

**MUTANTE ESPONTÂNEO DE *BACILLUS LICHENIFORMIS*
BLOQUEADO NO ESTÁGIO I DA ESPOROGÊNESE,
POSSUIDOR DE METABOLISMO RESPIRATÓRIO AUMENTADO**

**LEON RABINOVITCH¹, MARIA LUIZA PALMEIRA¹, RAUL
DODSWORTH MACHADO² & WANDERLEY DE SOUZA²**

¹Instituto Oswaldo Cruz, C. P. 926, 20000 Rio de Janeiro, Brasil

²Instituto de Biofísica, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 20000 Rio de Janeiro, Brasil

SINOPSE. Um mutante espontâneo de *Bacillus licheniformis*, derivado da amostra esporogênica 2390, foi estudado com vistas ao reconhecimento do estágio da evolução para esporo em que o mesmo se encontrava bloqueado. Eletronmicrografias sugeriram que as células desse mutante, colhidas durante a fase estacionária da curva de crescimento, não ultrapassaram o estágio I da esporogênese (i.e., permaneceram com o nucleóide disposto como filamento axial), enquanto a produção de antibiótico (bacitracina) e a atividade proteolítica foram francamente detectadas. A linhagem mutante, designada SpoIp-72, nas condições experimentais empregadas não biossintetizou esporos por estarvação em solução de sais inorgânicos, mas evidenciou uma frequência de esporulação menor que 10^{-7} , após crescimento vegetativo em meio de cultura favorável à esporogênese. A amostra SpoIp-72 externa um crescimento vegetativo inicial restringido, quando comparada com a amostra 2390, enquanto que, inversamente, sua atividade respiratória é significativamente mais elevada. Este último comportamento foi confirmado no presente trabalho, contrastando, nesse particular, com outros tipos de mutantes de esporulação já descritos, os quais se encontram bloqueados nos primeiros estágios da via esporogênica.

O mecanismo da esporogênese bacteriana tem sido exaustivamente pesquisado, particularmente em *Bacillus* e *Clostridium*, orientando os autores destes estudos suas atenções para os diferentes aspectos, quer citomorfológicos e fisiológicos, quer bioquímicos e genéticos da célula.

Somente após a constatação da ocorrência de mutantes asporogênicos em *Bacillus anthracis* por Roux (1890), foi que Spizizen (1958) demonstrou a possibilidade da transformação genética em *B. subtilis*. A partir de então, estudos sobre o desenvolvimento e diferenciação celulares puderam ser conduzidos em condições fisiologicamente definidas. Posteriormente, vários trabalhos se originaram em busca da caracterização fenotípica das etapas da evolução da célula vegetativa bacteriana para o esporo (Young & Fitz-James, 1959; Ellar & Lundgren, 1966; Holt, Gauthier & Tipper, 1975) e vice-versa (Handley & Knight, 1975), tendo os mutantes deficientes, quanto à capacidade de esporular, contribuído amplamente para o conhecimento de certas particularidades da esporogênese (Beskid & Lundgren, 1961; Ryter, 1965; Ryter et al., 1966; Balassa, 1966; Ito & Spizizen, 1972; Young, 1975).

Nos últimos anos alguns importantes trabalhos de revisão (Schaeffer, 1969; Young & Wilson, 1972; Hanson et al., 1970) relatam os resultados encontrados a respeito das alterações sofridas pela célula durante a esporogênese. Várias destas alterações permitiram que se classificassem os mutantes de esporulação sob os pontos de vista citológico,

Trabalho subvencionado pelo Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) através de auxílio a um dos Autores (R. D. M.).

Recebido em 29 de outubro de 1975.

bioquímico e genético (Schaeffer, 1969), havendo, posteriormente, Young & Wilson (1972) sugerido recomendações destinadas a caracterizar mutantes de esporulação com base em designações que refletissem o fenótipo, mas não o genótipo da célula em estudo. Assim, pelo critério desses últimos autores, uma célula apresenta bloqueio na esporulação se o organismo atingir qualquer um dos estágios morfogênicos, traduzidos pela expressão atual da ultra-estrutura celular, de um conjunto de sete estágios, dos quais o último corresponde à liberação do esporo maduro.

Baseados nestas recomendações, os autores do presente trabalho descrevem, identificam e caracterizam fenotipicamente um mutante espontâneo de *Bacillus licheniformis*, obtido neste laboratório, possuidor de baixa frequência de esporulação. Em comunicação anterior (Rabinovitch et al., 1975) foi este mutante, derivado da amostra 2390, considerado como possuindo o fenótipo Spo, isto é, capacidade de esporular alterada, e, em vista disso, designado Spop-72. Finalmente, seu fenótipo foi aqui determinado como sendo SpoI (SpoIp-72), traduzindo a capacidade de esporular alterada e bloqueio no estágio I da esporogênese.

MATERIAL E MÉTODOS

Culturas bacterianas. A amostra de *B. licheniformis* 2390 foi mantida sob a forma de esporos, tendo sido suas formas vegetativas cultivadas em ANM sólido (veja meios de cultura) até esporulação maciça e obtenção de esporos livres (7 dias), o que foi controlado por microscopia de contraste de fase. Após essas operações, o induto foi colhido em água destilada estéril e centrifugado a 3300x g a 10°C, seguindo-se mais três lavagens no mesmo veículo. O resíduo, praticamente isento de restos sólidos de formas vegetativas lisadas, foi ressuspenso, uniformemente, em água destilada estéril e distribuído em tubos estéreis (18x150mm) com tampas de atarraxar. Estes tubos, encerrando cada um 5 ml da suspensão, foram mergulhados em água e aquecidos a 85°C durante 20 minutos, e por fim armazenados à temperatura de 4°C, em refrigerador. Nestas condições, os esporos permanecem viáveis por dois anos, pelo menos.

A amostra mutante SpoIp-72 foi mantida em tubos (10x75mm) contendo meio de Lignières (Bier, 1975) recoberto com óleo mineral estéril. Esta amostra, encontrada ao acaso, foi isolada quando plaqueou-se a linhagem parental, por ocasião da feitura de experimentos relacionados com esporulação.

A condição de mutante e sua identidade, em confronto com a amostra parental, foram determinadas com base na comprovação das características bioquímicas da espécie (Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 1957; Lemille et al., 1969), bem assim em algumas características já descritas anteriormente (Rabinovitch et al., 1975). Para o ensaio da produção de antibiótico foram usadas as seguintes culturas: *Staphylococcus aureus* FDA 6538, *S. aureus* coagulase e manitol positivos e *Escherichia coli*.

Meios de cultura. Com relação às experiências de crescimento, as amostras estudadas foram cultivadas nos meios ANM líquido e MS66-C (Rabinovitch et al., 1975), e em ANM solidificado com ágar (Difco) a 2%, como indicado no texto.

Para o inóculo dos esporos da amostra 2390, bem como para as formas vegetativas da SpoIp-72, empregaram-se tubos contendo 2 ml de ANM líquido ou caldo nutriente (CN), os quais foram incubados por 24h. Os microrganismos usados para demonstrar a produção de antibiótico foram crescidos em meio CN. Em todas as experiências a temperatura de incubação foi de 37°C.

Ensaio da termorresistência (TR). Este ensaio foi empregado para se detectar a biossíntese de esporo ou endósporo, dado que no estágio VI da morfogênese celular a resistência ao calor torna-se evidenciada (Young & Wilson, 1972). Neste caso, 1 ml das culturas a serem ensaiadas foi transferido, cuidadosamente, para o fundo de tubos (18x150mm) estéreis e, em seguida, mergulhados em água e aquecidos a 85°C durante 20 minutos. Após o aquecimento, 2 ml de ANM líquido eram adicionados a cada cultura, as quais eram incubadas por um dia. O ensaio era considerado positivo quando ocorria crescimento, normalmente externado pela formação de uma película na superfície do meio. Em caso de dúvida sobre esse crescimento um novo repique era feito com agulha para 2 ml de ANM líquido, tornando-se a incubar por mais um dia. A formação de esporo e endósporo também foi pesquisada por microscopia de contraste de fase, preparando-se suspensões das culturas entre lâmina e lamínula. Este último procedimento permitiu surpreender células a partir do estágio morfogênico IV quando o córtex do esporo se apresenta formado, tornando-o refringente.

Frequência de esporulação. Culturas crescidas em 1 ml de ANM líquido foram transferidas para Erlenmeyer de 125 ml contendo 20 ml do mesmo meio e incubadas por 5 dias. De modo ocasional, a cada dia, procedia-se a agitação manual dos frascos. Volumes de 1 ml de cada cultura eram então transferidos para 9 ml de salina estéril (NaCl 0,85), procedendo-se assim a diluições seriadas, das quais alíquotas foram semeadas por espalhamento em placas de Petri (4 placas por diluição) contendo ANM sólido. Paralelamente, 2 ml de cada cultura, após aquecimento a 85°C por 20 minutos, eram diluídos em salina e plaqueados em CN para contagem de células viáveis. Em ambos os casos, antes de proceder-se às diluições, foram as culturas vigorosamente homogeneizadas durante 10 minutos, num agitador "Lab-Line Super-Mixer" e, ainda, com auxílio de uma pipeta estéril. Areia lavada estéril também foi usada em algumas determinações, a fim de desfazer as longas cadeias de células.

A frequência de esporulação foi calculada como a relação entre o número médio de colônias originárias de partículas termorresistentes e o número médio de células totais existentes, antes do aquecimento.

Esporulação endotrófica. As culturas crescidas em 5ml de ANM líquido, com 24h, foram centrifugadas e os sobrenadantes substituídos por 5 ml de solução salina estéril. Com tempos de incubação de 24 h, pesquisava-se a presença de esporos e endósporos refringentes com microscopia de contraste de fase. Paralelamente, um outro procedimento de estarvação era efetuado, substituindo-se o meio de cultura pela solução de sais do meio sintético MS66-A (Rabinovitch, 1972), procedendo-se a exames como anteriormente.

