

ESTUDOS SOBRE A ESPORULAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE *BACILLUS*

IV — Outras evidências sobre a atividade do íon Mn^{2+} na esporulação endotrófica.¹

LEON RABINOVITCH * e SÔNIA MARIA DA SILVA **

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 8 figuras)

SUMÁRIO: Foram feitas experimentações com o intuito de se buscar mais evidências sobre a participação do íon Mn^{2+} no mecanismo esporogenético de uma amostra de *Bacillus licheniformis*. Quando as formas vegetativas desta bactéria eram depositadas em um meio mineral, carente de fonte de carbono utilizável, em conjunto com um agente seqüestrante de metais como o EDTA, a esporulação endotrófica deixava de ocorrer. Entretanto, a esporulação pôde ser protegida quando as células eram previamente saturadas com um excesso de Mn^{2+} exógeno. As formas esporuladas obtidas nas condições estudadas mostraram termorresistência a 85°C durante 20 minutos.

ALGUNS íons metálicos desempenham papel reconhecidamente na esporogênese bacteriana, destacando-se, dentre eles, certos cátions divalentes.

Igualmente se conhece, que a formação de esporos em bacilos aeróbios é rapidamente induzida em meios líquidos não nutritivos. Estes meios podem ser hipotônicos, contendo simplesmente fosfatos, como mostraram **Perry & Foster**,⁽¹⁾ ou soluções isotônicas de NaCl ou KCl, segundo trabalho de **Portellada**.⁽²⁾

Todavia, a evolução das formas vegetativas para esporos endotróficos, encontra-se na dependência de serem elas previamente cultivadas em meios que encerrem, na sua composição, uma concentração suficiente de íons, tais como o Mn^{2+} ou Mg^{2+} (**Rabinovitch**)⁽³⁾

Assim sendo, na presente comunicação, os autores relatam os resultados de experiências nas quais foram obtidos esporos bacterianos em um meio mineral isento de fonte de carbono utilizável, bem como são mos-

1 Recebido para publicação a 5 de fevereiro de 1973.

* Laboratório de Bacteriologia, Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto Oswaldo Cruz.

** Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

tradas mais evidências sobre a influência do Mn^{2+} na esporulação endotrófica de uma amostra de *Bacillus licheniformis*.

MATERIAL E MÉTODOS

Condições de cultivo — Durante todo o trabalho foi empregado o *Bacillus licheniformis*-2390. A sua manutenção no laboratório foi feita sob a condição de esporos, os quais eram conservados e germinados conforme descrição constante em outro trabalho (Rabinovitch & col.).⁽⁴⁾ As formas vegetativas oriundas dos esporos eram cultivadas em frascos Erlenmeyer de 2l de capacidade, contendo 300 ml do meio MS 66-A estéril (Rabinovitch),^(3,5) acrescido de 1 mg% de Mn^{2+} (como $Mn SO_4 \cdot 4H_2O$) e 5 mg% de extrato de lêvedo (Difco). O pH final foi de 7,0 e a incubação a 37°C, com agitação ocasional, durante 72 horas.

Preparo das células — Após o crescimento, as células de um frasco eram centrifugadas a 3.300 x g a 10°C, e, nestas condições, eram lavadas uma vez com água destilada em vidro neutro. Finalmente, eram ressuspensas em água destilada a 10°C, numa proporção correspondente a 19 vezes menos o volume inicial do meio de cultivo. Procedia-se, também, um exame para a verificação da ausência de formas esporuladas.

Esporulação endotrófica — A obtenção de esporos endotróficos, bem como as experiências destinadas a demonstrar o bloqueio da esporogênese, foram realizadas em frascos Erlenmeyer de 125 ml de capacidade, encerrando, cada, um volume total de 50 ml do meio MS 66-A contendo células, porém isentos de glicose. Estes frascos eram agitados com órbitas circulares de 3/4 de polegadas, em agitador.

Contagem de células esporuladas — Com uma câmara de Petroff-Hausser para contagem de bactérias, e sob microscopia de contraste de fase, pôde-se avaliar o número de células esporuladas (esporos livres e endósporos). Todavia, uma relação entre a quantidade destas células e as formas vege-

tativas originais não foi possível de se obter, em virtude do *B. licheniformis* reproduzir-se originando extensas cadeias de células, fato que tornaria inútil uma tentativa de contagem em placas de Petri. Entretanto, a relação numérica entre formas esporuladas/volume do meio pôde ser obtida, uma vez que estas células suportaram um tratamento ao ultra-som (Biosonik III, Bronwill Scientific Inc.) com uma intensidade aplicada equivalente a 52,5 Watts/cm², durante 90 segundos e sob banho de gelo.

Para este tratamento, o material foi previamente submetido a ação do formol a 0,5%, v/v, durante 60 minutos em estufa a 37°C.

Metais e agente quelante — Os metais, empregados sob a forma de sais, eram mantidos em solução estéril, sendo adicionados proporcionalmente, quando necessário, aos meios de experiência. Foram usados $Zn SO_4 \cdot 7 H_2 O$; $Mg SO_4 \cdot 7 H_2 O$ e $Fe (NH_4)_2 (SO_4)_2 \cdot 6 H_2 O$, com teores de manganês inferiores a 0,0005%.

Como agente quelante foi utilizado o ácido etilenodiaminotetracético, sob a forma de sal dissódico ($EDTA Na_2 \cdot 2H_2O$) o qual era conservado em solução, a baixa temperatura.

Prova da termorresistência — Cerca de 0,1 ml do material de cada frasco de experiência era transferido para 5 ml de caldo nutritivo, quando então se submetia a 85°C durante 20 minutos. Seguia-se a incubação a 37°C.

