

# ESTUDOS SOBRE A ESPORULAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE *BACILLUS*

## III — Influência da concentração da glicose sobre o início da esporogênese<sup>1</sup>

LEON RABINOVITCH\* e SÔNIA MARIA DA SILVA\*\*

Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Guanabara

(Com 5 figuras)

**SUMÁRIO:** Células do *Bacillus licheniformis* 2390 foram cultivadas em um meio semi-sintético, a fim de se observar uma possível influência de diferentes concentrações de glicose sobre o tempo necessário para o início da esporogênese.

Quando se empregou 10 mg% do açúcar, obteve-se endósporos após dois dias de incubação, enquanto que, com 1000 mg%, obteve-se endósporos no nono dia.

Os resultados obtidos mostraram uma influência da concentração da fonte de carbono ensaiada, no tempo necessário para o início da esporogênese.

A esporogênese em bactérias do gênero *Bacillus*, está intimamente ligada à composição do meio de cultivo. Alguns trabalhos têm demonstrado que o aparecimento das formas esporuladas ocorre ao final da fase de crescimento exponencial, quando o meio de cultivo encontra-se exaurido, além do que determinadas fontes de carbono podem impedir as vias metabólicas que conduzem a síntese do esporo.

Recentemente, Freese e cols. (4) verificaram que a frutose, glicosamina, glicose, L-malato, glicerol ou ma-

nose eram capazes de reprimir a formação de esporos em *B. subtilis*, ocorrendo uma derepressão, entretanto, quando estes compostos eram consumidos praticamente de modo total. Um comportamento idêntico já foi descrito, com relação à glicose, por St. Julian & Bulla Jr. (10) em *B. larvae* e Rabinovitch (7) em *B. licheniformis*.

Todavia, Aubert, Millet & Castoriadis-May (1) obtiveram esporos durante o crescimento exponencial do *B. megaterium* e, posteriormente, Aubert & Millet (2) verificaram que a relação

1 Recebido para publicação a 18 de janeiro de 1973.

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

\*\* Bolsista do Instituto Oswaldo Cruz.

célula/esporos, encontrava-se na dependência da natureza da fonte de carbono. Com *B. subtilis*, esta mesma relação mostrou-se igualmente dependente da natureza da fonte de nitrogênio, segundo **Schaeffer** e cols. (9).

No presente trabalho, considerando as informações encontradas na literatura, os autores procuraram observar uma possível correlação entre concentração de glicose e o tempo requerido para que células de uma amostra de *Bacillus licheniformis*, em condições de crescimento vegetativo, iniciassem a formação de esporos. A referida amostra é capaz de esporular em meio mineral líquido ou solidificado, contendo  $Mn^{2+}$  após 8-10 dias de incubação, quando se emprega 1000 mg% de glicose como fonte de carbono, **Rabinovitch** (6, 7).

## MATERIAL E MÉTODOS

*Amostra Bacteriana e Preparo do Inóculo* — A amostra 2390 do *B. licheniformis* foi utilizada neste trabalho. A sua manutenção foi feita sob a forma de esporos viáveis, lavados, suspensos em água destilada e conservados em geladeira. Antecedendo a cada experiência, os esporos eram germinados em ágar nutritivo, durante 20 ou 22 horas a 37°C, sendo as formas vegetativas suspensas em água deionizada, onde permaneciam por 15 minutos na temperatura ambiente. Os inóculos foram feitos com pipetas estiradas tipo Pasteur, colocando-se quatro gotas desta suspensão, em cada frasco contendo os meios de experiência.

*Meio Empregado* — Foi utilizado o meio MS 66-A descrito em trabalho anterior (6), porém, modificado pela inclusão dos seguintes componentes:  $Mn^{2+}$  (como  $Mn SO_4 \cdot 4H_2O$ ) — 1.0 mg% e extrato de lêvedo (Difco) — 5,0 mg%. D (+)glicose anidra completou a composição com as seguintes concentrações testadas: 10 mg%; 40 mg%; 80 mg%; 125 mg%; 250 mg%; 500 mg%

e 1000 mg%. A glicose em soluções era adicionada ao restante do meio, proporcionalmente, após esterilização em separado. A inclusão do extrato de lêvedo numa pequena concentração visou abreviar a fase "lag".

