

## ESTUDIO COMPARATIVO DE LA RESPIRACION DE ESPORAS DURMIENTES E HINCHADAS DE *Streptomyces antibioticus*

Por  
JOSE ANTONIO SALAS

y  
CARLOS HARDISSON

Departamento Interfacultativo de Microbiología.  
Universidad de Oviedo. España

### RESUMEN

Las esporas durmientes de *S. antibioticus* presentan valores  $QO_2$  para la respiración endógena y exógena de 10,69 y 32,71  $\mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$  peso seco, respectivamente. Diversas especies estudiadas de este género presentaron valores superiores e inferiores a los obtenidos con *S. antibioticus*. La respiración exógena, tanto en esporas durmientes como en esporas hinchadas, fue sensible al cianuro potásico, atabrina, EDTA y 2,4-dinitrofenol e insensible a rotenona, antimicina A y dicumarol. La azida sódica ejerció un doble efecto: inhibidor y estimulante de la respiración exógena, dependiendo el efecto observado de la concentración de inhibidor y del estado morfológico de las esporas. Para conseguir el mismo efecto en esporas hinchadas que en esporas durmientes fueron necesarias concentraciones 10 veces superiores de azida sódica. Se demuestra asimismo la presencia en las esporas durmientes de dos actividades enzimáticas relacionadas con el metabolismo respiratorio: catalasa y citocromo oxidasa. Ambas actividades específicas fueron muy superiores en esporas hinchadas con respecto a las esporas durmientes. Estos resultados sugieren la participación de flavoproteínas y citocromos en la cadena respiratoria de las esporas, ausencia de quinonas y la presencia de actividad citocromo oxidasa y catalasa. Asimismo, muestran que no parecen existir diferencias significativas importantes en la composición de la cadena respiratoria en ambos estados morfológicos de la germinación.

### SUMMARY

Dormant spores of *S. antibioticus* showed  $QO_2$  values for endogenous and exogenous respiration of about 10.69 and 32.71  $\mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$  dry weight. There was important differences in the  $QO_2$  values obtained with different *Streptomyces* species. No significant differences in sensitivity to several metabolic inhibitors in dormant and swollen spores were detected. Exogenous respiration was sensitive to potassium cyanide, atabrin, EDTA and 2,4-dinitrophenol and insensitive to rotenone, antimycin A and dicoumarol. Sodium azide produced inhibition and stimulation of the respiration depending on the inhibitor concentration and of the morphological stage of the spores, being necessary 10 times superior concentrations to get the same effect in swollen spores than in dormant spores. Other two enzymatic activities related with the respiratory metabolism were also detected in dormant and swollen spores. These enzymatic specific activities were 3-4 times higher in swollen spores than in dormant spores. Our results suggest the presence of flavoproteins, cytochromes *b* and *c*, cytochrome oxidase and catalase in the respiratory chain of the spores.

## INTRODUCCION

El estudio del género *Streptomyces* presenta un gran interés tanto en el aspecto industrial como en el aspecto científico. La mayor parte de los antibióticos conocidos así como distintos metabolitos de interés industrial son producidos por especies de este género. Por otro lado, este microorganismo presenta un ciclo de vida complejo que comprende distintos procesos de gran importancia en estudios de diferenciación celular: diferenciación de micelio sustrato en aéreo, esporulación y germinación. Distintos aspectos de la germinación de las esporas han sido estudiados por varios autores (ATTWELL y CROSS, 1973; CROSS y ATTWELL, 1975; HIRSCH y ENSIGN, 1976 a y b; HARDISSON, MANZANAL, SALAS y SUÁREZ, 1978; HARDISSON, SALAS, GUIJARRO y SUÁREZ, 1980), pero a pesar de ser *Streptomyces* un microorganismo aerobio estricto, se conoce muy poco sobre los procesos de obtención de energía, su metabolismo respiratorio, la composición de su cadena respiratoria, actividades enzimáticas relacionadas con ella, etc., y los pocos datos existentes en la bibliografía han sido obtenidos empleando micelio vegetativo. Así, se ha estudiado la composición de la cadena respiratoria del micelio de varias especies de *Streptomyces* (INOUE, 1958; NIEDERPRUEM y HACKETT, 1961; REHACEK, RAMANKUTTY y KOZOVA, 1968; INOUE, 1973) y solamente en un trabajo se ha señalado la presencia de citocromos en las esporas de *Streptomyces* (TAPTIKOVA, KALAKOUTSKII y AGRE, 1969).