Produção de antibiótico. As amostras 2390 e SpoIp-72 foram semeadas em estrias em ANM sólido, contido em placas de Petri e incubadas por 2 dias. Após o crescimento, foram semeadas nas mesmas placas, e em estrias perpendiculares, as culturas de *S. aureus* e *E. coli*, tornando-se a incubar por mais um dia. A inibição do crescimento dos microrganismos sensíveis pode ser observada na Fig. 1.

Atividade amilolítica. Os sobrenadantes das culturas, livres de células, das amostras em estudo, crescidas durante 3 a 4 dias no meio CN, foram ensaiadas de acordo com Bernlohr & Novelli (1963).

Produção de protease. A verificação da produção de exoprotease foi feita em placas de Petri encerrando o meio ANM sólido, contendo 0,2% de caseína seg. Hammarsten. Um halo nítido de hidrólise da caseína foi observado ao redor das colônias crescidas com 24h de incubação.

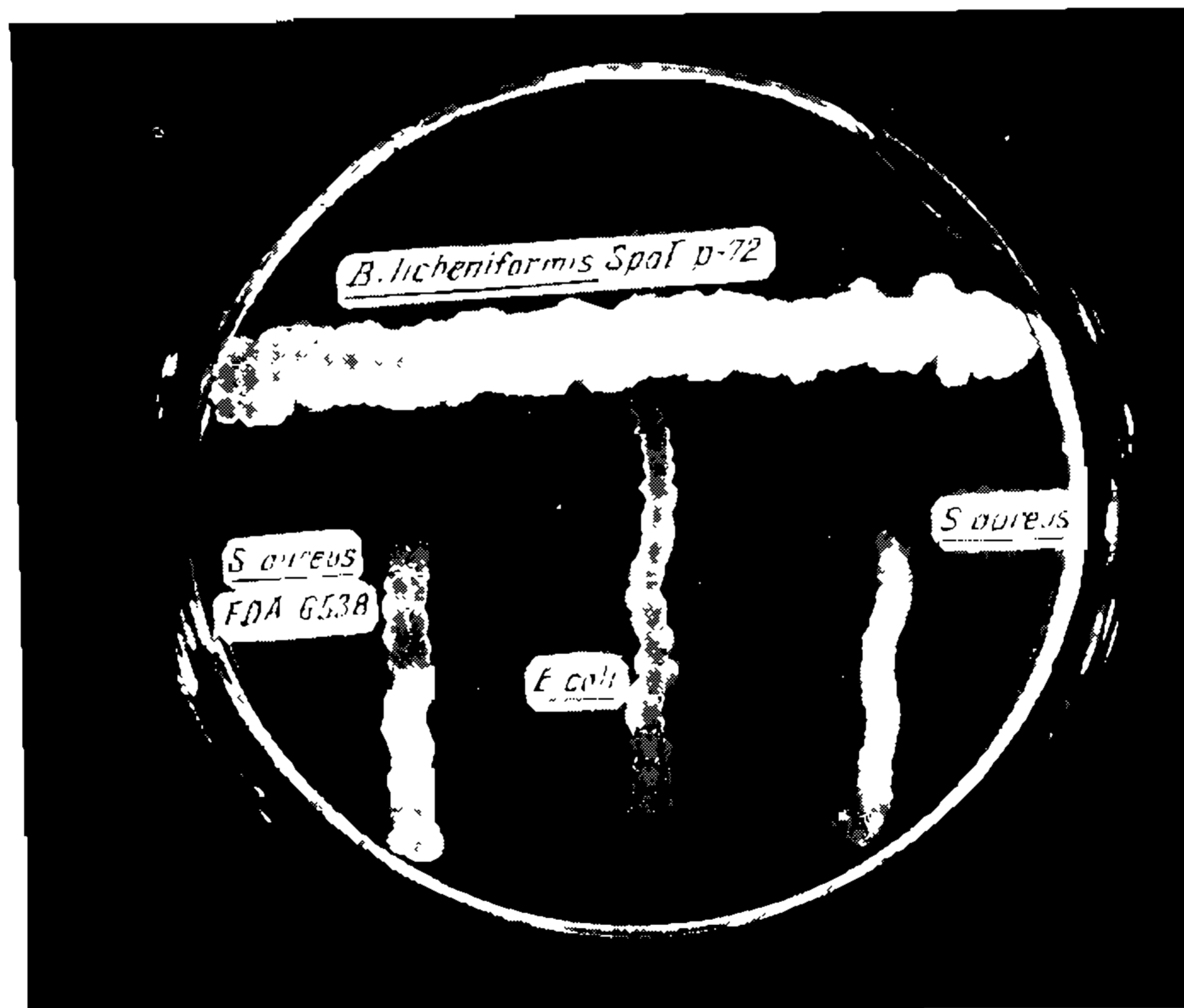
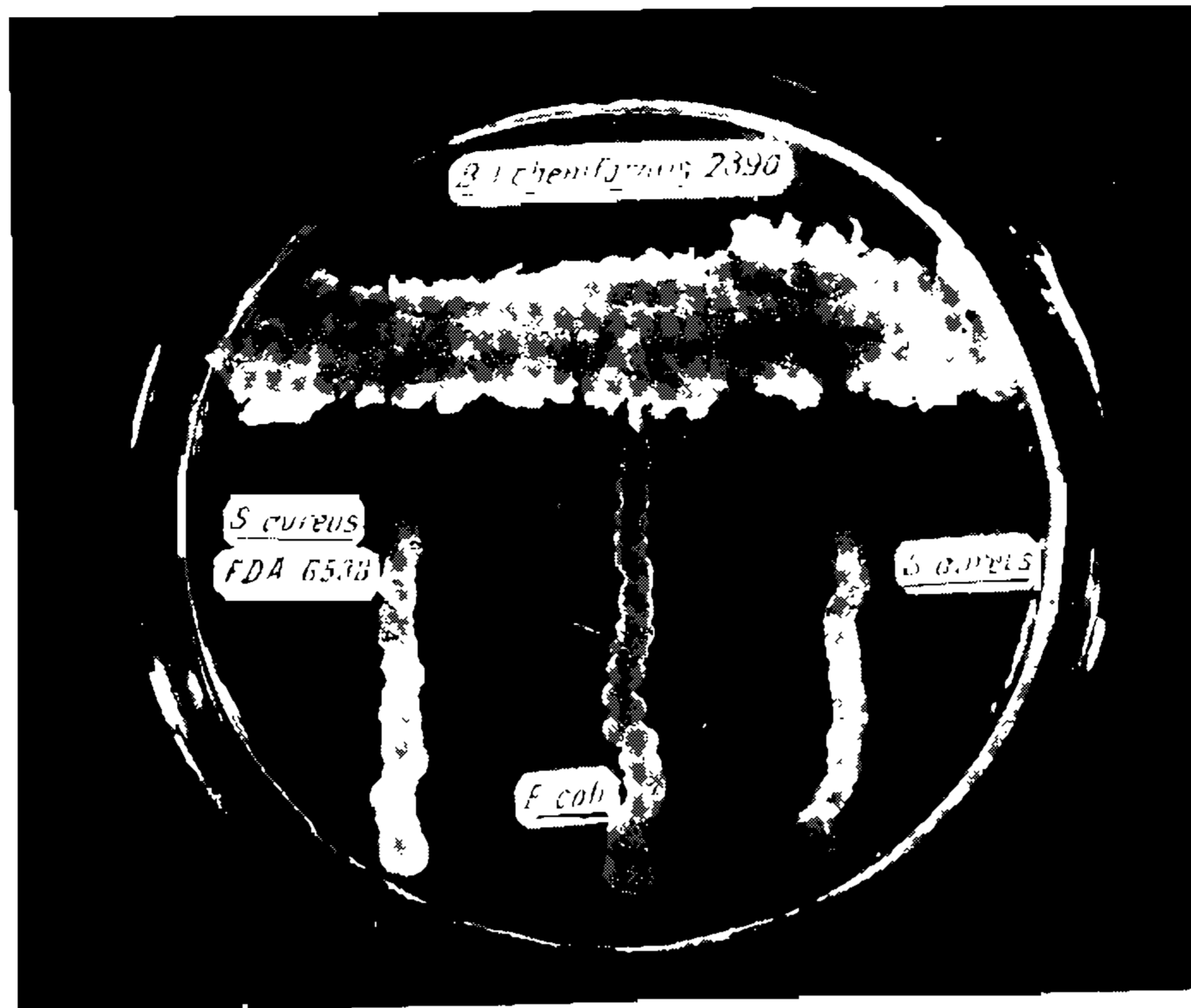


Fig. 1. Inibição de *S. aureus* por bacitracina excretada pelas amostras 2390 (parental) e Spolp-72 (mutante) de *B. licheniformis*. Uma amostra Gram negativa (*E. coli*) foi empregada como testemunha.

Manometria. As medidas manométricas do metabolismo respiratório das amostras parental e mutante foram realizadas em respirômetro (B. Braun Apparatebau Mel-sungen, modelo V 166), empregando-se o "método direto" de Warburg Umbreit et al., (1949) para determinação do O₂ e CO₂, tendo-se glicose $5,5 \times 10^{-2}$ M como substrato. O preparo das células e os procedimentos foram os mesmos descritos anteriormente (Rabinovitch et al., 1975).

Microscopia eletrônica. Eletronmicrografias foram obtidas com as amostras 2390 e SpoI-72 crescidas no meio ANM líquido. Para dois Erlenmeyer de 125 ml, contendo cada um 20 ml deste meio, transferiu-se 0,3 ml da amostra 2390 e 0,6 ml da linhagem mutante, em inóculo pré-adaptado. Os frascos foram submetidos a 400 oscilações por minuto em agitador. Após a decorrência de tempo determinado, e conhecidas as características das curvas de crescimento de ambas as amostras, obtidas em trabalho anterior (Rabinovitch et al., 1975), foram as células centrifugadas a $3300 \times g$ a 20°C. A seguir, foram as mesmas tratadas com solução tampão de veronal-acetato pH 6,1, contendo 1% de ácido ósmico, segundo o procedimento de Kellenberger et al. (1958), tendo-se introduzido, ainda, algumas recomendações recentes sobre a metodologia desta técnica (Dunley et al., 1973). Os cortes corados foram examinados ao microscópio eletrônico AEI, modelo EM 6 B.

