

FISIOLOGIA DE LA GERMINACION EN DOS ACTINOMICETOS: *Streptomyces* y *Micromonospora*

Por
C. BARBES, M. B. MANZANAL, M.^a R. RODICIO,
J. A. SALAS, J. E. SUAREZ

y
C. HARDISSON
Departamento Interfacultativo de Microbiología.
Universidad de Oviedo

RESUMEN

La germinación de las esporas de *S. antibioticus* y *M. chalcea* transcurre a través de tres fases: oscurecimiento, hinchamiento y emergencia de los tubos germinativos. La primera fase, oscurecimiento, se caracteriza por un descenso de la D.O. y una disminución de la refringencia; solamente requiere cationes divalentes y la energía necesaria puede obtenerse a partir de las reservas endógenas de la espora. La segunda fase, hinchamiento, necesita una fuente de carbono exógena y no es bloqueada por mitomicina C; en este estado las esporas presentan una gran actividad metabólica. La última fase, emergencia, requiere fuentes de carbono y de nitrógeno. La temperatura óptima para la germinación fue 45°C y 40°C para *S. antibioticus* y *M. chalcea*, respectivamente, y el pH óptimo fue 8 para ambos microorganismos. La síntesis de macromoléculas siguió el orden ARN, proteína y ADN y fue sensible a inhibidores de síntesis de macromoléculas. Ambos microorganismos no parecen presentar diferencias notables en su germinación, a excepción del metabolismo más lento que posee *M. chalcea*.

INTRODUCCION

Los Actinomicetos son un grupo de bacterias en las cuales a partir de una espora asexual se desarrolla un micelio ramificado; en este micelio posteriormente se producirán esporas por tabicación de las hifas las cuales una vez maduras y colocadas en condiciones apropiadas repetirán el ciclo. La germinación es el proceso por el cual una espora se transforma en un organismo vegetativo (CROSS & ATTWELL, 1975). Dentro del orden Actinomycetales se encuentran los géneros *Streptomyces* (productor de la mayor parte de los antibióticos conocidos) y *Micromonospora* (productor de varios antibióticos).

Este trabajo presenta un estudio comparativo de la fisiología de la germi-

nación de dos especies de estos géneros: *Streptomyces antibioticus* y *Micromonospora chalcea*.

MATERIAL Y METODOS

Microorganismos

Los microorganismos utilizados en este estudio fueron *Streptomyces antibioticus* ATCC* 11891 y *Micromonospora chalcea* ATCC 12542.

Obtención de esporas

Ambos microorganismos se sembraron en matraces de 250 ml con 75 ml de medio G.A.E. sólido (glucosa-asparagina-extracto de levadura) (HARDISSON et al. 1978), y se incubaron a 28°C durante nueve días (*S. antibioticus*) y 20 días (*M. chalcea*). Pasado este tiempo, a los matraces esporulados se añadieron unas 200 bolas de vidrio estériles de 3-4 mm de diámetro y se agitaron los matraces suavemente con el fin de que las esporas quedasen adheridas a las bolas. Las bolas se lavaron con solución salina + Tritón X-100 0,025 % y se filtró la suspensión a través de papel de filtro Whatman n.º 1 para eliminar los restos de micelio. El filtrado se lavó dos veces mediante centrifugación en solución salina y el sedimento se resuspendió en el medio adecuado y se ajustó la densidad óptica (580 nm) a 0,3 (10^8 esporas/ml para *S. antibioticus* y 3×10^8 esporas/ml para *M. chalcea*).

Germinación

Alicuotas de 10 ml de las suspensiones de esporas fueron incubadas en matraces de 100 ml a 35°C y 200 r.p.m. A intervalos de tiempo determinados, se tomaron muestras para determinar su D.O. y para su observación en el microscopio de contraste de fases.

Influencia de factores físicos, químicos y nutricionales

El efecto de la temperatura sobre la germinación se estudió incubando matraces de 100 ml con 10 ml de suspensión de esporas en medio GAE a distintas temperaturas desde 23 a 55°C, y tomando muestras a distintos tiempos para su observación al microscopio. Para determinar el efecto del pH sobre la germinación, los componentes del medio GAE se disolvieron en distintos tampones 0,1 M (GOMORI, 1955) con valores de pH desde 1 a 10, siguiéndose la germinación mediante toma de muestras y observación en el microscopio.