Outros detalhes sobre métodos estão explicados em conjunto com a tabela I.

RESULTADOS

Em trabalho anterior (Rabinovitch),⁽³⁾ a formação de esporos endotróficos no *B. licheniformis*-2390 pôde ser demonstrada, quando as células desta bactéria eram submetidas a meios isotônicos e hipotônicos não nutritivos. Foi aventado, então, que os íons Mn^{2+} e Mg^{2+} deveriam encon-

trar-se previamente incorporados às células, a fim de que a esporogênese ocorresse. Na presente pesquisa, reproduziu-se a esporogênese no meio líquido MS 66-A, carente de fonte de carbono. No entanto, quando neste mesmo meio era feita a adição de EDTA numa concentração suficiente, 4 mg%, a evolução das células para esporos resultava integralmente bloqueada. Os dados numéricos constantes da Tabela I ilustram amplamente tal fato. Por outro lado, quando as células bacterianas eram saturadas previamente com excesso de Mn^{2+} , um tratamento posterior com EDTA não

impedia a esporogênese. Resultado semelhante se obteve, quando se substituiu o íon Mn^{2+} por uma mistura de outros metais divalentes como o Zn^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} . Todos os meios da experiência foram ensaiados quanto à termorresistência das formas esporuladas, ocasionando resultados positivos, exceto naqueles em que a esporogênese foi totalmente bloqueada pela ação quelante do EDTA. As figuras existentes na Estampa I revelam nitidamente a presença e a ausência da formação de esporos nas diferentes condições a que foram submetidas as células do *B. licheniformis*-2390.

TABELA I

Células esporuladas $\times 10^5$ /ml do *B. licheniformis*-2390, contadas no meio MS 66-A sem glicose, adicionado ou não de metais e do quelante.

	Sem adição (*)	EDTA (**)	Mn^{2+} ; EDTA (***)	Zn^{2+} ; Mg^{2+} ; Fe $^{2+}$; EDTA (****)
a	7,91	0	1,67	3,68
b	7,13	0	1,02	5,21
c	8,43	0	1,90	4,73
Média	7,82	0	1,53	4,54

a, b e c = Resultados de duas experiências, sendo a e b uma mesma experiência realizada em duplicata, para as quais adicionou-se, em cada meio, 2,0 ml de uma suspensão de formas vegetativas.

(*) — As células foram depositadas no meio sintético e agitadas a 150 r.p.m., durante 1,5 hora a 37°C, após o que, continuou-se a agitação com 100 r.p.m. por 40 horas a 37°C.

(**) — As células foram agitadas a 150 r.p.m., durante 1,5 hora a 37°C. Em seguida, adicionou-se EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ — 4,0 mg% e a agitação prosseguiu com 100 r.p.m. por 40 horas a 37°C.

(***) — As células foram agitadas no meio contendo Mn^{2+} — 2,0 mg% a 150 r.p.m., durante 1,5 hora a 37°C. Adicionou-se, a seguir, EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ — 4,0 mg%, continuando a agitação com 100 r.p.m. por 40 horas a 37°C.

(****) — As células foram agitadas no meio contendo Zn^{2+} , Mg^{2+} e Fe^{2+} — 1,0 mg% de cada metal, com 150 r.p.m., durante 1,5 hora a 37°C. A seguir, juntou-se EDTA $Na_2 \cdot 2H_2O$ — 4,0 mg%, continuando a agitação com 100 r.p.m., durante 40 horas a 37°C.

DISCUSSÃO

Embora vários autores já houvessem observado que células de bacilos aeróbios eram capazes de esporular em água destilada (**Buchner**, 1870; **Schreiber**, 1896; **Knaysi**, 1945, 1951) citados por **Foster**, ⁽⁶⁾ somente mais tarde é que **Perry & Foster** ⁽¹⁾ propuseram o termo “esporulação endotrófica” para designar os esporos produzidos na ausência de nutrição exógena. **Foster** ⁽⁶⁾ sugeriu, ainda, que durante o processo da esporulação ocorreria a síntese “de novo” de proteínas e ácidos nucleicos. Entretanto, **Weinberg**, ⁽⁷⁾ trabalhando com *B. megaterium*, foi incapaz de conseguir esporos endotróficos por intermédio da substituição do meio de cultura empregado, por uma solução tampão de fosfatos contendo manganês, pois, segundo o autor, o microrganismo não sobrevivia neste meio.

Os resultados conseguidos na presente investigação são evidentes quanto à participação do íon Mn^{2+} na esporulação endotrófica. Possivelmente, em algum sistema reacional desencadeante da síntese de esporos. Como se observa na Tabela I, quando as formas vegetativas do *B. licheniformis*-2390 eram tratadas previamente com uma concentração suplementar de Mn^{2+} , o bloqueio da esporogênese era parcialmente evitado. Isto deveu-se provavelmente, ao consumo do EDTA adicionado exogenamente, enquanto que a parte do metal integrante das células não era quelada. Por outro lado, quando exogenamente eram forneci-

dos outros metais divalentes queláveis pelo EDTA, idêntico efeito era obtido, embora o rendimento numérico das formas esporuladas fosse mais amplo, provavelmente em virtude de um consumo maior de EDTA para a formação de quelato, evitando, assim, a inativação do Mn^{2+} intracelular.

Quanto à possibilidade do Zn^{2+} , Fe^{2+} e Mg^{2+} de haverem ativado a esporogênese do *B. licheniformis*-2390, parece não proceder, se forem levadas em consideração as observações anteriores, ⁽³⁾ segundo as quais, a adição exógena de certos metais às células pré-formadas não favorece a esporogênese.

SUMMARY

Studies on the sporulation of a Bacillus strain.