Identificação da bacitracina. Sendo um dos antibióticos produzidos por *B. licheniformis* (Sadoff, 1972; Bernlohr & Novelli, 1963), a bacitracina foi identificada nas culturas das amostras estudadas, segundo descrição a seguir. Com a finalidade de se observar a biossíntese do antibiótico, em meio de composição semidefinida, as amostras foram crescidas com agitação (400 oscilações por minuto) durante 36h no meio MS 66-C. Duas alíquotas de 30 ml dos meios foram centrifugadas e dializadas, em sacos de papel celofane, contra 400 ml de água destilada a 4°C. Esta água foi permutada 4 vezes, durante 3 dias, seguindo-se uma concentração a 48-50°C, até cerca de 3 ml. Os líquidos, assim obtidos, foram depositados em cromatofolhas previamente ativadas a 60°C (DC – Alufolien Kieselgel 60F 254, E. Merck). Como padrão, foi empregada uma bacitracina contendo 50 U/mg (Nutritional Biochemicals Corp.) da qual 40 µl de uma solução aquosa, encerrando cerca de 0,02U, foi depositada em cada um de 3 pontos de origem. De cada material concentrado depositaram-se, em 3 pontos, aproximadamente 40 µl. No desenvolvimento que perdurou 3h se empregou a mistura solvente: n-butanol-ácido acético-água (4:1:2). A revelação, feita com lâmpada ultravioleta (Mineralight U. V. S-54, short wave), evidenciou duas manchas que absorviam igualmente ao padrão de bacitracina, cujos Rfs variaram de 0,57-0,58 e 0,35. Posterior revelação com ninhidrina (0,15% em água destilada, saturada com n-butanol), confirmou os resultados obtidos anteriormente.

Extratos metanólicos do meio ANM sólido em placas, contendo crescimento de 48h das duas amostras, também foram cromatografados. Próximo aos crescimentos em estrias cortou-se o meio de cultura até a distância de 3 cm, transferindo-se pequenos cubos para beaker de 100ml. A bacitracina foi extraída com 50ml de metanol, deixando-se os extratos e fragmentos do meio a 4°C por um dia, após o qual foram filtrados em algodão hidrófilo, previamente lavados com metanol. Os extratos foram concentrados até 5 ml a 40°C e, depois, cromatografados como descrito. Igualmente, foram encontradas duas manchas que absorveram o ultravioleta como o padrão, cujos Rfs variaram de 0,42-0,43 e 0,35, confirmando-se em seguida com ninhidrina.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Aspecto colonial e testes bioquímicos. Como está mostrado na Fig. 2, o mutante SpoI-72 apresenta uma morfologia colonial atípica em relação à da amostra parental, sendo esta a primeira característica observada por ocasião do seu plaqueamento, em que

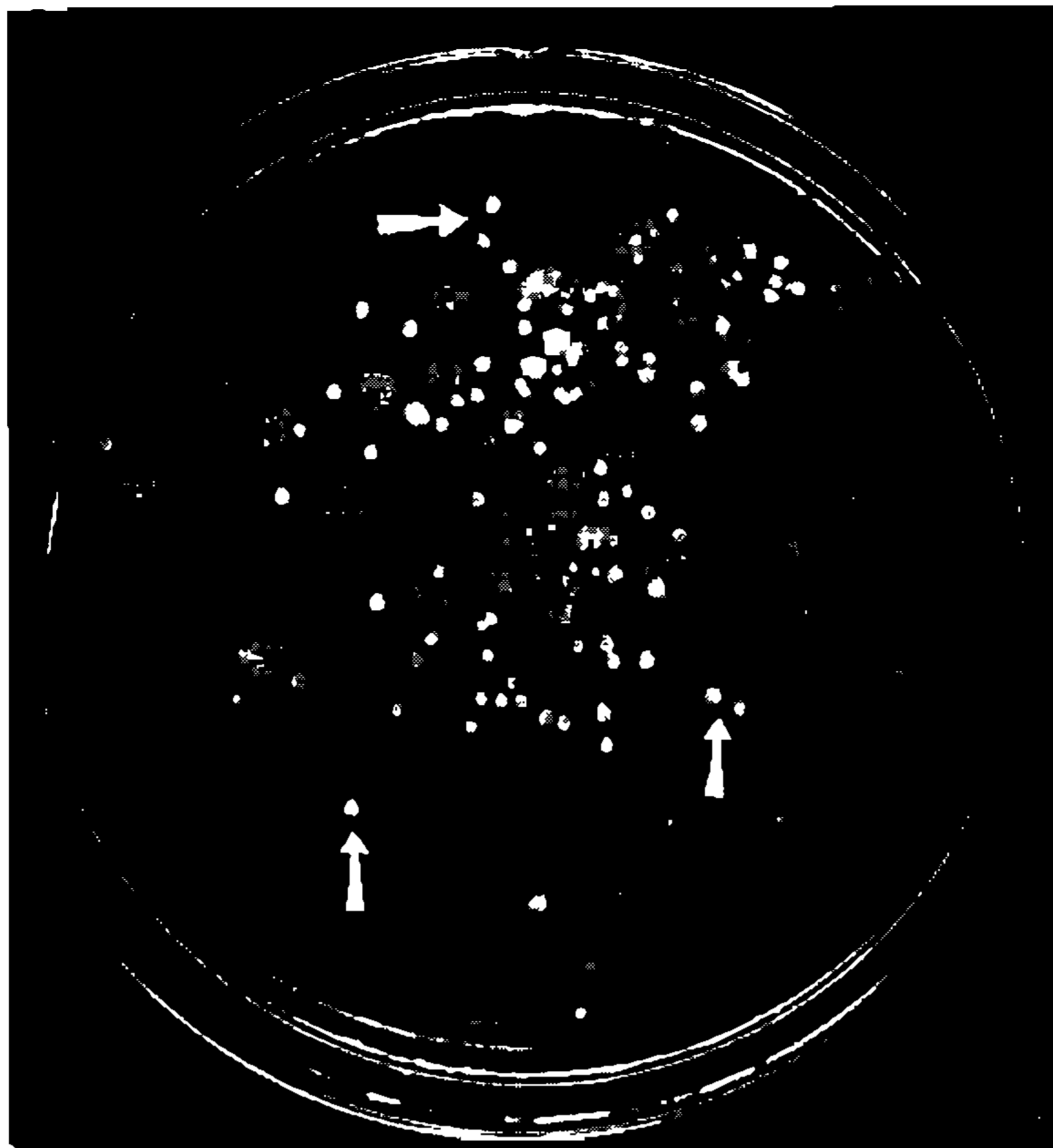


Fig. 2. *B. licheniformis*, mutante e original, crescidos no meio ANM sólido, durante 20h. As setas indicam colônias do mutante.

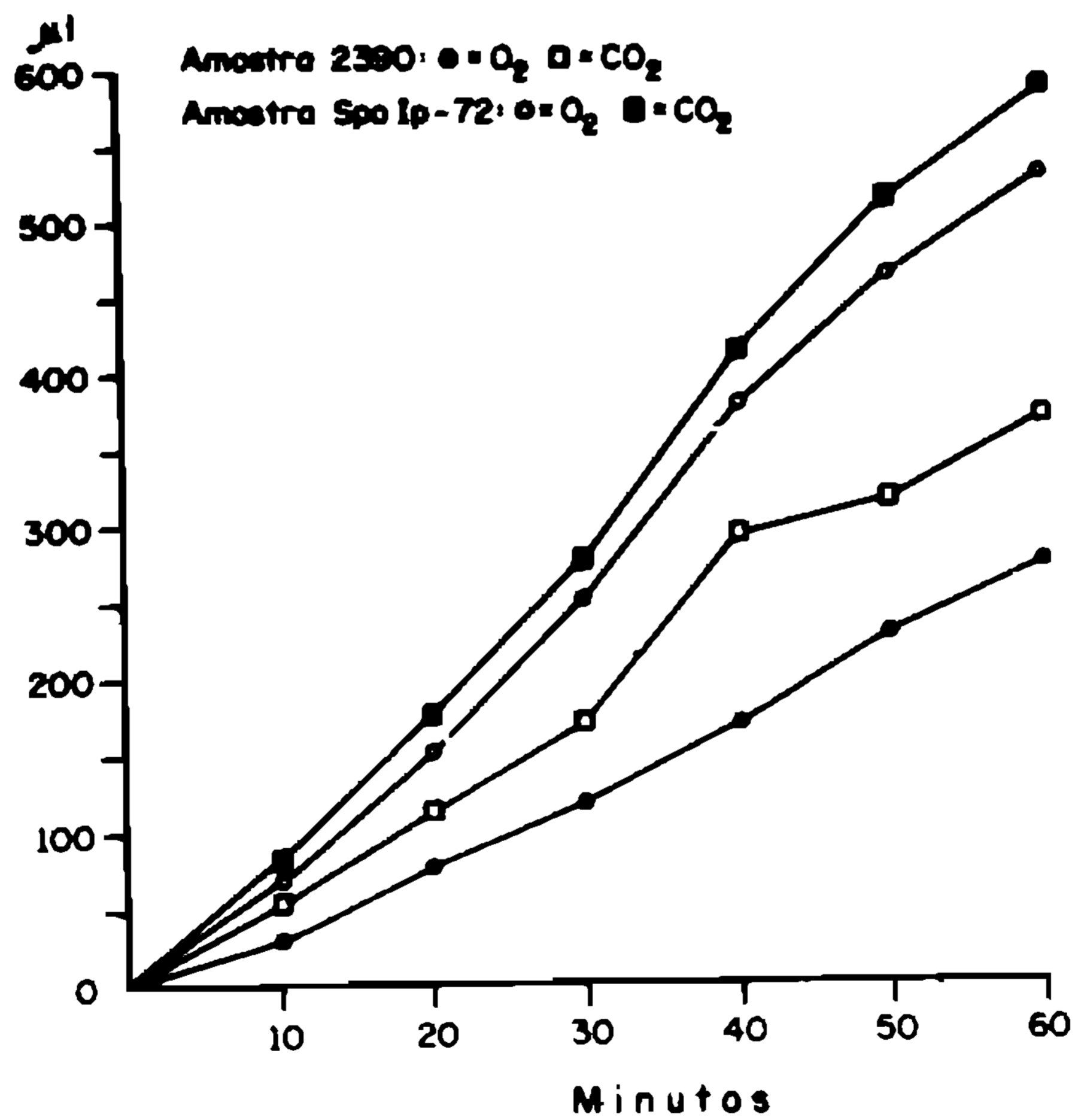


Fig. 3. Comportamento respiratório das amostras parental e mutante de *B. licheniformis*. As curvas resultaram das médias dos valores obtidos em duas e três determinações manométricas, respectivamente, com as amostras 2390 e SpoIp-72.

as colônias do mutante se apresentaram circulares e não rizóides, mais opacas do que translúcidas e menos móveis do que a amostra parental.