* ATCC American Type Culture Collection.

El estudio nutricional se realizó observando el efecto de cationes divalentes, fuente de carbono y fuente de nitrógeno sobre la germinación. Los cationes ensayados fueron Ca^{2+} , Mg^{2+} y Fe^{2+} , todos ellos en concentración 0,001 % en agua destilada. Se ensayaron 14 fuentes de carbono y 20 fuentes de nitrógeno a concentraciones finales 1 % y 0,2 % respectivamente, usando como medio basal las sales del medio GAE. Como fuente de nitrógeno se empleó en el primer caso $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$ y como fuente de carbono glucosa para el segundo caso. La acción de varios inhibidores sobre la germinación se estudió añadiendo el inhibidor al medio GAE al inicio de la germinación y observando su efecto sobre la posterior emisión de los tubos germinativos a las seis horas (*S. antibioticus*) y a las ocho horas (*M. chalybeata*).

Determinación de actividades respiratoria, catalasa y citocromo oxidasa

Se empleó un electrodo de oxígeno polarográfico tipo Clark. Suspensiones de esporas a concentraciones de 2×10^8 esporas/ml para *S. antibioticus* y 10^9 esporas/ml para *M. chalybeata*, en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 se colocaron en la cubeta del electrodo durante tres minutos a 35°C para alcanzar la temperatura del experimento y a continuación se añadieron los respectivos sustratos. Las muestras se mantuvieron en continua agitación mediante agitación magnética. Los sustratos empleados fueron glucosa 20 mM para respiración, ascorbato sódico 10 mM y NNN'-N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) 2,5 mM para citocromo oxidasa y H_2O_2 1 mM para catalasa. La actividad citocromo oxidasa se ensayó según el método de JURTSUK et al. (JURTSUK, MARCUCCI & MCQUITTY, 1975) y la actividad catalasa según el método de RORTH & JENSEN (1967).

Síntesis de macromoléculas

La síntesis de macromoléculas durante la germinación se estudió por métodos radioactivos y colorimétricos. Por métodos radioactivos se estudió la incorporación de ^3H -Uridina, ^3H -Leucina y ^3H -Timina todos ellos en concentración 1 $\mu\text{Ci/ml}$ a RNA, proteína y DNA, respectivamente. A tiempos determinados se sacaron muestras en las que se detuvo la incorporación de elemento radioactivo, se filtraron y se contó la radioactividad precipitada en el filtro en un contador de centelleo. En algunos experimentos la incorporación de elemento radioactivo se determinó mediante pulsos de 3 min (*S. antibioticus*) ó 5 min (*M. chalybeata*). La cantidad total de macromoléculas durante la germinación se determinó por métodos colorimétricos. Las muestras de esporas (60 ml de D.O. = 0,3) fueron lavadas y posteriormente rotas en un homogeneizador Braun. El extracto crudo se hizo 0,25 M con ClO_4H y se mantuvo 30 min en baño de hielo. Posteriormente se centrifugó y el sedimento se extrajo con ClO_4H 0,5 M a 70°C durante 20 min repitiéndose la operación tres veces. Los sobrenadantes que resultaron se utilizaron para la determinación de RNA por el método de SCHNEI-

DER (1957) y de DNA por el método de BURTON (1956). El sedimento se extrajo con Na OH 1M en caliente y el sobrenadante se empleó para la determinación de proteínas por el método de LOWRY et al. (LOWRY, ROSEBROUGH, FARR & RANDALL, 1951).

