

Reserva endógena de los estafilococos

R. Vaamonde-Fernández, C. Nogueira-Calvo y B. Regueiro-Varela

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

(Recibido el 26 de octubre de 1970)

R. VAAMONDE-FERNANDEZ, C. NOGUEIRA-CALVO and B. REGUEIRO-VARELA. *Endogenous Reserve of Staphylococci*. R. esp. Fisiol., 27, 103-110. 1971.

A study of the endogenous reserve of amino acids, ceto-acids and nucleotides in strains of *S. epidermidis*, *S. aureus*, and mutants of both, white and gold, respectively was made. The difference between the pigmented strains and the non-pigmented strains were determined. Here is a tendency to increase the reserve of amino acids and to decrease the reserve of nucleotides in accordance with the age of the culture. Differences were found in the effects of tetracycline and novobiocine on the endogenous reserva of amino acid and nucleotids between the pigmented strains. The presence of lysostaphin also influences both strains but in different manner.

Si consideramos que existe una relación potencial entre el metabolismo del estafilococo y su patogenicidad, posiblemente el *pool* o reserva intracelular del mismo debe de poseer alguna importancia, pues a partir del mismo se realiza la biosíntesis de las proteínas y los ácidos nucleicos.

Cuando una molécula sencilla atraviesa la membrana celular, puede incorporarse directamente en una macromolécula o puede quedar en reserva para su posterior uso en la biosíntesis de macromoléculas. El contenido del *pool* puede determinarse específicamente y se conoce que el mismo aumenta o disminuye según las circunstancias que atraviesa la célula. Las reservas intracelulares más importantes son las de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos, de las cuales la primera fue la más estudiada.

Según estudios de HOLDEN (3), se sabe que los microorganismos tienen una reserva de aminoácidos. Estudios sobre el *pool* de aminoácidos del estafilococo, en fase

estacionaria y exponencial, demostraron que se componía de: glutámico, aspártico, alanina, prolina, serina y otros; asimismo se encontró un péptido que luego pasa a formar parte de la pared celular.

Diversos factores pueden influir en el contenido del *pool*. Así, si la célula consume aminoácidos en vez de N-inorgánico, el *pool* será mayor. Si bacterias sensibles se exponen a cloramfenicol, aumenta el *pool*, probablemente al interferirse la biosíntesis de proteínas. Cuando la bacteria crece en presencia de penicilina, disminuye el *pool* total.

Por lo anterior se infiere que la reserva endógena puede relacionarse con la biosíntesis de los factores de virulencia, así el estafilococo virulento (4) tiene un mayor coeficiente respiratorio y utiliza aminoácidos del *pool* como sustrato para su respiración endógena.

Es por todo lo anterior que nos interesa realizar algunas experiencias en relación con esta fase del metabolismo.

Material y métodos

Se utiliza una raza de *S. aureus* y otra de *S. epidermidis*, aisladas por nosotros de muestras patológicas y sus mutantes «blanco» y «dorado», respectivamente, obtenidos por la técnica dada en un trabajo anterior (5).

Los cultivos se realizan por los métodos que se dan en cada tipo de experiencia. Para trabajar con los *pool* o reserva endógena, se siguen los métodos de HANCOCK (2). Para esto, los cultivos se enfrían y centrifugan, se lavan y se hace una suspensión a extinción 1.500 en agua destilada. Se realiza una extracción con ácido tricloracético al 5 %, se separa luego éste por éter y en una parte alícuota se hacen las determinaciones correspondientes.

Los aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos se determinan por los métodos de HAGEN y ROSE (1). Los aminoácidos por medio de la ninhidrina y comparación con curva patrón de glicina; los cetoácidos se determinan con hidrazina y sosa y comparan con curva patrón de piruvato y los nucleótidos por medida de extinción a UV 260 y comparación con curva patrón de adenosintrifosfato (ATP).