IV — Further evidences of the Mn^{2+} ion activity in the endotrophic sporulation.

In the present paper the authors bring out more evidences concerning the influence of Mn^{2+} ion on the endotrophic sporulation of *Bacillus licheniformis*-2390. Vegetative cells of this bacteria could not sporulate if they were submitted to a sufficient concentration of EDTA. Otherwise, this sporulation occurred when the vegetative forms were first protected by an excess of exogenous Mn^{2+} or Zn^{2+} , Fe^{2+} and Mg^{2+} . Those spores obtained shown thermoresistence to 85°C during 20 minutes.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — FOSTER, J. W., 1956 — Morphogenesis in bacteria: Some aspects of spore formation. *Quart. Rev. Biol.*, 31 (2): 102-118.
- 2 — PERRY, J. J. & FOSTER, J. W., 1954. Non-involvement of lysis during sporulation of *Bacillus mycoides* in distilled water. *Jour. Gen. Physiol.*, 37: 401-409.
- 3 — PORTELLADA, P. C. L., 1959b — Estudos sobre esporogênese III — Formação de esporos endotróficos. *An. Microbiol.*, 7: 71-76.
- 4 — RABINOVITCH, L. 1970. — Nota sobre o efeito indutor do Mn^{2+} na esporulação do *Bacillus*. *Rev. Bras. Farm.*, 51 (4):205-208.
- 5 — RABINOVITCH, L. 1972 — Influência dos íons Mn^{2+} e Mg^{2+} na esporulação endotrófica do *Bacillus licheniformis*-2390. *Rev. Microbiol.*, 3 (1):47-50.
- 6 — RABINOVITCH, L. & DA SILVA, S. M. — Estudos sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus*. III — Influência da concentração da glicose sobre o início da esporogênese. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 71(1/2): 115-121.
- 7 — WEINBERG, E. D., 1964 — Manganese requirement for sporulation and other secondary biosynthetic processes of *Bacillus*. *App. Microbiol.*, 12 (5): 436-441.

ESTAMPA I

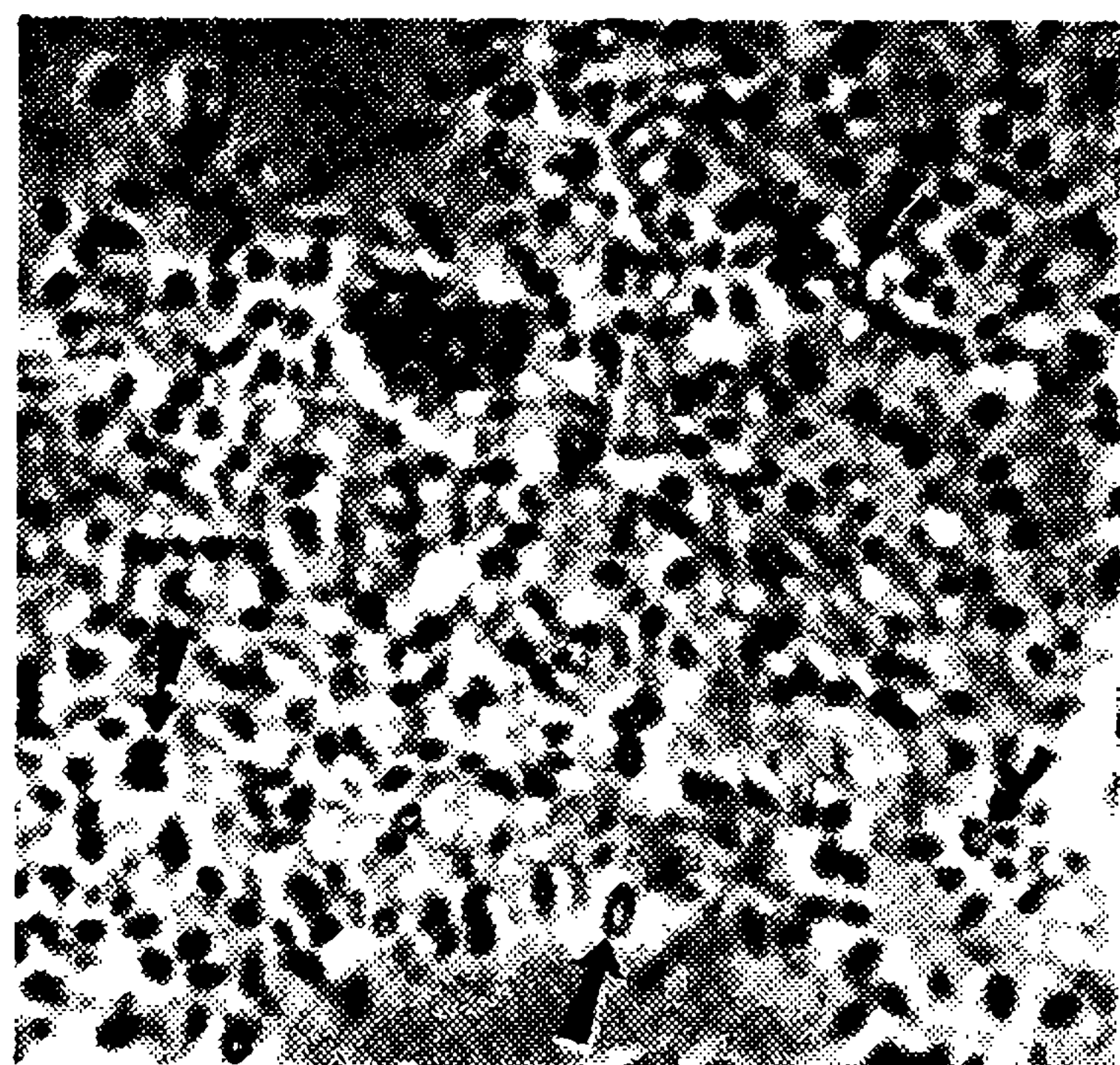
Figs. 1 e 2 — Massas de esporos de *B. licheniformis*-2390 no meio MS-66-A sem glicose; as setas indicam esporos livres refringentes.