Durante la germinación de las esporas de *Streptomyces antibioticus* se suceden distintos estados morfológicos que han sido descritos y caracterizados previamente (HARDISSON, MANZANAL, SALAS y SUÁREZ, 1978): espora durmiente, espora oscura, espora hinchada y espora con tubo germinativo. El presente trabajo presenta un estudio comparativo de la respiración de las esporas durmientes e hinchadas de *Streptomyces antibioticus*, así como un estudio de la acción de distintos inhibidores respiratorios y desacoplantes de la fosforilación oxidativa y la detección en las esporas de dos actividades enzimáticas, catalasa y citocromo oxidasa, relacionadas con el metabolismo respiratorio.

## MATERIAL Y METODOS

### *Microorganismo, medios de cultivo y obtención de esporas*

El microorganismo empleado en este trabajo fue *Streptomyces antibioticus* ATCC\* 11891. En algunos experimentos se emplearon también otras especies del mismo género que se citan a continuación: *Streptomyces viridochromogenes* ATCC 14290, *Streptomyces fradiae* ATCC 10745, *Streptomyces aureofaciens* ATCC 13304 y *Streptomyces scabies* ATCC 99049. El medio de cultivo empleado

\* ATCC American Type Culture Collection.

para el crecimiento y esporulación del microorganismo fue el medio sólido GAE, cuya composición es la siguiente (g/l): glucosa, 10; asparragina, 1; extracto de levadura, 0,5;  $K_2PO_4H$ , 0,5;  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,5;  $FeSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 0,01; agar, 20. Este medio, una vez esterilizado, se distribuyó en matraces de 250 ml estériles conteniendo aproximadamente 75 ml de medio y una vez inoculados con una suspensión de esporas, se incubaron a 28°C durante 7-9 días; transcurridos estos, se obtuvieron suspensiones de esporas libres de fragmentos de micelio empleando el método ya descrito anteriormente (HARDISSON, MANZANAL, SALAS y SUÁREZ, 1978).

#### *Preparación de las esporas para las medidas de consumo de oxígeno*

Las esporas recién obtenidas se lavaron varias veces mediante centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos en una centrífuga refrigerada empleando tampón fosfato 5 mM pH 7,0, y finalmente se suspendieron en el mismo tampón en una concentración de  $5 \cdot 10^8$  esporas/ml. Esta suspensión se empleó como muestra de esporas durmientes. Paralelamente se incubaron esporas en medio GAE líquido a 35°C y en agitación durante unas 2 horas (tiempo necesario para que un elevado porcentaje de la población alcanzase la fase de espора hinchada). A continuación, las esporas se centrifugaron y se lavaron varias veces con tampón fosfato 5 mM pH 7,0 siendo suspendidas finalmente en este tampón en una concentración de  $5 \cdot 10^8$  esporas/ml. Esta muestra se denominó esporas hinchadas. En ambos casos, esporas durmientes e hinchadas, las esporas fueron usadas inmediatamente para las medidas de consumo de oxígeno.

#### *Preparación de extractos libres de células*

Para la obtención de extractos libres de células, las esporas durmientes o hinchadas obtenidas como se describió en el apartado anterior, se trataron en un homogeneizador Braun modelo MSK durante 3 minutos a 4.000 rpm en presencia de bolas de vidrio de 0,11 mm de diámetro y refrigeración mediante nieve carbónica. Tras este tratamiento se comprobó mediante observación al microscopio de contraste de fases que más de un 95 % de las esporas habían sido desintegradas.

