

CICLO DE DESARROLLO DE *Streptomyces* y *Micromonospora*

Por

C. BARBES, A. FERNANDEZ, M. B. MANZANAL,
P. MORALEDA, J. A. SALAS, J. E. SUAREZ

y

C. HARDISSON

Departamento Interfacultativo de Microbiología.
Universidad de Oviedo.

INTRODUCCION

Los actinomicetos son bacterias de morfología compleja y cuya característica común es la formación de hifas en algún estado de su ciclo de desarrollo. Dentro de este grupo existen microorganismos que poseen ciclos de diferenciación que varían según las especies. Así, existen microorganismos con un desarrollo muy próximo al de las eubacterias como es el caso de *Actinomyces* donde el micelio se forma de una manera transitoria y se reproducen por escisión. Otros como *Micromonospora* ya poseen un desarrollo miceliar estable durante todo su ciclo y se reproducen mediante esporas. El mayor grado de complejidad lo alcanza el *G. Streptomyces* que posee dos tipos de micelio; un micelio sustrato con funciones vegetativas que formará un segundo tipo de micelio, el aéreo, con funciones reproductoras y que originará las esporas. Estas esporas, en condiciones favorables, germinarán dando lugar al micelio sustrato y cerrando el ciclo.

Pese a las características tan peculiares de estos microorganismos, es aún escasa la información que se posee sobre su desarrollo. En el presente trabajo realizamos un estudio detallado sobre las variaciones a nivel de ultraestructura que tienen lugar durante el ciclo de desarrollo de dos especies típicas de los actinomicetos como son *Micromonospora chalcea* y *Streptomyces antibioticus*.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos.—Se utilizaron las cepas *Streptomyces antibioticus* ATCC 11891 y *Micromonospora chalcea* ATCC 12542. Para el estudio de la esporogéne-

sis y germinación los microorganismos se cultivaron en las condiciones descritas previamente. (HARDISSON and MANZANAL, 1976; HARDISSON et al., 1978).

Microscopía electrónica.—Las muestras se fijaron con OsO_4 según el método de RYTER and KELLENBERGER (1958). La deshidratación se realizó en acetona y las muestras se incluyeron en Epon. Los cortes se obtuvieron en un ultramicrotomo L.K.B. y se examinaron en un microscopio Philips EM-300 a un voltaje de 60-80 kv. Para observación de polisacáridos se utilizó la técnica descrita por THIÉRY (1967).

RESULTADOS Y DISCUSION

Ciclo de desarrollo de Streptomyces antibioticus

HOPWOOD en 1960 observó que el micelio aéreo de *S. coelicolor* se origina por ramificación del micelio sustrato, manteniendo una ultraestructura similar a la de éste. En estudios posteriores, pudo comprobarse que el micelio aéreo poseía algunas características que lo diferenciaban del micelio sustrato tales como el mayor diámetro de sus hifas, la presencia de una vaina fibrosa exterior a la pared y un mayor número de ramificaciones. (KALAKOUTSKII and AGRE, 1976).

En *S. antibioticus*, junto con las características ya mencionadas, hemos comprobado la existencia de variaciones en la ultraestructura de ambos tipos de hifas que afectan a la pared celular, región nuclear, distribución de mesosomas y ramificaciones. Así, en el micelio sustrato, la pared celular posee un grosor de 25-30 nm y no presenta una densidad uniforme a los electrones, mientras que la pared del micelio aéreo tiene un espesor inferior (15 nm) y aparece uniformemente densa a los electrones. Por otra parte, la región nuclear ocupa una mayor extensión y es más visible en el micelio aéreo. En el micelio sustrato los mesosomas son muy numerosos y aparecen en su mayoría próximos a la pared. Los mesosomas del micelio aéreo se observan tanto en la proximidad de la pared como en el interior del citoplasma y aunque menos numerosos, poseen por lo general, un volumen mayor. (Figs. 1-4).

Una característica del micelio aéreo es la elevada presencia de ramificaciones que parecen asegurar un mayor volumen celular destinado a la formación de esporas. Esta circunstancia, que supone una alta tasa de crecimiento celular, resulta sorprendente dada la distancia existente entre el medio de cultivo y la posición que ocupan estas hifas en la colonia. Por otra parte, la formación de tabiques vegetativos y de ramificaciones parecen ser procesos relacionados en las hifas aéreas, mientras que esta correspondencia no se ha observado en el micelio sustrato. (Figs. 1 y 2).