Figs. 3 e 4 — Bloqueio da esporulação do *B. licheniformis* 2390 no meio MS 66-A sem glicose pela ação seqüestrante do EDTA. Assinalam-se algumas células globosas, observando-se, ainda, várias formas vegetativas com granulações.

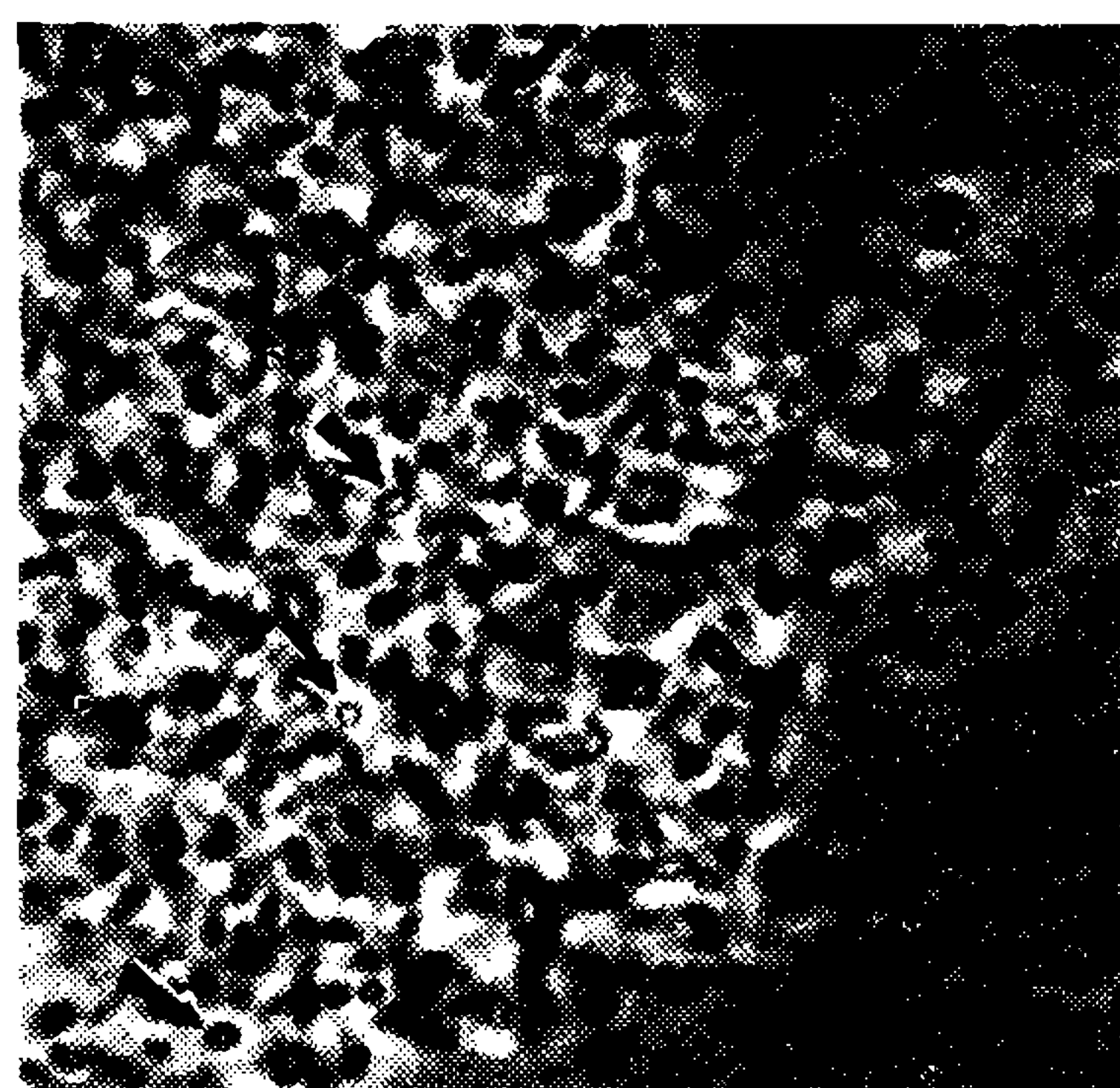
Figs. 5 e 6 — Esporos do *B. licheniformis*-2390, obtidos após saturação prévia das formas vegetativas com excesso de Mn^{2+} , e posterior tratamento com EDTA.

Figs. 7 e 8 — Idem, após saturação prévia com Fe^{2+} , Zn^{2+} e Mg^{2+} .