Com respeito aos testes bioquímicos, o confronto dos resultados mostrou o mesmo comportamento da amostra mutante em relação à parental. Alguns testes a que foi submetido o mutante para confirmação da espécie vão relacionados a seguir. Foram positivos: fermentação da glicose (sem gás), sacarose e manitol; reação do vermelho de metila, produção de acetilmetilcarbinol; produção de nitrito; hidrólise da gelatina; mobilidade; gás em caldo nitrado (em anaerobiose); crescimento nos meios CN com 7% de NaCl; CN com 10% de NaCl; CN solidificado com ágar (pH 6,0) e CN adicionado de glicose (em anaerobiose); hidrólise da caseína e do amido. Foram negativos: fermentação da lactose; produção de indol e H₂ S; urease e utilização do citrato (segundo Simmons & Koser).

O fato de ambas as amostras não utilizarem o citrato constituiu-se na única divergência marcante quando comparada com a descrição constante do Manual de Bergey (1957), cuja divergência não colide, entretanto, com outros caracteres ali descritos para outras espécies do gênero. Acresce, ainda, a circunstância de que essas amostras estão perfeitamente enquadradas como *B. licheniformis* da chave I de Lemille et al. (1969) para a espécie.

Frequência de esporulação e esporulação endotrófica. Os resultados acima descritos ensejaram a procura de outro marco diferencial, nítido, entre as amostras, o que foi encontrado quando se determinou as respectivas frequências de esporulação. Estas foram de $8,5 \times 10^{-1}$ e $< 10^{-7}$, respectivamente, para as amostras 2390 e SpoIp-72 (Tabela 1). Paralelamente, as culturas que se destinavam a tais determinações foram observadas sob microscopia de contraste de fase, não se conseguindo, por esse meio, surpreender qualquer vestígio de esporogênese na amostra mutante. Este resultado coincidiu, também, com o de duas experiências destinadas a detectar a biossíntese de esporos a partir de células vegetativas em condições não proliferantes (esporulação endotrófica).

Modelo respiratório, crescimento e atividade amilolítica. As células vegetativas do mutante mostraram possuir um metabolismo respiratório global aumentado, traduzido por um consumo de oxigênio equivalente a cerca do dobro daquele verificado para as células vegetativas da amostra parental (Fig. 3). Este resultado se apresenta, de algum modo, em desacordo com os assinalados na revisão de Schaeffer (1969) no que tange às amostras mutantes de bacilos com deficiências respiratórias. Incluem-se, aqui, os resultados obtidos por Szulmajster (1964) com *B. subtilis*, no qual o QO₂ era aumentado nas células esporogênicas (sp⁺), verificando-se o inverso nas asporogênicas (sp⁻).

Trabalhos posteriores, correlacionando citocromos e enzimas respiratórias no processo de esporulação em *Bacillus* (Taber et al., 1972; Lang et al., 1972; Felix & Lundgren, 1973), parecem sustentar esta discordância. Igualmente Wilkinson & Ellar (1975) demonstraram em *B. megaterium* a formação de citocromo c entre os estágios I e II da esporogênese, fato coincidente com a quintuplicação da atividade NADH-citocromo c redutase (EC. 1.6.99.3).

De modo diferente, a amostra SpoIp-72 possui uma velocidade de crescimento diminuída quando cultivada nos meios MS66-C (semidefinido) e ANM líquido (complexo), como foi demonstrado anteriormente (Rabinovitch et al., 1975). Neste meio complexo detectou-se esporogênese (partículas termorresistentes) com 10 horas de crescimento, o mesmo não ocorrendo, porém, com o mutante, em 72 horas. Diferenças no metabolismo vegetativo, de mutantes oligoesporogênicos de *B. subtilis*, induzidos por laranja de acridina foram, outrossim, assinalados por Bott & Davidoff-Abelson (1966). E, como evidencia ainda a Tabela 1, o tempo despendido para a hidrólise total do amido, para a