*Condições de Cultivo* — O meio experimentado completo foi distribuído em volumes de 100 ml, em frascos erlenmeyer de 250 ml de capacidade, e cada teor de glicose foi repetido em duplicata. Após o inóculo, os frascos eram incubados a 37°C sem agitação.

*Verificação do Crescimento e Esporogênese* — O crescimento bacteriano foi medido em fotocolorímetro e a observação das formas esporuladas foi feita por microscopia de contraste de fase, segundo os procedimentos descritos anteriormente (7).

O início da esporogênese foi considerado, quando se detectou os primeiros estágios da evolução das formas vegetativas para esporos, aqui traduzidos por endósporos, após pesquisas diárias nas culturas.

*Determinação da Glicose* — A glicose inicial (antes do inóculo) e residual, nos diferentes frascos, foi avaliada segundo o método de **Nelson** (5) em cada 5,0 ml do meio empregado para a determinação do crescimento bacteriano.

Antecedendo a cada dosagem, procedeu-se a uma desproteinização baseada em **Somogyi** (8), juntando-se 0,5 ml de NaOH 0,5 M e 0,5 ml de  $Zn SO_4$  0,34 M, centrifugando-se em seguida para se obter um sobrenadante límpido.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados experimentais estão representados nos gráficos (Figuras 1, 2, 3, 4 e 5), onde os valores expressam a média de duas experiências, nas quais cada ponto foi estimado em duplicata, e as setas indicam o tempo no qual se surpreendeu os primeiros endósporos. Quando no meio de cultivo as adições de glicose foram de



10 mg% e 40 mg%, o aparecimento das formas esporuladas foi observado no segundo dia de incubação das culturas, enquanto que a glicose já se encontrava quase totalmente consumida nas primeiras 24 horas, em ambas as concentrações. Contudo, as culturas atingiram a fase estacionária de crescimento somente no terceiro dia de incubação (Fig. 1).

Para as adições de 80 mg% e 125 mg% de glicose, o aparecimento de endósporos foi observado a partir do terceiro dia de incubação e, igualmente, em tempo anterior aos crescimentos máximos das culturas, enquanto que os níveis das concentrações do açúcar não consumido eram de 2,6% do total adicionado, em ambos os casos (Fig. 2).

Aumentando-se a glicose para 250 mg%, as culturas mostraram endósporos no quinto dia de crescimento, o qual atingiu o seu máximo no sexto dia. Neste caso, a glicose já havia sido totalmente consumida no quarto dia (Fig. 3).

Nas experiências efetuadas com 500 mg% e 1000 mg% de açúcar, os primeiros endósporos foram obtidos nos oitavo e nono dias, respectivamente. Para a concentração inicial de 500 mg%, a glicose estava totalmente consumida no quinta dia, enquanto que para a maior concentração do açúcar testado, o início da esporogênese ocorreu no nono dia de cultivo. Nesta época, o açúcar residual apresentou uma concentração média de 8,12% do total adicionado.

