

# ESTUDO SÔBRE A ESPORULAÇÃO DE UMA AMOSTRA DE *BACILLUS*. II — Importância dos íons Mn e Mg na indução do processo<sup>1\*</sup>

**LEON RABINOVITCH**

Instituto Oswaldo Cruz — Rio de Janeiro - Guanabara  
(Com 3 figuras)

A influência do  $Mn^{2+}$  na indução da esporogênese de uma amostra de bacilo aeróbio, crescida em meio sintético sólido, foi verificada anteriormente (**Rabinovitch, 1970**).

Também foi verificada que a ocorrência da esporulação se dava após o oitavo ou nono dias de incubação, quando no meio sintético era adicionado  $Mn^{2+}$  numa concentração mínima de 1,0 mg%. O  $Ca^{2+}$  sòmente ou combinado com  $Mn^{2+}$  pareceu não favorecer o processo.

A presente comunicação relata os resultados obtidos quando se verificou a possível influência de nove íons metálicos, incluindo o cálcio e o manganês, na indução da esporogênese, e, também, a determinação do teor de glicose residual existente no meio sintético líquido, quando do aparecimento de esporos.

## MATERIAL E MÉTODOS

**AMOSTRA BACTERIANA** — A amostra foi a mesma empregada em trabalho anterior (**Rabinovitch, 1970**). A sua correta identificação, gentilmente efetuada pela Dra. **Ruth E. Gordon**, mostrou tratar-se de *Bacillus licheniformis* agora catalogado em nossa coleção com o número 2 390. A cultura foi estocada em caldo nutriente, sendo quinzenalmente renovada.

**CULTIVO NO MEIO SINTÉTICO** — O meio sintético MS 66-A (**Rabinovitch, 1970**) foi utilizado. Para o inóculo, fazia-se uma suspensão de células colhidas, com agulha, em 20 ml de água deionizada estéril provenientes de um tubo com agar nutriente inclinado, após cresci-

<sup>1</sup> Recebido para publicação a 10 de maio de 1971.