Resultados

DETERMINACIONES EN LA CURVA DE CRECIMIENTO. Una misma cantidad de inóculo de cada raza de estafilococo se siembra en medio de caldo común que se incuba en agitación a 30°. A intervalos de tiempo se toma muestra y se determina su extinción. Con estos datos se construye una gráfica en la que puede observarse un crecimiento similar en las cuatro razas de estafilococo (fig. 1). En las muestras anteriores se hace una extracción del *pool*, donde se determinan aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos por los métodos antes indicados. Observamos que la reserva de aminoácidos va aumentando con la edad especialmente en las razas pigmentadas, desde las 6 a las 24 horas

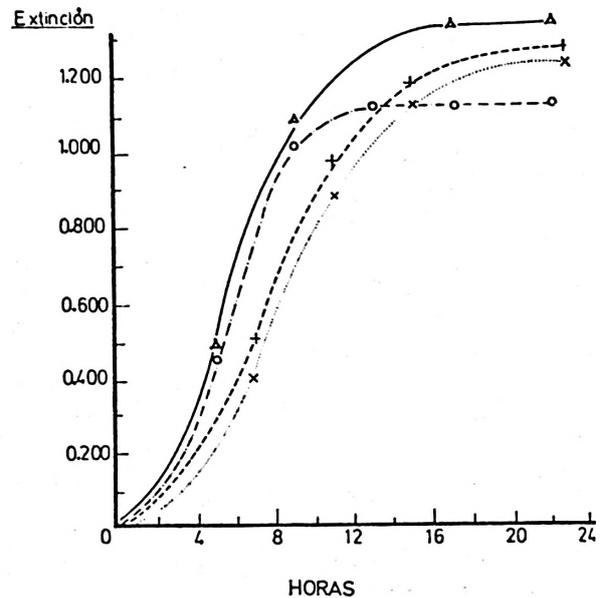


Fig. 1. Curva de crecimiento de estafilococos. *S. aureus* (Δ); «blanco» (+); *S. epidermidis* (×); «dorado» (○).

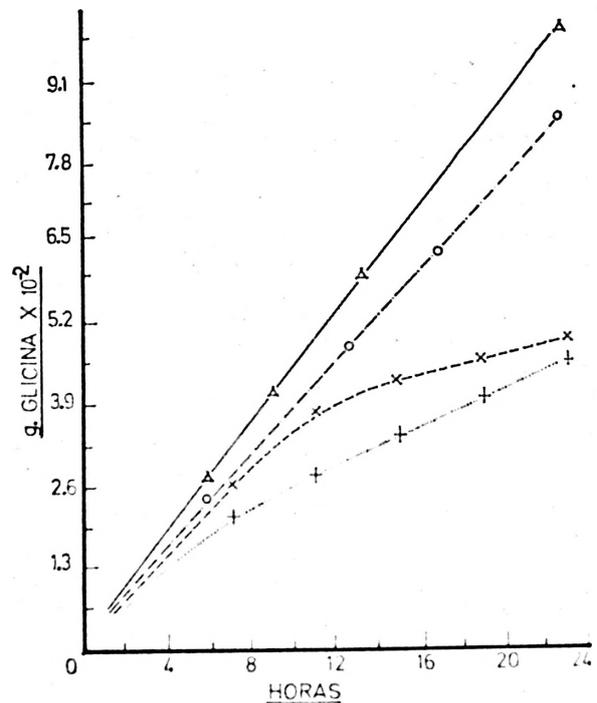


Fig. 2. Reserva endógena de aminoácidos en estafilococos. *S. aureus* (Δ); «blanco» (+); *S. epidermidis* (×); «dorado» (○).

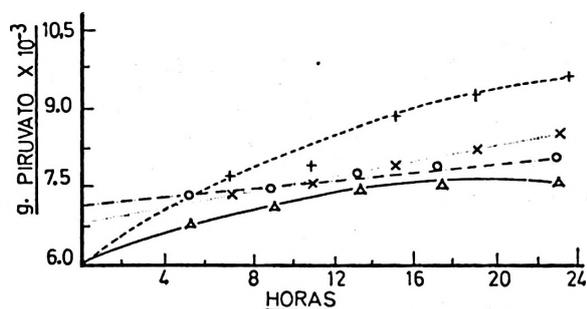


Fig. 3. Reserva endógena de cetoácidos en estafilococos.

S. aureus (Δ); «blanco» (+); *S. epidermidis* (×); «dorado» (○).

de crecimiento (fig. 2). La reserva de cetoácidos varía muy poco, aun cuando se observa un ligero aumento con la edad en el caso de las razas no pigmentadas (figura 3). La reserva de nucleótidos tiende a disminuir con la edad, siendo menor siempre en las razas no pigmentadas (fig. 4).