Fig. 1

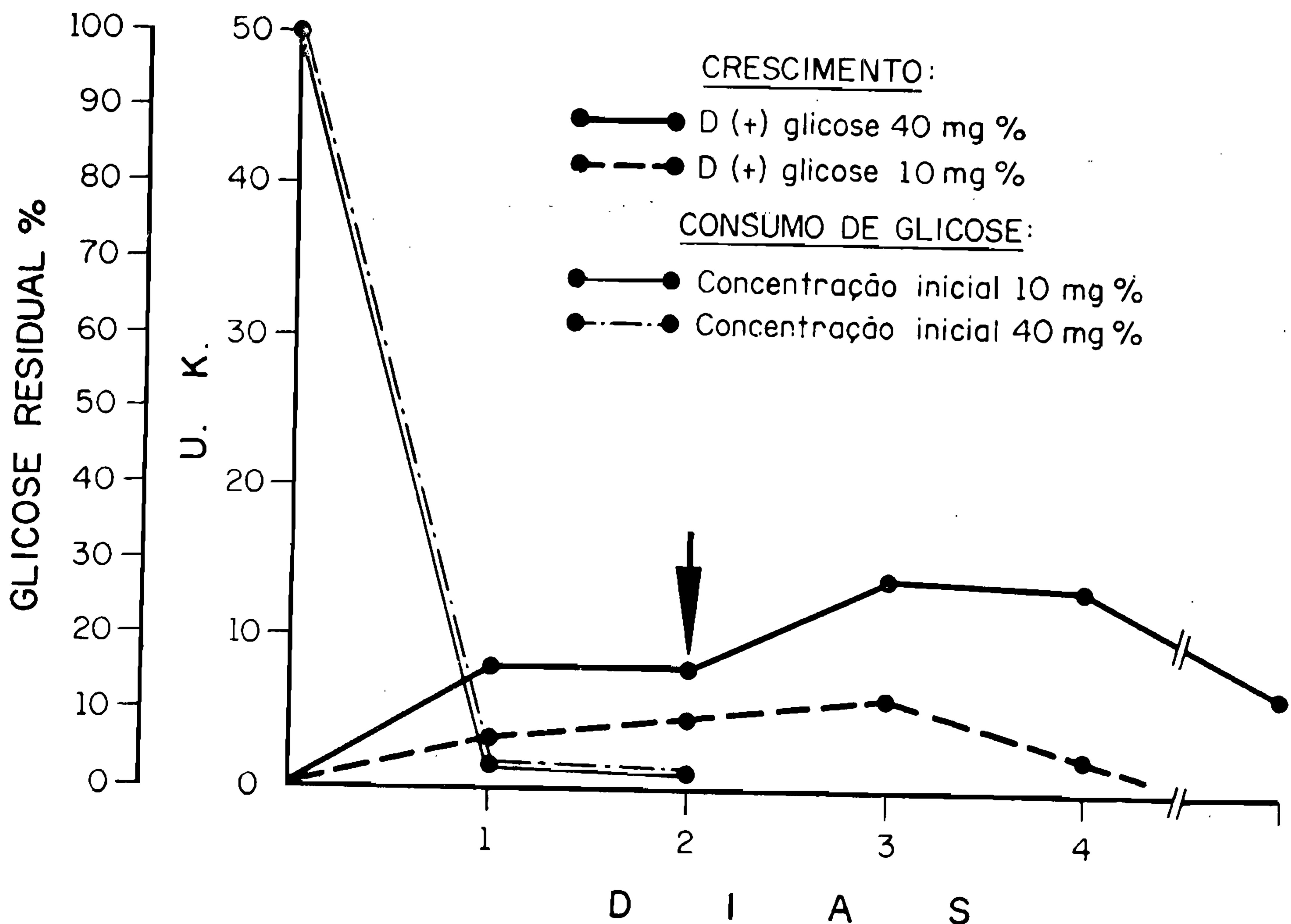