Estas diferencias, junto con las ya descritas por otros autores parecen confirmar la existencia de un proceso de diferenciación celular en el paso de micelio sustrato al aéreo, proceso que sería necesario tanto para el cambio de una

función típicamente vegetativa a una reproductora como para permitir el desarrollo de las actividades celulares en microambientes tan diferentes.

Esporogénesis.—La esporogénesis en *S. antibioticus* tiene lugar a través de dos fases: la septación y la maduración. Durante la septación, las hifas aéreas se dividen en compartimentos aislados mediante la formación de tabiques especiales o septa de esporulación. Estos tabiques se forman a intervalos regularmente espaciados, por deposición de material de nueva síntesis entre la pared de la hifa y la membrana plasmática que se invagina (Fig. 7). Durante esta fase la región nuclear se divide quedando una copia del genoma en cada uno de estos compartimentos. En *S. antibioticus* este tabique de esporulación posee una estructura similar al descrito en *S. viridochromogenes* (RANCOURT and LECHEVALIER, 1964) y consta de una estructura mixta formada por dos depósitos unidos centralmente por un doble anillo (septum del Tipo II, HARDISSON and MANZANAL, 1976). Una vez formados los tabiques se inicia la maduración durante la cual se sintetiza la pared de las esporas (Fig. 8). En esta pared entrarán a formar parte los anillos del septum mientras que los depósitos se desintegran por completo. A medida que este proceso avanza las estructuras citoplasmáticas se observan con dificultad, lo que probablemente sea debido a la baja permeabilidad de la nueva pared a los fijadores (Fig. 14).

Las esporas de *S. antibioticus* parecen originarse sin un proceso de reorganización citoplásmica y por un mecanismo más simple que el de las endosporas bacterianas. Por esta razón algunos autores aplican el término de exosporas a las esporas originadas por *Streptomyces* con el objeto de distinguirlas de las endosporas que forman las eubacterias de la *F. Bacillaceae*.

Aunque para *Streptomyces* ya ha sido descrita la presencia de materiales de reserva en forma de inclusiones citoplásmicas de poli- β -hidroxibutirato (KANNAN and REHACEK, 1970), mediante técnicas citoquímicas de polisacáridos hemos detectado la presencia de acúmulos de azúcares que probablemente corresponden a reservas en forma de glucógeno (Fig. 9). Este material comienza a formarse principalmente en las primeras fases de la maduración y no ha podido detectarse en las esporas formadas, lo que pudiera estar debido a su utilización en las fases tardías de la maduración o bien a que este material resulta de difícil visualización en las esporas.

Germinación.—El primer cambio observado al microscopio electrónico en las esporas de *S. antibioticus* durante la germinación tuvo lugar a las dos horas de cultivo. Las esporas aumentaron de volumen haciéndose visible con detalle toda su estructura (Fig. 15). La pared mostró una clara estratificación en tres capas que no se observaba en la espora durmiente. De estas capas, la más interna será la que origine la pared del tubo germinativo. El citoplasma, con abundantes mesosomas y ribosomas, parece reflejar un estado de alta actividad biosintética. En un estado más avanzado de la germinación, la mayoría de las esporas habían

emitido el tubo germinativo, apreciándose con frecuencia la división del material genético (Fig. 16).

Ciclo de desarrollo de Micromonospora

El ciclo de vida de *M. chalcea* comprende la formación de un micelio a partir de una espora que al germinar formará tubos germinativos, los cuales al crecer y ramificarse se transformarán en hifas cuyo conjunto se denomina micelio. Estas hifas en un principio poseen poca tendencia a la ramificación y tienden a crecer paralelas entre sí (Fig. 5). Posteriormente, se produce una diferenciación en el micelio de modo que las porciones apicales muestran gran tendencia a la ramificación y ya no tienden a desarrollarse paralelamente (Fig. 6). Sobre este micelio secundario se formarán nuevas esporas, cuya maduración y posterior germinación completará el ciclo.

