

Enzimas respiratorios en una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*

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

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

(Recibido el 26 de octubre de 1970)

I. BERNARDEZ-HERMIDA and B. REGUEIRO-VARELA. *Respiratory Enzymes in a Psychrophilic and a Mesophilic Strain of Arthrobacter*. R. esp. Fisiol., 27, 173-178. 1971.

The respiratory activities of a psychrophilic and a mesophilic strain of *Arthrobacter* has been studied.

Optimal dehydrogenase activity occurs in the psychrophilic strain when incubated at 20-30° and in the mesophilic strain at 30-37° C. Chemical inhibitors act in a different manner on each strain.

The determination of the catalase activity was made by different methods and it was observed that the maximum activity in the psychrophilic strain occurred when it was incubated at 2-20° C and in the mesophilic at 30-37° C.

The activity of DPNH-oxidase is higher in the psychrophilic strain when incubated at 10-20° C and becomes inactive at 50° C. In the mesophilic strain it is maximum at 30° C and becomes inactive at 65° C.

The peroxidase activity is maximum in the psychrophilic strain when incubated at 5-15° and become inactive at 50°. In the mesophilic strain it is maximum at 20-35° and becomes inactive at 70°.

Sugiere ROSE (11) que las bases bioquímicas del crecimiento de los microorganismos a bajas temperaturas, se asocian a ciertos componentes celulares anormalmente termosensibles: los enzimas. La cuestión está en conocer cual, de todos los que intervienen en el metabolismo celular, es el que posee tal sensibilidad y es responsable de la máxima baja temperatura a que crece el microorganismo.

Se sabe que ciertos enzimas de microorganismos psicrófilos pueden catalizar reac-

ciones a más baja energía de activación que los correspondientes de mesófilos (12). DAWES y HOLMS (3) y STOKES y LARKIN (13) también señalan diferencias entre enzimas de psicrófilos y mesófilos.

Parece que la represión de la síntesis de enzimas es mayor a bajas temperaturas, luego la fase termosensible pudiera también ser la de la síntesis de su represor. Se tiene evidencia de que los enzimas fermentativos, oxidativos y lipolíticos, así como sus sistemas formadores, son anormalmente sensibles a la temperatura, en los microorganismos psicrófilos.

Algunos autores (4) observan sensibili-

* Con una beca de Ayuda a la Investigación.

dad anormal a la temperatura en la malicodeshidrogenasa de los psicrófilos y se conoce una de un microorganismo termófilo que resiste hasta los 78°. Otras deshidrogenasas con parecidas propiedades son estudiadas por otros diversos autores (1, 2, 6, 8, 9). IMGRAHAM y BAILEY (7), no observan las citadas sensibilidades y sugieren que las diferencias en respuesta a la temperatura se deben más a aspectos de la organización celular que a diferencias enzimáticas.

Por otra parte, FRANK *et al.* (5), muestran en una bacteria psicrófila que, cuando crece a 2°, produce más catalasa que cuando lo hace a 30°; la actividad en ambos casos disminuye con la edad; luego un incremento en la síntesis de catalasa puede ser esencial para el crecimiento a baja temperatura.

Otros enzimas endocelulares respiratorios son la DPNH-oxidasa y la peroxidasa a los que no se menciona en la literatura sobre el tema de trabajo y que, en unión de los anteriores, son el objeto del presente.

Material y métodos

Se utilizan en el presente trabajo una raza de *Arthrobacter* psicrófila enviada por el Dr. DRUCE, de Inglaterra, y otra mesófila aislada por nosotros. Se cultivan

en medio tripticasa-soja y en medio sintético (ROSE), a las temperaturas que se indican en cada caso.

La proteína se determina por el método del biuret. La actividad deshidrogenasa por el método de DAWES y HOLMS (3) por reducción del trifeniltetrazolonio y determinación colorimétrica del formazan originado. La actividad catalasa por el método de FRANK *et al.* (5), uno por catalasímetro y otro espectro-fotométrico.