RESULTADOS

Cambios morfológicos y absorbancia durante la germinación

Hemos empleado dos métodos para el estudio de la germinación de *S. antibioticus* y *M. chalybeata*: a) Recuento en cámara Thoma al microscopio de contraste de fases de las distintas fases morfológicas y b) Variación de la densidad óptica. Las esporas durmientes de ambos actinomicetos presentan un centro claro refringente rodeado de una zona más oscura; al colocarse en un medio de germinación la espora oscurece, posteriormente hincha alcanzándose un máximo de esporas hinchadas a las 2 y 5 horas en *S. antibioticus* y *M. chalybeata* respectivamente; finalmente tiene lugar la emergencia de los tubos germinativos. Estos cambios morfológicos van acompañados de variaciones de la D.O. (Fig. 1). El oscurecimiento coincide con un descenso de la D.O. (20 y 30 % con respecto al valor inicial en *S. antibioticus* y *M. chalybeata* respectivamente); posteriormente la D.O. aumenta con la emergencia de los tubos germinativos. El peso seco de las esporas permanece constante hasta el momento de la emisión de los tubos germinativos en que comienza a aumentar progresivamente (Fig. 1).

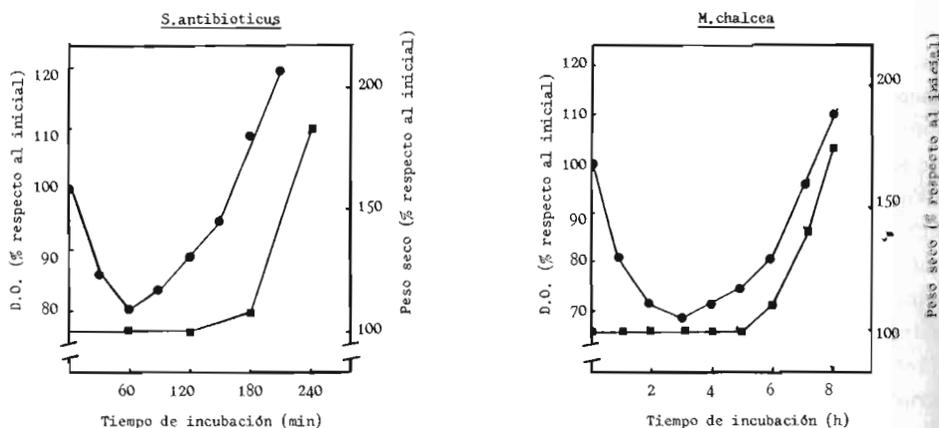


Fig. 1.-Variación de la densidad óptica (●) y el peso seco (■) durante la germinación.

Influencia de factores físicos, químicos y nutricionales

a) *Temperatura*. Los márgenes de temperatura entre los cuales germinaron las esporas fueron 20-50°C para *S. antibioticus* y 20-45°C para *M. chalcea*, siendo la temperatura óptima 45°C y 40°C para *S. antibioticus* y *M. chalcea* respectivamente.

b) *pH*. Las esporas germinaron dentro del margen de pH 6,0-9,5 (*S. antibioticus*) y 6,5-11,0 (*M. chalcea*) siendo el pH óptimo 8,0 para ambos microorganismos.

c) *Nutrientes*. Las esporas de ambos microorganismos no germinaron en agua destilada, pero oscurecieron con la adición de muy pequeñas cantidades de cationes divalente: SO_4Mg , SO_4Fe y Cl_2Ca (0,001 %). Para que el hinchamiento tenga lugar es necesaria la adición de una fuente de carbono (por ejemplo, glucosa 1 %) y para la emergencia de los tubos germinativos son necesarias la presencia simultánea de fuente de carbono y de nitrógeno. Se ensayó el efecto de 20 fuentes de nitrógeno (orgánicas e inorgánicas) y de 14 fuentes de carbono. En ambos microorganismos hubo compuestos que permitieron una rápida germinación, otros que permitían una germinación lenta y otros que no fueron metabolizables. Las mejores fuentes de nitrógeno fueron sales inorgánicas: $\text{SO}_4(\text{NH}_4)_2$, NO_3NH_4 y NO_3Na y entre los aminoácidos: alanina, prolina, glicina, isoleucina e histidina en ambos microorganismos. Como fuentes de carbono ambos utilizaron muy bien glucosa y galactosa, siendo también bien empleadas sacarosa y maltosa.