Formación de esporas.—Las esporas de *M. chalcea* se forman sobre el micelio secundario tanto en posición intercalar como apical y habitualmente se presentan aisladas. Previamente a la formación del tabique de esporulación la zona de la hifa que dará lugar a la espora sufre un hinchamiento (Fig. 10) y a la vez existe un gran desarrollo de los mesosomas. Posteriormente, se produce la formación del tabique de esporulación por deposición centrípeta de un doble anillo denso a los electrones, que encierra una zona clara en su interior, cuyo crecimiento aislará la espora de la hifa sobre la que se forma (Figs. 11 y 12). Muy a menudo aparecen mesosomas asociados a la zona del tabique en crecimiento, lo cual concuerda con los resultados encontrados en *Streptomyces* (WILDERMUTH, 1971) y *Bacillus* (FITZ-JAMES, 1960). El tabique una vez completo presenta una apariencia semejante a la de los tabiques vegetativos y es también similar a la encontrada por HARDISSON y MANZANAL (1976) en el tipo I de esporulación de *Streptomyces*. A la vez que se forma el tabique de esporulación, la superficie de la espora se hace rugosa por evaginación de la pared de la hifa en puntos localizados. Esta evaginación se produce sin presencia de material en esos lugares de modo que no es posible una presión de tipo selectivo sobre los mismos, por lo que pensamos que podría ser debido a la acción localizada de enzimas que al disminuir la rigidez de la pared provocará la formación de los salientes. La membrana citoplásmica se evagina igualmente siguiendo la forma interna de las verrugas.

Maduración.—La maduración de las esporas de *M. chalcea* se produce como consecuencia de la deposición de materiales de pared internamente a la de la espora los cuales se dispondrán formando dos capas de diferente densidad electrónica. En la Fig. 13 se observa una espora en fase de maduración siendo claramente visibles las tres capas de las cuales la más externa es la pared de la hifa original y las dos interiores son de nueva formación presentando la exterior baja densidad a los electrones y la interior alta densidad. De estas capas la más interna alcanzará un enorme grado de desarrollo comprimiendo el citoplasma de

la espora y dificultando la penetración de los fijadores al mismo por lo que ya no son visibles estructuras internas en la espora (Fig. 17).

Germinación.—La germinación es el proceso por el cual la espora madura, que es una forma de resistencia metabólicamente inactiva, se transformará en una estructura vegetativa y por lo tanto con actividad metabólica. Este proceso ocurre siguiendo los pasos de espora durmiente, hinchada y con tubo germinativo. La ultraestructura de las esporas durmientes es muy diferente a la de las esporas hinchadas (Fig. 18), ya que aunque conservan las tres capas típicas de la pared la apariencia de las mismas se presenta muy cambiada. La capa más externa, procedente de la pared de la hifa esporógena, aparece rota revelándose así como una capa rígida incapaz de soportar el aumento de volumen experimentado por la espora durante su hinchamiento. La capa intermedia no presenta cambios notables y la interna aparece muy estrecha rodeando toda la superficie de la espora. Probablemente como consecuencia de este estrechamiento de la pared, los fijadores pueden penetrar al interior de la espora y así el citoplasma aparece nítido, observándose bien la región nuclear que en esta espora aún está bastante compacta, una gran cantidad de ribosomas y la membrana citoplasmática.

