen directamente, es decir, que produzcan un efecto negativo sobre los genes de la esporulación, sin embargo, también es posible que actúen previniendo la síntesis de compuestos que enciendan los genes de la esporulación. Sobre esto, sería importante considerar que tetra- y hexafosfatos de adenosina se acumulan durante las etapas iniciales de la esporulación (108). A pesar de que la exigencia de estos compuestos está bien establecida, poca información existe sobre su efecto en la esporulación. Se ha sugerido su papel como efectores regulatorios debido a que cepas mutantes afectadas en el o los genes estructurales de las enzimas -

involucradas en su biosíntesis, no son capaces de esporular eficientemente (108).

Ciclo de los ácidos tricarbóxicos. Represión Catabólica y Esporulación

El funcionamiento del ciclo de los ácidos tricarbóxicos es esencial para proporcionar energía y esqueletos de carbono para la síntesis de aminoácidos, especialmente glutamato durante la esporulación (144). Las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos no son específicas de la esporulación, normalmente se encuentran en bajos niveles, incluso en células creciendo rápidamente en un medio con glucosa, amonio y fosfatos. Sin embargo, la inducción de las enzimas del ciclo se lleva a cabo junto con la inducción de la esporulación, bajo condiciones de limitación de carbono, nitrógeno y fósforo, esto indica que lo que causa la inducción de las enzimas del ciclo al final del crecimiento, está también regulando la iniciación de la esporulación, aunque cabe mencionar que algunas condiciones favorables para la inducción de las enzimas de este ciclo pueden ser desfavorables para la esporulación. Esta diferencia hace notar que el estudiar a la esporulación mediante el comportamiento de sistemas enzimáticos no específicos de ella puede ser erróneo y no concluyente. Si bien es cierto esto, también hay que mencionar que sólo un pequeño número de proteínas de función conocida -proteína de la cubierta de la espora, enzima

formadora de la corteza y sintetasa del ácido dipicolínico- se han visto que está ausentes en la célula vegetativa, muy poco o ningún análisis genético existe en estas funciones, y además estas no se expresan al inicio de la esporulación, por lo que el análisis de su regulación no se podría relacionar con el del inicio de la esporulación, con lo que parece mas razonable analizar cualquier gene en el que se modifique su expresión al inicio de la esporulación.

La síntesis de la aconitasa y de la citrato sintetasa es reprimida por glucosa y otras fuentes de carbono fácilmente metabolizables, para que esta represión sea completa debe estar presente glutamato o un derivado (56), lo mismo sucede para la enzima isocitrato deshidrogenasa. Este control asegura la producción de glutamato cuando glucosa está presente y previene la expresión génica innecesaria cuando la biosíntesis de glutamato no se requiere. El catabolito de carbono que produce la represión de las enzimas del ciclo de los ácidos tricarbóxicos no se ha identificado pero se ha visto que la represión de la enzima acetoina deshidrogenasa por glicerol se revierte en una cepa mutante que carece de la función glicerol-1-fosfato deshidrogenasa (85), lo que indicaría que el fosfato de dihidroxiacetona puede ser el represor, obien un intermediario de la síntesis del mismo.

Glutamina Sintetasa

La enzima glutamina sintetasa, determinante de la asimilación de amonio, juega un papel clave en la regulación del metabolismo nitrogenado en algunas bacterias Gram negativas. - Específicamente se ha propuesto que la forma no adenilada, enzimáticamente activa de esta enzima en *Klebsiella aerogenes*, tiene un efecto estimulador en la transcripción de su propio gene (110) y de operones cuyos productos génicos proveen amonio por el catabolismo de aminoácidos y otros productos. Esta misma enzima puede tener un efecto negativo en la transcripción de otros genes. Ya que la adenilación de esta enzima es estimulada cuando amonio está presente, la expresión de estos genes responde al contenido de amonio. En el caso de la glutamina sintetasa de *Bacillus*, no se sabe que exista mas de una forma, y ésta no es sustrato de adenilación (28), sin embargo, su papel clave en el metabolismo nitrogenado, la hace un blanco en los estudios de regulación.

A la glutamina sintetasa se le han adjudicado dos papeles en la regulación de la expresión génica de *Bacillus*. Debido a que la gran mayoría de mutantes de *Bacillus megaterium* y por lo menos una de *Bacillus subtilis* que requieren glutamina para crecer, esporulan deficientemente (107), se ha sugerido que se requiere de esta enzima para activar los genes de la población (14). Por otra parte se ha dicho que la enzima glu

glutamina sintetasa puede ser un regulador negativo de la expresión génica (39), ésto se debe a que mutantes capaces de esporular que requieren de glutamina son hiperproductoras de histidasa y aconitasa bajo condiciones de represión catabólica (39). Existen también mutantes que carecen de la actividad de glutamina sintetasa que no muestran estos efectos pleiotrópicos, tanto para esporulación como para histidasa (26).

A pesar de estos hechos contradictorios, la glutamina sintetasa podría ser un buen modelo en la regulación del metabolismo celular de la esporulación, no sólo por su situación determinante en la asimilación de amonio y desasimilación de esqueletos de carbono, sino por ser una protefina capaz de identificar simultaneamente las cantidades de amonio y energía, pues amonio y ATP son sustratos de esta enzima, además de que glutamina y nucleótidos de purinas han sido implicados como posibles efectores de la esporulación (28) y se sabe que estos productos inhiben sinérgicamente la actividad de la glutamina sintetasa en *Bacillus*.

Control de la transcripción

Una minoría de los genes de *Bacillus subtilis* son específicos para el estado vegetativo o para el esporulante. En experimentos de hibridización se ha visto que cerca del 25% -

transcritos por células vegetativas (131), además, si genes diferentes son expresados durante la esporulación en medios diferentes, el número de genes que son específicos de la esporulación y deben ser expresados bajo cualquier condición, es menor. Se ha mostrado también que estas especies de RNA esporulante se encuentran presentes en la fase estacionaria de una cepa mu tante incapaz de iniciar la esporulación (102). Estos resultados sugieren que el número de genes específicos de la esporulación no es tan elevado como se piensa, hay que notar que estos experimentos de competencia e hibridización pueden ser usados para demostrar cualitativamente las diferencias entre la poblaciones de RNAs pero no permite estimar las diferencias entre las velocidades de transcripción de ellas. Así un RNA transcrito a baja velocidad en células vegetativas puede estar presente en cantidades suficientes para competir con transcritos hechos a velocidades altas en células esporulantes. Para tener una idea clara del control transcripcional durante la esporulación, es necesario medir la velocidad de transcripción de especies individuales de RNA mediante el uso de marcadores radiactivos aplicados en períodos cortos de tiempo en un gene específico para la hibridización. Esto se ha hecho recientemente mediante la clonación de un fragmento de DNA de *Bacillus subtilis* que contiene dos genes de esporulación en *Escherichia coli* (117). Este DNA amplificado se ha usado para demostrar que dos especies de RNA transcritas durante la esporulación, no lo ha-

Un tipo de RNA para el que ha sido posible medir la velocidad de transcripción en células esporulantes y vegetativas es el RNA ribosomal, ésto se ha hecho midiendo la incorporación de RNA ribosomal marcado isotópicamente en ribosomas (102), donde se vió una velocidad de incorporación 20 veces mayor en células vegetativas respecto a células esporulantes.