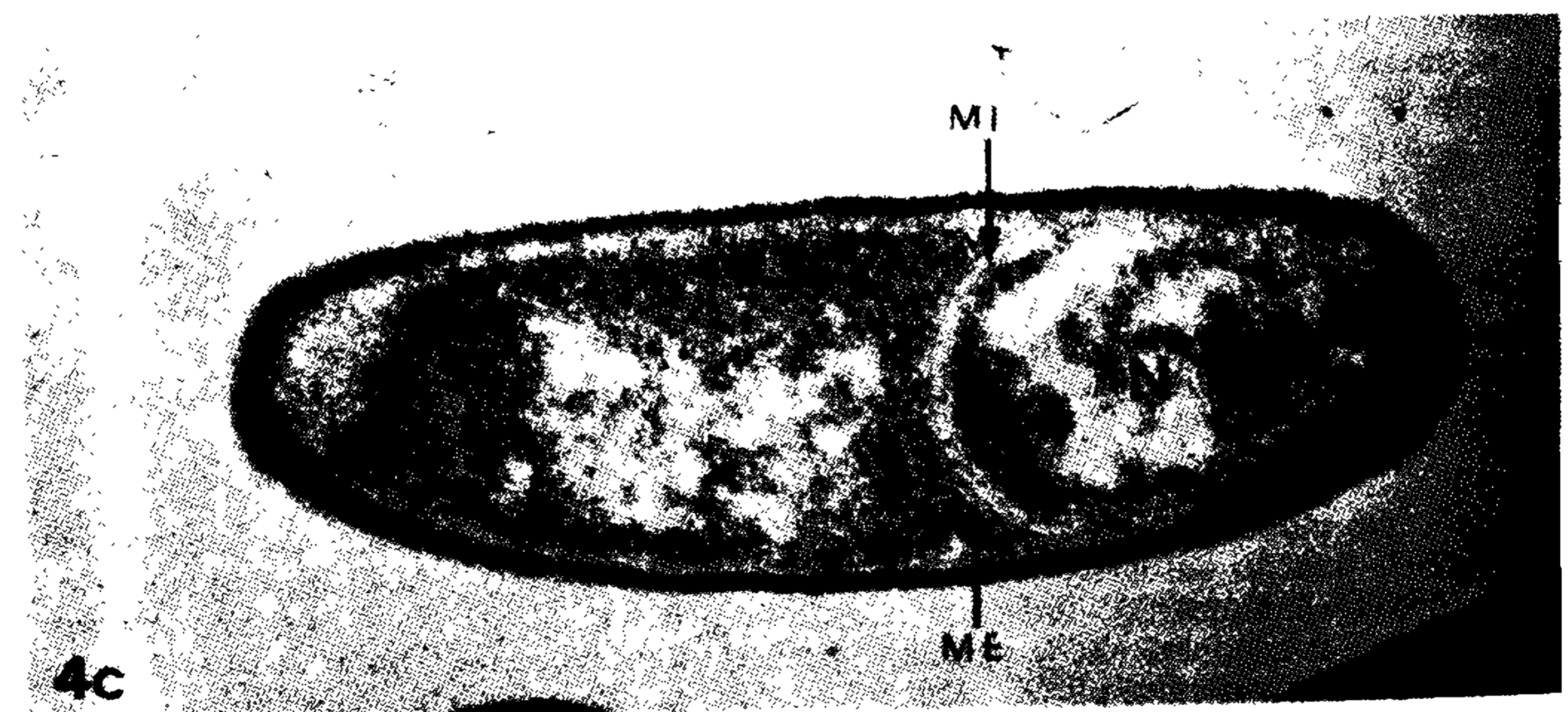
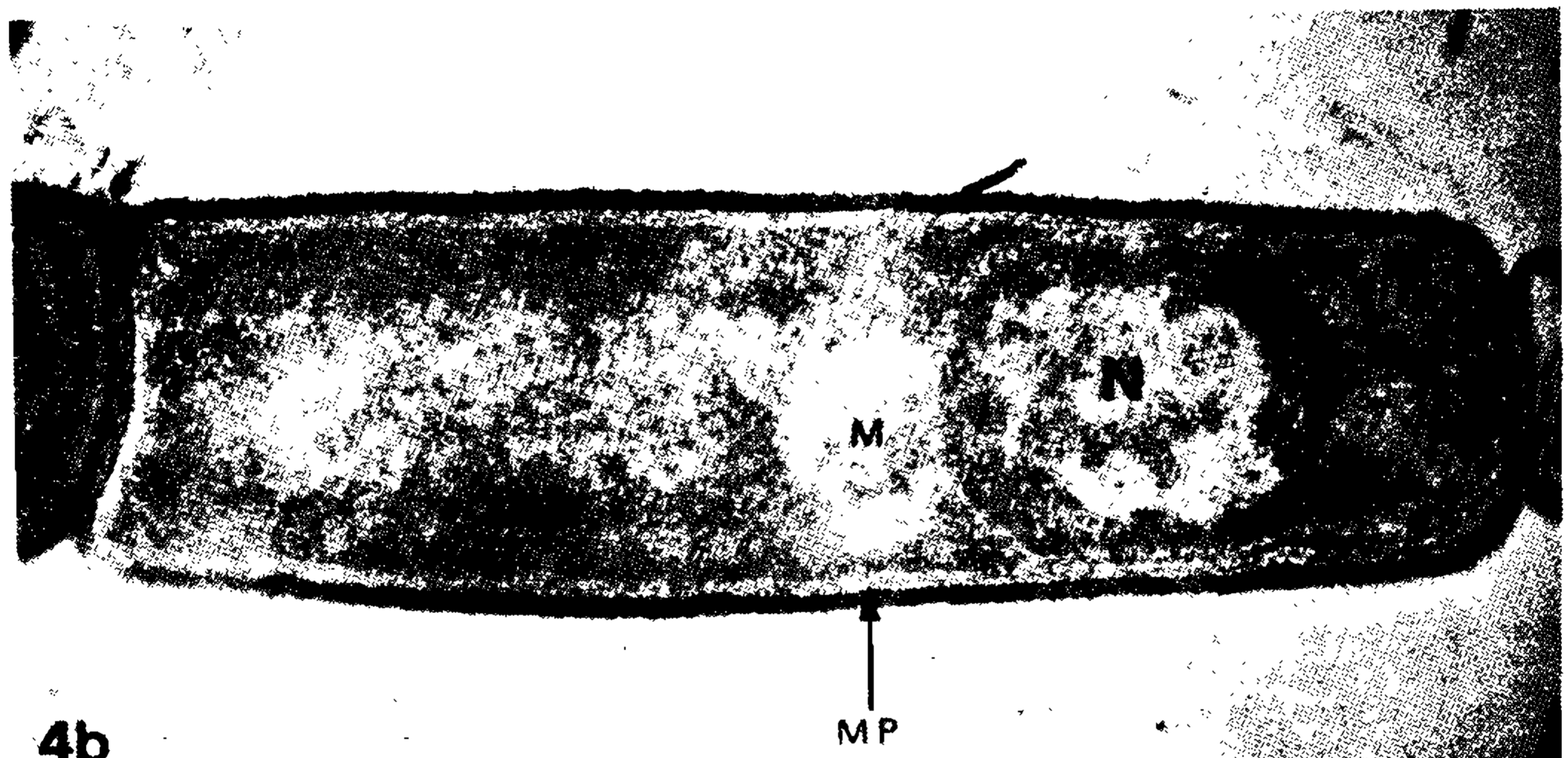
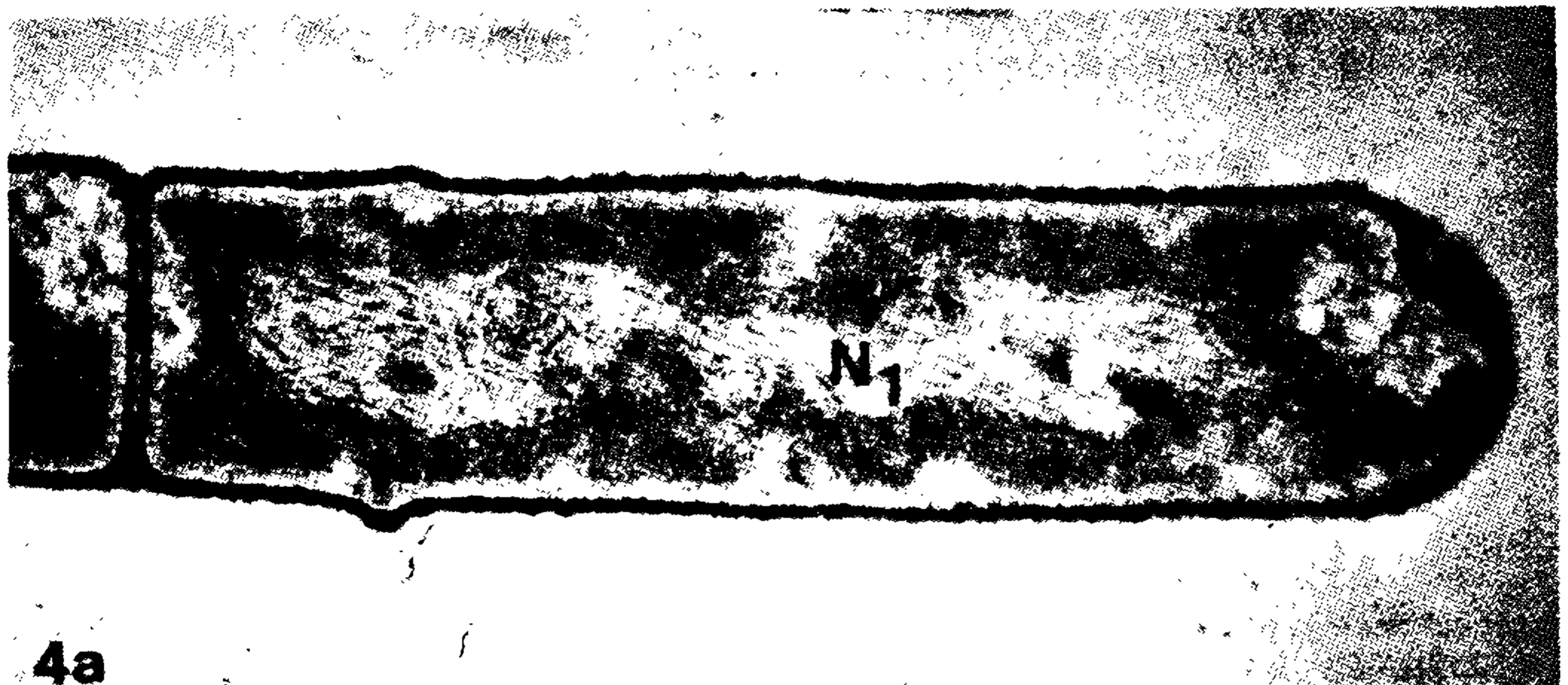


Fig. 4. *Bacillus licheniformis* 2390, com 7h (4a) e 10h (4b, 4c) de cultivo. Estão assinalados: N, nucleóide; N₁, material nuclear (DNA) disposto de modo axial; M, mesossomo; MP, membrana citoplasmática; MI, membrana interna do pré-esporo; ME, membrana externa do pré-esporo. x 60.000.

TABELA 1
CONFRONTO ENTRE ALGUMAS CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS AMOSTRAS PARENTAL E MUTANTE DE

Amostras	Frequência de esporulação	Excreção de antibiótico	Produção de exoprotease	<i>B. licheniformis</i>					
				Aspecto colonial	Metabolismo respiratório	Atividade amilolítica (minutos) ^a	Teste da TE (crescimento em meio complexo) ^b	Metabolismo vegetativo (Método semi-definido e complexo) ^b	Esporulação endotrófica
2390	8,5X 10 ⁻¹	positiva	positiva	típico	normal	30	positivo com 10 hrs	normal	positiva
SpoI p-72	10 ⁻¹	positiva	positiva	atípico	aumentado	60	negativo ainda com 72 hrs	diminuído	não detectada

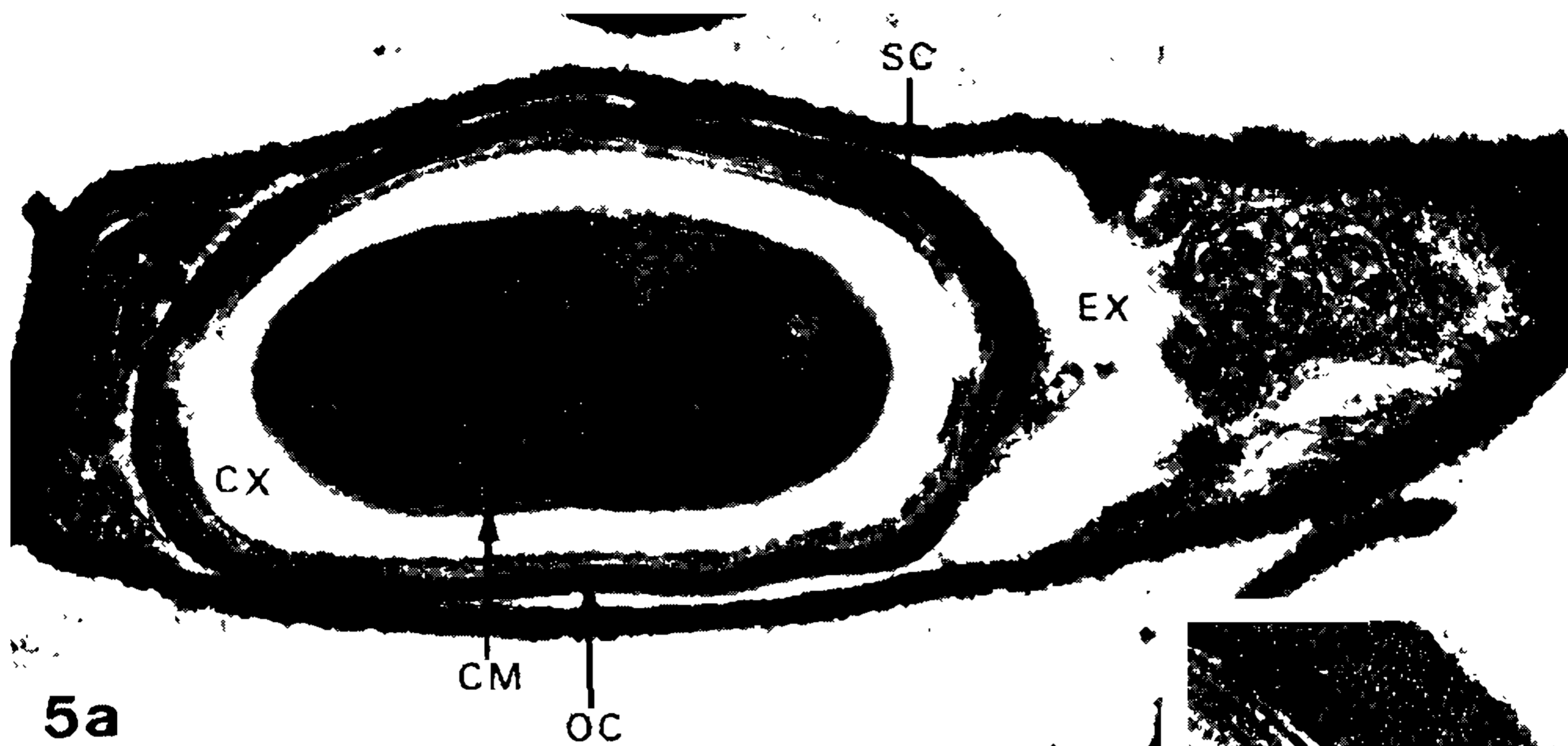
a - Resultados originados de duas experiências
b - Dados obtidos de Rabinovitch & cols., 1975

mesma amostra, foi duas vezes maior nas condições experimentais empregadas. Poderiam ser muitas as explicações teóricas para tal fato, das quais uma, provavelmente, estaria relacionada com a biossíntese da enzima em níveis anormais na linhagem mutante. Porém, a propriedade de hidrolisar o amido parece ser um caráter independente não relacionado com o mecanismo da esporulação. Por exemplo, a síntese da alfa-amilase pode ser catabolicamente reprimida desde que o substrato seja acrescentado a um meio de cultivo de composição complexa sem que ocorra, todavia, alteração na esporulação (Schaeffer, 1969). Não obstante, as amostras asporogênicas de *B. subtilis* Marburg, estudadas por Schaeffer (1967), mostraram-se deficientes na atividade amilolítica.

