

Laboratorio de Microbiología  
Facultad de Farmacia  
Santiago de Compostela  
(España)

## Fosfatasa ácida de estafilococos

por

J. Calafat Far\*, C. Domínguez Noya\* y B. Regueiro Varela

(Recibido para publicar el 12 de abril de 1966)

Las manifestaciones de la actividad del estafilococo son el resultado de su composición química y de su organización molecular. Entre los numerosos componentes esenciales que existen en la célula, el ión fosfato juega un papel primordial, cual es el de conservar y transferir energía (1). En este mecanismo intervienen enzimas que catalizan la hidrólisis de los ésteres fosfóricos y que reciben el nombre genérico de *fosfatasas*. De este grupo de enzimas nos concretaremos a la llamada *fosfomonoesterasa ácida*.

El problema de establecer una relación entre la actividad metabólica y la patogenicidad es muy complejo (15), sin embargo, parece experimentalmente demostrado que las razas virulentas de un microorganismo son bioquímicamente más activas que las no virulentas. En el estafilococo se han estudiado varios factores bioquímicos en relación con su patogenicidad (10), sin que hasta el momento puedan establecerse conclusiones definitivas. Entre estos factores se encuentra la fosfomonoesterasa ácida, que es de los menos estudiados.

Las fosfatasas estafilocócicas se conocen hace ya tiempo (2, 5, 6, 8, 11, 20), pero trabajos de tipo cuantitativo son

relativamente recientes (3, 4, 7, 9, 16, 18).

De los resultados logrados por los autores mencionados, se deriva el que no existe acuerdo en las conclusiones, probablemente por el empleo de métodos diferentes o debido a la gran variabilidad que poseen los estafilococos. En el presente trabajo, tratamos de fijar las propiedades de la fosfomonoesterasa ácida estafilocócica y estudiar algunos factores que pueden influir sobre su actividad. Asimismo se amplía este estudio a las diferentes razas empleadas para propagación de fagos, determinando algunas propiedades. Por último, determinamos la actividad nucleotidasa de una fosfatasa ácida estafilocócica purificada.

### Material y métodos \*\*

Empleamos para este trabajo 23 razas de *Staphylococcus aureus*, propagadores de fagos y una raza de *Staphylococcus*

\* Con ayuda de becas de la Comisaría de Protección Escolar.

\*\* Agradecemos al Dr. PARKER (Central Public Health Service, London) el envío de las 23 razas de *Staphylococcus aureus*.

*albus*, no virulenta. Los cultivos se realizan en: caldo común (Oxoid); caldo-tripticosa-soja (BBL); caldo común con un 1 % de extracto de levadura (Difco); infusión cerebro-corazón (Difco) y un medio sintético con aminoácidos, vitaminas y sales minerales. La incubación se hace en agitación a 30° y en reposo a 37°.

La actividad fosfatasa ácida intracelular se determina en células desecadas en acetona y la exocelular en los líquidos centrifugados. El método empleado es el fundado en la hidrólisis del p.nitrofenilfosfato y determinación colorimétrica del p.nitrofenol (3), que encontramos más sensible y reproducible que el de la hidrólisis del glicerofosfato (16) o el tetracolamín-fenoltaleín-difosfato (7).

La proteína se determina por el método de biuret (13) y la nucleotidasa (12) se hace empleando como sustratos los nucleótidos: ATP, GTP, CTP, UTP, TTP, deoxi.ATP, deoxiGTP, deoxi.CTP y deoxi.UTP.

## Resultados

### A. — Influencia del cultivo en la producción del enzima

Observamos resultados sensiblemente homogéneos para fosfatasa exocelular y endocelular en diferentes colonias de la

misma raza de *S.aureus* crecidas en placas de agar-caldo a 37° durante 24 horas. En subcultivos realizados durante siete meses con varias razas de *S.aureus*, sólo observamos un ligero incremento de actividad fosfatasa en todos los casos.