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

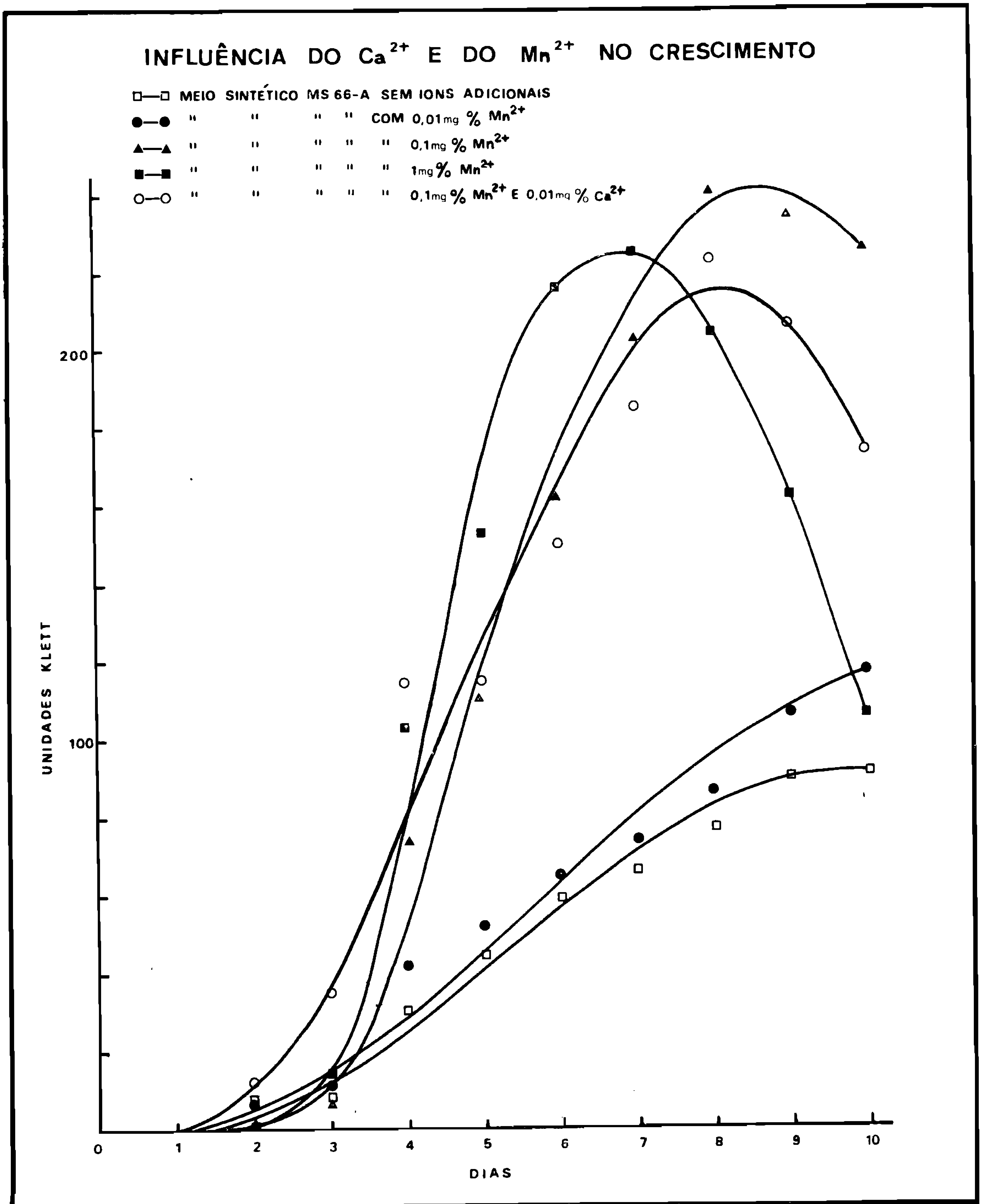


Fig. 1

## INFLUÊNCIA DO $Ca^{2+}$ NO CRESCIMENTO

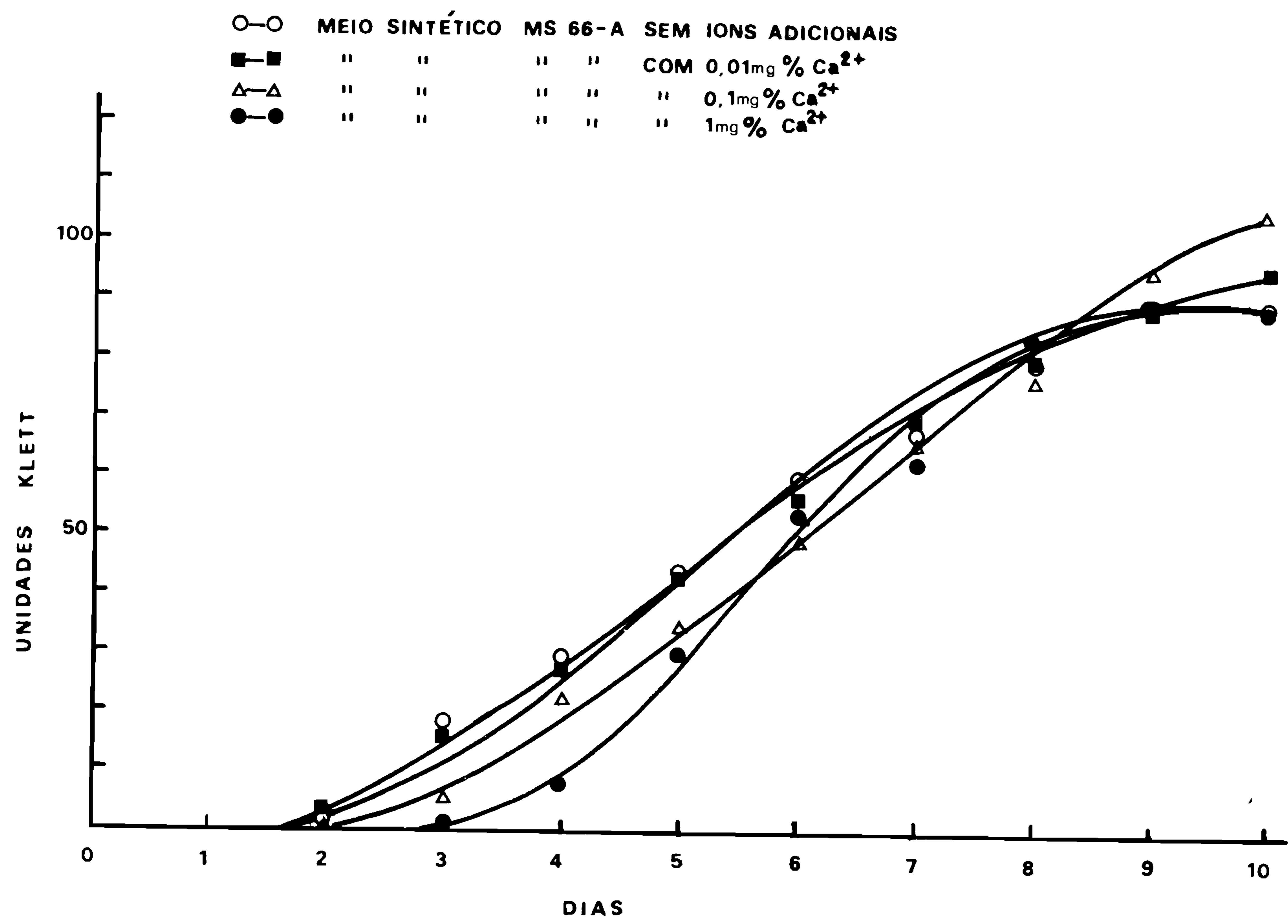


Fig. 2

### INFLUÊNCIA DO $Mn^{2+}$ NO CRESCIMENTO E CONSUMO DA GLICOSE

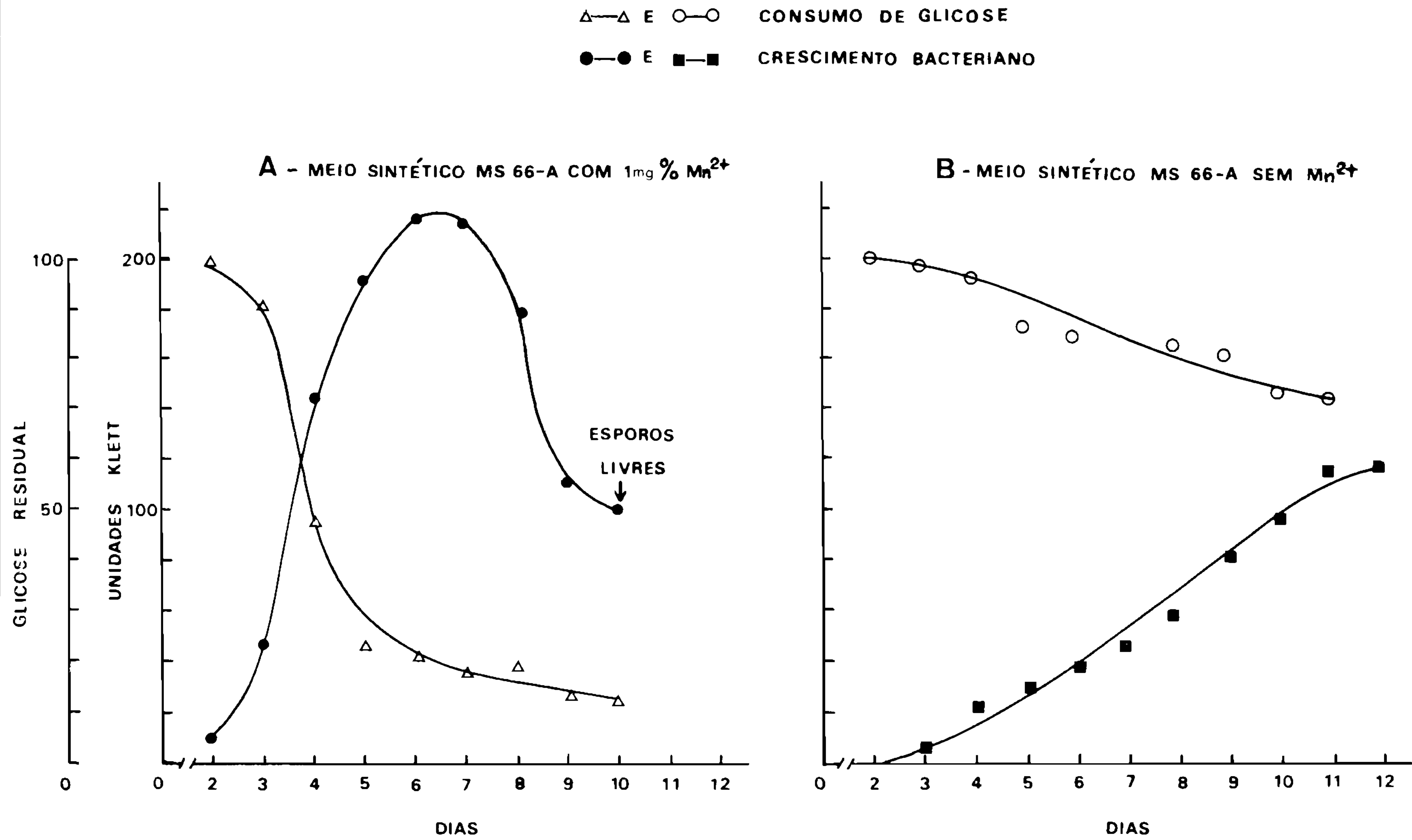


Fig. 3

mento de 18-20 horas a 37° C. Desta suspensão, uma gôta, proveniente de pipeta estirada, era inoculada em tubos de ensaio duplicatas contendo 5,0 ml de meio sintético mais o íon metálico. Duas gôtas eram inoculadas em frascos erlenmeyer de 250 ml de capacidade, contendo 100 ml do meio sintético, nas experiências de crescimento e consumo de glicose. Em todos os casos a temperatura de incubação foi de 37° C. O cultivo foi estático.

**MEDIDA DO CRESCIMENTO** — Foi efetuada em fotocolorímetro Klett-Summerson, empregando-se o filtro verde (540 nm). Após cada 24 horas de incubação fazia-se a leitura em 5,0 ml do meio contido em tubo do fotocolorímetro. As leituras figuram em unidades Klett (U.K.).