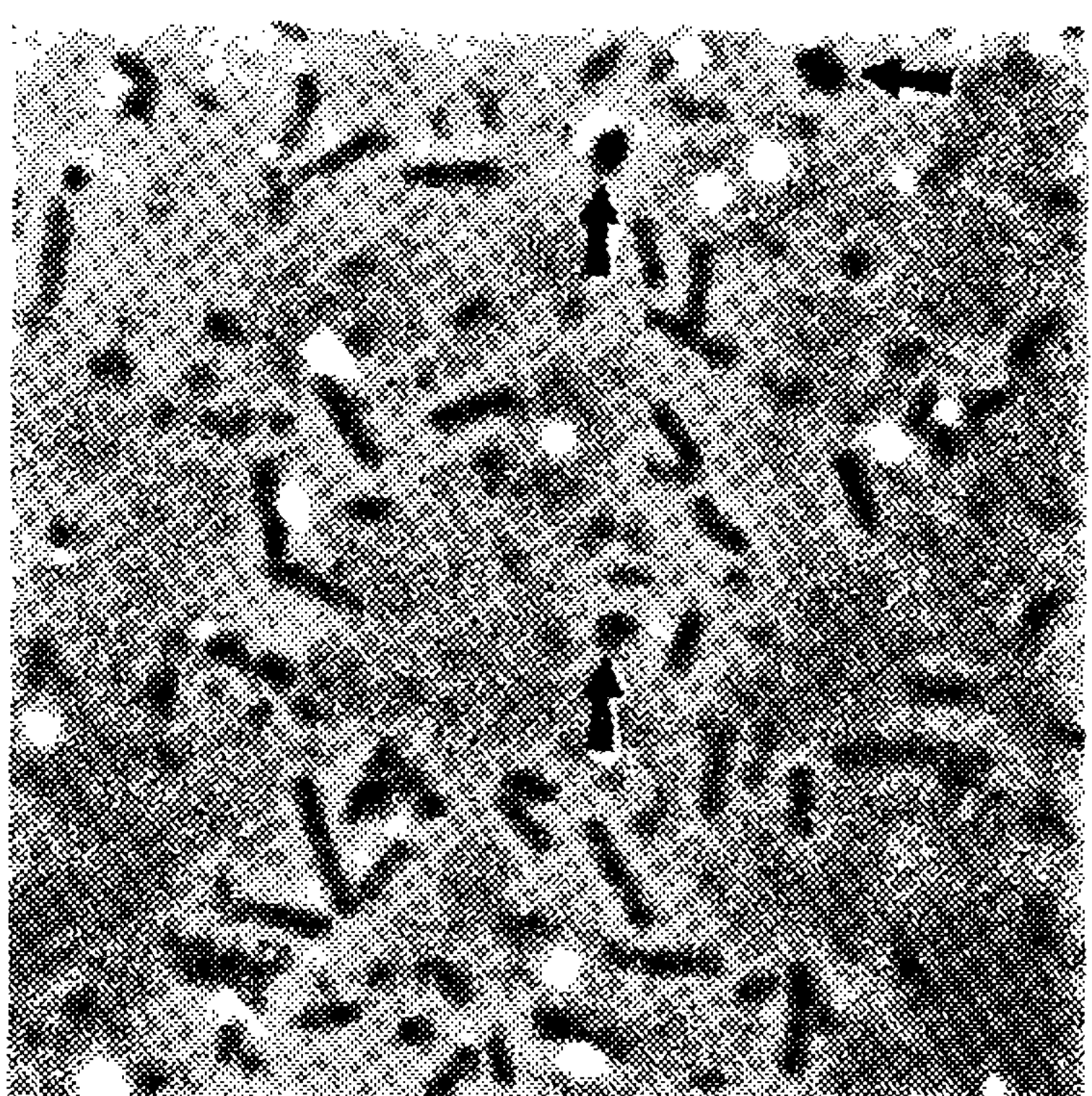
Aumento de 300 x em microscopia de contraste de fase.