Regulación por RNA polimerasa.

La RNA polimerasa dependiente de DNA tiene la propiedad de reconocer y unirse a sitios promotores del DNA, su habilidad de iniciar y terminar la síntesis de RNA es por lo general, modulada por protefmas que interactúan con la enzima. El reconocimiento y la unión al promotor se debe, por lo menos en forma parcial a la función de la subunidad σ de la RNA polimerasa (22), con base en ésto, se ha propuesto que cambios en la RNA polimerasa en especial del factor σ , pueden ser responsables de la alteración de la especificidad transcripcional (19). Se ha tratado de transcribir DNA del fago ϕ e cuya transcripción es altamente dependiente del factor σ (123) con RNA polimerasa extraída de células esporulantes y se ha visto que la habilidad de transcripción disminuye, por lo que se ha propuesto que la RNA polimerasa de células esporulantes tiene un factor de iniciación diferente de σ o incluso que no requiere de un factor de iniciación. Si ésto es cierto, la velocidad de

transcripción en la esporulación, es determinada sólo por las afinidades de los promotores específicos de la esporulación - con la RNA polimerasa.

Actualmente se sabe que la actividad del factor σ - disminuye después de que la célula deja de crecer (17, 18) y durante la esporulación, el factor σ persiste pero es inactivo (134). Cabría aquí pensar en la proteólisis del factor σ , sin embargo, la modificación de este factor es reversible, - pues se ha visto que si se para la síntesis de proteínas con un inhibidor específico de procariotes, la proteína σ se restablece (118). También se ha visto que mientras el factor σ - está inactivo, la RNA polimerasa de células esporulantes se - une a polipéptidos ausentes en células vegetativas, éstos son por lo menos dos cuyos pesos moleculares son 85 000 (83) y - 27 000 (45), estos polipéptidos no restablecen la función de σ , pero tampoco existe evidencia de que le confieran a la RNA polimerasa propiedades diferentes de reconocimiento hacia alguna fracción de DNA.

Se ha propuesto que la RNA polimerasa se modifica en las subunidades α y β' por proteasas, pero se demostró que en un sistema de transcripción de esporulación, usando el fago - ϕ e como templado se restablece la transcripción al agregar el factor σ .

En el caso de *Bacillus thuringiensis*, se han observado

cambios secuenciales en los patrones de movilidad electroforética del factor σ , y de las subunidades α y β' de la RNA polimerasa, además de la aparición de nuevas proteínas (69), sin embargo, no se le han adjudicado funciones transcripcionales a estas nuevas proteínas (69).

Se ha propuesto también que la gramicidina, un antibiótico producido durante la esporulación de *Bacillus brevis* tiene un papel en la regulación de la síntesis del RNA, este antibiótico que mata a las células vegetativas, inhibe parcialmente la actividad de la RNA polimerasa *in vitro*, interfiriendo con la formación del complejo DNA-enzima (113). Aunque la gramicidina se requiere para la termorresistencia de esporas que contienen ácido dipicolínico (94), no se sabe con certeza si su función *in vivo* sea la de modular la síntesis del RNA.

Mutantes de la RNA polimerasa.

El aislamiento y caracterización de mutantes con la actividad de la RNA polimerasa alterada, ha permitido hacer importantes comparaciones entre la enzima de células esporulantes y la de células vegetativas.

Casi todas las cepas mutantes de *Bacillus subtilis* resistentes a los antibióticos rifampina, streptovaricina, y streptolidigina, son capaces de esporular, normalmente no lo

hacen en presencia de estos antibióticos, se puede concluir, - que el gene que es mutado para conferir estas resistencias, co difica para un componente de la RNA polimerasa común a las células vegetativas y esporulantes (122). Por otra parte, la i - dentificación de mutantes que son deficientes en la esporula - ción a 37°C o a temperaturas mayores, permite concluir que la RNA polimerasa en las células esporulantes tiene alguna función diferente de la de las células vegetativas (76). En estas mu - tantes la función que parece estar afectada es la actividad - transcripcional, lo que quizá se deba a una mutación que afec - ta la interacción de polipéptidos en esta enzima. Un mecanismo específico ha sido propuesto para explicar la presencia de es - tas mutantes, es éste se considera que las subunidades mayores al ser afectadas se unen fuertemente al factor σ y no permiten su inactivación durante la esporulación (121).

El uso de una nueva droga llamada lipiarmicina, la - cual inhibe específicamente la RNA polimerasa dependiente del factor σ , ha mostrado que éste no se requiere para la expre - sión de los genes específicos de la esporulación (122), aunque no se demostró que esta droga entrara a la célula esporulante y que en caso de que entre, no se degrade en el interior de la espora.

RNA polimerasa y su restablecimiento por Fagos

Se ha encontrado que el fago PMB12 de *Bacillus subte-*

Es capaz no sólo de aumentar la velocidad de esporulación - en cepas silvestres de esta especie, sino que puede corregir - la deficiencia de esporulación de un determinado grupo de mu - tantes denominado Spo^- cuyas lesiones mapean cerca de las re - giones de resistencia a los antibióticos mencionados en la sec - ción anterior, y también de mutantes denominadas Spo^0J . Ningún otro tipo de mutantes Spo^- revirtieron a células silvestres, - por lo que parece ser que este fago produce una RNA polimerasa capaz de transcribir los genes de la célula esporulante (15). De aquí se podría pensar que el locus $spo0J$ define un gene de la RNA polimerasa.

Control de la transcripción durante el crecimiento de la espora

El control de la expresión génica a nivel de trans - cripción durante el crecimiento de la espora, es probable ya - que se ha visto que se requiere síntesis de RNA para el desa - rrollo esporal (71) y que las especies de RNA encontradas en esporas en desarrollo están ausentes en células vegetativas - (68). Además la transcripción de genes lleva un orden determi - nado respecto al tiempo, ya que se ha visto que la síntesis de las fracciones 16S y 23S de RNA ribosomal precede a la síntesis de RNA de tamaño heterogeneo, que posiblemente sea RNA mensajero (2).

La estructura de la RNA polimerasa en la espora madura se creía que era diferente de la célula vegetativa, es decir, -

que se modificaba por la acción de proteasas (86), experimentos posteriores en donde se tuvo precaución contra la proteólisis permitieron el aislamiento de una proteína con subunidades de composición indistinguibles de la RNA polimerasa de células vegetativas (60). La especificidad de la RNA polimerasa de la espora madura es similar a la de la enzima de células esporulantes; el DNA del fago ϕ e es transcrito deficientemente por esta enzima (20). Durante el desarrollo de la espora la actividad del factor σ es parcialmente restablecida, permitiendo la expresión del DNA del fago ϕ e *in vivo* e *in vitro* (20).