d) *Inhibidores*. La germinación de las esporas de ambos microorganismos fue sensible a inhibidores respiratorios y desacoplantes de la fosforilación oxidativa tales como cianuro potásico, atabrina y 2,4-dinitrofenol (todos ellos a concentración 1 mM), bloqueándose la germinación en su fase inicial permaneciendo las esporas en estado durmiente. También fue sensible a inhibidores de síntesis de macromoléculas como estreptomicina, rifampicina, cloranfenicol, mitomicina C y actinomicina D, aunque en este caso la inhibición no afecta a la fase inicial u oscurecimiento, permaneciendo las esporas oscuras.

e) *Variación en actividades enzimáticas y respiración durante la germinación*. Las esporas durmientes de ambos microorganismos presentan una actividad respiratoria baja pero detectable con el electrodo de oxígeno, así como actividades catalasa y citocromo oxidasa. Con la germinación todas estas actividades específicas aumentan progresivamente alcanzándose un máximo con el hinchamiento para después disminuir y alcanzar un valor constante (Fig. 2).

f) *Síntesis de macromoléculas*. El orden de inicio de la síntesis de macromoléculas fue el mismo en ambos microorganismos determinado tanto por métodos radioactivos como por métodos químicos: ARN, proteína y ADN (Figs. 3 y 4). La síntesis de ARN comienza con el oscurecimiento, la de proteína con el hinchamiento y la de ADN con la emisión de los tubos germinativos. Se estudió el efecto de la adición de inhibidores de la síntesis de macromoléculas añadidos al

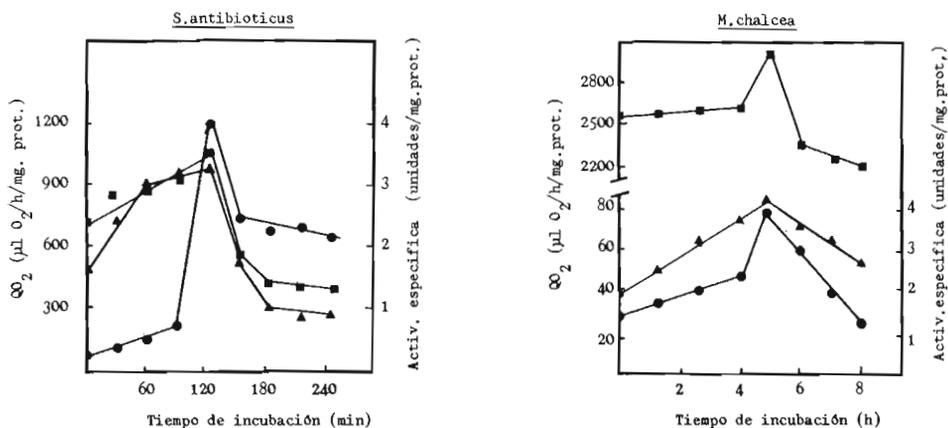


Fig. 2.—Cociente respiratorio (●), actividad catalasa (▲) y actividad citocromo oxidasa (■) durante la germinación.

inicio de la incubación. En *S. antibioticus*, la rifampicina y la estreptomicina bloquearon totalmente la síntesis de las tres macromoléculas, mientras que la mitomicina C solamente bloqueó la síntesis de ADN. En *M. chalybeata* la rifampicina bloqueó la síntesis de las tres macromoléculas mientras que estreptomicina y mitomicina C bloquearon tanto la síntesis de proteína como la de ADN pero no la de ARN.

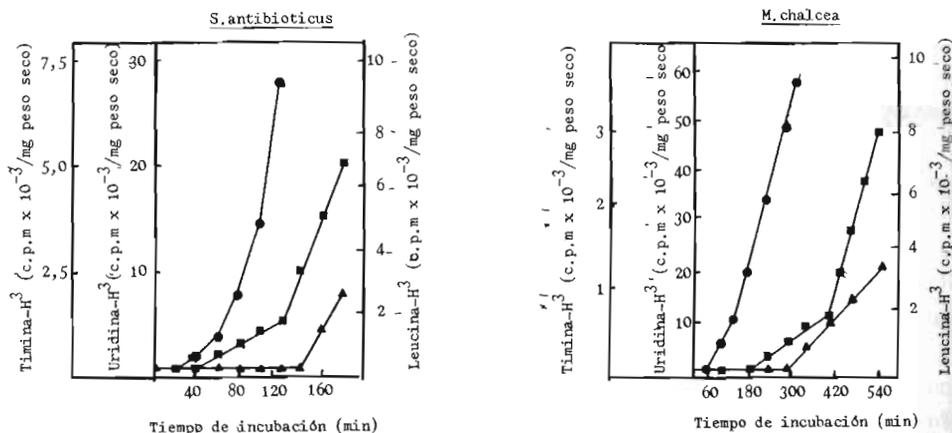
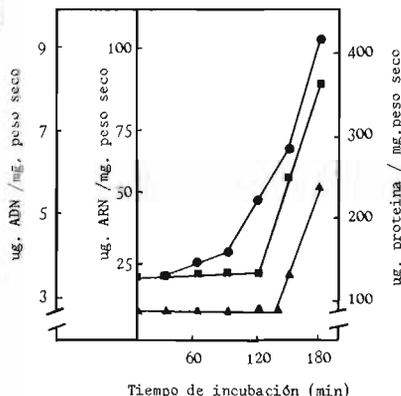