La actividad DPNH-oxidasa por el método de REGUEIRO *et al.* (10), por disminución de la densidad óptica a 340 m μ de una mezcla de 100 ml de tampón fosfato a pH = 7,4, 0,40 mmol. DPNH y suspensión bacteriana hasta volumen final de 3 ml (la unidad es la cantidad de enzima que hace disminuir la densidad óptica 0,001/minuto). La actividad peroxidasa por el método de WALKER y KILGOUR (14) que tienen un fundamento análogo al anterior, siendo la mezcla de: 40 m mol. tampón acetato a pH = 5,4, 0,13 m mol. de DPNH y 0,9 m mol. de H₂O₂ y suspensión bacteriana.

Resultados

ACTIVIDAD DESHIDROGENASA. Esta actividad se localiza en las células, las cuales se suspenden en solución salina. Estas

Tabla I. Influencia de la temperatura y del sustrato sobre la actividad deshidrogenasa de una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*.

Sustrato	PSICROFILO				MESOFILO *		
	2°	20°	30°	37°	20°	30°	37°
Glucosa	0,112	0,70	0,540	0,062	0,001	0,090	0,045
Isocitrato	0,020	0,225	0,330	0,145	0,075	0,080	0,094
Pirúvico	0,290	0,330	0,600	0,190	0,166	0,280	0,290
Cetoglutárico	0,250	0,295	0,740	0,106	0,137	0,175	0,180
Succínico	0,435	0,710	0,051	0,041	0,040	0,080	0,080
Aspártico	0,760	0,410	0,072	0,040	0,280	0,290	0,250
Málico	0,000	0,582	0,647	0,185	0,050	0,644	0,620
Manitol	0,036	0,550	0,130	0,049	0,125	0,487	0,480

* Esta raza, a 2° no da crecimiento y, por lo tanto, no hay actividad.

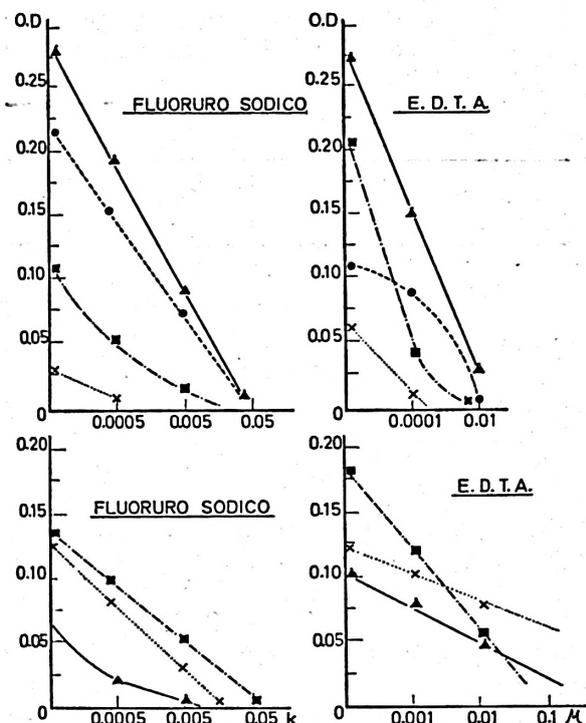


Fig. 1. Inhibición de la actividad glucosa-deshidrogenasa de dos razas de *Arthrobacter* por el fluoruro sódico y el EDTA. (○) 2° C; (△) 20° C; (■) 30° C; (×) 37° C. Parte superior, raza psicrófila. Parte inferior, raza mesófila.

células proceden de cultivos de la raza psicrófila y mesófila incubadas a 2°, 20°, 30° y 37° durante 48 horas.

Como sustratos se emplean: glucosa, isocitrato, piruvato, cetoglutarato, succinato, aspartato, malato y manitol. Los resultados se recogen en la tabla I. La máxima actividad deshidrogenasa se encuentra en células incubadas a 20°-30° en la raza psicrófila y a 30°-37° en la raza mesófila. A 0° sólo tienen actividad en la raza psicrófila.

