

Algumas exigências metabólicas de
*Pseudomonas denitrificans*¹

O. J. CROCOMO²
C. C. DELWICHE³

1 — Realizado com auxílio da Fundação Rockefeller. Entregue para publicação em 20-10-66; 2 — Cadeira de Química Biológica, E.S.A.L.Q.; 3 — Department of Soil and Plant Nutrition, Univ. of California, Davis, U.S.A.

RESUMO

Para estudos da bioquímica da desnitrificação os desnitrificadores são cultivados em meio parcialmente sintético, com extrato de levedura ou de carne ou ainda peptona. Procurou-se então um meio de cultura completamente sintético no qual *P. denitrificans* pudesse desenvolver-se e fazer desnitrificação. Para tanto, células de um "strain" dessa bactéria foram crescidas durante 24 e 48 horas em tubos de ensaio contendo 10 ml de meio de cultura consistindo de succinato de sódio, nitrato de potássio, extrato de levedura e tampão de fosfato IM, valôr pH 6,8. Dêsse meio (contrôle) 0,1 ml foi inoculado em 10 ml do meio de cultura em estudo, mantido então em condições parcialmente anaeróbicas. Após 24 horas uma alíquota foi retirada e suspensa em água destilada e a turbidês lida em espectrofotômetro Beckman, a 420 m μ .

Os dados obtidos após longa série de ensaios permitiram concluir que a fim de se obter em 48 horas um crescimento da mesma ordem que o obtido com o meio contrôle, o meio de cultura sintético deve conter micronutrientes (Zn, Fe, Mn, Cu, Co, B e Mo, em EDTA), sulfato de sódio, sulfato de magnésio e ácido glutâmico, além de KNO₃, succinato e tampão de fosfato.

1. INTRODUÇÃO

A fim de se obter os desnitrificadores em cultura pura, usa-se frequentemente a técnica do enriquecimento de cultura, na qual succinato ou glucose atuam como substrato e o nitrato como um acceptor de hidrogênio. Nenhum microrganismo pode fermentar succinato de sódio porque não há compostos aos quais esta substância possa ser convertida com significante produção de energia. Succinato representa, portanto, um substrato bastante bom para o estudo do processo de desnitrificação.

Frequentemente nas investigações sobre o processo de desnitrificação ou sobre os processos de conversão de energia acoplados com a redução do nitrato, os desnitrificadores são crescidos em um meio parcialmente sintético com extrato de levedura ou de carne ou ainda peptona. Com o fito então de se conseguir um meio completamente sintético no qual o desnitrificador *Pseudomonas denitrificans* pudesse crescer

e reduzir nitrato em ambiente parcialmente anaeróbico é que se conduziu o presente experimento. O meio difere em vários aspectos daquele usado por SACKS & BARKER (1952) em seu estudos sobre esse desnitrificador.

2. — MATERIAL E MÉTODOS

Células de um "strain" de *P. denitrificans* cresceram a 26°C durante 24 ou 48 horas em tubos de ensaio contendo 10 ml de um meio de cultura consistindo de 5g/1 de succinato de sódio, 10g/1 de nitrato de potássio, 5g/1 de extrato de levedura, tampão de fosfato ($\text{KH}_2\text{PO}_4 + \text{K}_2\text{HPO}_4$) 1M, valôr pH 6,8. Esse é o *meio controle*. Após o período de crescimento, fêz-se uma suspensão a 10% dessas células. Dessa suspensão usou-se uma alíquota de 0,1 ml em cada tubo de ensaio que continha 10 ml do *meio de crescimento* em estudo.

Meio de crescimento. Com exceção do extrato de levedura, o meio de crescimento tem a mesma composição que o meio controle. A essas substâncias se juntou também cada um dos outros compostos em estudo, conforme o indicado no texto.

Condições e período de crescimento. As células cresceram em 10 ml do meio de crescimento em observação, sob condições parcialmente anaeróbicas. O período de crescimento foi de 24 e/ou 48 horas após o qual uma alíquota apropriada foi suspensa em água e a turbidês foi lida no espectrofotômetro Beckman, a 420 m μ . Os resultados são expressos como percentagem do meio controle.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Necessidade de sais inorgânicos. Ensaio foram realizados a fim de se determinar que sais inorgânicos seriam exigidos para dar um bom crescimento. 1 ml de uma mistura de micronutrientes incluindo Zn, Fe, Mn, Cu, Co, B e Mo dissolvidos em 0,25% de ácido etilenodiaminotetraacético (EDTA) foi adicionado ao meio de cultura em estudo para dar 10 mg de cada um dos elementos por litro de solução. Os outros sais, estudados separadamente, foram sulfatos de magnésio e sulfato de sódio. Os resultados mostrados na Tabela I foram obtidos em um ensaio típico e indicam que

esses sais quando adicionados ao meio aumentam o crescimento das células tanto em períodos de 24 como de 48 horas. As melhores concentrações foram de 1,0 g e 2,0 g por litro para $MgSO_4$ e Na_2SO_4 respectivamente. Quando quantidades maiores desses sais foram adicionadas não houve aumento no crescimento.