Fig. 3.—Síntesis de macromoléculas determinada por incorporación de precursores radioactivos. TNA (●), DNA (▲) y proteína (■).

S. antibioticus



M. chalybea

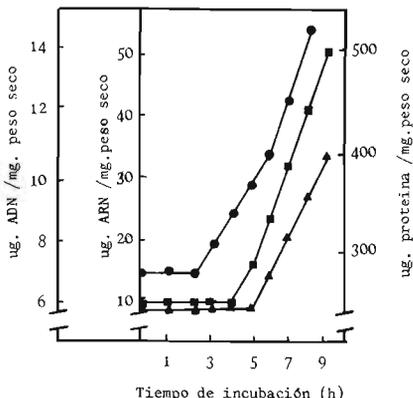


Fig. 4.-Síntesis de macromoléculas determinada por métodos colorimétricos. RNA (●), DNA (▲) y proteína (■).

DISCUSION

La germinación abarca el conjunto de cambios morfológicos, fisiológicos y bioquímicos por los que las esporas durmientes se transforman en células vegetativas. En los Actinomicetos estudiados en este trabajo, el proceso puede dividirse en tres fases: oscurecimiento, hinchamiento y emergencia de los tubos germinativos. El oscurecimiento es un proceso por el cual las esporas pierden la refringencia característica del estado durmiente y consecuentemente se produce un descenso en la densidad óptica de la suspensión de esporas, la cual es mayor en *M. chalybea* que en *S. antibioticus* dada la mayor refringencia de sus esporas. Para que el oscurecimiento tenga lugar es absolutamente necesario en ambos microorganismos la presencia de cationes, siendo independiente del aporte energético externo, aunque sin embargo es inhibido por inhibidores respiratorios por lo que el proceso requiere energía que las esporas obtienen a partir de sus reservas endógenas. Este resultado coincide con el encontrado por ENSIGN (1976) en *S. viridochromogenes*. Además durante el oscurecimiento no existe síntesis de macromoléculas teniendo lugar en presencia de inhibidores de estas biosíntesis, aunque una vez las esporas han oscurecido comienza la biosíntesis de ARN. El oscurecimiento difiere esencialmente del proceso denominado iniciación de la germinación de *Bacillus* ya que éste es un proceso esencialmente degradativo durante el cual se pierde hasta un 30 % del peso seco de las esporas (POWELL & STRANGE, 1953).

Durante el hinchamiento las esporas aumentan de diámetro como consecuencia de la hidratación de su citoplasma, ya que su peso permanece constante, habiéndose postulado que ocurriría como consecuencia de la hidrólisis controlada