En esporas de *Bacillus cereus* que llevan el fago CP51 la síntesis del RNA del fago normalmente ocurre después de que la espora deja su etapa de vida latente, si se adicionan inhibidores de la síntesis de proteínas, se produce una transcripción selectiva del DNA del fago (21). Esto indicaría que la transcripción del fago CP51 es limitada inicialmente por la falta del factor σ .

Control de la traducción

Cambios en la maquinaria sintética constituida por proteínas en células eucarióticas durante su desarrollo y envejecimiento (14), sugieren que la expresión génica durante estos procesos puede estar, por lo menos, parcialmente regulada a nivel traduccional. Los componentes traduccionales en los que se han observado alteraciones son los RNAs de transferencia -

cia (99), tRNA sintetisas (65) y ribosomas (25). Estudios de regulación en el desarrollo de bacteriófagos en *Escherichia coli*, indican que el control traduccional puede presentarse - también en procariotes (93). También los operones de arginina y triptofano están regulados, en parte, a nivel traduccional - en el caso de *Escherichia coli* (75).

En esta sección se resumirán las evidencias que indican la presencia de un sistema de regulación traduccional y - post-traduccional durante la esporulación.

RNA mensajero estable

La discriminación en la traducción de RNA mensajero - citoplásmico en eucariotes podría ser un mecanismo de control importante pues permitiría cambios rápidos en el contenido de las proteínas celulares, a pesar de que estos RNA mensajeros - tengan una vida media larga (106). Debido a que el RNA mensajero tiene una vida media corta -aproximadamente 2 minutos como promedio- (79), ajustes rápidos en la expresión génica pueden generalmente llevarse cabo a nivel transcripcional. Sin embargo existen algunas especies de RNA mensajero estables reportadas para algunos procariotes como *Escherichia coli* (81), *Bacillus subtilis* (90), *Bacillus cereus* (101).

La existencia de RNA mensajero estable en las bacterias esporulantes y su posible papel en la regulación de la esporulación ha sido discutido (122), pero no se tienen a la fecha expe

rimentos concluyentes para alguna protefna especifica.

RNA de transferencia

La población de los RNAs de transferencia ha sido examinada en forma extensiva (1 ,24 ,34). Mediante el uso de - técnicas cromatográficas (139), se han detectado cambios en - las proporciones de especies isoceptoras de RNA de transferencia además de la aparición y desaparición de RNAs de transfe - rencia específicos de la esporulación en *Bacillus subtilis*. Para nueve especies de RNA de transferencia no se encontraron diferencias entre las células esporulantes y las vegetativas, estos son fenilalanil-, valil-, alanil-, aspartil-, isoleucil-, proliil-, metionil-, formilmetinil- e histidil-tRNA. Después de la fase logarítmica de crecimiento aparecen cambios en las especies isoceptoras de tirosil-, leucil-, seril-, treonil-, - asparagil-, y arginil-tRNA y en las especies únicas para lisil-, glutamil-, triptofanil- y glicil-tRNA. No todos estos cambios son específicos de la esporulación, pues algunos de ellos ocurren en mutantes incapaces de iniciar la esporulación pero el hecho de que aparezcan estos RNAs de transferencia diferentes - sugiere la posibilidad de un evento regulatorio a través de ellos.

Se ha visto también en *Bacillus megaterium* que algunos RNAs de transferencia de las células esporulantes carecen de 3' adenosina terminal, fenómeno que también se ha visto en células -

vegetativas al final de la fase de crecimiento , ésto quizá se deba mas a envejecimiento del RNA de transferencia que a una - modificación específica para un fenómeno regulatorio (136). Debido a que ninguna de las alteraciones observadas en los RNAs de transferencia de células esporulantes se han demostrado que sean específicas de la esporulación, no se les puede implicar directamente en la esporulación, aunque esto no desecha la posibilidad de que estos cambios sean necesarios para que se lleve a cabo la esporulación.

trNA sintetetasas

El involucrar a las trNA sintetetasas en la regulación de la esporulación de *Bacillus subtilis* se ha hecho pues se ha visto que durante la esporogénesis estas actividades presentan cambios (137). Estudios subsecuentes se han dedicado a la caracterización de mutantes sensibles a la temperatura por modificaciones en la enzima lisil-trNA sintetasa (128). Si esta cepa crece en forma exponencial y se cambia a condiciones de temperatura restrictiva, muere rápidamente, sin embargo, células esporulantes de esta cepa son capaces de soportar la temperatura restrictiva. Si las propiedades de las enzimas de las células esporulantes y vegetativas, son consistentes con la idea de que tienen un origen genético común, el experimento anterior sugiere que la enzima esporulante es modificada a manera de hacerse termorresistente , algunas condiciones fisiológicas de la espora pueden ser las que ocasionen esta estabilidad, ya que -

no se ha demostrado la existencia de modificaciones en la enzima de la célula esporulante.

Factores de iniciación.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas en *Escherichia coli* confieren especificidad a los templados traduccionales con los ribosomas. Cambios en esta especificidad ocurren durante la infección del fago T4 en *Escherichia coli* - (36), estos cambios se han atribuido a la alteración de los factores de iniciación.

Los factores de iniciación de las células esporulantes de *Bacillus subtilis* imparten una especificidad de reconocimiento de templados diferente que el de las células vegetativas - (23). Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de las células esporulantes son capaces de discriminar al RNA del fago SPO1, mensajero representativo del existente en células vegetativas.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de las células esporulantes fueron activos con otros templados como se puede ver por su habilidad de estimular la transcripción del RNA del colifago Q β , y la síntesis dirigida de lisosoma in vitro del fago T4 con ribosomas de *Escherichia coli* libres de factores de iniciación (23). Lo que indica que la maquinaria traduccional de *Bacillus subtilis* es capaz de distin-

no se ha demostrado la existencia de modificaciones en la enzima de la célula esporulante.

Factores de iniciación.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas en *Escherichia coli* confieren especificidad a los templados traduccionales con los ribosomas. Cambios en esta especificidad ocurren durante la infección del fago T4 en *Escherichia coli* - (36), estos cambios se han atribuido a la alteración de los - factores de iniciación.

Los factores de iniciación de las células esporulantes de *Bacillus subtilis* imparten una especificidad de reconocimiento de templados diferente que el de las células vegetativas - (23). Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas - de las células esporulantes son capaces de discriminar al RNA - del fago SP01, mensajero representativo del existente en células vegetativas.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de las células esporulantes fueron activos con otros templados como se puede ver por su habilidad de estimular la transcripción del RNA del colifago Q β , y la síntesis dirigida de lisosoma *in vitro* del fago T4 con ribosomas de *Escherichia coli* libres de factores de iniciación (23). Lo que indica que la maquinaria traduccional de *Bacillus subtilis* es capaz de distin-

no se ha demostrado la existencia de modificaciones en la enzima de la célula esporulante.