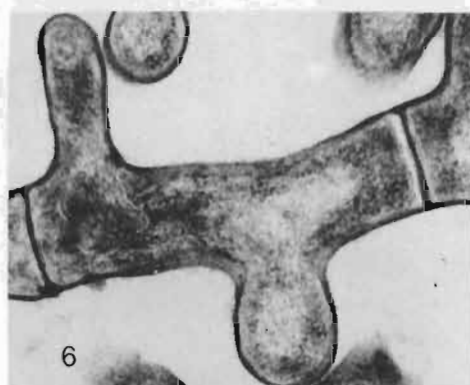
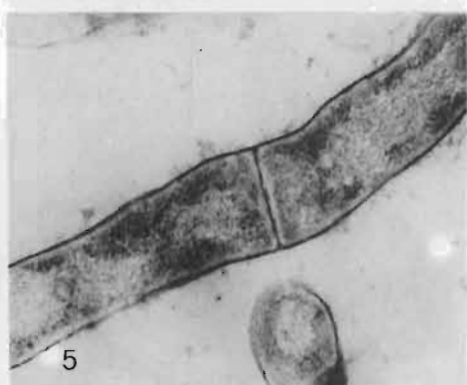
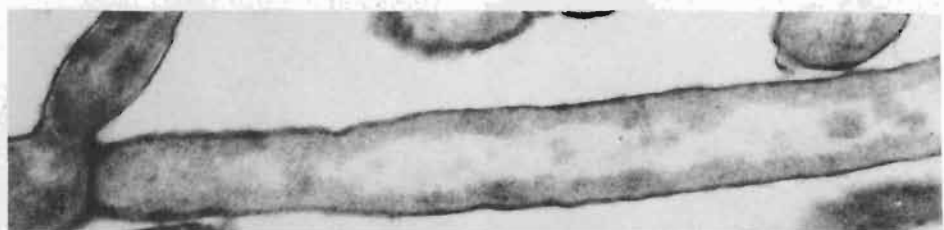
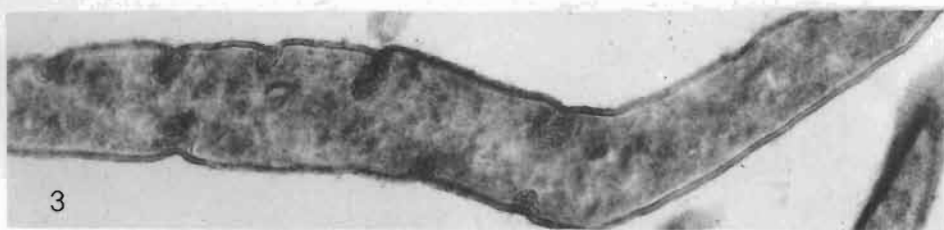
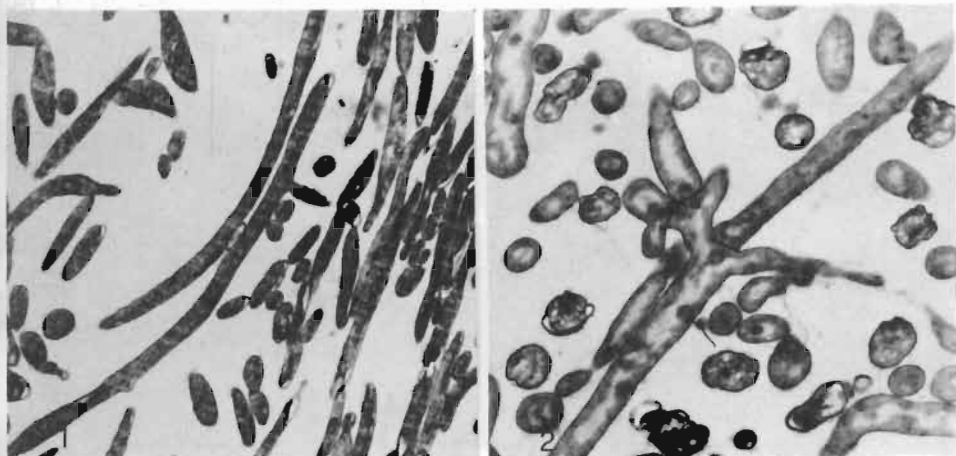
La emisión de los tubos germinativos se produce a partir de la capa más interna de la espora hinchada que atravesará las más externas formando la pared del tubo (Fig. 19). En estas esporas el ADN presenta ya una forma irregular indicando una transcripción muy activa y son visibles mesosomas aunque aparecen muy poco desarrollados teniendo la apariencia de sacos membranosos simples.

Se ha calculado si el estrechamiento de la pared sufrido por la espora durante su hinchamiento sería suficiente para cubrir la mayor superficie de la misma o bien si sería necesaria la síntesis de nuevo material de pared. El cálculo se realizó por la fórmula de GULL y TRINCI (1971): $t_s = t_d(100/S)$. En la que t_s es el grosor de la pared de la espora hinchada, t_d el de la durmiente y S la superficie de la hinchada expresada en % respecto al de la espora durmiente. Se observó que la pared de las esporas durmientes presentaba un valor medio de 44 nm de ancho y una superficie de 0,115-0,125 μm^2 mientras las hinchadas tenían 21-23 nm y 0,23-0,25 μm^2 respectivamente. El valor esperado de grosor de la pared de la espora hinchada según la fórmula fue de 22 nm por lo que los valores observados concuerdan con los esperados y consecuentemente así no es necesaria la síntesis de nuevo material de pared para que se produzca el hinchamiento.