Determinamos la actividad fosfatasa exo y endocelular de una raza de *S.aureus* en diferentes medios de cultivo (Tabla I), observando que los mejores son el caldo común y la infusión de cerebro-corazón. Encontramos que es necesaria la aireación y que la presencia de extracto de levadura inhibe la producción de fosfatasa exocelular.

Estudiamos la cinética de producción de fosfatasa exo y endocelular en una raza de *S.aureus* crecida en caldo común a 30° y en agitación (fig. 1). El nivel de enzima endocelular es constante, pero el exocelular se produce durante la fase logarítmica, entre 6 y 12 horas, permaneciendo después constante.

### B. — Influencia de factores físicos y químicos en la actividad

Determinamos la influencia de cada uno de los factores que intervienen en el sistema enzimático y encontramos que las condiciones óptimas son las siguientes: un mg de p.nitrofenilfosfato en 0,2 ml de tampón; un mg de células desecadas en acetona en 0,2 ml de tampón;

Tabla I

Actividad fosfomonoesterasa ácida de *Staphylococcus aureus* en diferentes medios de cultivo.

Medio de cultivo	μmol/ml. p. nitrofenol liberado	
	exocelular	endocelular
caldo común . . . . .	3,68	3,12
caldo + ext. levadura . . . . .	1,24	4,16
caldo + tiamina . . . . .	3,84	3,60
caldo tripticasa-soja . . . . .	2,52	3,68
infusión cerebro-corazón . . . . .	3,88	4,48
caldo + ext. levadura + tiamina . . .	1,16	3,88
idem (en reposo) . . . . .	0,00	0,00

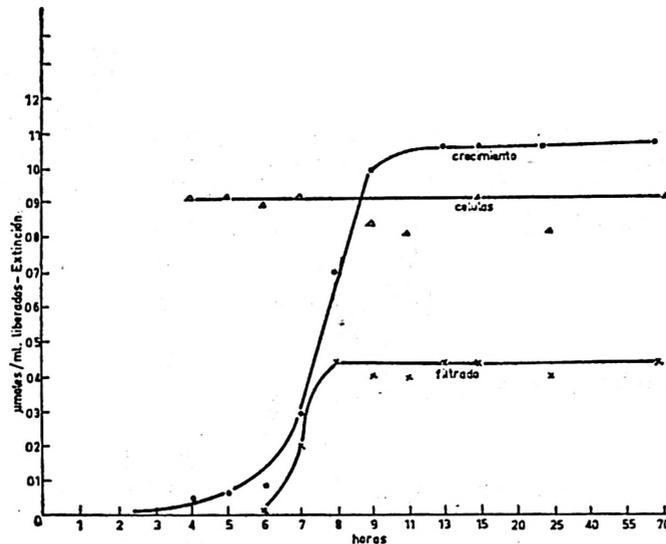


FIG. 1. Cinética de producción de fosfomonoesterasa ácida exo y endocelular, por una raza de *S. aureus* crecido en caldo común a 30° en agitación.

0,2 ml de  $MgSO_4$  0,1 M y 0,4 ml de tampón Tris (pH:6,8). Se incubó a 37° durante 3 horas.

Aunque de tampón usamos Tris, no se encuentran diferencias con el empleo de citrato, ptalato, veronal y fosfato.

La fosfomonoesterasa ácida estafilocócica es un enzima bastante estable, pues determinaciones de muestras del enzima sometidas a diferentes temperaturas (0°-15°) durante 85 días, sólo muestran un descenso muy ligero.

En relación con la temperatura de inactivación del enzima, observamos que su actividad disminuye rápidamente a partir de los 40° durante 15 minutos, para inactivarse a 60° durante 15 minutos.