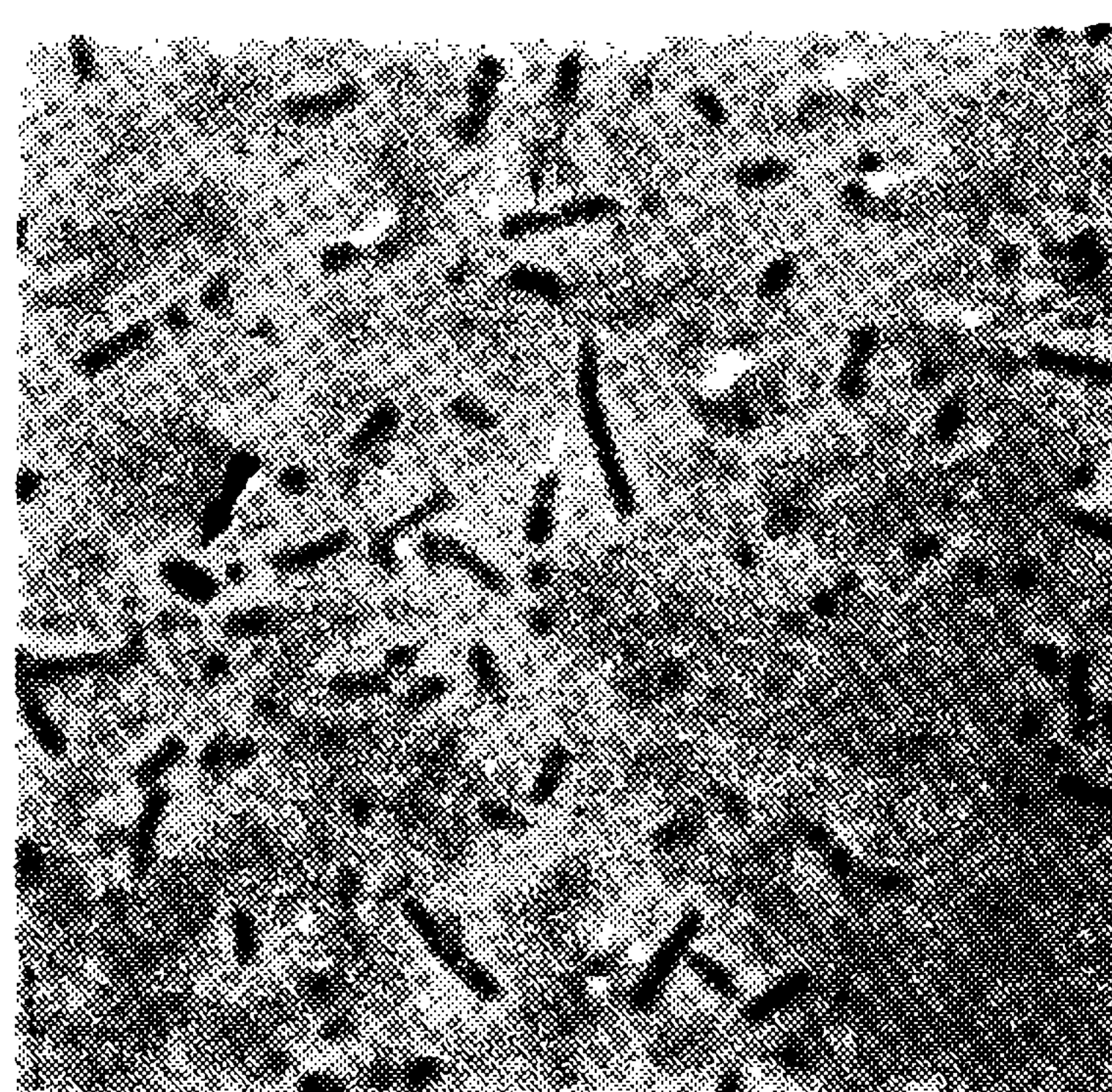
1



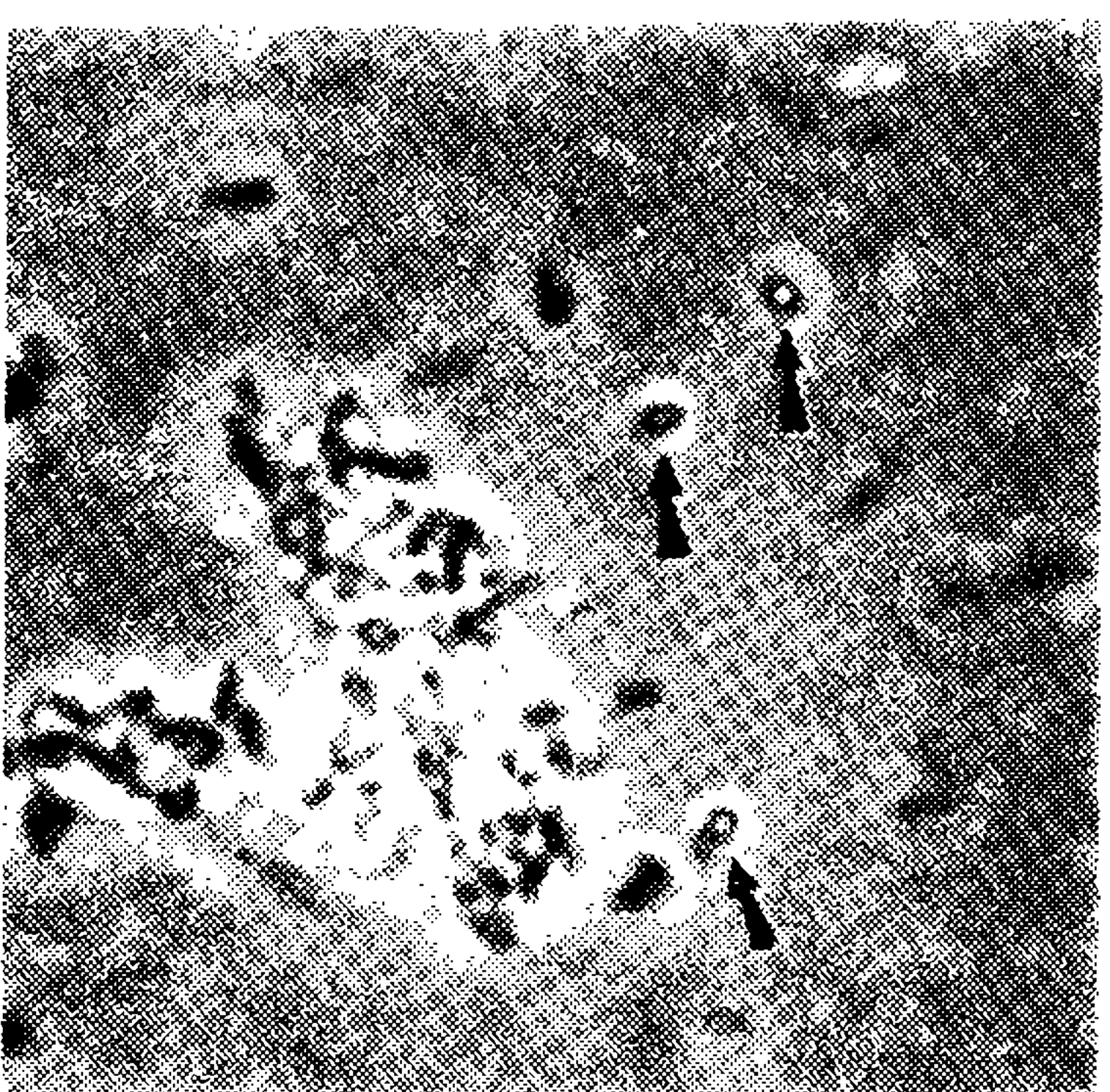