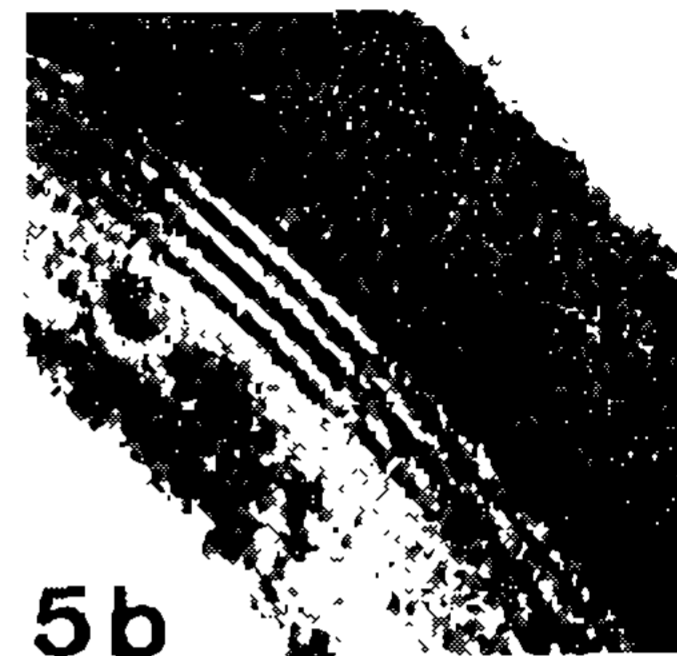
Com respeito ainda a essa Tabela, os resultados qualitativos referentes à excreção de antibiótico (aqui identificado como bacitracina ou mistura de pelo menos duas estruturas polipeptídicas do antibiótico, a julgar pelos Rfs encontrados), e à excreção de exoprotease (s) foram comuns em ambas as amostras.

Possibilidade de bloqueio posterior ao estágio 0. O mutante do *B. licheniformis* 2390 estudado sintetiza bacitracina (ab⁺) e protease (pr⁺) normalmente. Ambas estas propriedades, juntamente com a competência para transformação (com) quando presentes, ausentes ou intercombinadas, caracterizam mutantes de esporulação desde o chamado estágio 0 até o estágio I (Young & Wilson, 1972). Deste modo, quatro possibilidades de bloqueio, anteriores ao estágio I, podem existir, cujos fenótipos são representados pelos símbolos: Spo 0, Spo 0a (ab⁻, pr⁻, com⁻), Spo 0b (ab⁻, pr⁺, com⁺) e Spo 0c (ab⁺, pr⁺, com⁺). Considerando que o mutante em questão revelou-se ab⁺, pr⁺, e julgando-se pouco provável a combinação ab⁺, pr⁺, com⁻ (veja-se por exemplo, Schaeffer, 1969; Waites et al., 1970; Ito & Spizizen, 1972), buscou-se observar, então, o fenótipo correspondente ao estágio em que o mutante se encontrava bloqueado, através de uma análise mais avançada, tal como o aspecto morfogênico da ultra-estrutura da célula sob microscopia eletrônica. Por este motivo, a competência para a transformação não foi determinada neste mutante, isto porque o estágio I e os demais são melhor caracterizados por detalhes no aspecto citomorfológico, e não, basicamente, pelas anormalidades no comportamento fisiológico e/ou bioquímico, que parecem variar, quantitativamente, dentro de um mesmo estágio de bloqueio, embora exista certa correlação entre estes marcos e as alterações citomorfológicas da via esporogênica (Waites et al., 1970; Coote, 1972).

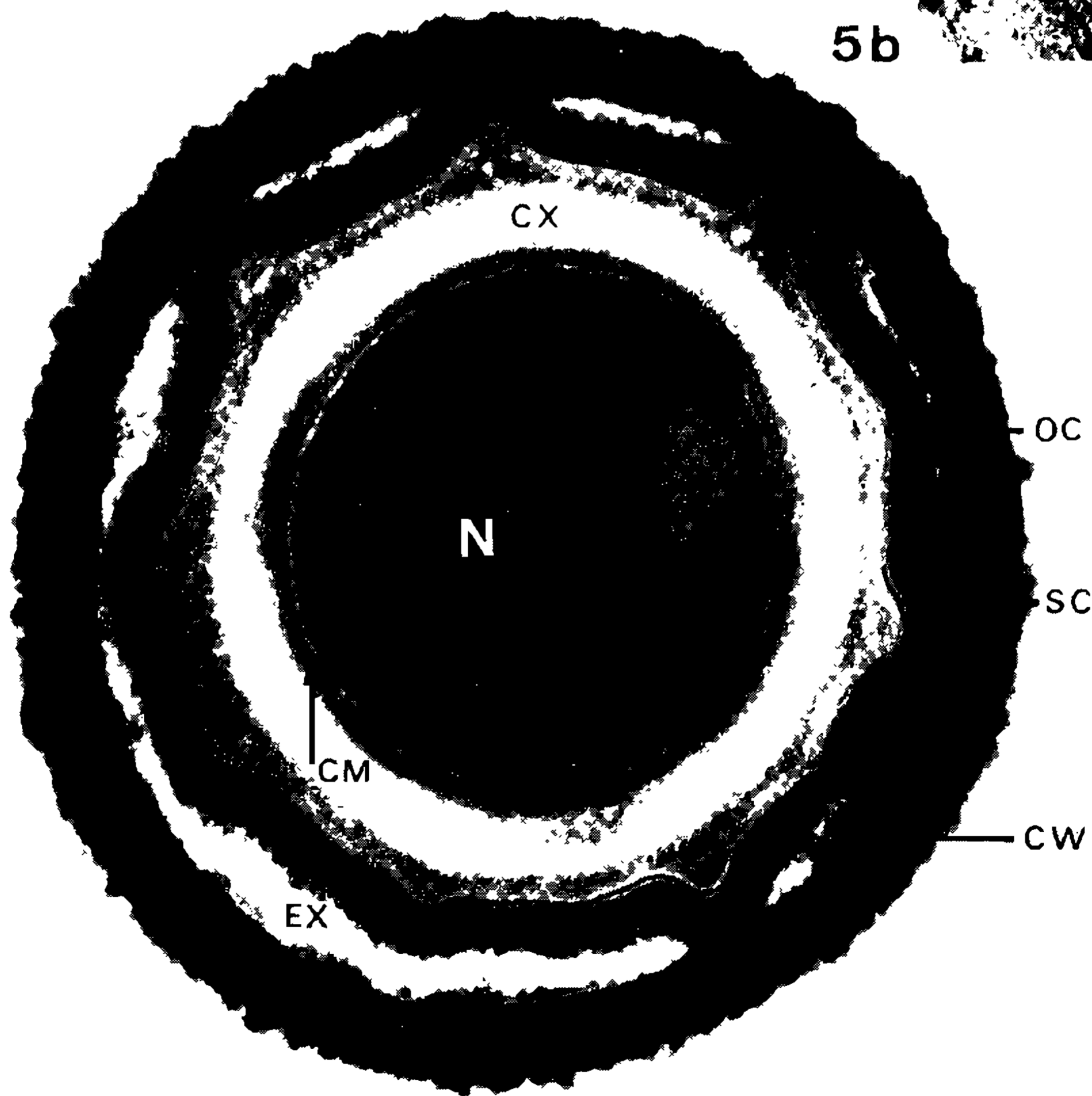
Ultra-estruturas das amostras mutante e parental. O exame ao microscópio eletrônico procedeu-se nos cortes de células, de ambas as amostras, colhidas em três tempos distintos de suas respectivas curvas de crescimento (veja Material e Métodos), a partir das proximidades do término da fase exponencial. Um grande número de células, com 7 horas de crescimento, pôs em evidência o seu material nuclear (DNA), a formar um nucleóide composto do entrelaçamento de delicadas fibrilas, e disposto longitudinalmente (filamento axial), caracterizando, assim, o estágio I (Fig. 4a). Aspectos semelhantes, em *B. subtilis*, foram registrados por Ryter (1965), e, em *B. cereus*, por Ellar & Lundgren (1966).



5a



5b



5c

Fig. 5. Esporângios do *Bacillus licheniformis* 2390, com 20h de cultivo, no estágio VI da esporogênese, 5a, x 60.000. 5c, corte transversal, x 180.000. A capa interna tetralamelada do esporo, SC (5b, x 300.000) foi ampliada a partir da região assinalada em 5a. Estão assinalados ainda: CX, córtex; EX, exosporium, CM, membrana citoplasmática do centro do esporo; OC, capa externa do esporo; CW, parede celular do esporângio.

Além dessa estrutura, foram encontrados, da mesma forma, na linhagem mutante, mesossomos nitidamente evidenciados, constituídos por inúmeras vesículas aparentemente esféricas e mantidas num saco delimitado por membrana, e dispostos em número de três em algumas células (Fig. 6a). Mesossomos com aspectos semelhantes foram descritos, em *B. licheniformis* esporogênico, por Burdett & Rogers (1972). Tais autores demonstraram, nas células deste organismo, colhidas na fase exponencial de crescimento, que essas organelas aparecem, comumente, em número de três: uma na altura do septo e uma em cada um dos pólos da célula. Este foi, portanto, o aspecto morfogênico mais avançado que se encontrou nas células do organismo mutante, com 7 h de cultivo.