En otra experiencia se prueba el efecto de ciertos inhibidores, tales como fluoruro sódico, EDTA, glicina, cianuro potásico, lauril sulfato y azida sódica sobre la glucosa-deshidrogenasa. Se ha encontrado inhibición completa de la actividad enzimática a las concentraciones que se indi-

can: para la raza psicrófila, el lauril sulfato 0,01 M y EDTA 0,01 M y para la raza mesófila, la azida de sodio 0,01 M, fluoruro sódico 0,05 M y lauril sulfato 0,0005 M. En la figura 1 se representa gráficamente el efecto del fluoruro sódico y del EDTA.

ACTIVIDAD CATALASA. Se realiza primeramente una prueba de tipo cualitativa, utilizando placas de agar-tripticosa-soja incubadas a 2°, 20°, 30°, 37°, donde crecen colonias de las razas psicrófila y mesófila. Se bañan los cultivos con agua oxigenada al 3%. El desprendimiento de oxígeno indica presencia de catalasa, observándose que la mayor actividad corresponde a la raza psicrófila incubada a 2° y 20° y la mesófila a 30° (tabla II).

Tabla II. Actividad catalásica en dos razas de *Arthrobacter*.

Prueba cualitativa en dos razas de *Arthrobacter* cultivadas en placas de agar-tripticosa-soja. En la determinación cuantitativa los valores se expresan en mililitros de gas desprendido.

Temperatura °C	Determinación cualitativa		Determinación cuantitativa	
	Psicrófila	Mesófila	Psicrófila ml	Mesófila ml
2	++	±	1,0	0,4
20	+++	+	1,7	0,6
30	+	++	0,5	0,9
37	±	+	0,2	1,0

En una prueba cuantitativa, se añade a un catalasímetro 1 ml de cultivo, 8 ml de solución salina y 1 ml de H₂O₂ al 3%. Se incuban a las temperaturas que se indican y los resultados se expresan en mililitros de gas desprendido (tabla II). Los cultivos empleados tienen la misma edad fisiológica. Observamos una mayor actividad catalasa en la raza psicrófila a 2° y 20° y en menor proporción en la mesófila a 30° y 37°.

Por último, se hacen determinaciones de actividad catalasa por un método es-

pectrofotométrico. Las células con la mínima edad fisiológica se lavan y suspenden en solución salina; se ponen a la misma extinción y se rompen con ultrasonido (MSE), en cantidades de 10 ml. El tiempo de rotura es de 30 minutos para la raza psicrófila y 60 minutos para la mesófila. Se centrifugan y los sobrenadantes se emplean como fuente de enzima (1,7 mg/ml de proteína). Los resultados son similares a los anteriores (tabla III).

Tabla III. *Determinación espectrofotométrica de la actividad catalásica en dos razas de Arthrobacter.*

Temperatura °C	Psicrófila (segundos)	Mesófila (segundos)
5	26	85
20	23	71
37	119	41

ACTIVIDAD DPNH-OXIDASA. Esta actividad es muy importante dentro del metabolismo celular. Se preparan cultivos de la raza psicrófila a 10° por 5 días y de la

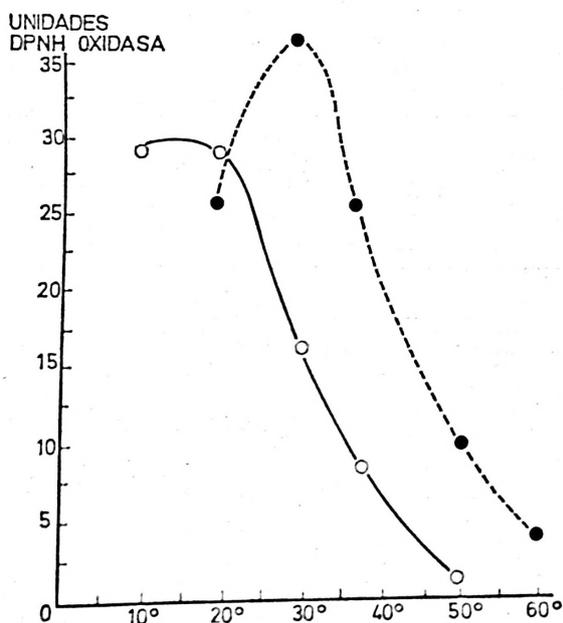


Fig. 2. *Efecto de la temperatura sobre la actividad DPNH-oxidasa de una raza psicrófila (○) y otra mesófila (●) de Arthrobacter.*