Los actinomicetos parecen representar el nivel superior de organización procariótica. En *Streptomyces* aparece una clara diferenciación en una línea somática (micelio vegetativo) y otra germinal (micelio aéreo), mientras que en *Micromonospora* no es tan manifiesta. Esta diferenciación fue probablemente el resultado de la adaptación a un medio circundante como el terrestre, diferente a los medios hídricos en los que se desenvuelven el resto de las formas procarióticas (WILDERMUTH, 1970; KALAKOUTSKII and AGRE, 1976).

BIBLIOGRAFIA

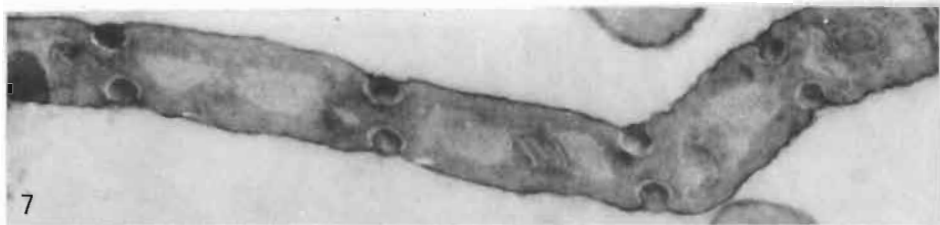
- (1) FITZ-JAMES, P. C. (1960).-*J. Biophys. Biochem. Cytol.*, **8**: 507-528.
- (2) GULL, K. and A. P. J. TRINCI (1971).-*J. Gen. Microbiol.*, **68**: 207-220.
- (3) HARDISSON, C. and M. B. MANZANAL (1976).-*J. Bacteriol.*, **127**: 1.445-1.454.
- (4) HARDISSON, C., M. B. MANZANAL, J. A. SALAS and J. E. SUÁREZ (1978).-*J. Gen. Microbiol.*, **105**: 203-214.
- (5) HOPWOOD, D. A. (1960).-*J. Gen. Microbiol.*, **22**: 295-302.
- (6) KALAKOUTSKII, L. V. and N. S. AGRE (1976).-*Bacteriol. Rev.*, **40**: 469-524.
- (7) KANNAN, L. V. and Z. REHACEK (1970).-*Indian. J. Biochem.*, **7**: 126-129.
- (8) RANCOURT, M. W. and H. A. LECHEVALIER (1964).-*Can. J. Microbiol.*, **10**: 311-316.
- (9) RYTER, A. and E. KELLENBERGER (1958).-*Z. Naturforsch.*, **13**: 597-605.
- (10) THIÉRY, J. P. (1967).-*J. de Microscopie.*, **6**: 987-1.018.
- (11) WILDERMUTH, H. (1970).-*J. Gen. Microbiol.*, **60**: 43-50.
- (12) WILDERMUTH, H. (1971).-*J. Gen. Microbiol.*, **70**: 53-63.



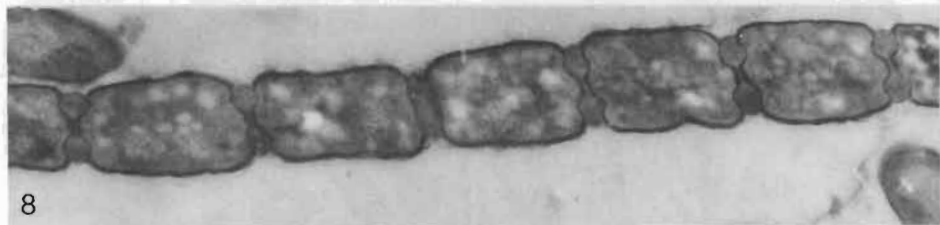
Figs. 1 y 3.—Micelio sustrato de *Streptomyces antibioticus* ($\times 6.000$ y $\times 33.000$).

Figs. 2 y 4.—Micelio aéreo de *Streptomyces antibioticus* ($\times 10.000$ y $\times 25.000$).

Figs. 5 y 6.—Micelio de *Micromonospora chalcea* en distintas fases de su desarrollo ($\times 25.000$).