INFLUENCIA DEL TIEMPO DE INCUBACIÓN. Por los métodos generales se cultivan las razas de estafilococos en caldo común, en agitación a 30° durante 16 horas (fase logarítmica). Se recogen por centrifugación, lavan y suspenden en agua destilada a extinción 1,119.

Estas suspensiones se incuban a 37°, tomando muestra a intervalos de tiempo y determinando el pool endógeno (tabla I).

Se observa que en todas las razas de estafilococos, la reserva endógena de aminoácidos va aumentando durante el tiempo

de incubación, quizás por degradación de proteínas celulares, pues no hay fuente de aminoácidos exógenos. El efecto es más notable en la raza mutante «dorada».

Inicialmente es mucho más elevado el contenido de cetoácido como reserva endógena, especialmente en las razas no pigmentadas; con el tiempo de incubación disminuye esta reserva, quizás por su paso a aminoácidos, también con la excepción

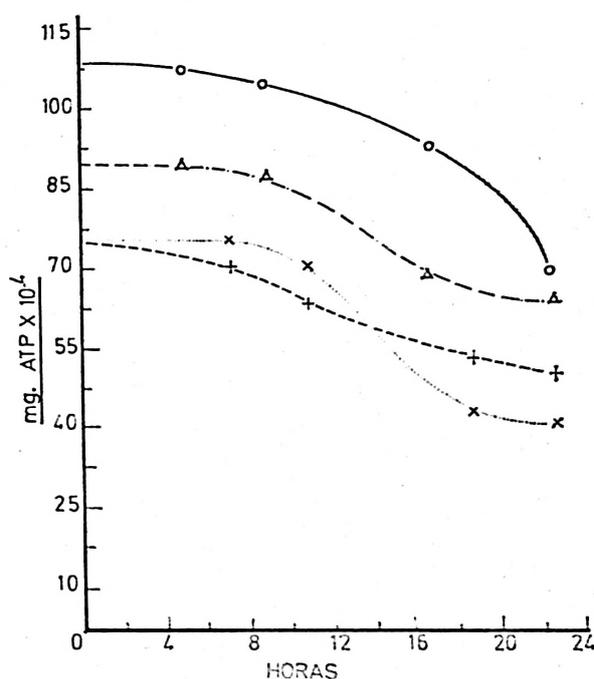


Fig. 4. Reserva endógena de nucleótidos en estafilococos.

S. aureus (○); «blanco» (+); *S. epidermidis* (×); «dorado» (Δ).

Tabla I. Influencia del tiempo de incubación sobre la reserva endógena de aminoácidos (AA), cetoácidos (CA) y nucleótidos (NT) en distintas razas y mutantes de estafilococos.

Tiempo horas	<i>S. epidermitis</i>			«Blanco»			<i>S. aureus</i>			«Dorado»		
	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT
0	0.050	0.337	0.800	0.070	0.298	0.820	0.000	0.187	0.325	0.180	0.180	1.220
2	0.100	0.328	0.850	0.120	0.257	0.960	0.070	0.174	1.125	0.200	0.185	1.600
4	0.137	0.319	1.090	0.125	0.194	1.080	0.125	0.160	1.180	0.310	0.180	1.720
6	0.170	0.301	1.280	0.140	0.190	1.350	0.140	0.143	1.280	0.330	0.200	1.780