**GLICOSE RESIDUAL** — O açúcar foi determinado colorimetricamente segundo Folin-Wu nos 5,0 ml de meio empregado para a medida do crescimento bacteriano, sendo que uma prévia desproteneização foi procedida, juntando-se a cada 5,0 ml do material a dosar 0,5 ml de NaOH 0,5 M e 0,5 ml de ZnSO<sub>4</sub> 0,34 M. No líquido límpido remanescente, após centrifugação, determinou-se a glicose residual.

**ÍONS METÁLICOS TESTADOS** — Os sais de Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, B<sup>3+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup>, empregados para teste no MS 66-A, foram todos reagentes analíticos, sendo respectivamente: CaCl<sub>2</sub> anidro; FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O; MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub> · 10 H<sub>2</sub>O; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> · 5H<sub>2</sub>O; CoCl<sub>2</sub> · 6H<sub>2</sub>O; ZnSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O; e CuSO<sub>4</sub> · 5H<sub>2</sub>O.

**ESPORULAÇÃO** — Para a verificação do aparecimento de esporos e endósporos efetuou-se o contróle da cultura por microscopia de fase. O material a examinar era colhido em duas tomadas, com auxílio de uma alça com 4 mm de diâmetro, e depositado sôbre lâmina, cobrindo-se, em seguida, com lamínula de 20 × 20 mm. Cada observação foi repetida duas vêzes com nova amostra de material.

## RESULTADOS

Os resultados constantes da Tabela I indicam a necessidade da presença dos íons manganês ou magnésio no meio sintético MS 66-A, para que ocorra a esporogênese da amostra bacteriana estudada. Os íons Ca<sup>2+</sup>, Fe<sup>2+</sup>, Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mo<sup>6+</sup>, Zn<sup>2+</sup> e B<sup>3+</sup> não mostraram influência no processo, sendo que Co<sup>2+</sup> e Cu<sup>2+</sup> foram tóxicos, já nas concentrações de 0,01 mg%, inibindo o crescimento. O aparecimento de esporos e endósporos foi observado no 10.<sup>o</sup> dia de crescimento da cul-



tura quando o  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  encontravam-se nas concentrações de 1,0 mg%. Com uma concentração mais baixa, 0,1 mg% de  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ , pôde-se detectar no meio sintético mais esporos que endósporos com 14 dias de crescimento, enquanto que nos meios contendo 0,01 mg% de  $Mn^{2+}$  e  $Mg^{2+}$  o mesmo não se observou, ainda que com tempos maiores de cultivo.