Factores de iniciación.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas en *Escherichia coli* confieren especificidad a los templados traducionales con los ribosomas. Cambios en esta especificidad ocurren durante la infección del fago T4 en *Escherichia coli* - (36), estos cambios se han atribuido a la alteración de los factores de iniciación.

Los factores de iniciación de las células esporulantes de *Bacillus subtilis* imparten una especificidad de reconocimiento de templados diferente que el de las células vegetativas - (23). Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de las células esporulantes son capaces de discriminar al RNA del fago SPO1, mensajero representativo del existente en células vegetativas.

Los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de las células esporulantes fueron activos con otros templados como se puede ver por su habilidad de estimular la transcripción del RNA del colifago Q β , y la síntesis dirigida de lisosima *in vitro* del fago T4 con ribosomas de *Escherichia coli* libres de factores de iniciación (23). Lo que indica que la maquinaria traduccional de *Bacillus subtilis* es capaz de distin-

gir entre diferentes moléculas de RNA mensajero. Debido a que los factores de iniciación de la síntesis de proteínas de cepas mutantes incapaces de iniciar la esporulación no presentan estos cambios en la especificidad de reconocimiento traduccional, se ha postulado que éste sea un evento específico de la esporulación.

Debe notarse que no es necesario postular un cambio en los factores de iniciación para explicar la alteración de la especificidad. La limitación total en la capacidad de iniciación puede producir cambios que permitan que únicamente se lean mensajeros que tienen mayor afinidad para ser transcritos preferencialmente (84). Este ha sido el caso en varios sistemas eucarióticos (97).

Ribosomas

Cambios funcionales y estructurales en los ribosomas de células esporulantes han sido identificados. Los ribosomas de las especies esporulantes han sido caracterizados por electroforesis bidimensional de las proteínas ribosomales y por estudios de su conducta de sedimentación (70 ,141). Ha habido varios reportes sobre las diferencias en la movilidad electroforética de las proteínas ribosomales de las células vegetativas y esporulantes (42 , 41) pero no se ha establecido el número o la naturaleza de dichas diferencias.

Se han reportado varias diferencias funcionales entre los ribosomas de especies esporulantes y vegetativas, una de ellas es la diferencia que presentan los ribosomas de esporulación al antibiótico llamado ácido fusídico (42).

Una serie de mutantes ribosomales se han obtenido con el fin de caracterizar este fenómeno (42), sin embargo, el mecanismo molecular por medio del cual estas mutantes ribosomas afectan la esporulación es desconocido. Se podría pensar que ciertas mutaciones limitan la habilidad del ribosoma para cambiar la especificidad del nuevo templado por reconocer, ya que un cambio específico de la esporulación en el templado ribosomal podría producir una traducción preferencial de los RNAs mensajeros específicos de la esporulación. Ya que la mayoría de los RNAs del estado vegetativo se siguen produciendo durante la esporulación, un mecanismo para la selección de mensajeros favorecería la expresión de mensajes propios de la esporulación.

Por otra parte uno puede imaginar también que mutaciones en los ribosomas, no permitan la síntesis de pequeñas moléculas que puedan ser efectores regulatorios de la esporulación como el caso de los nucleótidos polifosforilados.

Control Post-traducciona1.

Un mecanismo de control importante en la esporulación puede ser el de la modificación de las proteínas después de -

concluida su síntesis.

La forma vegetativa de la enzima fructosa-1,6-difosfa -
to aldolasa al ser sometida a una ruptura proteolítica especí -
fica, es convertida en una forma termoestable, ésta es idénti -
ca a la aislada de las esporas (111). La formación de la cu -
bierta de la espora puede involucrar también un procesamiento
post-traducciona (142) ya que se han detectado anticuerpos -
anticubierta antes de que esta se forme. Por último la modifi -
cación covalente de proteínas por adenilación, fosforilación,
acetilación, etc., en la esporulación no ha sido demostrada.

CONCLUSIONES

La formación de esporas en *Bacillus* está acompañada por cambios marcados en la composición química, contenido enzimático y en la morfología de la célula. La información que existe sobre esto es amplia y detallada. Los primeros estudios sobre la esporulación se enfocaron a describir los cambios morfológicos que dan lugar a la formación de esporas, - éstos se hicieron de una manera aislada y limitados únicamente a la identificación de estructuras y composición de éstas, cuando la información fue aumentando se integró a manera de un esquema general de lo que sucedía de manera observable y se determinaron con mas detalle los eventos morfológicos de la esporulación.

En el caso de los eventos bioquímicos la situación es diferente, inicialmente se intentó la caracterización de las enzimas involucradas en la esporulación, entendiéndose por esto, a aquellas que se encuentran en las esporas, para explicar el fenómeno de termorresistencia, se logró caracterizar una gran cantidad de enzimas y a la fecha no se han podido relacionar sus funciones con los eventos morfológicos de la esporulación, es decir, se conoce el perfil de aparición de una gran parte de las proteínas que se forman durante la esporulación pero no se ha podido determinar si estas actividades enzimáticas son indispensables para la esporulación o su presencia en ésta es circunstancial. Es decir, que la aparición de actividades enzimáticas que relacionen la forma

ción de estructuras no se ha caracterizado, es actualmente im posible hablar de una actividad relacionada con la formación del septum de la espora o de alguna enzima participante en la formación del exosporio. Si se pretende hacer una secuencia en zimática que relacione la aparición de estructuras, la informa ción es insuficiente y difícil de relacionar.

Las primeras enzimas que aparecen son las relaciona - das con la formación de energía, es decir, las enzimas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. El siguiente grupo de enzi - mas son las que proporcionan nitrógeno a partir de estructuras de aminoácidos, acompañadas por la aparición de las proteasas. Con la presencia de estos grupos enzimáticos, la célula está - en posibilidad de sintetizar estructuras nuevas útiles en la - esporulación, el siguiente paso es el de la aparición de las - enzimas que sintetizan y ensamblan las estructuras propias de los primeros eventos de la esporulación, éstas no se han iden - tificado. Durante esta etapa deben estar presentes las enzimas que sintetizan los componentes de la corteza y la cubierta, - pues se ha visto que aunque estas estructuras se hacen presen - tes mas adelante, la síntesis de sus precursores se realiza al principio de la esporulación llevándose a cabo el ensamble de éstos en los períodos últimos de la esporulación por la incor - poración de metabolitos pequeños capaces de intercalarse dando lugar a rearrreglos estructurales que permiten su observación - fácilmente.

Dentro de los metabolitos formados durante la esporulación están las proteasas, a éstas se les han atribuido diferentes papeles fisiológicos. La mayoría de la opiniones admiten que las proteasas funcionan como proveedores de nutrientes asimilables. Se les pueden atribuir funciones intracelulares - mas específicas como la degradación de estructuras preexistentes para la formación de nuevos compuestos útiles en la esporulación como se mencionó anteriormente. Se ha propuesto que una proteasa pueda funcionar como enzima clave en la inducción de la esporulación ocasionando la destrucción de un represor específico (116).