#### *Determinaciones respiratorias*

El consumo de oxígeno por las esporas se determinó a 35°C empleando un electrodo de oxígeno polarográfico tipo Clark, tanto en ausencia de sustrato exógeno (respiración endógena) como tras la adición de glucosa 20 mM (respiración exógena). Cuando se ensayó el efecto de inhibidores sobre la respiración, se prepararon soluciones frescas de cada uno de ellos inmediatamente antes de ser usados. Azida sódica, cianuro potásico, EDTA, atabrina y 2,4-dinitrofenol, se

disolvieron en tampón fosfato 5 mM pH 7,0. Rotenona y antimicina A se disolvieron en etanol absoluto; dicumarol se disolvió en KOH 0,03 M. En el caso de estos tres últimos inhibidores, todos ellos insolubles en agua, se realizaron controles sin adición de inhibidor pero con la adición del solvente, con el fin de comprobar que la cantidad de solvente añadido a la cubeta del electrodo de oxígeno no afectaba al consumo de oxígeno de las esporas.

La determinación de las actividades catalasa y citocromo oxidasa se realizó asimismo en un electrodo de oxígeno por los métodos descritos por RORTH y JENSEN (1967) y JURTSUK, MARCUCCI y MC QUITTY (1975) respectivamente, empleando como sustratos  $H_2O_2$  1 mM para catalasa y ascorbato sódico 10 mM y NNN'N'-tetrametil-p-fenilendiamina (TMPD) 2,5 mM para la citocromo oxidasa.

### *Determinación de peso seco*

Para la determinación del peso seco de las muestras de esporas durmientes e hinchadas, se centrifugaron alícuotas de 6 ml de la suspensión de esporas en tampón fosfato 5 mM pH 7,0 (concentración total  $3 \times 10^9$  esporas) y se lavaron varias veces con agua destilada. Finalmente las esporas se suspendieron en un pequeño volumen de agua destilada y la suspensión se colocó en placas de vidrio de 3-4 cms de diámetro, que habían sido previamente pesadas. Las placas se colocaron en un horno a 100°C y tras 24 horas en estas condiciones se determinó su peso, realizándose distintas pesadas hasta obtener un peso constante.

## RESULTADOS

### *Respiración de esporas durmientes e hinchadas*

Empleando un electrodo de oxígeno detectamos consumo de oxígeno por las esporas durmientes de *S. antibioticus* (Tabla I), incluso en ausencia de una fuente de carbono exógena metabolizable. Esta respiración endógena presentó valores  $QO_2$  de 7,71  $\mu l O_2/h/mg$  peso seco en agua destilada. La adición de fosfato inorgánico (respiración en tampón fosfato 5 mM pH 7,0) produjo un incremento en el valor  $QO_2$  (de 7,71 a 10,69  $\mu l O_2/h/mg$  peso seco). La respiración exógena de las esporas durmientes, tras la adición de glucosa 20 mM, fue unas 2,5 veces superior a la respiración endógena en agua destilada. Sin embargo, ni la adición de galactosa ni de fructosa produjo ningún efecto sobre el valor  $QO_2$  obtenido para la respiración endógena.

Las esporas hinchadas, obtenidas tras 2 horas de incubación en medio líquido GAE, presentaron valores  $QO_2$  para la respiración endógena 3-4 veces superiores a los obtenidos con las esporas durmientes: 29,29 y 32,71  $\mu l O_2/h/mg$  peso seco en agua destilada y en tampón fosfato respectivamente (Tabla I). La adición de un sustrato exógeno, glucosa 20 mM, produjo un fuerte incremento en

TABLA I

*Respiración endógena y exógena de esporas durmientes e hinchadas de Streptomyces antibioticus.*