Fig. 2

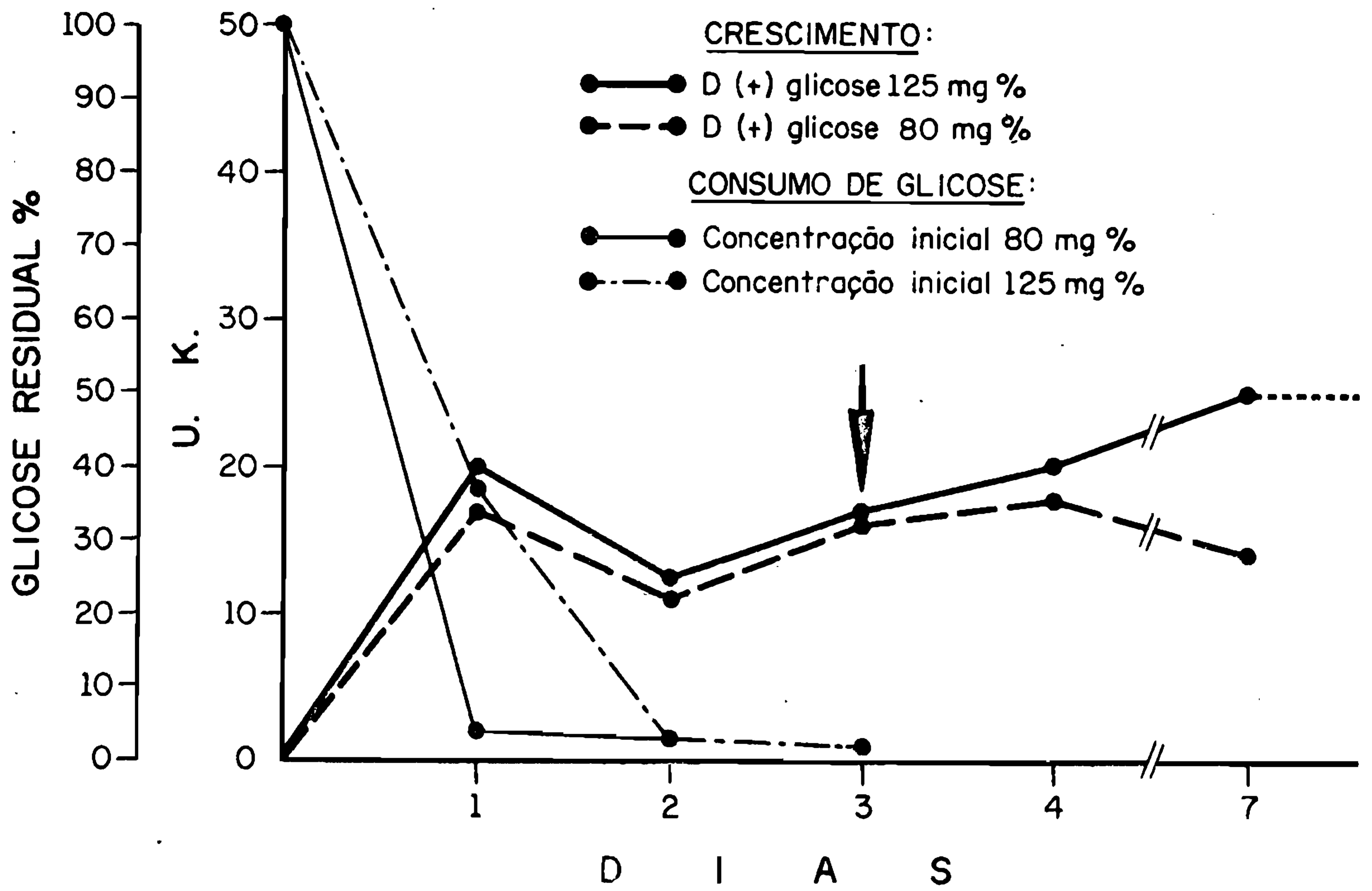