#### C. — Actividad de las razas propagadoras de fagos

Se determina la actividad de las 23 razas de *S. aureus*, propagadoras de fagos en sus aspectos exo y endocelular (fig. 2). Como observamos es difícil deducir con-

clusiones homogéneas. La máxima actividad exocelular ocurre en las razas: 55, 81, 53, 77, 10019, 3B, 3C y 8353; la máxima actividad endocelular ocurre en las razas: 55, 79, 10019, 77 y 3A. La menor actividad exocelular se presenta en las razas: 42E, 42D, 6 y 7; la menor actividad endocelular se presenta en las razas: 8353, 6, 42D y 3C. En todas las razas anteriores hemos observado que el magnesio actúa de cofactor aumentando la actividad. Asimismo hemos determinado la temperatura de inactivación en todos los casos, observando que es similar a la vista anteriormente de inactivación a los 60°. Por otra parte, el pH óptimo de actividad en todos los casos es a pH:5,6, en casos más cerca de 5,0 y nunca pasando de 6,0.

#### D. Estimulantes e inhibidores de la actividad

Se comprende en este apartado el efecto de los iones metálicos y de algunos

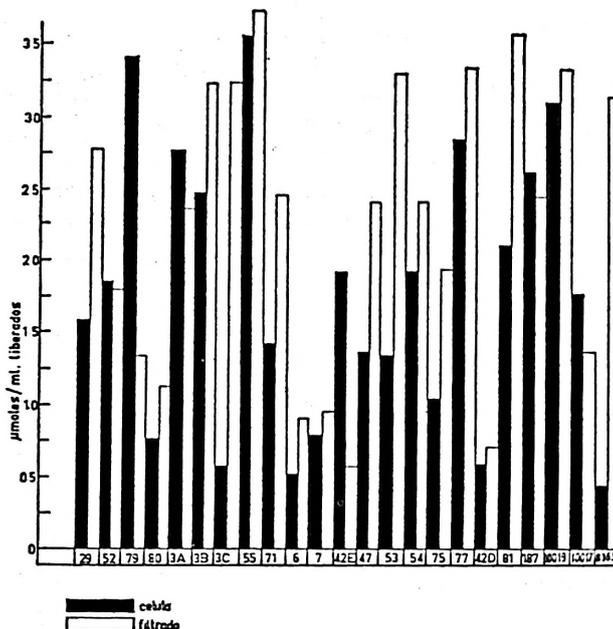


FIG. 2. Actividad fosfomonoesterasa ácida de *Staphylococcus aureus* propagadores de fagos, en medio de caldo común a 30° en agitación por 18 horas.

compuestos orgánicos. Los resultados son también muy variables en todos los casos.

En el efecto de: magnesio, zinc, manganeso, cobre, calcio, hierro, litio, cadmio, cromo, níquel y aluminio, en concentraciones entre 0,0001 M y 1 M, encontramos, por ejemplo, que en la raza 55 el litio no tiene ningún efecto, así como el calcio; en cambio, en la raza 187, el litio es inhibidor y en las 38 y 79, lo es el calcio. Son estimulantes a concentraciones entre 0,01 M y 0,1 M el magnesio, cobalto, cromo, níquel y hierro. Son inhibidores a las concentraciones que se indican, los siguientes: zinc (0,1 M); cadmio (0,01 M); manganeso (1 M); cobre (1 M); aluminio (0,1 M) en todas las razas estudiadas.

No poseen efecto sobre la actividad fosfatasa los compuestos siguientes: tau-rocolato, cisteína, ácido indolacético, bencilpenicilina, dimetoxifenilpenicilina,

ácido 6-aminopenicilánico y alfa-amino-bencilpenicilina. Son ligeramente inhibidores de la actividad: glicina, fluoruro, azida, EDTA y fenol. Inhiben completamente a las concentraciones que se indican los siguientes compuestos: arseniato (1 M); mertiolato (0,5 M); cianuro (0,5 M); telurito (0,1 M); etanol (1 ml) y laurilsulfato (0,01 M).