Las esporas, en su fase durmiente o hinchada, fueron obtenidas como se describió en Material y Métodos, determinándose el consumo de oxígeno a 35°C empleando un electrodo de oxígeno. Paralelamente se determinó el peso seco de las muestras, calculándose finalmente los valores  $QO_2$  ( $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{mg}$  peso seco) que son los que se presentan en esta Tabla

| Condiciones                | Fase morfológica ( $QO_2$ ) |                  |
|----------------------------|-----------------------------|------------------|
|                            | Durmientes                  | Hinchadas        |
| Agua destilada             | 7,71 $\pm$ 0,25             | 29,29 $\pm$ 1,02 |
| Tampón fosfato 5 mM pH 7,0 | 10,69 $\pm$ 0,62            | 32,71 $\pm$ 0,98 |
| Idem + Glucosa 20 mM       | 18,50 $\pm$ 0,67            | 77,10 $\pm$ 0,44 |

el valor  $QO_2$  con respecto al de las esporas durmientes (de 18,50 a 77,10  $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{mg}$  peso seco).

Con el fin de estudiar la importancia de la integridad física y estructural de las esporas para el proceso respiratorio, se estudió la respiración de las esporas durmientes e hinchadas empleando extractos libres de células. La respiración exógena de las esporas durmientes e hinchadas disminuyó en un 15-25 % cuando el valor  $QO_2$  se determinó con un extracto crudo procedente de la rotura mecánica de las esporas con bolas de vidrio (Tabla II). Esta disminución fue mucho mayor cuando estos extractos se centrifugaron y se determinó el consumo de

TABLA II

*Respiración exógena de extratos libres de células de esporas de Streptomyces antibioticus.*

Las esporas durmientes e hinchadas fueron rotas mecánicamente con bolas de vidrio de 0,11 mm de diámetro como se describió en Material y Métodos, determinándose el valor  $QO_2$  en varias fracciones del extracto así obtenido, en presencia de glucosa 20 mM

| Esporas    | Condiciones                 | $QO_2$ ( $\mu\text{l O}_2/\text{h}/\text{mg}$ peso seco) |
|------------|-----------------------------|--|
| Durmientes | Intactas                    | 17,25 $\pm$ 0,32   |
|            | Extracto crudo              | 14,20 $\pm$ 0,40   |
|            | Sobrenadante extracto crudo | 7,40 $\pm$ 0,15  |
| Hinchadas  | Intactas                    | 77,40 $\pm$ 0,32   |
|            | Extracto crudo              | 54,25 $\pm$ 0,44   |
|            | Sobrenadante extracto crudo | 27,36 $\pm$ 0,37   |

oxígeno con el sobrenadante de esta centrifugación a 10.000 rpm durante 5 minutos.

### *Respiración de esporas durmientes de varias especies de Streptomyces*

Los resultados obtenidos para la respiración endógena y exógena de esporas durmientes de *S. antibioticus*, se compararon con los mismos obtenidos con esporas de otras especies del mismo género. En la Tabla III, se puede observar que existieron grandes diferencias en los valores  $QO_2$  para la respiración de las esporas de las distintas especies estudiadas. Así, algunas especies presentaron valores  $QO_2$  elevados como *S. viridochromogenes* y *S. aureofaciens*, otros valores  $QO_2$  muy bajos como *S. fradiae* y algunas presentaron valores intermedios como *S. antibioticus* y *S. scabies*.