Os íons Ca e Mn são destacadamente citados na literatura (Donnellan & cols., 1964; Portellada, 1959; Grelet, 1946b; Grelet, 1950; Church & cols., 1954; Curran & Evans, 1954) dentre outros metais necessários à esporogênese bacteriana. Como o  $Mn^{2+}$ , por si só, mostrou-se capaz de induzir o processo, o mesmo não ocorrendo com a  $Ca^{2+}$  nas experiências de crescimento anteriores, procuramos verificar os efeitos de uma combinação de ambos, na curva de crescimento da nossa amostra de *B. licheniformis*; a figura 1 ilustra os resultados obtidos.

Depois de uma "lag" variável, de 2 a 3 dias, verifica-se a presença marcante do  $Mn^{2+}$  determinando uma melhor utilização das fontes de C e N, quando nas concentrações de 0,1 mg% e 1,0 mg%. A combinação de  $Mn^{2+}$  e  $Ca^{2+}$ , nas concentrações respectivas de 0,1 mg% e 0,01 mg% não pareceu melhorar o crescimento, o mesmo ocorrendo quando  $Mn^{2+}$  encontra-se a 0,01 mg%.

A adição de cálcio ao meio sintético não interfere no crescimento (figura 2) quando na concentração de 0,01 mg%. Aumentando-se para 0,1 mg% e 1,0 mg% ocorre um retardo no início do crescimento, particularmente nesta última concentração, quando ainda, com 4 dias, o crescimento é bastante escasso. Experiências em que se empregou  $Ca^{2+}$  a 3,0 mg% obteve a inibição total do crescimento. E mesmo após 20 dias de observação das culturas crescidas o  $Ca^{2+}$  não foi capaz de induzir a esporogênese. Quando se procurou correlacionar a curva de crescimento bacteriano, glicose residual e a época em que ocorria a esporulação, quando se adiciona 1,0 mg% de  $Mn^{2+}$  no MS 66-A, obteve-se as curvas que se encontram na figura 3. O aparecimento de esporos e endósporos se deu no 10.º dia de crescimento, quando ao mesmo tempo a concentração da glicose era de aproximadamente 12,5% da concentração inicial. O mesmo se obteve quando foi tentada a adição de 10,0 mg% de  $Mn^{2+}$ . Com observações diárias, durante 20 dias, quanto à possível esporulação em culturas isentas de  $Mn^{2+}$  adicional, não se pôde observar indício de formação de esporos.

## DISCUSSÃO

A exigência da adição de diferentes íons metálicos em conjunto aos meios de cultura para estimular a esporogênese em bacilos aeróbios é amplamente conhecida. Contudo, a amostra de *Bacillus licheniformis* estudada, quando cultivada no meio MS 66-A, de composição bastante simples, é capaz de esporular quando  $Mn^{2+}$  ou então  $Mg^{2+}$  encontra-se presente. O exato papel destes íons na indução da esporogênese ainda não foi explicado, embora se saiba que ambos participam de vários sistemas enzimáticos (Dixon & Webb, 1964), um podendo substituir o outro em alguns deles.

Recentemente Linnett & Tipper, 1970, relataram a presença de enzimas no extrato de células de *Bacillus sphaericus* responsáveis pela síntese de peptidoglicanas e córtex dos esporos, sendo algumas dependentes de ATP,  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$ . Apesar de vários autores assinalarem a adição de  $Ca^{2+}$  no meio de cultivo, como fator capaz de aumentar significativamente o número de esporos livres, quando combinado com  $Mn^{2+}$  (Donnellan & cols., 1964; Church & cols., 1954), a nossa amostra pareceu não confirmar este fato (Rabinovitch, 1970), embora se saiba que este íon é encontrado no esporo sob a forma de dipicolinato de cálcio.