#### E. — Producción de fosfatasa en medio sintético

A partir de un inóculo en medio sintético, se inoculan con una raza de *S. aureus* un medio de caldo común y otro sintético e incuban en agitación a 30° durante 18 horas, al cabo de éstas se determina la actividad exocelular y endocelular, observándose notables diferencias (Tabla II). Determinamos que la presencia de fosfato inorgánico en el me-

**Tabla II**

*Producción de actividad fosfatasa en medio de caldo comn (natural) y en medio sintético.*

Medio de cultivo	μmol./ml. p. nitrofenol liberado	
	exocelular	endocelular
natural . . .	0,36	4,48
sintético . . .	0,00	1,80

dio, no ejerce efecto apreciable; por el contrario, la presencia de fosfato orgánico, parece inhibir la biosíntesis del enzima o quizá su actividad.

También determinamos la actividad fosfatasa en las razas de *S.aureus* propagadoras de fagos (fig. 3). No se observa en ningún caso actividad exocelular, en cambio sí la muestran en todos los casos y con resultados muy diferentes, la actividad endocelular. La mayor actividad corresponde a las razas : 55, 52 y 10019. Las de menor actividad son : 71, 47, 7 y 54; asimismo presenta un nivel mínimo de actividad el «S.-albus».

*F. — Purificación de la fosfatasa exocelular*

Conseguimos un cierto grado de purificación por el método siguiente: Cultivo de una raza de *S.aureus* en caldo común a 30° en agitación durante 18 horas, se centrifuga y el líquido se trata por un 50 % de sulfato amónico, se abandona 4 horas en nevera y centrifuga. Al líquido (II) se le añade más sulfato amónico hasta un 70 % y se vuelve a dejar 18 horas en nevera; se centrifuga y el sedimento se disuelve en tampón pталato (pH : 5,6) y se desliza. El dializado (III), se emplea como enzima purificado. La actividad específica es 32 veces mayor y el rendimiento es del 60 % (Tabla 3). Pos-

teriores fraccionamientos con : bentonita, DEAE-celulosa, ECTAOLA-celulosa, CM-celulosa y gel de fosfato, no consiguieron mejorar los rendimientos.

*G. — Actividad nucleotidasa de la fosfatasa purificada*

Habíamos observado anteriormente que el enzima crudo no poseía actividad sobre los nucleótidos, pero encontramos actividad cuando probamos con el enzima purificado. Utilizamos los nucleótidos ya mencionados en cantidad de 6 mg como indica el método (12). Los resultados (figura 4) indican que no hay actividad sobre la deoxi. GTP; poca actividad sobre : ATP, deoxi. ATP, deoxi. CTP y CTP; la actividad es notable sobre : GTP, UTP, deoxi.-UTP y TTP. Por su importancia en el metabolismo celular, estudiamos con algún detalle la actividad ATP-asa de la fosfatasa puri-

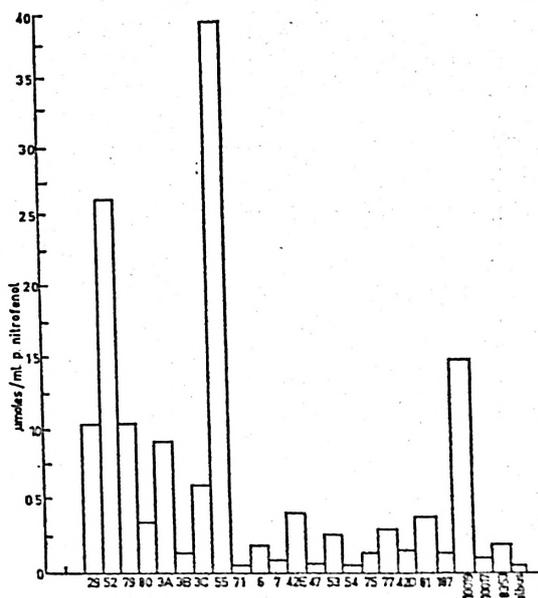


FIG. 3. Actividad fosfomonoesterasa ácida de razas de *Staphylococcus aureus* propagadores de fagos, en medio sintético a 30° en agitación por 18 horas.