Influência de aminoácidos. Como se pode verificar dos dados da Tabela 1, os sais inorgânicos não podem substituir o extrato de levedura no meio. Uma mistura de 19 aminoácidos foi então ensaiada, cujas quantidades, em mg/l, foram as seguintes: glutamato de sódio (300), DL-alanina (200), L-arginina-HCl (240), L-asparagina (400), ácido L-aspartico (100), L-cisteína (50), glicina (100), L-histidina.HCl (60), DL-isoleucina (250), L-leucina (250), L-lisina (250), DL-metionina (100), DL-fenilalanina (100), L-prolina (100),

Composição do meio	Crescimento % do contrôle	
	24 hs	48 hs
Succinato + KNO_3 + tampão de fosfato (1)	5,0	10,0
(1) + micronutrientes	8,0	14,0
(1) + micronutrientes + $MgSO_4$ (0,5 g/l)	12,0	19,0
(1) + micron. + $MgSO_4$ (1,0 g/l)	16,0	28,0
(1) + micron. + $MgSO_4$ (1,0 g/l) + Na_2SO_4 (1,0 g/l)	35,0	56,0
(1) + micron. + $MgSO_4$ (1,0 g/l) + Na_2SO_4 (2,0 g/l)	48,0	70,0

Tabela 1. Exigência em sais inorgânicos apresentada por *P. denitrificans*.

DL-serina (50), DL-treonina (200), DL-triptofano (40), L-tirosina (100), DL-valina (250). Algumas dessas quantidades foram estabelecidas em ensaios preliminares e outras sugeridas pela literatura geral sobre meios de cultura. Quando essa mistura de aminoácidos foi utilizada junto com os sais inorgânicos, o crescimento em um período de 24 horas foi superior ao do meio contrôle.

A adição de purinas e pirimidinas e/ou de uma mistura de vitaminas do complexo B, junto com os aminoácidos ou substituindo-os não determinou incremento no crescimento. Não há dúvidas, então de que os sais inorgânicos e os aminoácidos podem substituir o extrato de levedura no meio com bom resultado.

Entretanto, a fim de se estabelecer se cada um dos aminoácidos da mistura está sendo realmente necessário ou se somente alguns deles poderiam ser usados, foram ensaiadas várias combinações de aminoácidos. Muitas dessas combinações produziram quase os mesmos resultados, a mais simples delas consistindo de 10 aminoácidos. A quantidade total dessa última mistura foi posteriormente substituída por um único aminoácido. Obteve-se igual resultado com qualquer um dos aminoácidos dessa combinação mais simples (glutamato, alanina, asparagina, arginina, cisteína, leucina, lisina, metionina, serina e valina).

Influência de sal amoniacal. A fim de se estudar a possibilidade de substituir em parte os aminoácidos por sal amoniacal, um ensaio foi levado a efeito no qual sulfato de amônio foi usado em presença ou não de um dos aminoácidos, ou seja de ácido glutâmico. Neste caso, entretanto, a quantidade de glutamato foi reduzida para 10, 25, 50 e 75% daquela usada nos ensaios anteriores. Os resultados mostrados na Tabela 2 indicam que a presença do sulfato de amônio e de 400 mg/l de glutamato de sódio é suficiente para proporcionar um crescimento de células da bactéria da ordem de 90%, em 48 horas.

Composição do meio *	Crescimento % de controle	
	24 hs	48 hs
Succ. + KNO ₃ + micron. + MgSO ₄ + Na ₂ SO ₄ (1)	51	68
(1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ **	60	79
(1) + glutamato 10%***	65	83
(1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ + glut 10%	76	91
(1) + glutamato 25%	70	85
(1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ + glut 25%	85	96
(1) + glutamato 50%	82	—
(1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ + glut 50%	91	—
(1) + glutamato 75%	89	—
(1) + (NH ₄) ₂ SO ₄ + glut 75%	98	—

Tabela 2. Crescimento de *P. denitrificans* na presença de glutamato de sódio e de sulfato de amônio.

* todos os meios são tamponados com tampão de fosfato 1M, pH 6,8

** 3,75 g/l, quantidade estabelecida em ensaios preliminares

*** glutamato 100% = 4,0 g/l

Em outros ensaios utilizou-se uréia em substituição ao sal amoniacal, não se conseguindo, contudo, bons resultados. Do mesmo modo, o crescimento em presença de cloreto de amônio foi menor do que o obtido com o sulfato.

4. CONCLUSÕES

Os dados obtidos no presente experimento permitem concluir que as exigências mínimas para obtenção de células de *P. denitrificans* incluem os sais inorgânicos Na_2SO_4 , MgSO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, micronutrientes e um aminoácido, no caso o glutamato de sódio. Nitrato de potássio naturalmente deve estar presente a fim de proporcionar o nitrato que vai atuar como acceptor de elétrônios, e o meio deve estar tamponado com tampão de fosfato 1M, pH 6,8. Succinato serve como substrato. Entretanto, o papel de glutamato no sistema permanece obscuro. Se esse aminoácido está servindo como fonte de nitrogênio, o sulfato de amônio presumivelmente não será necessário; por outro lado, o glutamato poderá estar atendendo a algum aspecto do metabolismo de *P. denitrificans*. Sobre este particular ensaios estão sendo conduzidos neste laboratório.

5. SUMMARY

The experiment described herein was performed in order to establish a completely synthetic medium for growing P. denitrificans cells.

In order to obtain in 48 hr. a growth as good as that obtained with the control cultures (with yeast extract), the medium must be formed by micronutrients, the inorganic salts Na_2SO_4 , MgSO_4 and $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ and by an amino acid such as sodium glutamate. The KNO_3 is for course needed in order to proportionate the nitrate, and the medium must be buffered with 1M potassium phosphate buffer, pH 6.8. Succinate serves as a substrate. The role of glutamate is under investigation.

6. LITERATURA CITADA

SACKS, L. E. & H. A. BARKER, 1952 — Substrate oxidation and nitrous oxide utilization in denitrification. J. Bact. 64:247-252.