Para el caso de los antibióticos se han implicado - tres funciones posibles, la primera es que al estar la célula en condiciones de limitación de nutrientes, excrete los antibióticos para inhibir el crecimiento de posibles formas competitivas, otra es la idea de que los antibióticos peptídicos de *Bacillus* sean incorporados en las estructuras de la corteza de la espora como constituyentes normales de ésta (47,11). Y la - tercera los implica como inductores gratuitos de proteasas necesarias para la esporulación, ya que al ser de naturaleza peptídica pueden ser sustratos comúnmente utilizados por este tipo de enzimas.

Otro de los metabolitos que se forman durante la esporogénesis es el ácido dipicolínico, cuya ruta biosintética es

conocida, actualmente no se sabe si su presencia en la célula esporulante tenga implicaciones morfológicas o regulatorias, se le han atribuido funciones en el inicio de la germinación - (51).

La esporulación es un proceso complejo que sin duda, - debe estar controlado por un número elevado de mecanismos regulatorios que aseguren la secuencia ordenada de eventos que conducen a la formación de una espora completa. Se ha visto que la esporulación es un fenómeno catabólicamente represible (116). - Los nucleótidos más relacionados con el catabolismo son los de adenina y los de piridinas, cambios en la actividad catabólica de una célula serán reflejados por cambios en la concentración de estos compuestos. En *Escherichia coli* el AMP cíclico ha sido implicado en la represión catabólica (100). Sin embargo este - compuesto no ha sido detectado en bacilli lo que significa que una señal alternativa debe ser empleada por estos microorganismos. Algunos resultados demuestran que el ATP disminuye en su - concentración al depletarse la fuente de energía (64).

El papel del ATP o de la carga energética en la regulación de la esporulación es atractivo no sólo por su conexión - con el catabolismo, sino por el número de formas con las que el ATP o en general la carga energética puede ejercer un efecto regulatorio. Ninguno de estos mecanismos es exclusivo de otros posibles y en conjunto podrían contribuir a la regulación total - de la esporogénesis.

La forma más sencilla de regulación podría ser la interacción directa del ATP con un aporrepresor. Esta interacción - puede ser explicada también en términos de carga energética.

La carga energética puede ser considerada como una medida de la afinidad de los niveles de adenilato por la proteína aporrepresora, el número de fosfatos que tenga el adenilato puede determinar la habilidad de esta molécula para unirse a la proteína.

El ATP puede fosforilar o adenilar a una proteína involucrada en la represión de los genes que disparan la esporulación. Es decir, que el grado de viabilidad de la proteína dependería de la concentración del ATP en la célula, como modelo alternativo no exclusivo del anterior sería el de considerar una adenilación o fosforilación de la RNA polimerasa, se ha visto que la RNA polimerasa de *Escherichia coli* es asenilada durante la infección del fago T4 (64). Esta modificación puede ser la reponsable de un cambio en el sitio de reconocimiento del DNA. Se ha observado también que la RNA polimerasa de *Bacillus brevis* es inactivada in vitro por varios nucleótidos incluyendo al ATP (114).

Recientemente se ha visto que una subunidad de la RNA polimerasa es fosforilada durante la esporulación (64), esta alteración puede ser importante para la especificidad de la transcripción. Esto podría explicar la regulación del inicio de la esporulación, mas no de los eventos posteriores los cuales pueden estar regulados por otros efectores característicos de la espora.

Liberada la iniciación de la esporulación de la repre
sión por el bajo contenido de ATP o de carga energética, es po
sible que se expresen genes responsables de la síntesis de pro
teasas capaces de destruir en forma gradual los represores de
genes cuyos productos sean utilizados para la síntesis de es -
tructuras esporales o bien de genes cuyos productos sean in -
ductores de la síntesis de enzimas propias de la espora, lo -
que explicaría la naturaleza pleiotrópica de la esporulación.
Pues si no se sintetizaran las proteasas estos represores pre
sentes en los genes de expresión posterior no permitirían la -
síntesis de inductores y por lo tanto la esporulación no se lle
varía a cabo.

Otra posibilidad es que las proteasas modifiquen a la
RNA polimerasa a manera que en el transcurso de la esporulación
fuera modificada su especificidad de templado y así permitiera
la expresión gradual de los genes de la esporulación. Sin embar
go, los análisis de la RNA polimerasa durante la esporulación -
sí indican la presencia de modificaciones pero no en forma se -
cuencial como para poderlas correlacionar con los diferentes ge
nes que se expresan, además estos cambios no son generales para
todas las especies esporulantes.

Uno de los principales problemas que ha habido para -
tratar de establecer un esquema general de la esporulación es -
la variedad de resultados según el microorganismo que se utilice

pues aunque todos son del mismo género, las variaciones en los resultados son muy grandes. Algunos autores han sugerido que la esporulación se trate como un fenómeno independiente para cada microorganismo y no para el género ya que la clasificación de *Bacillus* es por ser aerobios esporogénicos lo que no asegura que sus sistemas de biosíntesis y regulación sean parecidos. Probablemente esto sea válido en un principio, pero el fenómeno está presente y sería mas ventajoso el poderlo considerar como un proceso generalizable.

En la actualidad se cuenta con un mayor número de recursos para la elucidación de fenómenos estudiados por la Biología Molecular, entre ellos se cuenta con las técnicas de recombinación *in vitro* de DNA que nos permite la clonación de genes susceptibles de estudio en vehículos moleculares donde la posibilidad de caracterización es mayor, para la esporulación ya se han logrado clonar genes (117), lo que contribuirá a la caracterización de los productos de éstos, que es una de las principales deficiencias en la genética de la esporulación. Con la identificación y purificación de los productos génicos esporales, se podrá determinar el tiempo de síntesis, su localización celular y la función de cada uno de ellos. Incluso permitirá determinar los mecanismos moleculares que controlan la actividad génica.

El estado actual de la esporulación es confuso, diver

Los modelos describen los papeles potenciales de pequeñas moléculas como efectores de la esporulación. Sin embargo, sería de mayor utilidad establecer con evidencias más firmes si alguna - de estas moléculas efectoras hipotéticas tienen algún efecto - primario en la expresión génica. Actualmente la mayoría de los argumentos de que un compuesto u otro está involucrado en la regulación de la esporogénesis están basados únicamente en la aparición de éste durante la esporulación, sin embargo su presencia puede deberse a otras causas no consideradas ajenas a la esporulación.

Los modelos describen los papeles potenciales de pequeñas moléculas como efectores de la esporulación. Sin embargo, sería de mayor utilidad establecer con evidencias más firmes si alguna de estas moléculas efectoras hipotéticas tienen algún efecto primario en la expresión génica. Actualmente la mayoría de los argumentos de que un compuesto u otro está involucrado en la regulación de la esporogénesis están basados únicamente en la aparición de éste durante la esporulación, sin embargo su presencia puede deberse a otras causas no consideradas ajenas a la esporulación.