Tabla III

Proceso de purificación de la fosfatasa ácida exocelular estafilocócica

Fracción	Volumen total (ml)	$\mu\text{mol. p. nitro-fenol/total}$	mg. protef-na/total	Actividad específica	Rendimiento %
Original I . . .	400	240	3000	0,08	100
Líquido II . . .	380	152	1140	0,13	63
Dializado III . .	20	144	56	2,57	60

ficada. Su constante  $K_m$  es de 10,9; el pH óptimo es a 5,6; la temperatura de inactivación es de  $55^\circ\text{-}65^\circ$  en 15 minutos; el magnesio es estimulante hasta la concentración 0,1 M. y el zinc es estimulante hasta la concentración 0,01 M., para luego ser inhibidor. En estudio comparativo, observamos que una fosfatasa ácida comercial (Sigma Co.) de embrión de trigo, es también activa contra los nucleótidos anteriores, pero al contrario que la estafilocócica, es más activa sobre los deoxi.-nucleótidos, especialmente el deoxi.-GTP. Esto indica caracteres diferenciales en especificidad.

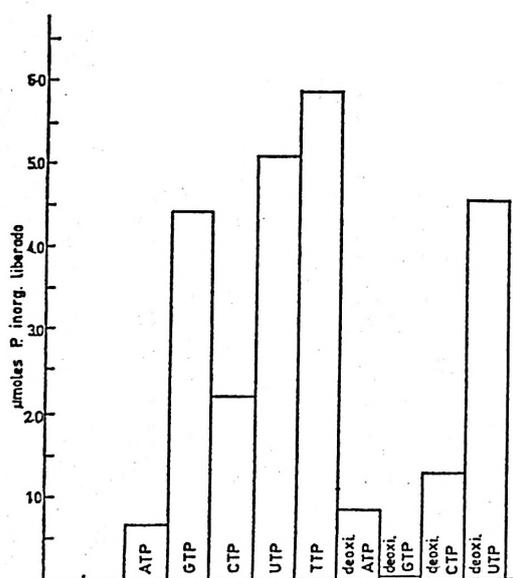


FIG. 4. Actividad nucleotidasa de una preparación de fosfomonoesterasa purificada, sobre nucleótidos.

### Discusión

Las diferencias entre razas de bacterias derivan de los caminos por los que realizan su metabolismo y derivado de esto, por los tipos de enzimas que entran en su composición. Quizás estas enzimas en sus diferencias, puedan distinguir las razas virulentas de las no virulentas, la cual es una de las razones del anterior trabajo. En realidad, en el momento actual se desconoce el mecanismo exacto de la virulencia del estafilococo.

Se había observado que la composición del medio y la edad del cultivo influían en la actividad y producción de la fosfomonoesterasa por el estafilococo (3), encontrando como medio más apropiado el de difusión cerebro-corazón. Observamos que esto es verdad para el enzima exocelular, pero, en cambio, para la endocelular va mejor el caldo común. Es necesaria la aireación.

Ya se había determinado (3), que la máxima actividad se encuentra en cultivos jóvenes, en que la actividad exocelular aumenta de las 6 a las 28 horas, en cambio, la endocelular disminuye a partir de las 22 horas. Por otro lado, otro autor (17), señala que la máxima actividad está al final de la fase logarítmica y comienzo de la estacionaria. Encontramos que la actividad exocelular aumenta de las 8 a las 12 horas y que la endocelular no varía dentro de un período de 70 horas.

En relación con la existencia de fosfatasa exocelular y endocelular los resul-

tados son muy contradictorios (3, 7, 10, 16, 17). Nosotros determinamos la existencia de los dos tipos de enzimas en todas las razas estudiadas.

