

Reserva endógena y enzimas hidrolíticos de una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*

I. Bernárdez-Hermida * y B. Regueiro-Varela

Departamento de Microbiología. Facultad de Farmacia
Universidad de Santiago de Compostela (España)

(Recibido el 26 de octubre de 1970)

I. BERNARDEZ-HERMIDA and B. REGUEIRO-VARELA. *Endogenous Reserve and Hydrolytic Enzymes of Psychrophilic and Mesophilic Strains of «Arthrobacter»*. R. esp. Fisiol., 27, 111-114. 1971.

During the study of the physiological and biochemical aspects of adaptation to temperature of a psychrophilic strain and mesophilic strain of *Arthrobacter*, a difference in the contents and the uptake of the endogenous reserve of amino acids, ceto-acids and nucleotids was observed.

Also, differences in the temperature at which the optimum proteinase and pyrophosphatase activity occurs for the psychrophilic strain (2-20°) and the mesophilic strain (30-37°) were obtained.

En un trabajo anterior (1) señalábamos que una de las maneras de enfocar el problema del fundamento de la adaptación de los microorganismos psicrófilos a las bajas temperaturas sería la de comparar sus caracteres fisiológicos y bioquímicos con los de otra raza mesófila de la misma especie y establecer las diferencias significativas básicas.

Previamente hemos estudiado algunos caracteres morfológicos y fisiológicos, determinando algunas diferencias significativas. Entre los caracteres bioquímicos que pueden tener alguna significación, se pueden incluir el contenido o reserva endógena celular y los enzimas.

El *pool* o contenido endógeno y el consumo de éste es fase importante del me-

tabolismo celular, pudiendo afectarse por la temperatura de crecimiento, siendo poco lo investigado en este sentido hasta ahora.

Entre otros, señala ROSE (12, 13), que los enzimas son los elementos celulares más sensibles a la temperatura. El problema estaría en descubrir cuál de los enzimas de la célula posee una sensibilidad anormal a la temperatura. Demuestra IMGRAHAM (5) que ciertos enzimas de bacterias psicrófilas pueden catalizar reacciones a más baja energía de activación que los correspondientes de mesófilos y ya hace algún tiempo que BROWN (2) decía que probablemente los enzimas de ambas razas fueran algo diferentes. Enzimas de ambas razas son comparativamente estudiados por algunos autores (11, 14).

Entre los enzimas importantes en el metabolismo celular están los proteoliti-

* Con una beca de Ayuda a la Investigación.

cos, que fueron estudiados ya por algunos autores en microorganismos psicrófilos. Así, PETERSON y GUNDERSON (10) ven que, aunque su síntesis en un psicrófilo es mayor de 0°, la máxima actividad ocurre a más temperatura. También fueron estudiados por McDONALD *et al.* (8) y por NUNOKAWA y McDONALD (9).

Otro enzima importante en el metabolismo celular es la pirofosfatasa, que no había sido estudiado previamente en relación con las bacterias psicrófilas. Nosotros lo consideramos en el presente trabajo.

Material y métodos

Se emplean dos razas de *Arthrobacter*: una psicrófila, R22/34, enviada por el Dr. DRUCE de Inglaterra y otra mesófila aislada por nosotros. Se cultivan en medio tripticasa-soja y en medio sintético de ROSE (12).

Las células de los diferentes cultivos se recogen por centrifugación, lavándolas varias veces con agua destilada. Las células se pueden romper por ultrasonido y fraccionar por centrifugación en ultracentrífuga preparativa Spinco.

La extracción de la reserva endógena se hace por el método de HANCOCK (4) y la determinación de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos por el método de HAGEN y ROSE (3). La de proteína por el método de biuret dado por LEGGET-BAYLEY (6). La determinación de pirofosfatasa se hace por el método de LEVINSON *et al.* (7).

Resultados

En algunas de las experiencias que luego se mencionan, se rompen las células bacterianas por ultrasonido (MSE 60). Se observa que la resistencia a la rotura es mayor en la raza mesófila que en la psicrófila (60 y 20 minutos, respectivamente) y tanto más cuanto más baja es la temperatura de crecimiento. En la raza psicrófila la rotura es más fácil a la tempe-

ratura óptima de crecimiento. Esto permitiría relacionar la estructura de la pared celular con las temperaturas óptimas de crecimiento de cada raza.

DETERMINACIÓN DE LA RESERVA ENDÓGENA. A partir de cultivos de las razas psicrófila y mesófila incubados a las temperaturas que se indican, se determina el contenido endógeno de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos, que corresponden a los líquidos procedentes de la rotura de las células por ultrasonido (tabla I, fig. 1). Observamos que el máximo contenido endógeno en la raza psicrófila ocurre cuando se incuba a 2°, disminuyendo a medida que se aumenta la temperatura de incubación; en la raza mesófila, el máximo contenido endógeno ocurre cuando se incuba a 30°, disminuyendo a medida que se baja la temperatura de incubación. En la raza psicrófila cuando crece en medio natural, la reserva de aminoácidos es superior a la de cetoácidos, mientras que si crece en medio sintético ocurre lo contrario.