TABLA III

### *Respiración endógena y exógena de esporas durmientes de varias especies del género Streptomyces.*

Las esporas durmientes de las distintas especies fueron obtenidas como se describió en Material y Métodos, determinándose el consumo de oxígeno en ausencia de sustrato exógeno (respiración endógena) y tras la adición de glucosa 20 mM (respiración exógena) de modo análogo al descrito en la Tabla I

|                             | $QO_2$ ( $\mu$ l $O_2$ /h/mg peso seco) |                  |
|-----------------------------|---|------------------|
|                             | Resp. endógena                          | Resp. exógena    |
| <i>S. fradiae</i>           | 1,11 $\pm$ 0,01                         | 1,22 $\pm$ 0,02  |
| <i>S. scabies</i>           | 8,81 $\pm$ 0,16                         | 14,31 $\pm$ 0,84 |
| <i>S. antibioticus</i>      | 10,79 $\pm$ 0,32                        | 18,50 $\pm$ 0,82 |
| <i>S. aureofaciens</i>      | 19,57 $\pm$ 0,44                        | 34,30 $\pm$ 0,62 |
| <i>S. viridochromogenes</i> | 31,19 $\pm$ 0,72                        | 43,54 $\pm$ 0,94 |

### *Acción de inhibidores metabólicos sobre la respiración de las esporas durmientes e hinchadas*

Se estudió la acción de varios inhibidores respiratorios y desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la respiración exógena de las esporas durmientes e hinchadas de *S. antibioticus*. El propósito de estos experimentos fue por un lado la caracterización de los componentes de la cadena respiratoria de las esporas y, por otro lado, estudiar las diferencias en sensibilidad a estos inhibidores en ambas fases morfológicas de la germinación. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla IV. Cianuro potásico y atabrina, inhibidores de la citocromo oxidasa y de flavoproteínas respectivamente, inhibieron fuertemente la respiración en ambos estados morfológicos (80-90 % inhibición con 1 mM de ambos

TABLA IV

*Acción de inhibidores respiratorios y desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la respiración exógena de esporas durmientes e hinchadas de Streptomyces antibioticus.*

| Inhibidor (mM)        | QO <sub>2</sub> (μl O <sub>2</sub> /h/mg peso seco) |              | Inhibición (%) |           |
|-----------------------|---|--------------|----------------|-----------|
|                       | Durmientes  | Hinchadas    | Durmientes     | Hinchadas |
| Control               | 20,15 ± 0,88  | 78,10 ± 0,23 | —              | —         |
| Atabrina 1            | 4,03 ± 0,38   | 11,71 ± 0,62 | 80             | 85        |
| Atabrina 0,1          | 8,06 ± 0,64   | 23,43 ± 0,63 | 60             | 70        |
| Atabrina 0,01         | 11,08 ± 0,53  | 53,10 ± 1,25 | 45             | 32        |
| Dicumarol 0,1         | 19,92 ± 0,15  | 78,04 ± 1,08 | 0              | 0         |
| Rotenona 0,1          | 20,64 ± 0,32  | 78,72 ± 0,45 | 0              | 0         |
| Antimicina A 0,1      | 19,86 ± 0,64  | 77,94 ± 0,32 | 0              | 0         |
| Cianuro potásico 1    | 2,61 ± 0,52   | 7,02 ± 0,10  | 86             | 91        |
| Cianuro potásico 0,1  | 5,64 ± 0,76   | 32,02 ± 0,34 | 72             | 59        |
| Cianuro potásico 0,01 | 13,30 ± 0,82  | 42,17 ± 0,25 | 34             | 46        |
| Azida sódica 1,25     | 12,58 ± 0,43  | 92,15 ± 0,45 | 38             | + 18      |
| 2,4-dinitrofenol 0,25 | 24,18 ± 0,83  | 89,03 ± 0,32 | + 20           | + 14      |
| EDTA 1,25             | 12,29 ± 0,72  | 62,48 ± 0,15 | 39             | 20        |

El signo + indica estimulación del consumo de oxígeno.