La actividad enzimática es función lineal de la concentración de enzima, de la cantidad de sustrato y del tiempo de incubación. Algunos autores (3, 19) decían que el fosfato inhibe la actividad fosfatasa, nosotros no observamos este efecto aun a concentraciones 1,25 M. Observamos también que el magnesio actúa como cofactor.

El enzima es bastante estable, pues a pesar de la variabilidad del estafilococo, no se observa cambio en la actividad entre varias colonias de una misma raza o a través de subcultivos durante siete meses. Tampoco hay variación durante 85 días, cuando el enzima se conserva a diversas temperaturas entre 4° y 15°. La temperatura de inactivación es de 60° durante 15 minutos.

Poco trabajo se había realizado hasta ahora sobre las propiedades enzimáticas de diferentes razas del *S. aureus* propagadoras de fagos (18, 9). En relación a la actividad fosfatasa, los primeros observan actividad en todas las razas, a excepción de la 73; el segundo en todas las de *S. aureus*, pero no en la de *S. albus*. Otros autores (14) estudian la relación entre la actividad fosfatasa y el tipo de fago, sin llegar a conclusiones definitivas. En nuestro trabajo observamos que, en general, es mayor la actividad exocelular que la endocelular, siendo la más activa la raza 55 y 81 y las menos activas las 42D y 6. En todos los casos el magnesio actúa como cofactor. También en todos los casos la inactivación del enzima ocurre a 60° durante 15 minutos y el pH óptimo se encuentra alrededor de 5,6. De todo esto deducimos que el enzima es similar en todas las razas de estafilococo y que las diferencias son únicamente de tipo cuantitativo. A esta misma conclusión se llega al determinar

la influencia de los iones metálicos y de ciertos compuestos orgánicos sobre la actividad fosfomonoésterasa.

Todas las experiencias anteriores fueron realizadas con enzimas producidos en medio natural complejo, pero cuando se estudia la biosíntesis de enzimas, suele hacerse con cultivos en medios sintéticos de composición conocida. Haciendo esto hemos podido comprobar que el fosfato inorgánico no ejerce influencia en la producción de fosfatasa, lo contrario que habían afirmado diversos autores y que, en cambio, el fosfato orgánico, disminuía la producción de fosfatasa. Se determina la actividad fosfatasa de todas las razas de estafilococo y encontramos es menor que cuando se realiza con medio natural complejo, aunque la más productora sigue siendo la raza 55.

Todas las experiencias anteriores fueron realizadas con enzima crudo, por lo cual es lógico se piense en realizar una purificación de dicho enzima. Por precipitación con sulfato amónico y diálisis, conseguimos preparaciones con 32 veces más actividad específica. Este enzima purificado actúa sobre nucleótidos (actividad no presente en el enzima crudo). Esta actividad ya había sido estudiada (12) Nosotros encontramos que el enzima estafilocócico actúa sobre todos los 5-nucleótidos, a excepción del deoxi-GTP y con mayor actividad sobre los ribonucleótidos que sobre los deoxirribonucleótidos, al contrario que una fosfatasa ácida comercial, que es más activa sobre los deoxirribonucleótidos, especialmente el deoxi-GTP, que sobre los ribonucleótidos.

Por último determinamos especialmente algunas propiedades de la ATP-asa, encontrando como constante de Michaelis ( $K_m$ ) la de 10,9. Su temperatura de inactivación está entre 55° y 65° durante 15 minutos; el pH óptimo está en 5,6 y encontramos que también el magnesio es necesario como cofactor,

### Resumen

Estudiamos la actividad fosfomonesterasa ácida, exocelular y endocelular de 23 razas de *Staphylococcus aureus* propagadoras de fagos y una de *Staphylococcus albus*. El medio de producción más apropiado es el de infusión cerebro-corazón para la exocelular y el caldo común para la endocelular, con aireación. La edad óptima de producción es de 8 a 12 horas para la exocelular, no variando la endocelular. El enzima es bastante estable a temperatura ambiente, pero es inactiva en 15 minutos a 60°.