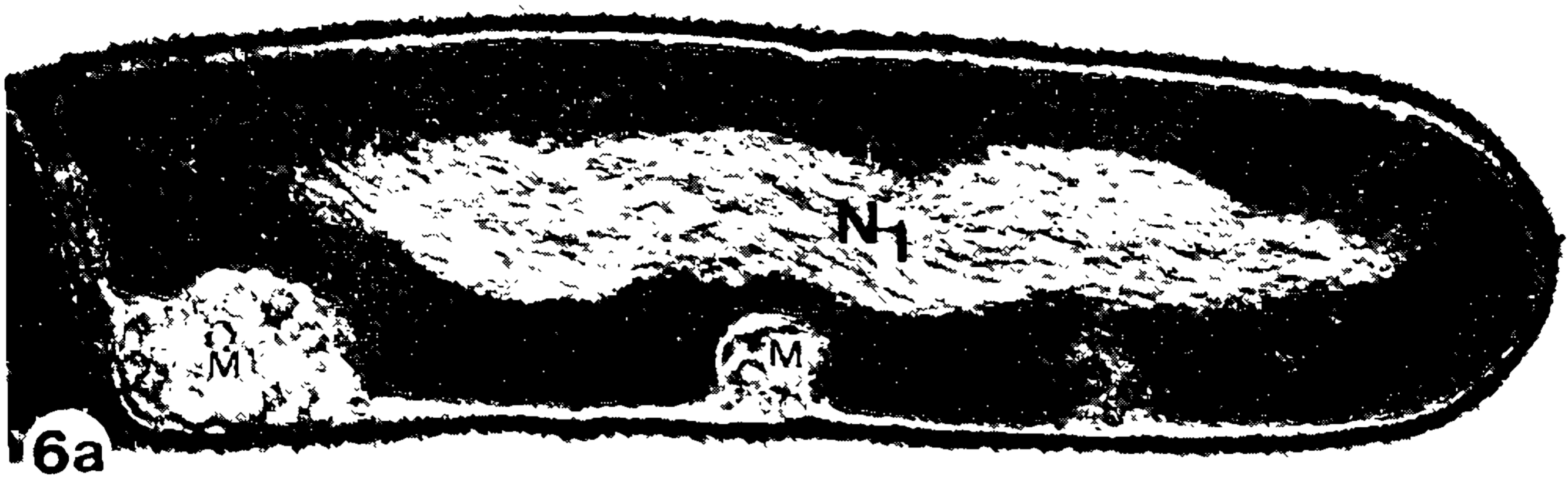
As células da amostra 2390, com 10h de crescimento, apresentaram aspectos variados nas suas estruturas, a traduzirem diferentes estágios morfogênicos em que até mesmo partículas termorresistentes puderam ser detectadas. Este último fato pode ser obviamente compreendido, tendo em vista que a cultura em questão não foi conduzida de modo a oferecer um crescimento sincronizado.

As Figs. 4b e 4c mostram alguns organismos nos quais se assinalam as membranas interna e externa do pré-esporo normalmente encontradas nos primórdios do estágio II da esporogênese. Neste mesmo tempo de crescimento, modificações mais avançadas não foram assinaladas na amostra mutante, a qual permaneceu com o nucleóide configurado num filamento longitudinal, característico do estágio I.

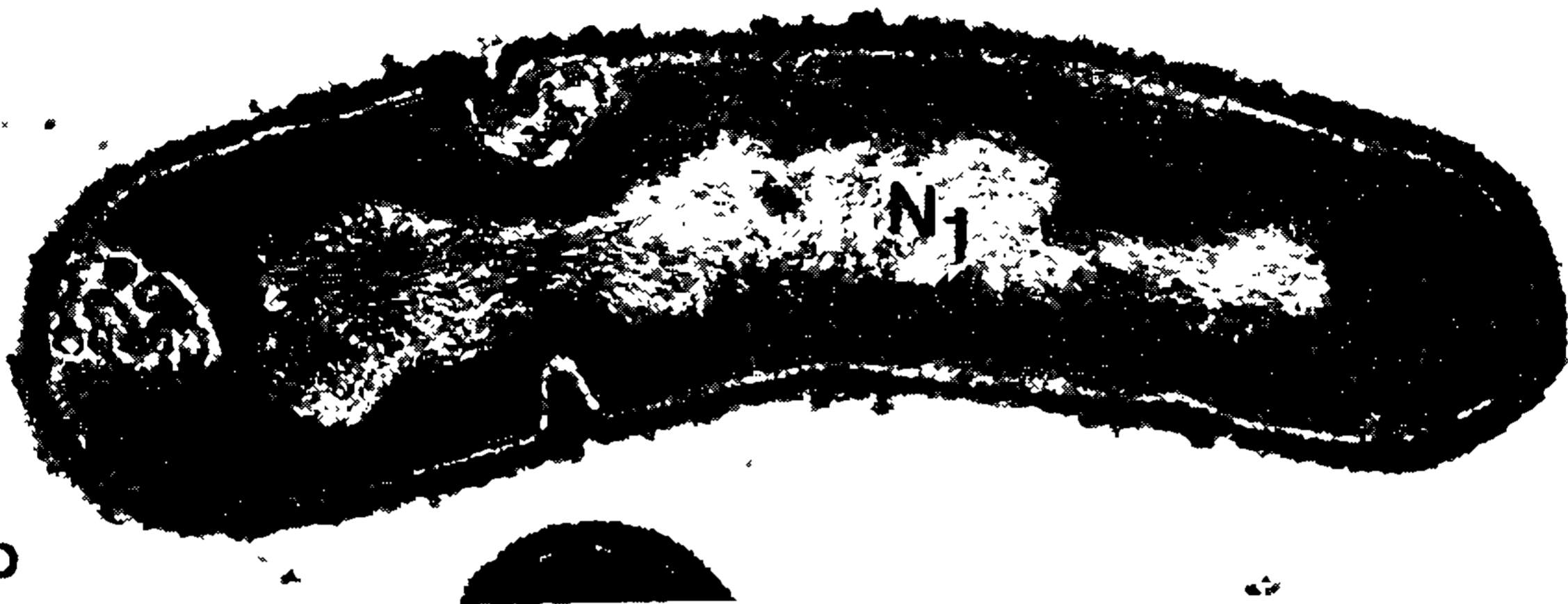
Nas células com 20h de cultivo, tempo correspondente à fase estacionária mais tardia de ambas as culturas, um grande número dos organismos, da linhagem mutante, se encontrava lisado, e as poucas células intactas aparentaram um bloqueio correspondente ao chamado estágio I (Figs. 6c e 6d), enquanto que esporos e esporângios, da amostra 2390, foram encontrados em abundância. Estas células esporuladas, evidenciando terem atingido o estágio VI, revelaram-se citologicamente normais.

Comentários finais. Como a amostra SpoIp-72 produz esporos numa proporção reduzida, o isolamento de exemplares destes foi realizado com o intuito de se conhecer a frequência de esporulação, após germinação e proliferação, procurando-se confrontá-la com a da linhagem 2390. Os resultados comprovaram que, em duas linhagens desses esporos, as frequências se elevaram aproximadamente a 100% em relação à parental. Este comportamento pode ser explicado com base nos relatos de Schaeffer, Ionesco, Ryter & Balassa, citados por Coote (1972), a respeito de populações asporogênicas (sp^-), as quais contêm indivíduos revertentes (sp^+) e populações Spo. De acordo com esses autores, o fenótipo Osp é caracterizado pelo fato de que células originárias da linhagem de seus esporos exibem uma frequência de esporulação normalmente baixa, fato a distinguir populações Osp de Sp^- possuindo revertentes Sp^+ e cujos esporos apresentam uma alta frequência de esporulação. Deste modo, o mutante SpoIo-72 poderia ser considerado como Sp^- ; todavia, à luz das recomendações de Young & Wilson (1972), a designação fenotípica Spo foi sugerida para exprimir qualquer alteração na capacidade de esporular, o que foi adotado na presente comunicação.

O principal escopo deste trabalho não é o de oferecer novas hipóteses acerca da seqüência de eventos, bioquímicos e genéticos, que culminam com a esporulação, como fizeram, entre outros, Waite et al. (1970), Coote (1972), e sim o da caracterização do mutante SpoIp-72, que demonstrou possuir a particularidade de exibir metabolismo vegetativo diminuído, em contraste com o metabolismo respiratório global aumentado, este último ainda não citado na literatura.



