

# UTILIDAD TAXONOMICA DE LA DETERMINACION DE ACTIVIDADES ENZIMATICAS EN *Streptomyces*

Por  
M.<sup>a</sup> E. ARIAS, J. SANCHEZ  
y

C. HARDISSON

Departamento Interfacultativo de Microbiología.  
Universidad de Oviedo.

## RESUMEN

Se ha investigado la presencia de una serie de actividades enzimáticas en 25 especies del *G. Streptomyces*. Algunas de éstas, como la hipuricasa, y los enzimas que intervienen en la degradación del p-hidroxibenzoato a  $\beta$ -cetoadipato, ofrecen un gran interés taxonómico, al no encontrarse presente en todas las especies. La existencia de la vía del ácido  $\beta$ -cetoadípico se pone de manifiesto por primera vez en *Streptomyces*, en este trabajo.

## INTRODUCCION

La clasificación del *G. Streptomyces* presenta en la actualidad grandes dificultades y, siendo muy elevado el número de especies descritas, se están llevando a cabo numerosas investigaciones destinadas a la búsqueda de aquellos criterios que permitan una mejor caracterización de las mismas y su posterior agrupación. Estos microorganismos se caracterizan por poseer un equipo enzimático que les capacita para la utilización de un gran número de sustratos resultando muy difícil elegir aquellas pruebas que permitan una mejor clasificación de las especies.

Seleccionamos para este trabajo la investigación en 25 especies de *Streptomyces* de algunas actividades enzimáticas ya descritas en el género (catalasa, amilasas, proteasas, hipuricasa y producción de melanina) y ensayamos la presencia de otras que no se habían descrito hasta ahora como de interés taxonómico dentro de este género:  $\beta$ -galactosidasa y degradación de compuestos aromáticos a través de la vía del ácido  $\beta$ -cetoadípico.

## MATERIAL Y METODOS

*Determinación de actividades catalasa, amilasa y proteolítica.*—Estas actividades se determinaron por los métodos clásicos, KUSTER (1972) y WILLIAMS & CROSS (1971).

*Determinación de actividad hipuricasa.*—Esta determinación enzimática se llevó a cabo en el medio agar-hipurato de THIRST (1957), tras 10 días de incubación a 28°C.

*Ensayo de producción de melanina.*—Se emplearon dos medios de cultivo: agar-peptona-hierro y agar-tirosina (SHINOBU, 1958), recomendados para este fin por el ISP (Proyecto Internacional de Streptomyces, 1966). El ennegrecimiento de ambos medios a los seis días de incubación confirmó esta propiedad.

*Determinación de actividad  $\beta$ -galactosidasa.*—Para la determinación de esta actividad enzimática se partió de un inóculo (suspensión concentrada de esporas en agua destilada estéril) que se añadió a matraces conteniendo el siguiente medio de cultivo: glicerol, 10 g; asparragina, 1 g; extracto de levadura, 0,25 g;  $\text{PO}_4\text{HK}_2$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}$ , 0,5 g;  $\text{SO}_4\text{Fe}$ , 0,01 g; agua destilada, 1.000 ml. A las 30 horas de incubación a 28°C y 200 rpm, se tomaron 3 ml de cada cultivo que sirvieron de inóculo a nuevos matraces con nuevo medio salino adicionado de lactosa, galactosa o glicerol. El medio salino tenía la siguiente composición: asparragina, 1 g;  $\text{PO}_4\text{H}(\text{NH}_4)_2$ , 1 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,5 g;  $\text{Cl}_2\text{Ca}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,2 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,69 g;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,8 g;  $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot \text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{Mo}_4\text{Na}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g y agua destilada 1.000 ml. La determinación cualitativa de la actividad se llevó a cabo en células enteras incubadas en presencia del posible inductor (lactosa o galactosa) y en células incubadas en glicerol (actividad basal) utilizando el método de Lederberg (1950).

*Determinación del ácido  $\beta$ -cetoacético.*—Se determinó la presencia de este cetoácido siguiendo el método descrito por HOSOKAWA (1970). Se empleó el siguiente medio de cultivo:  $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ , 1 g;  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{K}$ , 0,68 g;  $\text{PO}_4\text{HNa}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 1,79 g;  $\text{SO}_4\text{Mg}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 1 g;  $(\text{SO}_4)_3\text{Fe}_2\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,002 g;  $\text{SO}_4\text{Fe}\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{SO}_4\text{Mn}\cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{MoO}_4\text{Na}_2\cdot 12\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g;  $\text{SO}_4\text{Cu}\cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 0,005 g; agua destilada, 1.000 ml. Como fuentes de carbono se emplearon p-hidroxibenzoato sódico 15 mM y protocatecato sódico 8 mM. La prueba se llevó a cabo en células enteras, células rotas y sobrenadante del medio de cultivo. Como controles se utilizaron medio de cultivo sin inocular y solución enzimática más reactivos, omitiendo el sustrato (protocatecato sódico).

## RESULTADOS Y DISCUSION

### *Determinación de actividades catalasa, amilasa y proteasa*

El ensayo de la presencia de estas actividades enzimáticas en las 25 especies de *Streptomyces* dio resultado positivo en todos los casos, pudiendo deducirse que su determinación no es un criterio útil para fines taxonómicos, puesto que al menos cualitativamente no encontramos diferencias de comportamiento entre las distintas especies.