B I B L I O G R A F I A

- 1.- Arceneaux, J., and Susoka, N. *Journal of Biological Chemistry*. 224: 5969-5988 (1969).
- 2.- Armstrong, R. A., and Susoka, N. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America*. 59: 153-160 (1968).
- 3.- Aronson, A. I., Angelo, N., and Holt, S. C. *Journal of Bacteriology*. 108: 1016-1025 (1971).
- 4.- Aronson, A. I., and Fitz-James, P. *Bacteriological Reviews*. 40, 2: 380-402 (1976).
- 5.- Balassa, G. *Biochimica et Biophysica Acta*. 78: 410-418 (1983).
- 6.- Balassa, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 15: 236 (1984).
- 7.- Balassa, G. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 15: 240 (1984).
- 8.- Beaman, T. C., Parkratz, H. S., and Gerhardt, P. *Journal of Bacteriology*. 109: 1199-1209 (1972).
- 9.- Berger, J. A., and Marr, A. G. *Journal of General Microbiology*. 22: 147-157 (1980).
- 10.- Bernlohr, R. W., and Clark, V. *Journal of Bacteriology*. 105: 278-283 (1971).
- 11.- Bernlohr, R. W., and Novelli. *Archives in Biochemistry*. 103: 84-104 (1983).

- 12.- Black, S. H., and Gerhardt, P. *Journal of Bacteriology*.- 83: 960-967 (1962).
- 13.- Blumenthal, H. J. en Campbell, L. L., and Halvorson, H. G. (eds.). *Spores III*. p. 222-236. American Society for Microbiology. Ann Arbor, Mich. (1965).
- 14.- Bott, K. F. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 79: 996-1003 (1977).
- 15.- Bramucci, M. G., Keggins, K. M., and Lovett, P. S. *Journal of Virology*. 24: 194-200 (1977).
- 16.- Brahm, S. P., Le Hegerat, F., and Hoch, J. A. *Journal of Bacteriology*. 124: 977-984 (1975).
- 17.- Brevet, J. *Molecular and General Genetics*. 128: 223-234 (1974).
- 18.- Brevet, J. *Journal of Bacteriology*. 125: 74-83 (1976).
- 19.- Burgess, R. R., Travers, A.A., Dunn, J.J., and Bautz, E. K. F. *Nature*. 221: 43-46 (1969).
- 20.- Buu, A., and Sonenshein, A. L. *Journal of Bacteriology*. 124: 180-200 (1975).
- 21.- Cohen, A., Silberstein, Z., and Mazor, Z. en Halvorson - H. D., Hanson, R., and Campbell, L. L. (eds). *Spores V*. American Society for Microbiology. Washington, D. C. - (1972).
- 22.- Chamberlin, M. A. *Annual Reviews of Biochemistry*. 43: 721-775 (1974).

- 23.- Chamblis, G. H., and Legault-Demare, L. en Gerhardt, P., - Costilow, R. N., and Sedoff, H. L. (eds.). Spores VI. p. - 314-317. American Society for Microbiology. Washington, D. C. [1975].
- 24.- Chuang, R., and Doi, R. Journal of Biological Chemistry. - 247; 3478-3484 [1972].
- 25.- De Witt, N., and Price, R. Biochemical and Biophysical Research Communications. 56: 593-598 [1974].
- 26.- Dean, D. R., Hoch, J. A., and Aronson, A. Journal of Bacteriology. 131: 981-987 [1977].
- 27.- Deindorfer, F. M. Applied Microbiology. 5: 221-228 [1957].
- 28.- DaueI, T. F., Ginsberg, A., Yeh, J., Shelton, E., and - Stadtman, E.R. Journal of Biological Chemistry. 245: 5195-5205 [1970].
- 29.- Diesterheft, M. D., and Fresse, E. Journal of Biological Chemistry. 248: 6062-6070 [1973].
- 30.- Doi, R. H. Current Topics in Cellular Regulation. 6: 1-20 [1972].
- 31.- Doi, R. H. Annual Reviews of Genetics. 11: 29-48 [1977].
- 32.- Doi, R., Bishop, H., and Migite, L. en Campbell, L. L. - (eds.). Spores IV. p. 159-174. American Society for Microbiology. Bethesda, Md. [1969].

- 33.- Doi, R. H., and Halvorson, H. O. *Journal of Bacteriology*. 81: 51-58 (1961).
- 34.- Doi, R. H., and Igarashi, R. T. *Journal of Bacteriology*. 90: 384-390 (1965).
- 35.- Donohue, T. J., and Bernlohr, R. W. en *Spores VII*. P. 293-298. American Society for Microbiology.
- 36.- Jube, S., and Rudland, P. *Nature*. 226: 820-823 (1970).
- 37.- Elserich, C., and Aubert, J. P. en Gerhardt, P., Costilow, N., and Sadoff, H. L. *Spores VI*. p. 385-390. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1975).
- 38.- Falsaschi, A., and Kornberg, A. *Journal of Biological Chemistry*. 241: 1478-1482 (1966).
- 39.- Fisher, S. H., and Sonenshein, A. L. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 79: 987-995 (1977).
- 40.- Fitz-James, P. C., and Young, I. E. en Gould, G. W., and Hurst, A. (eds.). *Bacterial Spore*. p.39-72. New York - (1969).
- 41.- Fortnagel, P., and Bergman, R. *Biochimica et Biophysica Acta*. 229: 138-141 (1973).
- 42.- Fortnagel, P., Bergman, R., Hafemann, B., and Langelen, C. en Gerhardt, P., Costilow, R. N., and Sadoff, H. L. - (eds.). *Spores VI*. p. 301-306. American Society for Microbiology. Washington, D. C. (1975).

- 43.- Fortnagel, P., and Fréese, E. *Journal of Bacteriology*. -
95: 1431-1438 [1968].
- 44.- Foster, J. W., and Perry, J. J. *Journal of Bacteriology*.
67: 295-302 [1954].
- 45.- Fukuda, R., and Doi, R. H. *Journal of Bacteriology*. 129:
422-432 [1977].
- 46.- Gardner, R., and Kornberg, A. *Journal of Biological Chemistry*. 242: 2383-2388 [1967].
- 47.- Gerhard, S., and Strominger, J. L. *Proceedings of the -
National Academy of Sciences of The United States of America*. 57: 767-773 [1967].
- 48.- Gerhardt, P., and Bleck, S. H. *Journal of Bacteriology*.
82: 750-760 [1961].
- 49.- Gerhardt, P., and Ribi, E. *Journal of Bacteriology*. 88:
1774-1788 [1964].
- 50.- Glavert, A. M., Brieger, E. M., and Allen, J.M. *Experimental Cell Research*. 22: 73-85 [1961].
- 51.- Gould, G. W. *Journal of Applied Bacteriology*, 42: 297- -
309 [1977].
- 52.- Gould, G. W., and Dring, G. J. *Advances in Microbial -
Physiology*. 11: 137-164 [1974].
- 53.- Gould, G. W., and Dring, G. J. *Nature*. 258:402-405 [1975].