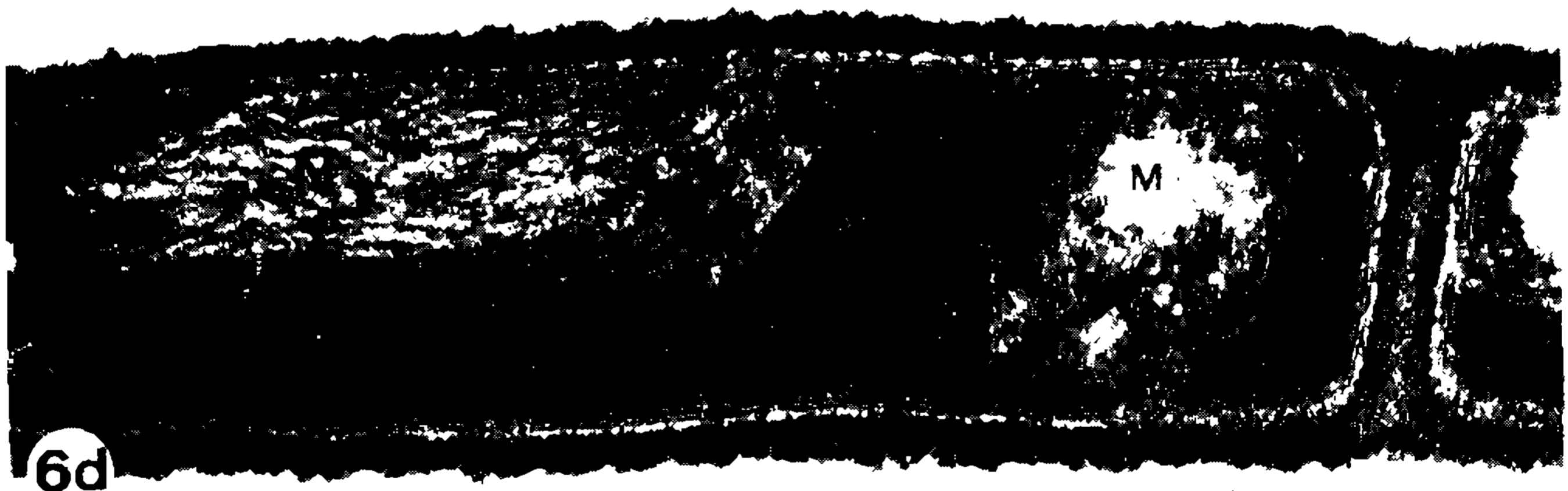
6a



6b



6c



6d

Fig. 6. *Bacillus licheniformis* Spolp-72. 6a, célula com 7h de cultivo, mostrando o DNA disposto de modo axial; um terceiro mesossomo é visto à direita ($\times 60.000$). 6b, célula com 10h de cultivo, em processo de divisão a partir do mesossomo central ($\times 60.000$). 6c, bacilo com 20th de cultivo, com material nuclear disposto em filamento axial. 6d, idem 6c. $\times 90.000$.

ABSTRACT

A spontaneous mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism, blocked in stage I of sporogenesis.

A spontaneous mutant strain derived from the sporogenic *B. licheniformis* 2390 was studied with a view to determining at what developmental stage toward sporulation it was blocked. Electronmicrographs suggested that the mutant cells harvested during the stationary phase of the growth curve were unable to go beyond stage I of sporogenesis (i. e., their nucleoid remained as an axial filament). On the other hand, antibiotic production (bacitracin) and proteolytic activity were easily detected. Under the present experimental conditions the mutant strain, named SpoIp-72, did not synthesize spores by starvation in a solution of inorganic salts, in contrast with the parental strain. However, it showed a sporulation frequency under 10^{-7} when cultivated in media favorable to sporogenesis. This strain shows a restricted initial vegetative growth when compared with strain 2390, whereas, inversely, its respiratory metabolism (oxygen consumption) is significantly higher. The last-mentioned behavior was confirmed in the present study, contrasting with other described types of sporulation mutants which are blocked at early stages of the sporogenetic path.

REFERÊNCIAS

- BALASSA, G. 1966. Renouvellement des ARN et des proteines au cours de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur* 110 : 316-346.
- BERNLOHR, R. W. & NOVELLI, G. D. 1963. Bacitracin biosynthesis and spore formation: the physiological role of an antibiotic. *Arch. Biochem. Biophys.* 103 : 94-104.
- BESKID, G. & LUNDGREN, D. G. 1961. Biochemical changes occurring in a minimal medium during growth and sporulation: comparison of sporogenic *Bacillus cereus* with asporogenic mutants. *Can. J. Microbiol.* 7 : 542-551.
- BIER, O. 1975. Meios de cultura básicos. In *Bacteriologia e Imunologia*. São Paulo, Melhoramentos, p. 789-794.
- BOTT, K. F. & DAVIDOFF-ABELSON, R. 1966. Altered sporulation and respiratory patterns in mutants of *Bacillus subtilis* induced by acridine orange. *J. Bacteriol.* 92 : 229-240.
- BREED, R. S., MURRAY, E. G. D. & SMITH, N. R. 1957. Genus I. *Bacillus* Cohn, 1872. In BERGEY'S Manual of Determinative Bacteriology. Williams & Wilkins, p. 613-634.
- BURDETT, I. D. J. & ROGERS, H. J. 1972. The structure and development of mesosomes studied in *Bacillus licheniformis* strain 6346. *J. Ultrastructure Res.* 38 : 113-133.
- COOTE, J. G. 1972. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Characterization of oligosporogenous mutants and comparison of their phenotypes with those of asporogenous mutants. *J. Gen Microbiol.* 71 : 1-5.

- DUNLEY, G. P., MACHADO, R. D. & ALMEIDA, D. F. 1973. Electron microscope study of temperature-sensitive mutants of *Escherichia coli* K 12: notes on the method and preliminary characterization. *An. Acad. Brasil. Cienc.* 45 : 611-619.
- ELLAR, D. J. & LUNDGREN, D. G. 1966. Fine structure of sporulation in *Bacillus cereus* grown in a chemically defined medium. *J. Bacteriol.* 92 : 1748-1764.
- FELIX, J. A. & LUNDGREN, D. G. 1973. Electron transport system associated with membranes of *Bacillus cereus* during vegetative growth and sporulation. *J. Bacteriol.* 115 : 552-559.
- HANDLEY, P. S. & KNIGHT, D. G. 1975. Ultrastructural changes occurring during germination and outgrowth of spores of the thermophile *Bacillus acidocaldarius*. *Arch. Microbiol.* 102 : 155-161.
- HANSON, R. S., PETERSON, J. A. & YOUSTEN, A. A. 1970. Unique biochemical events in bacterial sporulation. *Ann. Rev. Microbiol.* 24 : 53-90.
- HOLT, S. C., GAUTHIER, J. J. & TIPPER, D. J. 1975. Ultrastructural studies of sporulation in *Bacillus sphaericus*. *J. Bacteriol.* 122 : 1322-1338.
- ITO, J. & SPIZIZEN, J. 1972. Early-blocked asporogenous mutants of *Bacillus subtilis* 168. In HALVORSON, H. O., HANSON, R. & CAMPBELL, L. L. (eds) *Spores V*. Amer. Soc. Microbiol. p. 107-112.
- KELLENBERGER, E., RYTER, A. & SÉCHAUD, J. 1958. Electron microscopy of DNA containing plasmids. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 4 : 671-678.
- LANG, D. R., FELIX, J. & LUNDGREN, D. J. 1972. Development of a membrane-bound respiratory system prior to and during sporulation in *Bacillus cereus* and its relationship to membrane structure. *J. Bacteriol.* 110 : 968-977.
- LEMILLE, F., de BARJAC, H. & BONNEFOI, A. 1969. Essai sur la classification biochimique de 97 *Bacillus* du groupe I, appartenant à 9 espèces différentes. *Ann. Inst. Pasteur* 166 : 808-819.
- RABINOVITCH, L. 1972. Influência dos ions Mn^{2+} e Mg^{2+} na esporulação endotrófica do *Bacillus licheniformis* 2390. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo) 3 : 47-50.
- RABINOVITCH, L., PALMEIRA, M. L. & SILVA, S. M. 1975. A spontaneous Spo mutant of *Bacillus licheniformis* with increased respiratory metabolism. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo) 6 : 47-49.
- ROUX, E. 1890. Bactériodie charbonneuse asporogène. *Ann. Inst. Pasteur* 4 : 25-34.
- RYTER, A. 1965. Étude morphologique de la sporulation de *Bacillus subtilis*. *Ann. Inst. Pasteur* 108 : 40-60.
- RYTER, A., SCHAEFFER, P. & IONESCO, H. 1966. Classification cytologique, par leur stade de blocage, des mutants de sporulation de *Bacillus subtilis* Marburg. *Ann. Inst. Pasteur* 110 : 305-315.
- SADOFF, H. L. 1972. Sporulation antibiotics of *Bacillus* species. In HALVORSON, H. O., HANSON, R. & CAMPBELL, L. L. (eds) *Spores V*. Amer. Soc. Microbiol., p. 157-166.

- SCHAEFFER, P. 1967. Asporogenous mutants of *Bacillus subtilis* Marburg. *Folia Microbiol. Acad. Sci. Bohemoslov.* 12 : 291-296.
- SCHAEFFER, P. 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymes, and endotoxins. *Bacteriol. Rev.* 33 : 48-71.
- SPIZIZEN, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of *Bacillus subtilis* by deoxyribonucleate. *Proc. Nat. Acad. Sci. U. S.* 44 : 1072-1078.
- SZULMAJSTER, J. 1964. Biochimie de la sporogenèse chez *Bacillus subtilis*. *Bull. Soc. Chim. Biol.* 46 : 443-481.
- TABER, H. W., FARRAND, S. K. & HALFENGER, G. M. 1972. Genetic regulation of membrane components in *Bacillus subtilis*. In HALVORSON, H. O., HANSON, R. & CAMPBELL, L. L. (eds.) *Spores V.* Amer. Soc. Microbiol., p. 140-147.
- UMBREIT, W. W., BURRIS, R. H. & STAUFFER, J. F. 1949. *Manometric techniques and tissue metabolism.* Burgess Publ. Co., Minn., p. 1-20.
- YOUNG, F. E. & WILSON, G. A. 1972. Genetics of *Bacillus subtilis* and other Gram positive sporulating bacilli. In HALVORSON, H. O., HANSON, R. & CAMPBELL, L. L. (eds.) *Spores V.* Amer. Soc. Microbiol. p. 77-106.
- YOUNG, I. E. & FITZ-JAMES, P. C. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. I. The formation of spores in *Bacillus cereus*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6 : 467-481.
- YOUNG, I. E. & FITZ-JAMES, P. C. 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in *Bacillus cereus*. var. *Alesti*. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* 6 : 483-498.
- YOUNG, M. 1975. Genetic mapping of sporulation operons in *Bacillus subtilis* using a thermosensitive sporulation mutant. *J. Bacteriol.* 122 : 1109-1116.
- WAITES, W. M., KAY, D., DAWES, I. W., WOOD, D. A., WARREN, S. C. & MANDELS-TAM, J. 1970. Sporulation in *Bacillus subtilis*. Correlation of biochemical events with morphological changes in asporogenous mutants. *Biochem. J.* 118 : 667-676.
- WILKINSON, J. & ELLAR, D. J. 1975. Morphogenesis of the membrane-bound electron transport system in sporulating *Bacillus megaterium* KM. *Eur. J. Biochem.* 55 : 131-139.