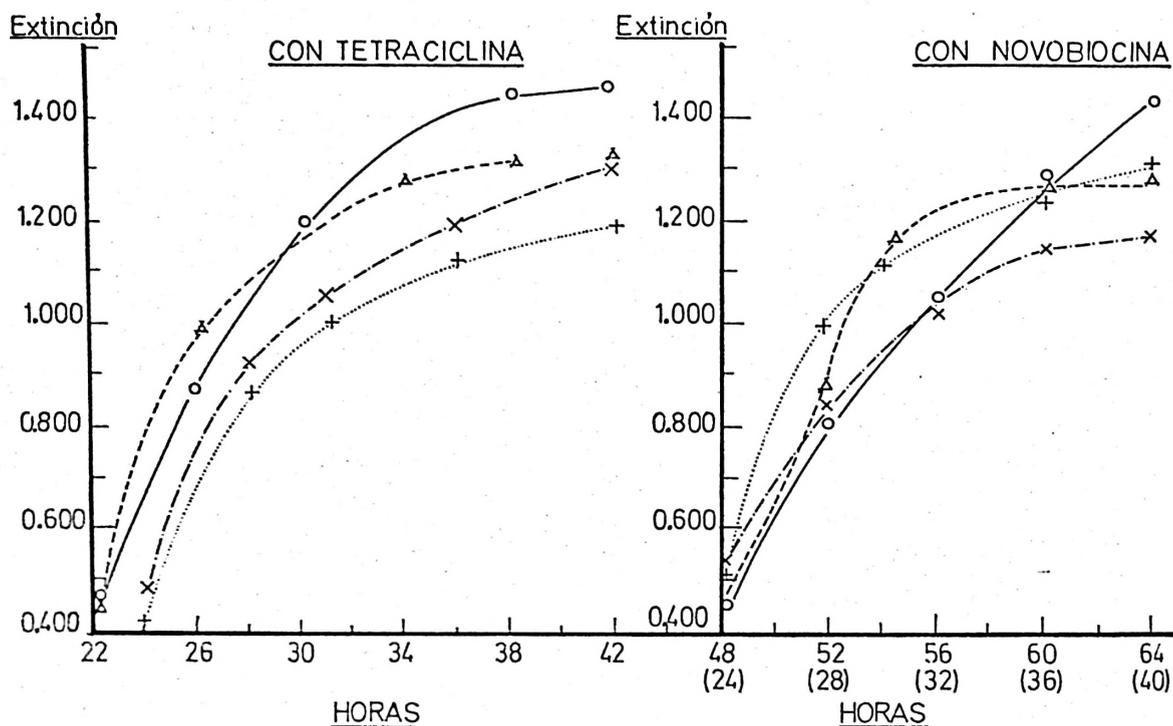


Fig. 5. Curvas de crecimiento de estafilococos en presencia de tetraciclina y novobiocina. *S. aureus* (Δ); «blanco» (\times); *S. epidermidis* (+); «dorado» (O).

de la raza mutante «dorada», que incrementa ligeramente su reserva de cetoácidos.

En relación con la reserva endógena de nucleótidos observamos que en todas las razas aumenta su contenido en forma similar, a excepción de la raza mutante «dorada» que es superior, aun cuando inicialmente también contenía más.

INFLUENCIA DE LOS ANTIBIÓTICOS. Se cultivan las razas de estafilococos en caldo común, en agitación a 30°. A estos cultivos se les ha añadido inicialmente dosis subbacteriostáticas de algunos antibióticos: novobiocina (12,5 γ /ml a los no pigmentados y 0,39 γ /ml a los pigmentados); tetraciclina (0,39 γ /ml a los no pigmentados y 25 γ /ml a los pigmentados).

A intervalos de tiempo, se toman muestras y se determina el crecimiento (figura 5) y la reserva endógena de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos.

El crecimiento con tetraciclina se determina entre las 22 y 42 horas, siendo similar en todas las razas aunque ligeramente superior en las pigmentadas (fig. 6). El crecimiento con novobiocina se determina entre las 24 y 44 horas en las razas pigmentadas y entre las 48 y 68 horas en las no pigmentadas, siendo similar en todas (figura 7). Esto es para que todas las determinaciones de reservas endógenas coincidan a la misma edad fisiológica (ver figuras 6, 7 y 8).

Observamos que en presencia de tetraciclina el *pool* de aminoácidos aumenta sensiblemente hasta las 32 horas en que queda estacionado, quizás por detenerse la utilización de aminoácidos exógenos. En presencia de novobiocina no se acumulan aminoácidos a excepción del caso del *S. epidermidis*, que no es afectado y continúa aumentando su reserva endógena de aminoácidos.