- 54.- Green, J. H., and Sedoff, H. L. *Journal of Bacteriology*. 89: 1499-1505 [1965].
- 55.- Halvorson, H. O., and Church, E. *Bacteriological Reviews*. 21: 112-131 [1957].
- 56.- Hanson, R. S., and Cox, D. P. *Journal of Bacteriology*. - 93:1777-1787 [1967].
- 57.- Hanson, R. S., Curry, M. V., Garner, J.V., and Halvorson, H. O. *Canadian Journal of Microbiology*. 18: 1139-1143 - [1972].
- 58.- Hanson, R. S., Peterson, J. A., and Yousten, A. A. *Annual Reviews of Microbiology*. 24; 53-90 [1970].
- 59.- Hardwick, W. A., and Foster, J. W. *Journal of General - Physiology*. 35: 907 [1952].
- 60.- Hattori, J., Ben Ze'ev, H., Silberstein, Z., Tesone, G., and Torriani, A. *Journal of Bacteriology*. 124: 542-549 - [1975].
- 61.- Hiragi, Y. *Journal of General Microbiology*. 72; 87-99 - [1972].
- 62.- Hoch, J. A. *Advances in Genetics*. 18: 69- 98 [1976].
- 63.- Holt, S. C., and Leadbetter, E. R. *Bacteriological Reviews*. 33; 348-378 [1969].
- 64.- Hutchison, K. W., and Hanson, R. S. *Journal of Bacteriology*. 119; 70-75 [1974].

- 65.- Ilan, J., Ilan, J., and Patel, N. *Journal of Biological Chemistry*. 245: 1275-1281 [1970].
- 66.- Ito, J. *Molecular and General Genetics*. 124: 97-106 [1973].
- 67.- Ito, J., Mildner, G., Spizizen, J. *Molecular and General Genetics*. 112: 104-208 [1971].
- 68.- Jehg, H. H., and Doi, R. H. *Journal of Bacteriology*. 119: 514-521 [1974].
- 69.- Klier, A. F., and Lööfdet, M. M. *European Journal of Biochemistry*. 47: 111-119 [1974].
- 70.- Kobayashi, Y. en Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. *Spores V*. p. 269-276. American Society for Microbiology. Washington, D. C. [1972].
- 71.- Kobayashi, Y., Seiberg, M., Higa, A., Halvorson, H. O., and Levinthal, C. en Campbell, L. L., and Halvorson, H. O. (eds.). *Spores III*. p. 200-242. American Society for Microbiology. Ann Arbor, Mich. [1965].
- 72.- Kornberg, A., Spudich, J. A., Nelson, D. L., and Deutscher, M. P. *Annual Reviews of Biochemistry*. 37: 51-78 [1968].
- 73.- Kramer, M. J., and Roth, I. L. *Canadian Journal of Microbiology*. 15: 1247-1248 [1969].
- 74.- Lemana, C. *Bacteriological Reviews*. 16: 90-93 [1952].
- 75.- Lavelle, R. *Journal of Molecular Biology*. 51: 435-447 [1970].

- 65.- Ilen, J., Ilen, J., and Patel, N. *Journal of Biological Chemistry*. 245: 1275-1284 (1970).
- 66.- Ito, J. *Molecular and General Genetics*. 124: 97-106 (1973).
- 67.- Ito, J., Mildner, G., Spizizen, J. *Molecular and General Genetics*. 112: 104-209 (1971).
- 68.- Jéhg, H. H., and Doi, R. H. *Journal of Bacteriology*. 119: 514-521 (1974).
- 69.- Klier, A. F., and Lecadet, M. M. *European Journal of Biochemistry*. 47: 111-119 (1974).
- 70.- Kobayashi, Y. en Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. *Spores V*. p. 269-276. *American Society for Microbiology*. Washington, D. C. (1972).
- 71.- Kobayashi, Y., Seinberg, W., Hige, A., Halvorson, H. O., and Levinthal, C. en Campbell, L. L., and Halvorson, H. O. (eds.). *Spores III*. p. 200-242. *American Society for Microbiology*. Ann Arbor, Mich. (1965).
- 72.- Kornberg, A., Spudich, J. A., Nelson, D. L., and Deutscher, M. P. *Annual Reviews of Biochemistry*. 37: 51-78 (1968).
- 73.- Kramer, M. J., and Roth, I. L. *Canadian Journal of Microbiology*. 15: 1247-1248 (1969).
- 74.- Lemons, C. *Bacteriological Reviews*. 16: 90-93 (1952).
- 75.- Leville, R. *Journal of Molecular Biology*. 51: 435-447 (1970).

- 76.- Lawrence, N.L., and Halvorson, H. O. *Journal of Bacteriology*. 68: 334-337 (1954).
- 77.- Lecadet, M. M., Ohevrier, S., and Dedonder, R. *European Journal of Biochemistry*. 25: 349-358 .
- 78.- Leighton, T. J. *Proceedings of The National Academy of - Sciences fo The United States of America*. 70: 1179-1183 (1973).
- 79.- Levinthal, C., Keynan, A., and Hige, A. *Proceedings of - the National Academy of Sciences of The United States of America*. 48: 1631-1638 (1952).
- 80.- Levisohn, S., and Aronson, A. I. *Journal of Bacteriology*. 93: 1023-1030 (1967).
- 81.- Levy, S. *Proceedings of the National Academy of Sciences of The United Sates of America*. 72: 2900-2904 (1975).
- 82.- Lewis, J. C., Snell, N. S., and Surr, H. K. *Science* 132: 544-546 (1960).
- 83.- Linn, T. G., Greenleaf, A. L., and Losick, R. *Journal of Biological Chemistry*. 250: 9256-9261 (1975).
- 84.- Lodish, H. *Nature*. 251: 385-388 (1974).
- 85.- Lopez, J. M., and Thoms, E. *Journal of Bacteriology*, 129: 217-224 (1977).
- 86.- Mais, J. C. C., Kerjan, P., and Szulmajster, J. *FEBS Letters*. 13: 269-274 (1976).

- 87.- Mandelstam, J., Key, D., and Hrenuelli, D. en Gerhardt, P. Costilow, N., and Sadoff, H. L. Spores VI. American Society for Microbiology. Washington, D.C. [1975].
- 88.- Mandelstam, J., and Waites, W. M. Biochemical Journal. 109: 793-804 [1968].
- 89.- Marshall, B., and Murrell, W. G. Journal of Applied Bacteriology. 33: 103-128. [1970].
- 90.- Martinez, R. Journal of Molecular Biology..17: 10-17 [1966]
- 91.- Milhaud, P., and Salassa, G. Molecular and General Genetics. 125: 241-250 [1973].
- 92.- Monroe, R. E. Biochemical Journal, 81; 225-232 [1961].
- 93.- Morrison, T., and Malsey, R. Nature. 231: 37-41 [1971].
- 94.- Mukherjee, P. K., and Paulus, H. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America. 74: 780-784 [1977].
- 95.- Murrell, W. G. Advances in Microbial Physiology. 1: 133-251 [1967].
- 96.- Murrell, W. G., and Warth, A. D. en Campbell, L. L., and Halverson, H. O. Spores III. Ann Arbor, Mich. American Society for Microbiology. [1965].
- 97.- Nuss, D., and Koch, G. Journal of Molecular Biology. 102: 801-812 [1976].