Fig. 3

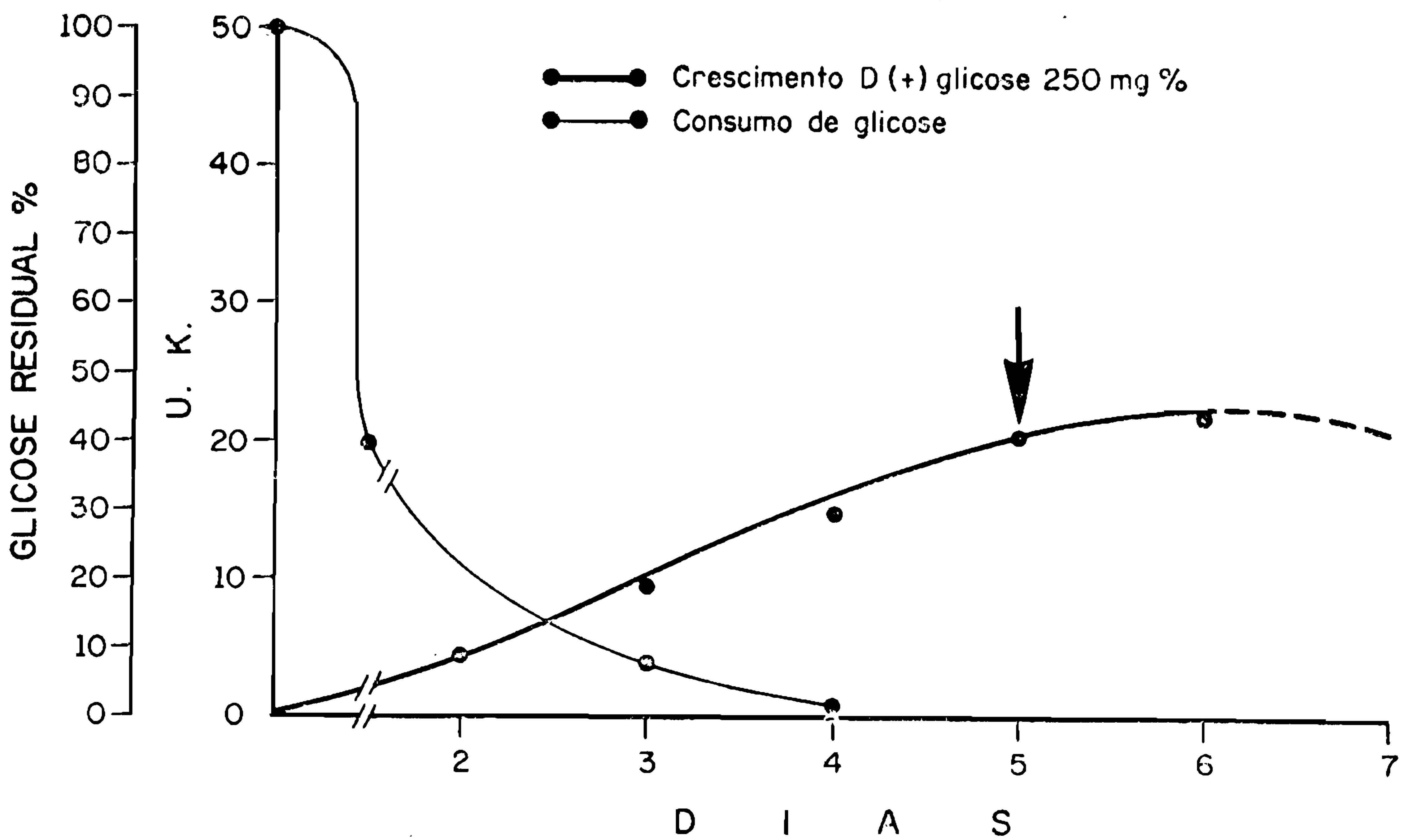