agentes). Sin embargo, ni dicumarol (análogo de quinonas) ni antimicina A y rotenona (inhibidores de la cadena respiratoria a nivel de citocromos) tuvieron ningún efecto sobre la respiración. Pudiera ocurrir que existiera una barrera de permeabilidad en las cubiertas esporales que dificultase la penetración de estos inhibidores; sin embargo, esta posibilidad fue descartada, ya que tampoco ejercieron ningún efecto sobre la respiración empleando extractos libres de células. El ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) inhibió parcialmente la respiración: 39 % y 20 % en esporas durmientes e hinchadas respectivamente. El agente desacoplante de la fosforilación oxidativa, 2,4-dinitrofenol (2,4-DNP) estimuló el consumo de oxígeno en un 20 % y 14 % en esporas durmientes e hinchadas respectivamente. La acción de la azida sódica sobre la respiración fue sorprendente, ya que una misma concentración del inhibidor (1,25 mM) inhibió la respiración de las esporas durmientes y estimuló la respiración de las esporas hinchadas (Tabla IV). Por ello, ensayamos varias concentraciones de este inhibidor sobre la respiración en ambas fases morfológicas, con el fin de ensayar si ambos efectos tenían lugar dependiendo de la concentración del agente. En esporas durmientes (Figura 1a), hasta una concentración de 0,25 mM, la azida produjo efecto estimulante y por encima de esta concentración la respiración fue inhibida; la máxima estimulación se obtuvo con una concentración de azida de 0,05 mM. En esporas hinchadas (Figura 1b), la estimulación de la respiración se observó hasta 2,5 mM, alcanzándose un máximo con 1 mM y por encima de 2,5 mM la

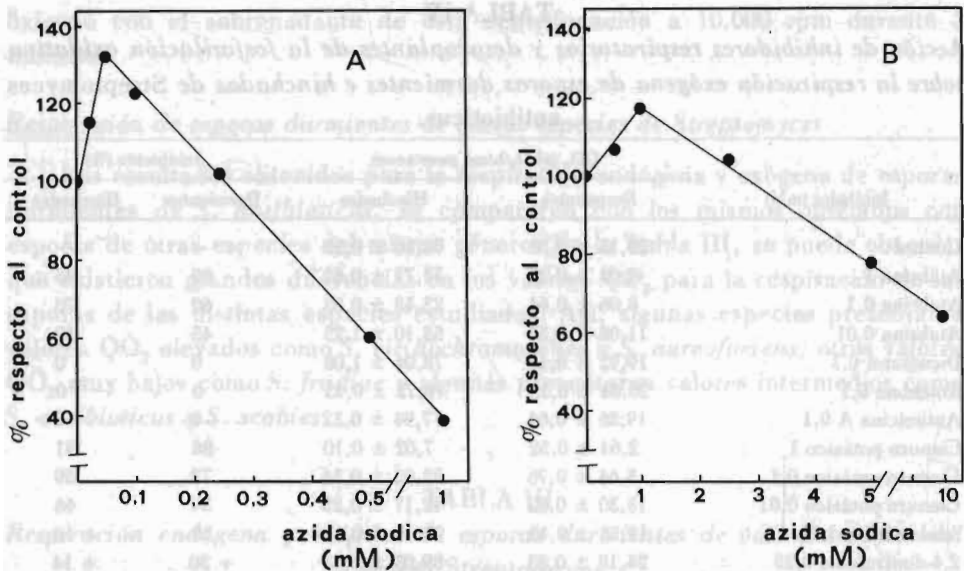


Fig. 1.—Acción de la azida sódica sobre la respiración exógena de esporas durmientes (A) y esporas hinchadas (B) de *Streptomyces antibioticus*.

respiración fue inhibida. Se puede observar que el mismo modelo de inhibición y estimulación se dio en ambas fases morfológicas de la germinación, pero la concentración de inhibidor necesaria para obtener el mismo resultado fue unas 10 veces superior en esporas hinchadas que en esporas durmientes.