de grandes macromoléculas citoplásmicas con el consiguiente aumento de la presión osmótica interna (HOHL, 1975). El hinchamiento requiere energía que ha de ser externa en el caso de *S. antibioticus*, pudiendo ser endógena durante gran parte del proceso en *M. chalybeata*. Durante este estado las actividades metabólicas de las esporas aumentan rápidamente obteniéndose máximas actividades específicas en el momento en que hay un máximo de esporas hinchadas y así tanto la respiración como la citocromooxidasa y la catalasa presentan máximo en este punto de la germinación. Este resultado está de acuerdo con el descrito por KALAKOUTSKII & POZHARITSKAJA (1973) en *Actinomyces streptomycini*. La actividad de biosíntesis de ARN es necesaria para el hinchamiento y así los inhibidores de su síntesis inhiben el proceso. La biosíntesis proteica comienza durante el hinchamiento por lo que los inhibidores de su síntesis la retardan severamente. El orden de biosíntesis de macromoléculas es ARN, proteína y ADN. A resultados semejantes han llegado BALASSA & CONTESSA (1965) en *Bacillus* y MIKULIK et al. (1977) en *S. granaticolor*. Es interesante resaltar que el hinchamiento ocurre en ausencia de compuestos nitrogenados por lo que estas biosíntesis han de ser efectuadas a expensas de reservas endógenas. Resultados similares fueron hallados en *Bacillus* (GARRICK & TORRIANI, 1973). La mitomicina C presentó un efecto diferente en su acción sobre ambos microorganismos ya que en *S. antibioticus* sólo inhibe la síntesis de ADN no siendo afectado por tanto el hinchamiento mientras que en *M. chalybeata* posee también efecto sobre la síntesis de proteínas con lo que el hinchamiento se retarda.

La emisión de los tubos germinativos requiere procesos de biosíntesis activa como se desprende del aumento de peso seco, siendo necesario aporte externo de fuentes de carbono y de nitrógeno; su comienzo coincide con el inicio de la síntesis de ADN, siendo inhibida por inhibidores de la síntesis de esta macromolécula. Estos resultados coinciden con los descritos por SETLOW & KORNBERG (1970) en *Bacillus* y por LOPERFIDO & SADOFF (1973) en cistos de *Azotobacter*. Esta fase de la germinación es la única que permite la obtención de protoplastos por tratamiento con lizozima (RODICIO et al., 1978).

BIBLIOGRAFIA

- (1) BALASSA, G. & CONTESSA, A. (1973).—Annales de l'Institut Pasteur, **109**: 683-705.
- (2) BURTON, K. (1956).—Biochemical Journal, **62**: 315-323.
- (3) CROSS, T. & ATTWELL, R. W. (1975).—Spores VI, 3-14. American Society for Microbiology.
- (4) ENSIGN, J. C. (1976).—Microbiology 1976, 531-533. American Society for Microbiology.
- (5) GARRICK-SILVERSMITH, L. & TORRIANI, A. (1973).—Journal of Bacteriology, **114**: 507-516.
- (6) GOMORI, G. (1955).—Methods in Enzymology, **1**: 138-146.
- (7) HARDISSON, C., MANZANAL, M. B., SALAS, J. A. & SUÁREZ, J. E. (1978).—Journal of General Microbiology, **105**: 203-214.
- (8) HOHL, H. R. (1975).—2th International Fungal Spore Symposium. Wiley Interscience.
- (9) JURTSCHUK, P., MARCUCCI, O. M. & MCQUITY, D. (1975).—Applied Microbiology, **30**: 959-963.

- (10) KALAKOUTSKII, L. V. & POZHARITSKAJA, L. M. (1973).—The Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance. 155-178. Academic Press.
- (11) LOPERFIDO, B. & SADOFF, H. L. (1973).—Journal of Bacteriology, **113**: 841-846.
- (12) LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. & RANDALL, R. J. (1951).—Journal of Biological Chemistry, **193**: 265-275.
- (13) MIKULIK, K., JANDA, I., MASKOVA, H., STASTNA, J. & JIRANOVA, A. (1977).—Folia Microbiológica, **22**: 252-261.
- (14) POWELL, J. F. & STRANGE, R. E. (1953).—Biochemical Journal, **54**: 205-209.
- (15) RODICIO, M.^a R., MANZANAL, M. B. & HARDISSON, C. (1978).—Current Microbiology, **1**: 89-92.
- (16) RORTH, M. & JENSEN, P. K. (1967).—Biochimica et Biophysica Acta, **139**: 171-173.
- (17) SETLOW, P. & KORNBERG, A. (1970).—Journal of Biological Chemistry, **245**: 3.645-3.652.
- (18) SCHNEIDER, W. C. (1957).—Methods in Enzymology, **3**: 680-689.