En otra serie de pruebas se realizan transferencias de los cultivos de 2 a 37° y de 20 a 37°. Los resultados para la raza psicrófila y mesófila se expresan en la tabla II. Se ve que, para la raza psicrófila, a medida que aumenta la edad y la temperatura, se aumenta la reserva de aminoácidos y cetoácidos, disminuyendo la de nucleótidos. En la raza mesófila aumentan todas las reservas.

Tabla I. *Determinación de reservas endógenas.*

T °C	Psicrófila			Mesófila		
	AA (1/3)	CA	NT	AA (1/3)	CA	NT
2	0,845	0,950	2,100	0,469	0,145	1,187
20	0,530	0,790	1,702	0,699	0,194	1,650
30	0,200	0,730	1,530	0,854	0,292	1,825
37	0,105	0,539	1,030	0,745	0,194	1,620

AA = aminoácidos (diluido a 1/3); CA = cetoácidos; NT = nucleótidos.

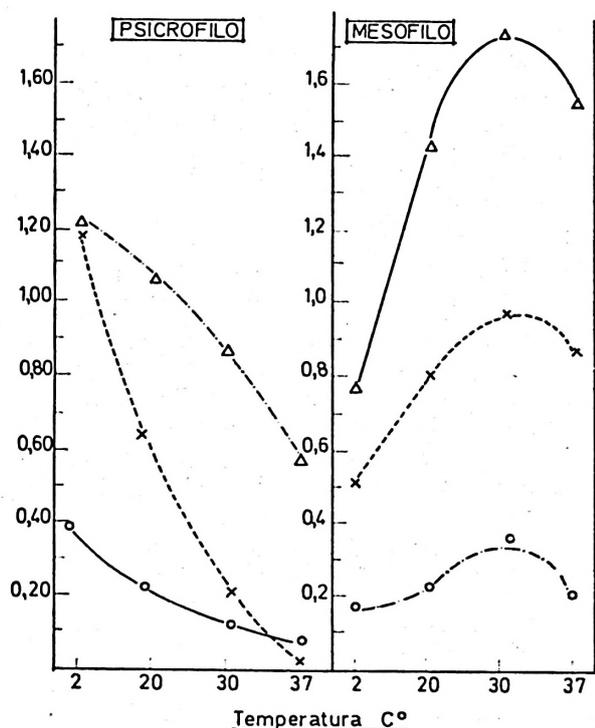


Fig. 1. Contenido en reservas endógenas. (X---X) aminoácidos; (O---O) cetoácidos; (Δ---Δ) nucleótidos.

Tabla II. Efecto transferencias en medio sintético.

Incuba inicialmente a 2° (A) y 20° (B) y cuando extinción 0,200, se transfieren a medios a 37° y realiza determinaciones a extinciones = 0,400, 0,600 y 0,800.

Extinc.	Psicrófilo			Mesófilo		
	AA (1/3)	CA	NT	AA (1/3)	CA	NT
0,200 (A)	0,560	0,100	2,210	0,140	1,900	0,865
0,400	0,690	0,130	1,570	0,265	1,580	1,155
0,600	0,720	0,180	1,495	0,350	1,605	1,240
0,800	0,845	0,255	1,095	0,520	1,700	1,415
0,200 (B)	0,230	0,654	1,800	0,238	0,925	0,605
0,400	0,245	0,062	1,430	0,485	0,500	0,870
0,600	0,260	0,065	1,050	0,690	0,735	0,980
0,800	0,306	0,075	0,950	0,715	0,915	1,055

DETERMINACIONES ENZIMÁTICAS. Se realizan unas pruebas de determinación de proteinasas y pirofosfatasa en las razas psicófila y mesófila de *Arthrobacter*

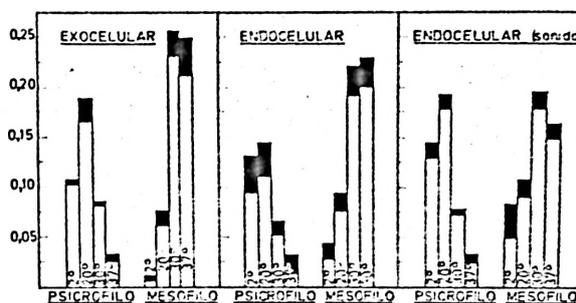


Fig. 2. Determinación de actividad proteínasa exocelular, endocelular y células rotas por ultrasonido.

Parte superior enzima inducido.

incubadas a las temperaturas que se indican.

Proteinasa. Como sustrato se emplea caseína y se hace una prueba de inducción enzimática (fig. 2), con la actividad endocelular y exocelular. Se observa una cierta inducción en todos los casos y todas las temperaturas. Determinaciones en medio natural y sintético con la raza psicrófila (fig. 3), permite observar que la máxima actividad proteínasa exocelular ocurre incubando a 2° en medio natural y a 30° en medio sintético; en cambio, la actividad endocelular es máxima a 20° en todos los casos.