2



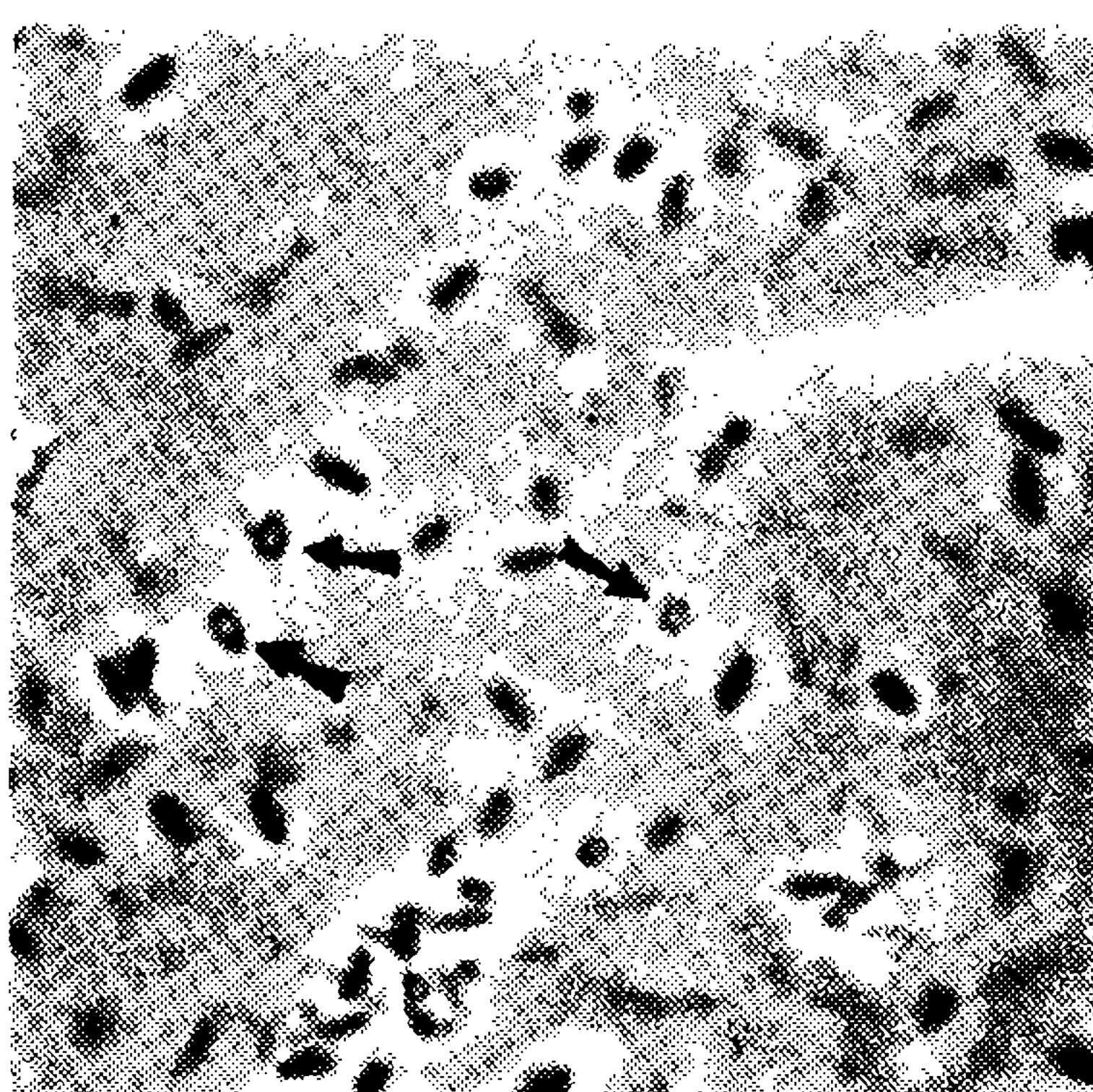
3



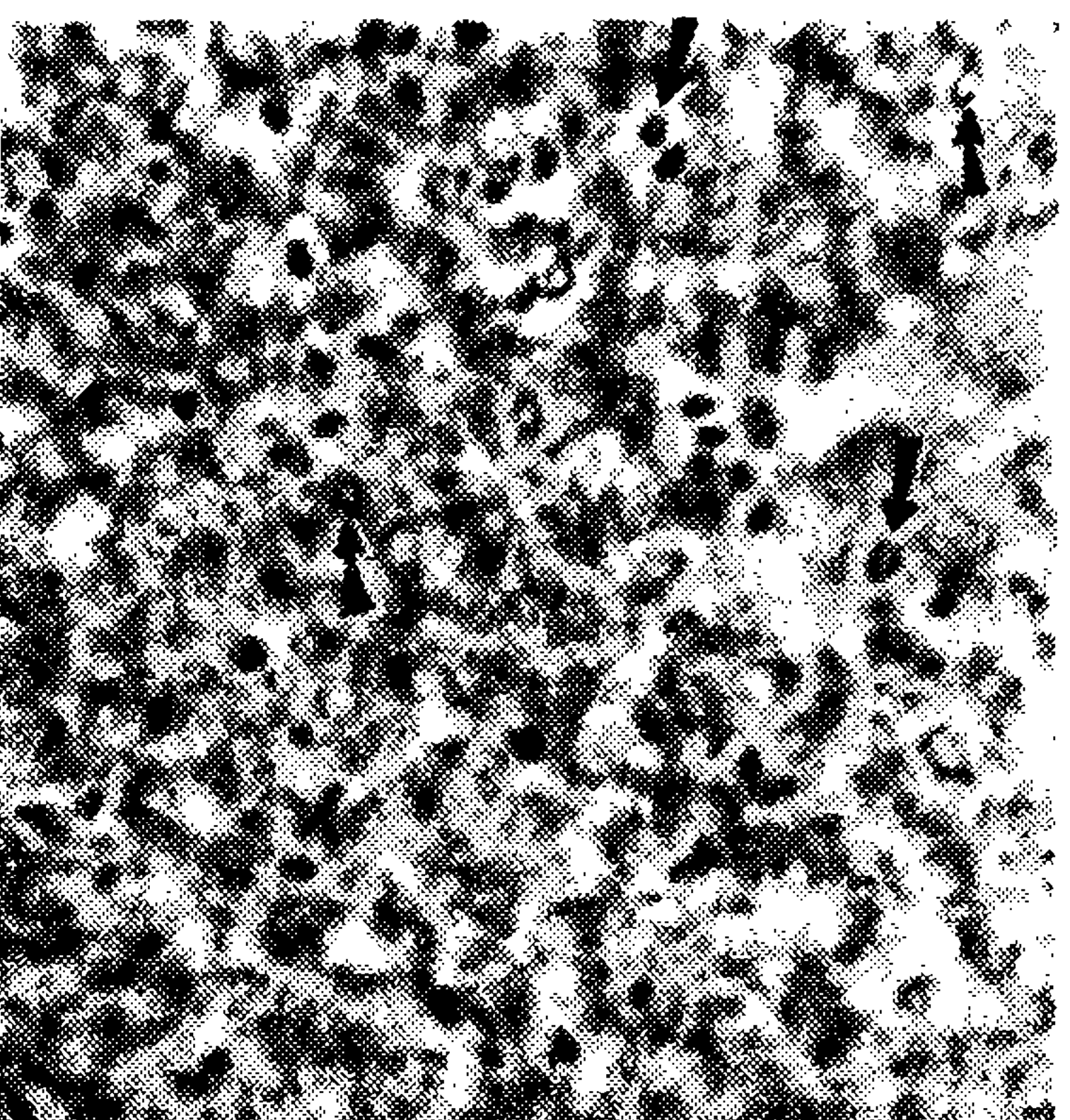