No parece que se afecte la reserva en-

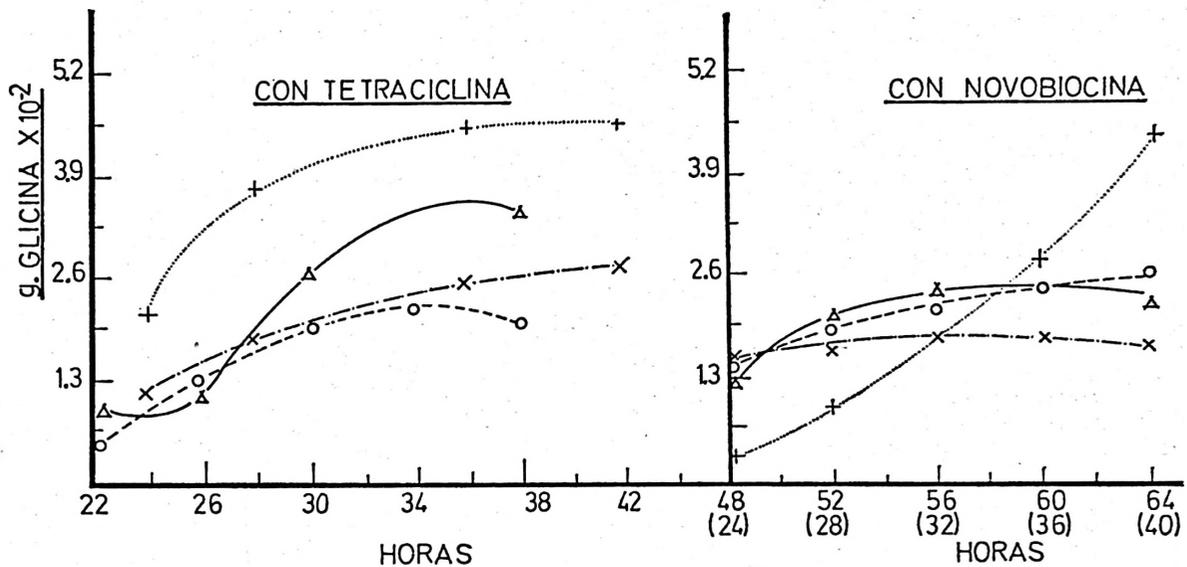


Fig. 6. Reserva de aminoácidos en presencia de tetraciclina y novobiocina. *S. aureus* (Δ); «blanco» (×); *S. epidermidis* (+); «dorado» (○).

dógena de cetoácidos, aun cuando parece que en presencia de tetraciclina tiene tendencia a aumentar y a disminuir en presencia de novobiocina.

La reserva de nucleótidos es consumida en presencia de tetraciclina, especialmente en el caso de la raza mutante «dorada». No parece que la novobiocina ejerza mucho efecto, a no ser en el caso del

S. aureus que consume dicha reserva de nucleótidos.

INFLUENCIA DE ANTIBIÓTICOS Y TIEMPO DE INCUBACIÓN. Las razas de estafilococo se cultivan en caldo común, en agitación a 30° y durante 16 horas (fase logarítmica), según las técnicas generales. Las células se recogen por centrifugación, la-

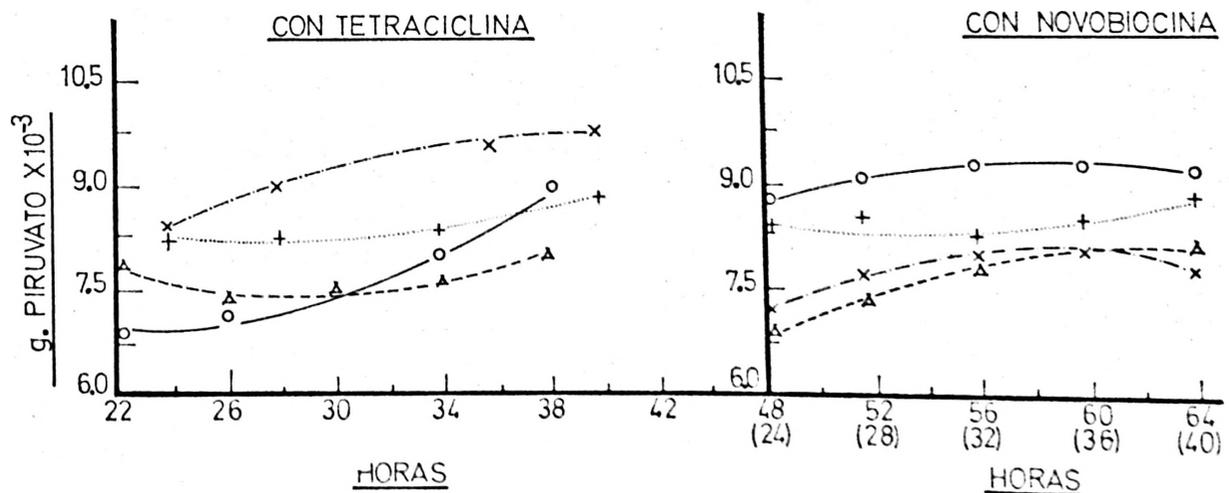


Fig. 7. Reserva de cetoácidos en presencia de tetraciclina y novobiocina. *S. aureus* (Δ); «blanco» (×); *S. epidermidis* (+); «dorado» (○).