Todas las razas estudiadas dan más o menos actividad (*S. albus* no presenta actividad) y por la temperatura de inactivación, pH óptimo, respuesta a los iones metálicos y a otros compuestos químicos, se sugiere que en todos los casos se trata del mismo enzima y sólo con diferencias cuantitativas.

El enzima se purifica dando 32 veces más actividad y esta preparación purificada presenta las mismas propiedades que la cruda, pero, además, posee actividad nucleotidasa, que, al contrario que una preparación de fosfatasa comercial (embrión de trigo), es más activa sobre los ribonucleótidos que sobre los deoxirribonucleótidos.

### Summary

#### Acid phosphatase of staphylococci

We study the production and activity of exo-, and endocellular acid phosphomonoesterase on 23 strains of *Staphylococcus aureus* and one strain of *Staphylococcus albus*. We study several factors with influence in production (medium and physical conditions) and on activity (substrate and enzyme concentration, buffer, pH, incubation, inactivation temperature, metallic ions and organic products). We suggest that all the enzymes are similar, with in quantitative differences. We obtain a purified preparations with nucleotidase activity, lower

with deoxiribonucleotides that with ribonucleotides, the contrary that a commercial preparation of phosphatase.

### Bibliografía

- (1) AXELROD, B.: *Adv. Enzymol.*, **17**, 159, 1956.
- (2) BARBER, M., KUPER, S. W.: *J. Path. Bact.*, **63**, 65, 1951.
- (3) BARNES, B. H., MORRIS, J. F.: *J. Bacteriol.*, **73**, 100, 1957.
- (4) BEINNING, P. A., KENNEDY, E. R.: *J. Bacteriol.*, **85**, 732, 1963.
- (5) BOIVIN, A., MESROBEANU, L.: *C. R. Soc. Biol.*, **112**, 1009, 1933.
- (6) BRAY, J., KING, E. S.: *J. Path. Bact.*, **55**, 315, 1943.
- (7) CANNON, F. D., HAWN, C. Z.: *J. Bacteriol.*, **86**, 1052, 1963.
- (8) CARRERE, L., ROUX, J.: *Ann. Inst Pasteur.*, **87**, 349, 1954.
- (9) DOMÍNGUEZ NOYA, C.: Estudios sobre propiedades fisiológicas del estafilococo. Tesis Doctoral. Santiago, 1964.
- (10) ELEK, S. D.: The *Staphylococcus pyogenes*. E. S. Livingstone Ltd. Edinburgo. 1959.
- (11) GORDON, J., COOPER, K. E.: *Brit J. Exp. Path.*, **13**, 503, 1932.
- (12) KOHN, J., REIS, J. L.: *J. Bacteriol.*, **86**, 713, 1963.
- (13) LEGGETT BAILEY, J.: *Techniques in Protein Chemistry*. Elsevier Publ. Co., Amsterdam. 1962.
- (14) PAN, Y., BLUMENTHAL, H. J.: *J. Bacteriol.*, **82**, 124, 1961.
- (15) PANOS, C., AJL, S. J.: *Ann. Rev. Microbiol.*, **17**, 297, 1963.
- (16) PORTO, E., REGUEIRO, B.: *Microbiol. Españ.*, **15**, 231, 1962.
- (17) SALL, T.: *J. Bacteriol.*, **83**, 1238, 1962.
- (18) SOLOMÓN, J. J., SANCLEMENTE, C. L.: *Appl. Microbiol.*, **11**, 36, 1963.
- (19) WEINBERG, R., ORTON, W. L.: *J. Bacteriol.*, **36**, 805, 1963.
- (20) WHITE, M. L., PICKETT, M. J.: *Amer. J. Clin. Path.*, **23**, 1181, 1953.