#### *Actividad catalasa y citocromo oxidasa en las esporas durmientes e hinchadas*

Las esporas durmientes presentaron niveles detectables de dos actividades enzimáticas, catalasa y citocromo oxidasa, íntimamente relacionadas con el metabolismo respiratorio. Ambas actividades presentaron valores de 1,5 UE/mg proteína para la actividad catalasa y 712  $\mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$  peso seco para la actividad citocromo oxidasa. El cianuro potásico fue un potente inhibidor de las dos actividades enzimáticas, bloqueando casi totalmente su actividad en concentración 1 mM. Con el hinchamiento de las esporas, las actividades específicas de estos dos enzimas aumentaron considerablemente: 3,25 UE/mg proteína y 1.050  $\mu\text{l O}_2/\text{h/mg}$  peso seco para catalasa y citocromo oxidasa respectivamente.

### DISCUSION

Las esporas durmientes de *S. antibioticus* presentan una tasa de respiración endógena detectable, en ausencia de una fuente de carbono exógena. Esta respiración endógena fue estimulada por la adición de fosfato inorgánico, resultado



que ya había sido descrito en micelio de *S. griseus* (HOCKENHULL, FANTES, HERBERT y WHITEHEAD, 1954). Sin embargo, existen grandes diferencias entre la respiración endógena de esporas durmientes de distintas especies de este género. Estas diferencias pueden estar relacionadas con una distinta concentración de reservas endógenas y/o con diferencias en concentración o actividad de los distintos componentes de la cadena respiratoria de las esporas. En cualquier caso, las esporas durmientes de *Streptomyces* presentan una respiración endógena, a diferencia de las endosporas bacterianas en las cuales no se detecta ningún consumo de oxígeno. Otra característica importante a destacar es la existencia en las esporas durmientes de la maquinaria enzimática necesaria para la oxidación de la glucosa, ya que la adición de este azúcar produjo un notable incremento del  $QO_2$ . Otros azúcares como galactosa y fructosa, no incrementaron el valor  $QO_2$  por encima del obtenido para la respiración endógena, probablemente debido a la ausencia en la espora durmiente de los sistemas de transporte para estos dos azúcares (SALAS y HARDISSON, 1981).

Con el hinchamiento de las esporas, los valores  $QO_2$  tanto para la respiración endógena como para la exógena aumentaron unas 2-4 veces con respecto a los obtenidos con las esporas durmientes, lo cual indica que como había sido descrito anteriormente (HARDISSON, MANZANAL, SALAS y SUÁREZ, 1978; HARDISSON, SALAS, GUIJARRO y SUÁREZ, 1980) esta fase de la germinación se caracteriza por una gran actividad metabólica y biosintética.

El estudio de la acción de inhibidores respiratorios y desacoplantes de la fosforilación oxidativa sobre la respiración exógena mostró que no existen diferencias significativas entre la sensibilidad a estos agentes en las esporas durmientes e hinchadas, a excepción del caso de la azida sódica. Este inhibidor produjo inhibición y estimulación de la respiración en ambos estados morfológicos, siendo necesaria una concentración 10 veces superior de inhibidor en esporas hinchadas para conseguir el mismo efecto que en esporas durmientes. Este doble efecto de la azida ya había sido descrito en *Bacillus cereus* (DRING y GOULD, 1975). Pensamos que la diferente sensibilidad de las esporas en función de su estado morfológico pudiera deberse a la existencia de una mayor concentración de citocromos en las esporas hinchadas. El inhibidor produciría simultáneamente ambos efectos: con altas concentraciones del agente, el efecto inhibidor sería superior y enmascararía el efecto desacoplante; por debajo de una determinada concentración de inhibidor, solamente se observaría el efecto desacoplante de la fosforilación oxidativa.