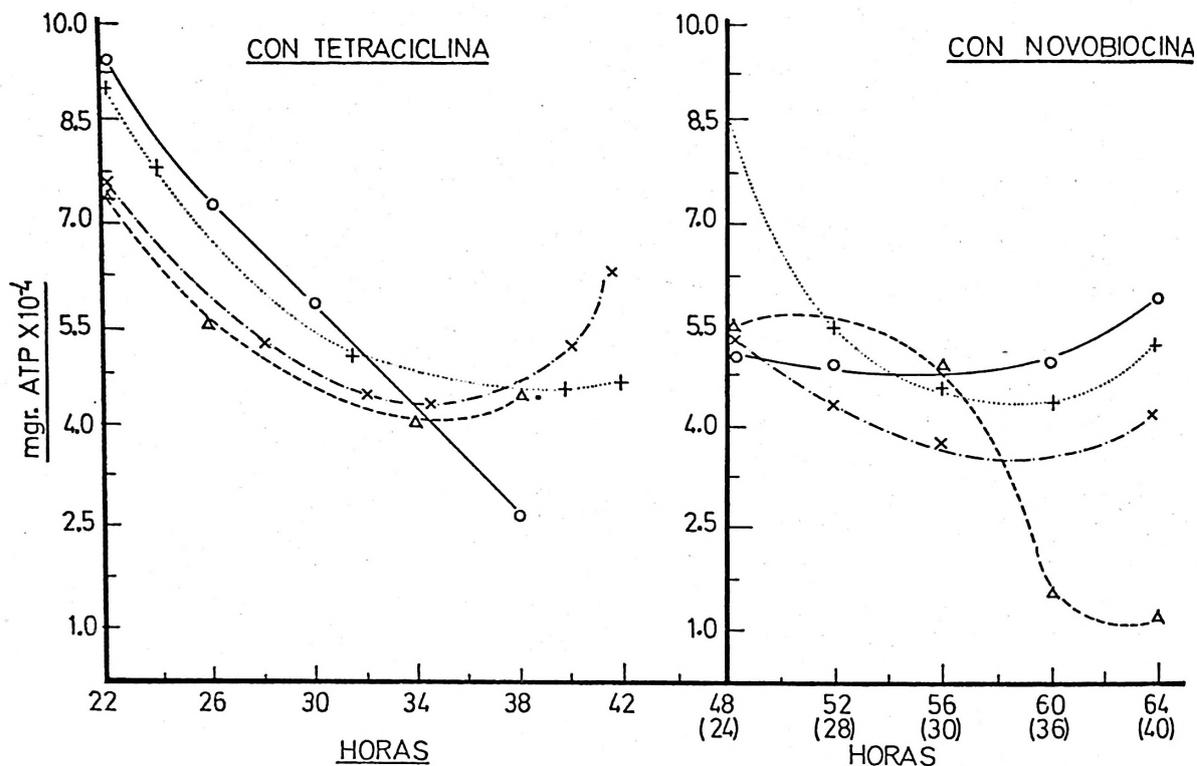


Fig. 8. Reserva de nucleótidos en presencia de tetraciclina y novobiocina. *S. aureus* (Δ); «blanco» (X); *S. epidermidis* (+); «dorado» (O).

van y suspenden en agua destilada a extinción de 1,199.

Una muestra se deja como control y otras se incuban a 37° . A las tres horas se añade a todas, menos al control, concentraciones subantibióticas de antibióticos que corresponden a las concentraciones siguientes:

S. epidermidis: $0,30 \mu/ml + 50 \mu/ml$; «blanco»: $0,78 \mu/ml + 50 \mu/ml$; *S. aureus*: $0,78 \mu/ml + 1,56 \mu/ml$, y «dorado»: $50 \mu/ml + 0,78 \mu/ml$ de tetraciclina y novobiocina, respectivamente. Todas las muestras se tienen hasta 6 horas en incubación a 37° . Se toman muestras a las horas que se indican y se determina la reserva endógena (tabla II).