Fig. 4

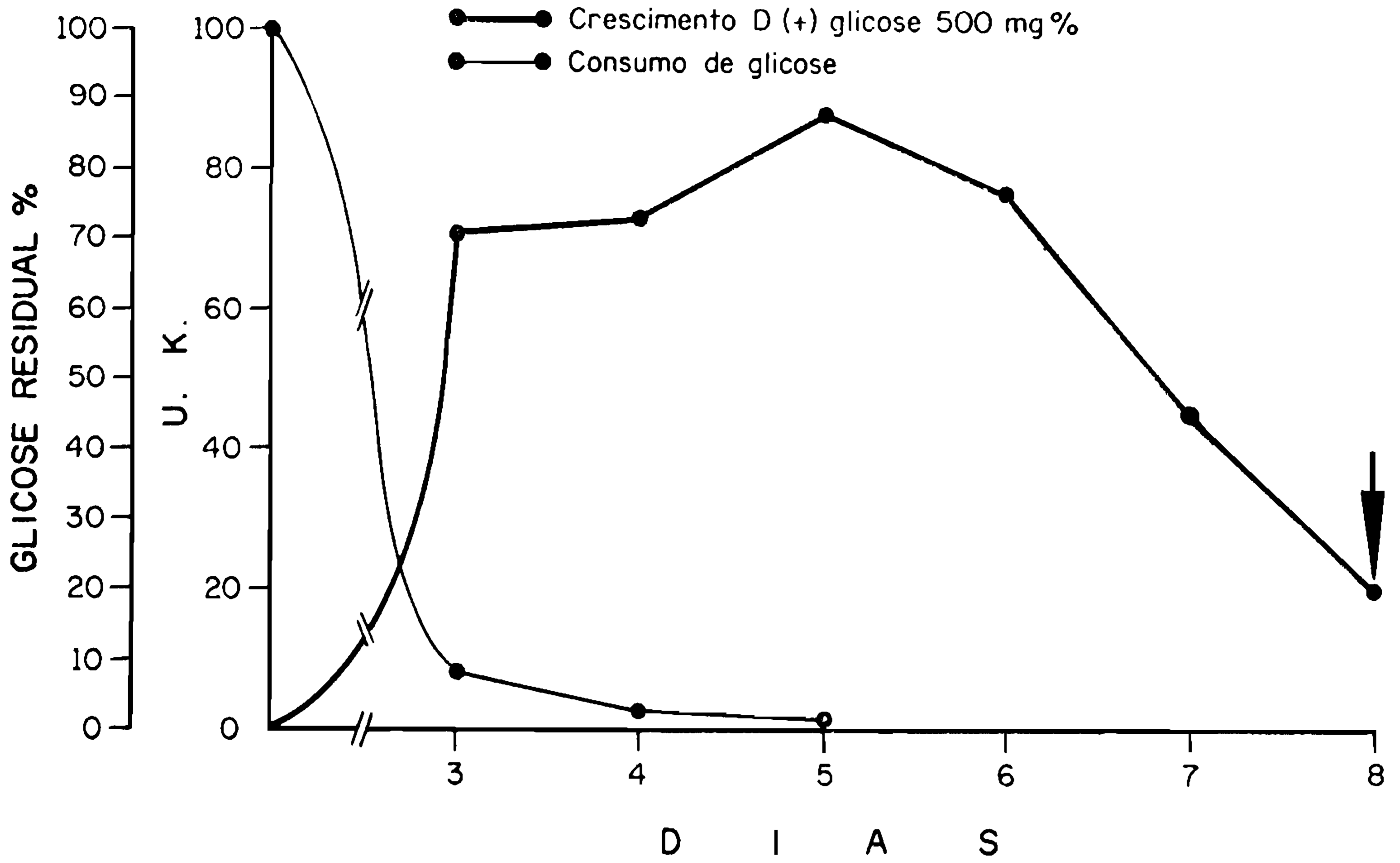