### *Determinación de actividad hipuricasa*

De las especies ensayadas, únicamente 9 (36 %) produjeron cambio de color (de amarillo a rosa) en el medio de cultivo, según las observaciones realizadas a los 10 días de incubación frente a controles sin inocular. Las especies que presentaron esta capacidad hidrolítica fueron las siguientes: *S. violaceus*, *S. cinnamonensis*, *S. fradiae*, *S. erythraeus*, *S. venezuelae* RA, *S. griseus* GM, *S. violascens*, *S. aureofaciens* y *S. coelicolor* A3 (2). Esta prueba confirmó su utilidad en taxonomía de *Streptomyces*, criterio compartido con ZIEGLER & KUTZNER (1972).

### *Ensayo de producción de melanina*

La confirmación de esta prueba se puso de manifiesto en las siguientes especies: *S. scabies*, *S. antibioticus*, *S. violascens*, *S. colerensis* y *S. glaucescens*, presentando pigmento pardo sobre agar-peptona-hierro y ennegrecimiento sobre agar-tirosina a los 10 días de incubación. Otras especies (*S. lavendulae*, *S. griseus* GM y *S. viridochromogenes*) produjeron pigmento únicamente sobre agar-peptona-hierro pero no sobre agar-tirosina. La formación de pigmentos únicamente sobre agar-peptona-hierro puede ser debida a la formación de pigmentos de naturaleza no melanoide, como propusieron ARAI & MIKAMI (1971) o bien a tratarse de especies productoras de SH<sub>2</sub> que, al combinarse con el hierro, provocaría el ennegrecimiento.

### *Determinación de actividad β-galactosidasa*

De las 25 especies ensayadas, únicamente 9 (36 %) presentaron débil actividad basal. En el caso de células incubadas sobre lactosa y galactosa se intensificó grandemente la actividad, aunque la naturaleza del inductor influyó grandemente en la respuesta según la especie ensayada. Basándonos en esta diferente respuesta al inductor agrupamos las especies del siguiente modo: 1.º) Especies que presentaron mayor actividad en lactosa: *S. antibioticus*, *S. bambergensis*, *S. griseus*, *S. griseus* GM, *S. venezuelae* RA, *S. lavendulae*, *S. viridochromogenes* y *S. erythraeus*. 2.º) Especies que presentaron mayor actividad en galactosa: *S. albus*, *S. ambofaciens*, *S. aureofaciens*, *S. flaveolus*, *S. violaceus*, *S.*

*colerensis*, *S. scabies*, *S. violascens*, *S. glaucescens*, *S. acrimycini* y *S. coelicolor* A3 (2). 3.<sup>o</sup>) Especies que no presentaron diferencias según el inductor utilizado: *S. cinnamomensis*, *S. fradiae*, *S. flavovirens*, *S. fluorescens*, *S. coelicolor* CBS y *S. rimosus*.

#### Determinación de ácido $\beta$ -cetoadípico

En células enteras no obtuvimos resultados positivos, concluyendo que las especies de *Streptomyces* no son permeables al sustrato, a pesar de la adición de tolueno. La aplicación del método en el sobrenadante del medio de cultivo dio resultado positivo a partir de las 48 horas de incubación en las seis especies que presentaron crecimiento en ambas fuentes de carbono (p-hidroxibenzoato y protocatecato). La prueba en el extracto libre de células dio positiva a las 24 y 48 horas de incubación y negativa a partir de este tiempo. Las especies que dieron positiva esta prueba fueron las siguientes: *S. violaceus*, *S. griseus*, *S. antibioticus*, *S. aureofaciens*, *S. coelicolor* A3 (2) y *S. scabies*.

Esta prueba no había sido aplicada hasta ahora en estudios sistemáticos de *Streptomyces*, probando los resultados obtenidos por nosotros su gran utilidad taxonómica puesto que únicamente seis de las especies fueron capaces de asimilar el p-hidroxibenzoato a través de la ruta del  $\beta$ -cetoadípico, que coincide con la ya descrita en otros géneros bacterianos como *Pseudomonas* (ORNSTON & STANIER, 1966), *Azotobacter* (HARDISSON et al., 1969; SALA-TREPAT y EVANS, 1971), *Alcaligenes* (JOHNSON & STANIER, 1971) y entre los actinomicetos en *Nocardia* (RANN & CAIN, 1969).

#### BIBLIOGRAFIA

- (1) ARAI, T. y MIKAMI, Y. (1971).—Appl. Microbiol., **23**: 402.
- (2) HARDISSON, C., SALA-TREPAT, J. M. y STANIER, R. Y. (1969).—J. Gen. Microbiol., **59**: 1.
- (3) JOHNSON, B. J. y STANIER, R. Y. (1971).—J. Bact., **107**: 468.
- (4) KUSTER, E. (1972).—Int. J. Syst. Bacteriol., **22**: 139.
- (5) LEDERBERG, J. (1950).—J. Bacteriol., **60**: 381-392.
- (6) ORNSTON, L. N. y STANIER, R. Y. (1966).—J. Biol. Chem., **241**: 3.766.
- (7) RANN, D. L. y CAIN, R. D. (1969).—Biochem. J., **114**: 77.
- (8) SALA-TREPAT, J. M. y EVANS, W. C. (1971).—Eur. J. Biochem., **20**: 400.
- (9) SHINOBU, R. (1966).—Int. J. System. Bacteriol., **16**: 313.
- (10) WILLIAMS, S. T. y CROSS, T. (1971).—Methods in Microbiology, **4**: 295-334.
- (11) ZIEGLER, T. y KUTZNER, H. J. (1972).—Jg. Heft., **3**, 123.