Son comparativos los resultados del control y los de presencia de antibióticos a las 6 horas. Observamos entonces en relación con la reserva endógena de aminoácidos, que los antibióticos probados in-

crementan dicha reserva en las razas no pigmentadas y la consumen en las pigmentadas. Que esto es así lo demuestra en las razas pigmentadas que el *pool* va subiendo hasta las tres horas que se añaden los antibióticos y entonces disminuye bruscamente. No observamos diferencias entre los dos antibióticos.

En relación con la reserva endógena de cetoácidos, observamos que los antibióticos empleados incrementan dicha reserva en el caso de las razas no pigmentadas, ligeramente en el *S. epidermidis* y mucho en el caso del mutante «blanco». En las razas pigmentadas hay una disminución ligera de dicho *pool*. No se encuentra tanta evidencia como en el caso anterior de que el efecto señalado es debido a los antibióticos empleados.

Los resultados en el caso de la reserva endógena de nucleótidos son diferentes. Así, en el *S. epidermidis* no se logra de-

Tabla II. *Influencia de la tetraciclina y de la novobiocina sobre la reserva endógena de aminoácidos (AA), cetoácidos (CA) y nucleótidos (NT) en distintas razas y mutantes de estafilococos.*

Tiempo horas	<i>S. epidermitis</i>			«Blanco»			<i>S. aureus</i>			«Dorado»		
	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT
	Efecto de la tetraciclina											
C	0,300	0,080	—	0,300	0,110	1,710	0,201	0,125	1,470	0,395	0,070	2,000
1	0,280	0,100	—	0,280	0,160	1,645	0,160	0,149	1,750	0,220	0,080	—
2	0,270	0,120	—	0,300	0,250	1,720	0,222	0,135	1,020	0,220	0,080	—
3	0,200	0,100	—	0,350	0,270	1,790	0,260	0,155	1,180	0,225	0,050	—
4	0,280	0,110	—	0,310	0,210	1,940	0,155	0,131	1,350	0,270	0,100	—
5	0,290	0,120	—	0,340	0,250	2,240	0,143	0,125	1,440	0,230	0,080	—
6	0,320	0,100	—	0,410	0,310	2,810	0,092	0,125	1,470	0,345	0,060	—
	Efecto de la novobiocina											
C	0,215	0,080	—	0,300	0,110	1,710	0,201	0,131	1,750	0,380	0,080	2,400
1	0,205	0,100	—	0,280	0,160	1,645	0,155	0,149	1,020	0,220	0,080	1,450
2	0,310	0,110	—	0,300	0,250	1,720	0,222	0,155	1,180	0,275	0,100	1,600
3	0,280	0,100	—	0,350	0,270	1,790	0,260	0,155	1,350	0,255	0,090	1,780
4	0,270	0,090	—	0,350	0,320	1,710	0,125	0,110	1,410	0,220	0,060	1,820
5	0,300	0,130	—	0,340	0,300	1,980	0,125	0,119	1,470	0,220	0,080	1,830
6	0,320	0,120	—	0,410	0,350	2,240	0,137	0,125	1,475	0,350	0,065	1,850

ectar reserva de nucleótidos en ningún caso. En el mutante «blanco» se produce un incremento de la reserva de nucleótidos por los antibióticos. Por otra parte, en las razas pigmentadas se produce una evidente disminución o consumo de este *pool* (en el caso del mutante «dorado» no logramos detectar nucleótidos cuando se trata por tetraciclina). En general, los antibióticos indicados retrasan la acumulación de nucleótidos en las razas pigmentadas, mientras que incrementa su acumulación en las razas no pigmentadas.

INFLUENCIA DE LA LISOSTAFINA. Las razas de estafilococos son cultivadas en caldo tripticasa-soja, en agitación a 30° y durante 16 horas (fase logarítmica). A continuación se centrifugan las células y lavan con tampón Tris-ClNa (pH 7.5). Al final se suspenden en dicho tampón a una extinción de 1,199.

A una serie de tubos se añaden 5 ml de la suspensión anterior dejando uno de control; a los demás se añaden, a las tres

horas de incubación a 37°, tres unidades de lisostafina. A intervalos de tiempo se toma una muestra y se determina la reserva endógena (tabla III).

En relación con la reserva endógena de aminoácidos, observamos su incremento en las cuatro razas, especialmente en el mutante «dorado». En relación con el efecto de la lisostafina, podemos observar que se produce una acumulación de aminoácidos endógenos en todas las razas.