4



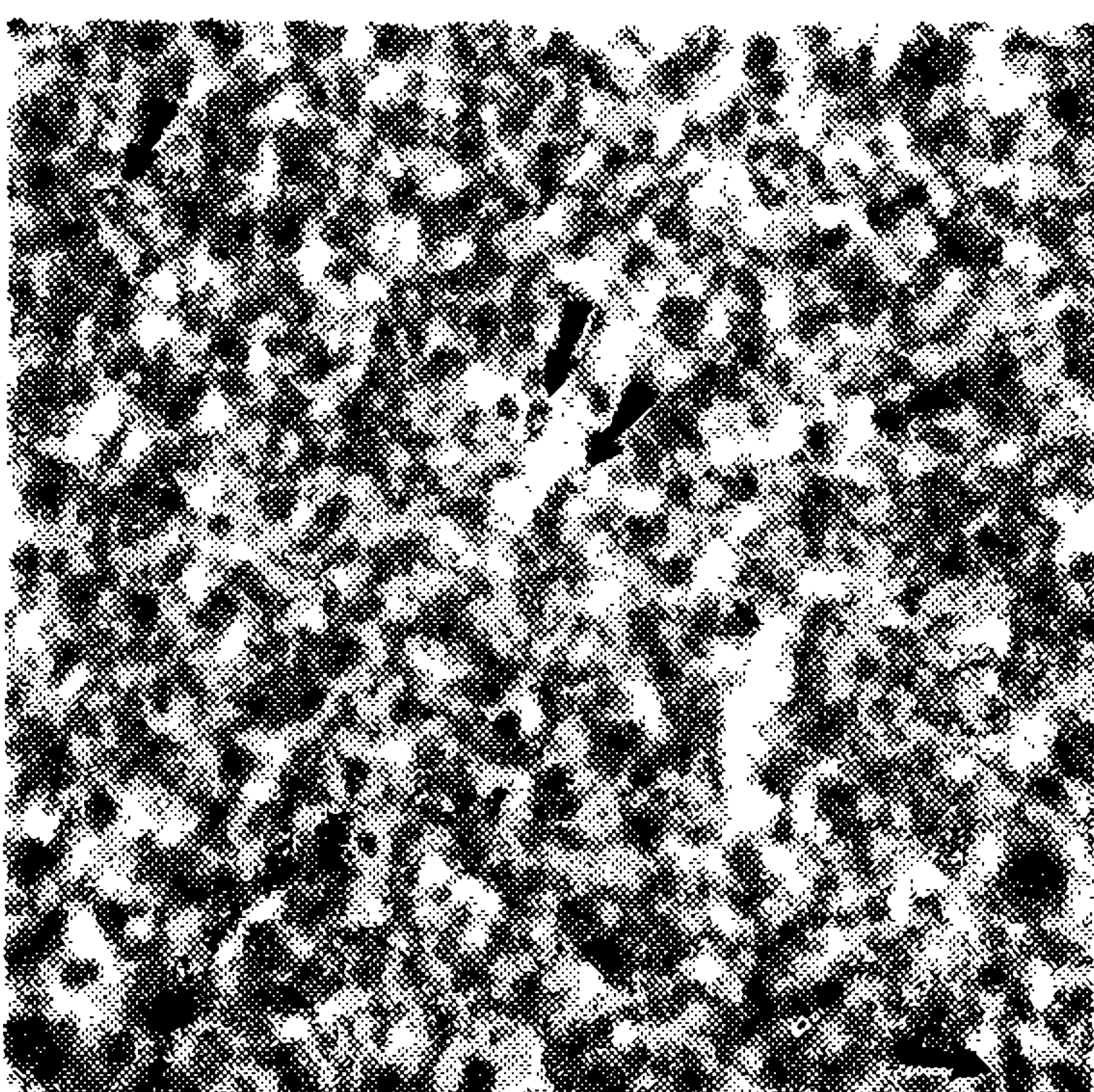
5



6



7



8