Tabla IV. *Determinación espectrofotométrica de la actividad DPNH-oxidasa en dos razas de Arthrobacter.*

Raza	20° (unidades)	30° (unidades)	37° (unidades)
Psicrófila	44	14	12
Mesófila	18	22	15

mesófila a 30° por 3 días. Se rompen las células por ultrasonido, se centrifuga y el líquido sobrenadante con un contenido en proteína de 0,90 mg/ml se emplea como fuente de enzima.

La actividad se determina espectrofotométricamente a las temperaturas indicadas y los resultados se dan en la tabla IV. Puede verse que la mayor actividad corresponde a la raza psicrófila incubada a 20° y en la mesófila a 30°.

Se determina la estabilidad al calor (figura 2), colocando el enzima durante 30 minutos a diferentes temperaturas de 10° a 80°. En la raza psicrófila, la máxima actividad ocurre a 10° y se inactiva a 50°; en la mesófila son 30° y 65°, respectivamente.

ACTIVIDAD PEROXIDASA. Las razas psicrófila y mesófila se cultivan y tratan como en el caso anterior y el líquido sobrenadante con un contenido en proteína de 1,37 mg/ml se emplea como fuente de enzima.

La actividad a las temperaturas que se indican (tabla V) se determina espectrofotométricamente. La mayor actividad corresponde a la raza psicrófila incubada a 5° y en la mesófila a 20°.

Se determina la estabilidad al calor como en el caso anterior y los resultados

Tabla V. *Actividad peroxidasa de dos razas de Arthrobacter a distintas temperaturas.*

Raza	5° (unidades)	20° (unidades)	30° (unidades)
Psicrófila	32	27	—
Mesófila	—	32	22

se expresan gráficamente (fig. 3). La máxima actividad en la psicrófila ocurre a 15° y la inactivación a 50°, en la mesófila a 35° y 70°, respectivamente.

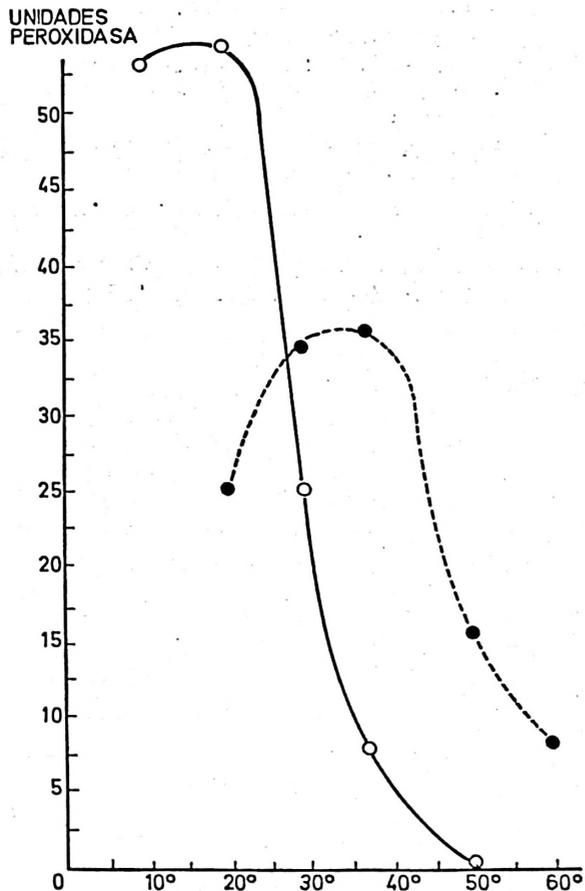


Fig. 3. Efecto de la temperatura sobre la actividad peroxidásica de una raza psicrófila (○) y otra mesófila (●) de *Arthrobacter*.