- 98.- Ohne, M., and Rutberg, G. *Journal of Bacteriology*. 125: -
453-460 [1976].
- 99.- Ouellette, A., and Taylor, M. *Biochemistry*. 12: 3542- -
3546 [1973].
- 100.- Pastan, I., and Perlman, R. *Science*. 169; 339- 344 [1970].
- 101.- Pearce, S., and Fitz-James, P. *Journal of Bacteriology*. -
107: 337-344 [1971].
- 102.- Pero, J., Nelson, J., and Losick, R. in Gerhardt, P., Cos-
tilow, R. N., and Sedoff, H. L. [eds.]. *Spores IV*. p. 202
212. American Society for Microbiology. Washington, D. C.
[1975].
- 103.- Piggot, P. J., and Coote, J. G. *Bacteriological Reviews*.
40: 908-962 [1976].
- 104.- Powell, J. F., and Hunter, J.R. *Biochemical Journal*. 62:
381-387 [1956].
- 105.- Præstidge, L., Gage, V., and Spizizen, J. *Journal of Bac-
teriology*. 107; 815-823 [1971].
- 106.- Revel, M., Miatt, L. *Proceedings of the National Academy
of Sciences of the United States of America*. 51; 810-818
[1963].
- 107.- Reyssat, G., and Aubert, J. P. *Biochemical and Biophys-
ical Research Communications*. 65: 1237-1241 [1975].

- 108.- Rhese, H., Hoch, J., and Grosch, L. Proceedings of -
the National Academy of Sciences of The United States of
America. 54: 1125-1129 [1977].
- 109.- Ross, K. F. A., and Billing, E. Journal of General Mi -
crobiology. 17: 418-425 [1957].
- 110.- Sedoff, H. L., Bach, J. A., and Koola, J. W. In Campbell,
L. L., and Halverson, H. O. (eds.). Spores III. p. 97-
110. American Society for Microbiology. Ann Arbor, Mich.
[1965].
- 111.- Sedoff, H., Celikkol, E., and Engelbrecht, H. Proceedings
of the National Academy of Sciences of The United States
of America. 66: 844-849 [1970].
- 112.- Sedoff, H. L., Hitchins, A. D., and Celikkol, E. Bacte -
riological Proceedings. 23. [1967].
- 113.- Serker, N., Langley, D., and Paulus, H. Proceedings of -
the National Academy of Sciences of the United States of
America. 74: 1478-1482 [1977].
- 114.- Serker, N., and Paulus, H. Proceedings of the National -
Academy of Sciences of The United States of America. 69:
3570-3574 [1972].
- 115.- Schaeffer, P. Bacteriological Reviews. 33: 48-71 [1969].
- 116.- Schaeffer, P., Millet, J., and Aubert, J. P. Proceedings
of the National Academy of Sciences of The United States
of America. 54: 704-711 [1965].

- 117.- Segall, J., and Losick, R. Cell. 11: 751-764 [1977].
- 118.- Segall, J., Tjian, R., Pero, J., and Losick, R. Proceedings of the National Academy of Sciences of The United States of America. 71: 4860-4863 [1974].
- 119.- Setlow, P. Biochemical and Biophysical Research Communications. 53: 365-372 [1973].
- 120.- Slapikoff, S., Spitzer, J. L., and Vaccaro, D. Journal of Bacteriology. 106: 739-744 [1971].
- 121.- Sonenshein, A. L., Cami, B., Brevet, J., and Cote, R. Journal of Bacteriology. 132: 73-79 [1977].
- 122.- Sonenshein, A. L., and Campbell, K. M. in Spores VII . p 179-192. American Society for Microbiology.
- 123.- Sonenshein, A. L., and Roscoe, D. H. Virology. 39; 265-276 [1969].
- 124.- Sousa, J. C. F., Siva, M. T., and Balassa, G. Nature. 263; 53-54 [1976].
- 125.- Spotts, C. R., and Szulmajster, J. Biochimica et Biophysica Acta. 61: 635-638 [1962].
- 126.- Spudich, J. A., and Kornberg, A. Journal of Biological Chemistry. 243; 4588-4589 [1968].
- 127.- Spudich, J. A., and Kornberg, A. Journal of Biological Chemistry 243; 4600-4605 [1968].

- 128.- Steinberg, W. en Gerhardt, P., Costilow, R. N., and Sedoff, H. L. (eds.). Spores VI. p. 290-300. American society for Microbiology. Washington, D, C. [1975].
- 129.- Stewart, B. T., and Halvorson, H. O. Journal of Bacteriology. 85: 160-166 [1953].
- 130.- Stewart, B. T., and Halvorson, H. O. Archives in Biochemistry and Biophysics. 49: 168-178 [1954].
- 131.- Sunida-Yasumoto, C, and Doi, R. H. Journal of Bacteriology 117: 775-782 [1974].
- 132.- Sussman, A. S., and Halvorson, H. O. Spores, Their Dormancy and germination. P. 15. Harper and Row Publ. New York. [1968].
- 133.- Szulmajster, J., and Hanson, R. S. en Campbell, L. L., and Halvorson, H, O. (eds.). Spores III. p. 165-173. - American Society for Microbiology. Ann Arbor, Mich. - [1965].
- 134.- Tjian, R., and Losick, R. Proceedings of de National Academy of Sciences of The United States of America. 71: 2872-2876 [1974].
- 135.- Urbs, R. C. Biochemical Journal. 71: 513-518 [1959].
- 136.- Vinter, V. en Gould, G. W., and Hurst, A. Bacterial Spores. p. 73-123. Academic Press. New York. [1968].
- 137.- Vold, B. Archives in Biochemistry and Biophysics. 154: 691-695 [1973].

- 138.- Vold, B. *Journal of Bacteriology*. 117: 1361-1362 [1974].
- 139.- Vold, B., and Minatogawa, S. en Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. *Spores V*. p. 254-263. American - Society for Microbiology. Washington, D. C. [1972].
- 140.- Warren, S. C. *Biochemical Journal*. 109: 811-818 [1968].
- 141.- Woess, C. *Journal of Bacteriology*. 82: 695-670 [1961].
- 142.- Wood, D. *Biochemistry*. 130: 505- 514 [1971].
- 143.- Young, I. E., and Fitz-James, P. *Journal of Biophysics and Biochemical Cytology*. 6: 483-498 [1959].
- 144.- Yousten, A. A., and Hanson, R. S. *Journal of Bacteriology*. 109: 886-894 [1972].
- 145.- Zytkevicz, T. H., and Halvorson, H. O. en Halvorson, H. O., Hanson, R., and Campbell, L. L. *spores V*. American Society for Microbiology. Washington, D.C. [1972].