La respiración fue sensible al cianuro potásico lo cual indica la presencia de citocromos en la cadena respiratoria de las esporas, a diferencia de las esporas de *S. streptomycini* las cuales fueron insensibles al cianuro (KALAKOUTSKII, MUKHIN, LAPTEVA, TAPTIKOVA y DOUZA, 1970). Asimismo, la participación de flavoproteínas parece confirmada por la inhibición debida a la atabrina. La presencia de cito-

cromos y flavoproteínas en la cadena respiratoria de las esporas concuerda con los resultados obtenidos por varios autores en micelio de *Streptomyces* (NIEDERPRUEM y HACKETT, 1961; REHACEK, RAMANKUTTY y KOZOVA, 1968; INOUE, 1973) y en esporas (TAPTIKOVA, KALAKOUTSKII y AGRE, 1969). La no inhibición con rotenona y antimicina A puede explicarse por la ausencia en las esporas del sitio de acción de estos agentes. Puede descartarse la participación de quinonas interpuestas entre flavoproteínas y citocromos, ya que la respiración fue insensible al análogo de quinonas dicumarol. La respiración fue sensible al EDTA, el cual probablemente actúe entre flavoproteínas y citocromo b. Asimismo, parece existir un acoplamiento entre la cadena respiratoria y la fosforilación oxidativa sensible al 2,4-dinitrofenol.

En conclusión, las esporas de *Streptomyces* presentan una respiración endógena, transcurriendo probablemente el flujo de electrones a través de una serie de intermediarios respiratorios como son flavoproteínas, citocromos *b* y *c* y citocromo oxidasa. Nuestros resultados son coincidentes con los obtenidos por otros autores en micelio de *S. antibioticus* (REHACEK, RAMANKUTTY y KOZOVA, 1968).

#### BIBLIOGRAFIA

- ATTWELL, R. W. y T. CROSS (1973).—En *The Actinomycetales: Characteristics and Practical Importance*, pp. 197-207. Ed. por G. Sykes y F. A. Skinner. Academic Press London and New York.
- CROSS, T. y R. W. ATTWELL (1975).—En *Spores VI*, pp. 3-14. Ed. por P. Gerhardt, R. N. Costilow y H. L. Sadoff. American Society for Microbiology. Washington.
- DRING, G. J. y G. W. GOULD (1975).—En *Spores VI*, pp. 488-494. Ed. por P. Gerhardt, R. N. Costilow y H. L. Sadoff. American Society for Microbiology. Washington.
- HARDISSON, C., M. B. MANZANAL, J. A. SALAS y J. E. SUÁREZ (1978).—*J. Gen. Microbiol.*, **105**: 203-214.
- HARDISSON, C., J. A. SALAS, J. A. GULJARRO y J. E. SUÁREZ (1980).—*FEMS Microbiology Letters*, **7**: 233-235.
- HIRSCH, C. F. y J. C. ENSIGN (1976 a y b).—*J. Bacteriol.*, **126**: 13-30.
- HOCKENHULL, D. J. D., K. H. FANTES, M. HERBERT y B. WHITEHEAD (1954).—*J. Gen. Microbiol.*, **10**: 353-370.
- INOUE, Y. (1958).—*J. Antibiotics.*, **11 A**: 109-115.
- (1973).—*Bot. Mag. Tokyo*, **86**: 121-132.
- JURTSHUK, P. Jr., O. M. MARCUCCI y O. N. MC QUITTY (1975).—*Appl. Microbiol.*, **30**: 951-958.
- KALAKOUTSKII, L. V., L. M. MUKHIN, E. A. LAPTEVA, S. D. TAPTIKOVA y M. V. DOUZHA (1970).—*Izv. Akad. Nauk Az. SSSR Ser. Biol. Nauk*, **4**: 593-599.
- NIEDERPRUEM, D. J. y D. P. HACKETT (1961).—*J. Bacteriol.*, **81**: 557-563.
- REHACEK, Z., M. RAMANKUTTY y J. KOZOVA (1968).—*Appl. Microbiol.*, **16**: 29-32.
- RORTH, M. y P. K. JENSEN (1967).—*Biochim. Biophys. Acta*, **139**: 171-173.
- SALAS, J. A. y C. HARDISSON (1981).—*J. Gen. Microbiol.* (en prensa).
- TAPTIKOVA, S. D., L. V. KALAKOUTSKII y N. S. AGRE (1969).—*J. Gen. Appl. Microbiol.*, **15**: 383-386.