7



8



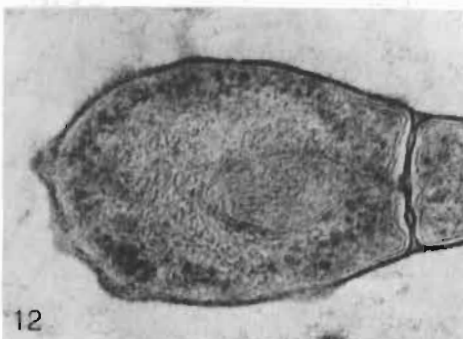
9



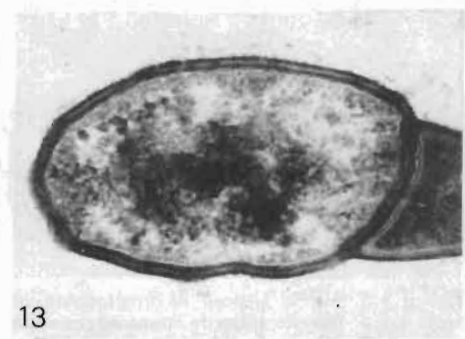
10



11



12

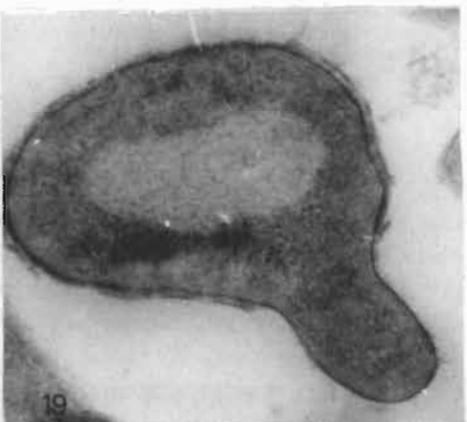
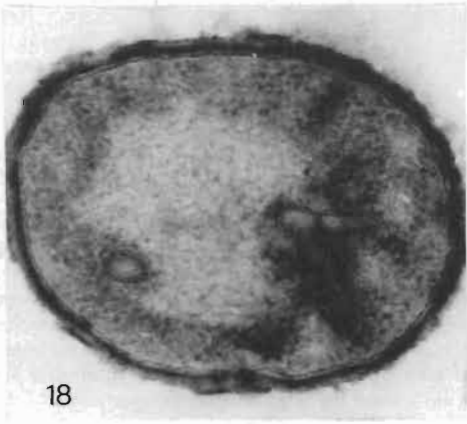
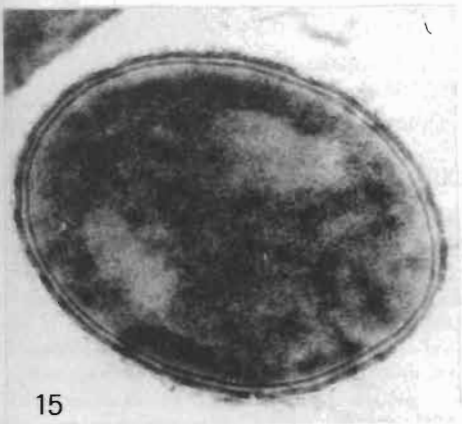
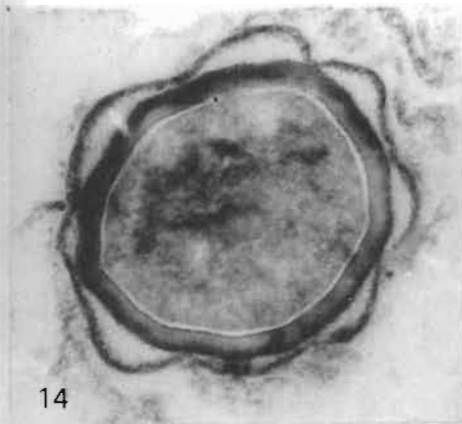


13

Figs. 7 y 8.—Formación de esporas en *Streptomyces antibioticus* ($\times 27.000$).

Fig. 9.—Presencia de polisacáridos durante la esporogénesis de *Streptomyces antibioticus* ($\times 43.000$).

Figs. 10-13.—Esporogénesis en *Micromonospora chalcea* ($\times 60.000$).



Figs. 14-16.—Germinación en *Streptomyces antibioticus* ($\times 60.000$).
Figs. 17-19.—Germinación en *Micromonospora chalcea* ($\times 70.000$).