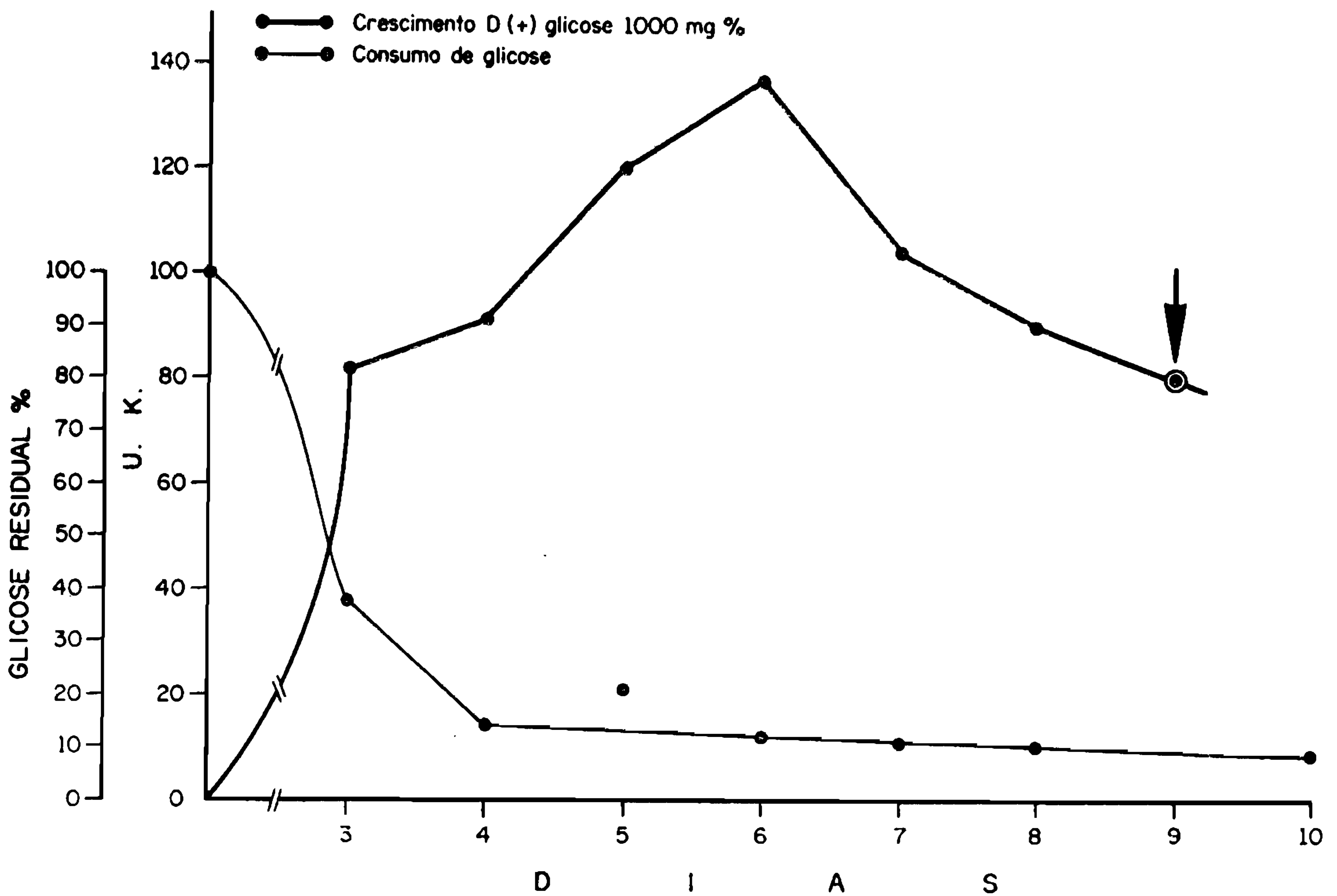