Discusión

La inactivación del metabolismo respiratorio es un factor importante en el crecimiento a bajas temperaturas. La cuestión es conocer cuál de los enzimas que en él intervienen es el de mayor labilidad a la temperatura. Nosotros estudiamos los siguientes enzimas: deshidrogenasas, catalasa, DPNH-oxidasa y peroxidasa, en

una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*.

Los resultados obtenidos comparando deshidrogenasas de psicrófilos y mesófilos son muy variables y dependen del sustrato utilizado. En general, las actividades óptimas difieren en el psicrófilo (20°-30°) y mesófilo (30°-37°). Algunos inhibidores son muy activos sobre deshidrogenasas; así, por ejemplo, el lauril sulfato en la raza mesófila; otros inhibidores actúan de forma diferente en una y otra raza.

En relación con la actividad catalasa nuestros resultados están de acuerdo con FRANK *et al.* (5) en relación con la raza psicrófila, pero, además, en los estudios comparativos con la raza mesófila hemos obtenido resultados muy significativos.

Se estudia por primera vez la actividad DPNH-oxidasa en razas psicrófila y mesófila comparativamente y lo mismo la actividad peroxidasa. El óptimo de actividad está a baja temperatura en la raza psicrófila (5°-20°) y más elevada en la mesófila (30°). Los enzimas psicrófilos son más termosensibles que los mesófilos (a 50° se inactiva el primero y a 80° el segundo).

Resumen

Se estudian comparativamente las actividades respiratorias de una raza psicrófila y otra mesófila de *Arthrobacter*.

La máxima actividad deshidrogenasa ocurre en la raza psicrófila incubada a 20°-30° y en la mesófila a 30°-37°. Inhibidores químicos actúan de forma diferente en una y otra raza.

En determinaciones de actividad catalasa por diferentes métodos, se observa que la máxima actividad ocurre en la raza psicrófila incubada a 2°-20° y en la mesófila a 30°-37°.

La actividad DPNH-oxidasa es máxima en la raza psicrófila incubada a 10°-20° y se inactiva a 50°, mientras que en la mesófila es a 30° y se inactiva a 65°.

Por último, la actividad peroxidasa es máxima en la raza psicrófila incubada a 5°-15° y se inactiva a 50°, mientras que en la mesófila es a 20°-35° y se inactiva a 70°.

Bibliografía

1. BAXTER, R. M. y GIBBONS, N. E.: *Can. J. Microbiol.*, **8**, 511, 1962.
2. BURTON, S. D. y MORITA, R. Y.: *J. Bacteriol.*, **86**, 1019, 1963.
3. DAWES, E. A. y HOLMS, W. H.: *Biochem. Biophys. Acta*, **30**, 278, 1958.
4. EVISON, L. M. y ROSE, A. H.: *J. gen. Microbiol.*, **40**, 349, 1965.
5. FRANK, A. H., ISHIBASI, S. T., REID, A. y SITO, J.: *Appl. Microbiol.*, **11**, 151, 1963.
6. IMGRAHAM, J. L.: Recent Progress Microbiol. VIII Intern. Congr. Microbiol. Montreal, 201, 1963.
7. IMGRAHAM, J. L. y BAILEY, G. F.: *J. Bacteriol.*, **77**, 609, 1959.
8. LANGRIDGE, P. y MORITA, R. Y.: *J. Bacteriol.*, **92**, 418, 1966.
9. PUROHIT, K. y STOKES, J. L.: *J. Bacteriol.*, **93**, 199, 1967.
10. REGUEIRO, B., AMELUXEN, R. y GRISOLIA, S.: *Biochem.*, **1**, 553, 1962.
11. ROSE, A. H.: Recent Progress Microbiol. VIII Intern. Congr. Microbiol. Montreal, 193, 1963.
12. ROSE, A. H. y EVINSON, L. M.: *J. gen. Microbiol.*, **38**, 131, 1965.
13. STOKES, J. y LARKIN, J. M.: *J. Bacteriol.*, **95**, 95, 1968.
14. WALKER, G. A. y KILGOUR, G. L.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **3**, 529, 1965.