En cuanto a la reserva endógena de cetoácidos, se produce una disminución en todas las razas muy ligera. En cuanto al efecto de la lisostafina observamos un incremento general, pero especialmente en el caso de las razas no pigmentadas.

Por último, en relación con la reserva endógena de nucleótidos, vemos que se produce un gran incremento en todas las razas y en cuanto al efecto de la lisostafina encontramos que produce un mayor incremento en todas las razas, siendo muy pequeño en el caso del mutante «dorado».

Tabla III. Influencia de la lisostafina sobre la reserva endógena de aminoácidos (AA), cetoácidos (CA) y nucleótidos (NT) en distintas razas y mutantes de estafilococos.

Tiempo horas	<i>S. epidermitis</i>			«Blanco»			<i>S. aureus</i>			«Dorado»		
	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT	AA	CA	NT
0	0,102	0,155	0,470	0,080	0,150	0,300	0,155	0,229	0,415	0,170	0,155	0,950
1	0,102	0,174	0,950	0,140	0,170	0,450	0,125	0,201	1,300	0,250	0,165	1,180
2	0,137	0,174	1,080	0,145	0,175	1,000	0,143	0,208	1,330	0,260	0,145	1,230
3	0,174	0,168	1,280	0,180	0,150	1,120	0,174	0,222	1,560	0,270	0,150	1,330
4	0,174	0,165	1,500	0,180	0,160	1,500	0,190	0,224	1,680	0,200	0,130	1,400
5	0,187	0,161	1,700	0,186	0,165	1,500	0,222	0,225	1,720	0,250	0,140	1,400
6	0,187	0,161	1,740	0,190	0,175	1,750	0,260	0,215	1,950	0,230	0,140	1,430
7	0,187	0,174	2,175	0,195	0,185	2,100	0,301	0,222	2,150	0,290	0,160	1,550
C	0,155	0,143	1,759	0,180	0,157	1,570	0,284	0,208	1,700	0,250	0,150	1,580

Conclusiones

La reserva endógena de aminoácidos aumenta con la edad de los cultivos de estafilococos, especialmente en las razas pigmentadas. La de cetoácidos varía muy poco con la edad del cultivo, siendo mayor en las razas no pigmentadas. La reserva de nucleótidos disminuye con la edad y es mayor en las razas pigmentadas.

Una suspensión de células de las razas de estafilococos en fase logarítmica, incubados a 37°, incrementa su reserva de aminoácidos y nucleótidos, disminuyendo la de cetoácidos, a excepción del mutante «dorado».

La presencia de tetraciclina y novobiocina en concentración subbacteriostática incrementa la reserva de aminoácidos en las razas pigmentadas y disminuye la de las no pigmentadas. Estos antibióticos no influyen sobre la reserva de cetoácidos y sí sobre la de nucleótidos, retrasando su acumulación en las razas pigmentadas y acelerando la misma en las no pigmentadas.

La presencia de lisostafina hace aumentar la reserva de aminoácidos, sobre todo en el mutante «dorado». También hace aumentar el de cetoácidos en las razas

no pigmentadas, pero no en las pigmentadas. Asimismo hace aumentar la reserva de nucleótidos en todas las razas menos en el mutante «dorado» que disminuye.

Resumen

Se estudia la reserva endógena de aminoácidos, cetoácidos y nucleótidos en raza de *S. epidermidis*, *S. aureus* y mutantes de ambos, «dorado» y «blanco», respectivamente. Se determinan diferencias entre las razas pigmentadas y las no pigmentadas. En relación con la edad de crecimiento tiende a aumentar la reserva de aminoácidos y disminuir la de nucleótidos. Se encuentra diferencia en la acción de tetraciclina y novobiocina en la reserva endógena de aminoácidos y nucleótidos entre las razas pigmentadas. También influye de forma diferente en unas y otras la presencia de lisostafina.

Bibliografía

- HAGEN, P. O. y ROSE, A. H.: *J. gen. Microbiol.*, **27**, 89, 1962.
- HANCOCK, R.: *Biochem. Biophys. Acta*, **37**, 47, 1960.
- HOLDEN, J. T.: «Aminoacids pool», p. 73, 1961.
- IVLER, D.: *Ann. N. Y. Acad. Sc.*, **128**, 62, 1965.
- NOGUEIRA, C. y REGUEIRO, B.: *Microbiol. Española*, 1970 (en prensa).