Fig. 5



Uma análise destes resultados sugere que o início da esporogênese pode se dar bem antes de a cultura haver atingido o seu crescimento máximo, embora este tenha ocorrido tempos após as concentrações da glicose haverem atingido valores reduzidos, ou mesmo, após o açúcar haver sido utilizado totalmente.

**Albert** e cols. (1) obtiveram resultados semelhantes, quando estudaram no *B. megaterium* a relação entre crescimento bacteriano e esporulação. Procuraram então explicar, que ambos os comportamentos — crescimento fisiológico e esporulação — encontram-se em equilíbrio durante o metabolismo glicídico, época em que as enzimas responsáveis pela esporulação estavam reprimidas. Entretanto, se este metabolismo tornava-se diminuído, o equilíbrio penderia para a esporulação. Este fato parece ser verdadeiro, se considerarmos a possibilidade da esporulação em meios que não suportam crescimento, e que é conhecido como esporulação endotrófica, **Foster** (3).

Por outro lado, um aspecto interessante observado nos nossos resultados é que, dependendo da concentração da fonte de carbono adicionada ao meio de cultivo, o início da esporogênese pode ocorrer antes ou depois do crescimento máximo bacteriano, como mostram as Figuras 1 e 5, por exemplo. Isto nos leva a supor, também, que o início da esporulação esteja relacionado com a concentração intracelular de um ou mais inibidores catabólicos, elaborados durante o crescimento bacteriano, como foi sugerido por **Schaeffer** et col. (9), e que tais catabólitos poderiam atuar,

possivelmente, como repressores em pelo menos uma enzima específica da esporulação.

Quando recentemente **Freese** e cols. (4) estudaram a influência de diferentes fontes de carbono na esporulação de amostras de *B. subtilis*, a fim de determinarem os repressores da esporulação, estes autores verificaram que vários metabolitos, os quais não podiam ser interconvertidos entre si, determinaram a supressão da esporogênese. Alguns destes metabolitos foram então identificados como sendo, D-glicose-6-fosfato, L-glicerofosfato ou compostos derivados destes como, fosfolipídios e glicerol-ácido teicóico.

#### SUMMARY

After growing bacteria cells of *B. licheniformis* strain 2390 in a semi-synthetic medium, with different glucose concentrations, it was possible to obtain the start of sporogenesis before the culture reached the maximum growth. The glucose concentrations were from 10 mg% to 1000 mg% and endospores were detected after two days in the incubator at 37°C with 10 mg% of glucose, and nine days when with 1000 mg%. The results obtained shown the influence of the carbon source concentrations tested, on the time taked up for the onset of sporogenesis.

#### AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Prof. Gobert Araujo Costa pelas sugestões apresentadas, bem como, ao Sr. José da Silva pela prestimosa cooperação nos trabalhos auxiliares.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 — AUBERT, J. P., MILLET, J. & C. CASTORIADIS-MAY, 1961. Relation entre le taux de croissance et la sporulation chez *Bacillus megaterium*. *Compt. Rend.* 253 (16) 1731-1733.
- 2 — AUBERT, J. P., & J. MILLET, 1961. Influence de l'alimentation carbonée sur le taux de sporulation de mutants de sporulation de *B. megaterium*. *Compt. Rend.*, 253 (17) 1880-1882.
- 3 — FOSTER, J. W., 1956. Morphogenesis in bacteria: some aspects of spore formation. *Quart. Rev. Biol.* 31 (2) 102-118.
- 4 — FREESE, E. OH, Y. K., FREESE, E. B., DIESTERHAFT, M. D. & C. PRASAD, 1972. Suppression of sporulation of *Bacillus subtilis*. In Halvorson, Hanson and Campbell (eds.), *Spores V*. American Society for Microbiology, Bethesda, Md. p. 212-221.
- 5 — NELSON, N., 1944. A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153 (1) 375-380.
- 6 — RABINOVITCH, L., 1970. Nota sobre o efeito indutor do  $Mn^{2+}$  na esporulação de *Bacillus*. *Rev. Bras. Farm.*, 51 (4) 205-208.
- 7 — RABINOVITCH, L., 1971. Estudos sobre a esporulação de uma amostra de *Bacillus*. II — Importância dos ions Mn e Mg na indução do processo. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 69 (2) 121-130.
- 8 — SOMOGYI, M., 1945. Determination of blood sugar. *J. Biol. Chem.*, 160: 69-73.
- 9 — SCHAEFFER, P., MILLET, J. & J. P. AUBERT. 1965. Catabolic repression of a bacterial sporulation. *Proc. N. A. S.*, 54 (3) 704-711.
- 10 — ST. JULIAN, G. & L. A. BULLA JR., 1971. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects IV. Glucose catabolism in *B. larvae*. *J. Bacteriol.*, 108 (2) 828-834.