Pirofosfatasa. Esta actividad se localiza en las células y se determina en células desecadas en acetona y que han crecido en medio natural a distintas temperaturas (tabla III). La máxima activi-

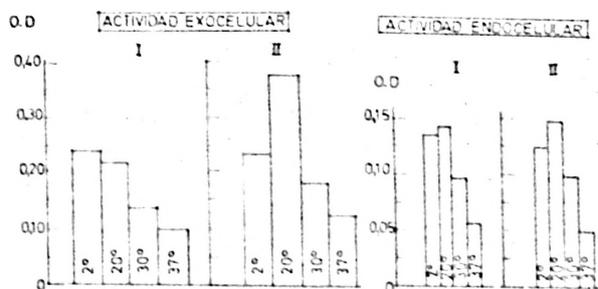


Fig. 3. Determinaciones de actividad proteínasa de la raza psicrófila en medio natural (I) y sintético (II).

Tabla III. Determinación actividad pirofosfatasa.

T °C	Psicrófila	Mesófila
2	0,074	0,057
20	0,342	0,295
30	0,081	0,490
37	0,000	0,570

dad se encuentra cuando la raza psicófila se incuba a 20° y la mesófila a 37°. Si la actividad se determina en lisados de células rotas por ultrasonido, los resultados son similares.

Discusión

En el estudio de las bases fisiológicas y bioquímicas que diferencian a los microorganismos psicrófilos de los mesófilos, tiene interés el conocimiento comparativo del contenido y utilización de la reserva endógena de los mismos. HAGEN y ROSE (3) estudiando el metabolismo de una levadura psicrófila incubada a 16°, observaron que, cuando se sube esta temperatura a 30°, hay una rápida utilización de la reserva de aminoácidos y cetoácidos.

Nosotros hemos observado que, a medida que se aumenta la temperatura de incubación en una raza psicrófila de *Arthrobacter*, disminuye la reserva endógena de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos, desapareciendo cuando se hace a 37°. Inversamente ocurre con la raza mesófila.

La relación de reserva de aminoácidos a cetoácidos en la raza psicrófila es diferente según crezca en medio natural o en medio sintético.

Se señalaba que los enzimas son quizá los componentes celulares más sensibles a la temperatura y es probable que, en alguno de ellos o en su sistema formador, se encuentre la causa de la adaptación a las temperaturas extremas.

En nuestro trabajo con enzimas proteolíticas y pirofosfatasa, se observa que en la raza psicrófila la actividad proteinasa

óptima es a más baja temperatura (2-20°) que en la mesófila (30-37°). Resultado parecido se encuentra en cuanto a la actividad pirofosfatasa, lo cual podría hacer suponer una diferencia estructural en cada enzima.

Resumen

Durante el estudio de las bases fisiológicas y bioquímicas de una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*, de adaptación a la temperatura se ha observado una diferencia en el contenido y consumo de la reserva endógena de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos. También se han determinado diferencias en la temperatura a que ocurre el óptimo de actividad proteinasa y pirofosfatasa entre la raza psicrófila (2°-20°) y mesófila (30°-37°).

Bibliografía

1. BERNÁRDEZ, I. y REGUEIRO, B.: *Microbiol. Española*, 1970 (en prensa).
2. BROWN, A. D.: *J. gen. Microbiol.*, **17**, 640, 1957.
3. HAGEN, P. O. y ROSE, A. H.: *J. gen. Microbiol.*, **27**, 89, 1962.
4. HANCOCK, R.: *Biochem. Biophys. Acta*, **37**, 47, 1960.
5. IMGRAHAM, J. L.: *Recent Progress Microbiology. VIII Intern. Congr. Microbiol. Montreal*, 201, 1963.
6. LEGGET-BAILEY, J.: *Techniques protein chemistry*, 1962.
7. LEVINSON, H. S., SLOAN, JR., J. D. y HYATT, M. T.: *J. Bacteriol.*, **75**, 291, 1958.
8. McDONALD, I. J., QUADLING, C. y CHAMBERS, A. K.: *Can. J. Microbiol.*, **9**, 303, 1963.
9. NUNOKAWA, Y. y McDONALD, I. J. *Can. J. Microbiol.*, **14**, 215 y 255, 1968.
10. PETERSON, A. C. y GUNDENSON, M. F.: *Appl. Microbiol.*, **8**, 98, 1960.
11. PUROHIT, K. y STOKES, J. L.: *J. Bacteriol.*, **93**, 199, 1967.
12. ROSE, A. H.: *J. Appl. Bacteriol.*, **31**, 1, 1968.
13. ROSE, A. H.: *Recent Progress Microbiology. VIII Intern. Congr. Microbiol. Montreal*, 193, 1963.
14. STOKES, J. y LARKIN, J. M.: *J. Bacteriol.*, **95**, 239, 1968.