TABELA I

CRESCIMENTO E ESPORULAÇÃO DO BACILLUS LICHENIFORMIS 2390 NO MEIO SINTÉTICO MS 66-A NA PRESENÇA DE ÍONS METÁLICOS EM TRÊS NÍVEIS DE CONCENTRAÇÃO

	0,01 mg%		0,1 mg%		1,0 mg%	
Ca <sup>+2</sup>	25,5&	—	30	—	57	—
Fe <sup>+2</sup>	30	—	35,5	—	77,5	—
Mg <sup>+2</sup>	30	—	107,5	(*)	178	+
Co <sup>+2</sup>	0	—	0	—	0	—
Cu <sup>+2</sup>	0	—	0	—	0	—
Mn <sup>+2</sup>	20,5	—	155	(*)	183,5	+
Mo <sup>+6</sup>	43	—	51	—	30	—
Zn <sup>+2</sup>	30	—	30,5	—	20	—
B <sup>+3</sup>	20,5	—	40,5	—	46	—
Sem adição	30,5	—	30,5	—	30,5	—

& = Média do crescimento após 15 dias, em U.K. — = Ausência de esporulação.  
 + = Endósporos e esporos no 10.º dia de incubação. (\*) = Endósporos após 14 dias de incubação. O = ausência de crescimento.

Com os dados aqui obtidos é possível admitir-se que o  $Mn^{2+}$ , e, provavelmente também o  $Mg^{2+}$ , atuem em fases distintas, estimulando o metabolismo e a reprodução celular bacteriana, o que é mostrado na curva de crescimento (Figura 1) e, após a fase estacionária do crescimento, quando a maior parte da glicose foi consumida e inicia-se a esporogénia, aí participando dos sistemas enzimáticos responsáveis pela síntese de proteínas e peptidoglicanas da córtex e capa do esporo (Linnett & Tipper, 1970; Spudich, 1970).

Por outro lado, afigurando-se o ácido didicolínico (DPA) indispensável à termoresistência do esporo (Church & Halvorson, 1959) e sendo somente nêle encontrado (Powell, 1953; Bach & Gilvarg, 1966), pode-se, sugerir, também, a exigência do  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  com ativador da síntese de DPA. Possivelmente tendo o ácido dihidro-didicolínico como precursor, se considerarmos a via de formação da lisina a partir do ácido aspártico, semelhante à verificada em *E. coli* (Yugari & Gilvarg, 1965; Aronson & cols., 1967) ou em *B. megaterium* e *B. subtilis* (Bach & Gilvarg, 1966; Chasin & Szulmajster, 1967).

## RESUMO

Foi verificado que a esporogénese de *B. licheniformis*, amostra 2390, somente ocorre quando  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  estão presentes, em meio sintético, nas concentrações de 0,1 mg% ou 1,0 mg%. Ambos os íons estimulam o crescimento, e no 14.º dia de incubação a cultura apresenta endósporos e esporos livres, quando a concentração dos metais é de 0,1 mg%. Aumentando-se o teor destes íons para 1,0 mg%, esporos livres são obtidos no 10.º dia de incubação.

Outros íons testados como,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $B^{3+}$  não mostraram influir no processo.  $Co^{2+}$  e  $Cu^{2+}$  foram tóxicos, inibindo o crescimento. O  $Ca^{2+}$  pareceu não interferir na esporogénese, mas foi capaz de inibir o crescimento na concentração de 3 mg%.

O aparecimento de endósporos e esporos livres, no meio, quando  $Mn^{2+}$  encontra-se a 1,0 mg%, coincide com um teor de glicose correspondente a cerca de 12,5% da concentração inicial do açúcar. O autor sugere, também, a possibilidade do  $Mn^{2+}$  ou  $Mg^{2+}$  ativar a síntese do ácido dipicolínico.



## SUMMARY

It was verified that sporogenesis in *B. licheniformis*, strain 2390, occurs only when  $Mn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  is present in a synthetic medium in the rates of 0,1 mg% or 1,0 mg%.

Both these ions stimulate the growth of the culture and after 14 days of incubation, endospores and free-spores were found in the medium, in which metals concentrations were of 0,1 mg%. Using higher concentrations of  $Mn^{2+}$  or  $Mg^{2+}$  such as 1,0mg%, free-spores were obtained after 10 days incubation.

Other ions tested like,  $Ca^{2+}$ ,  $Fe^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mo^{6+}$ ,  $Zn^{2+}$  and  $B^{3+}$  did not influence the process.  $Co^{2+}$  and  $Cu^{2+}$  were toxic, inhibiting culture's growth. The ion  $Ca^{2+}$  seemed not to interfere in sporogenesis, but was able to inhibit culture's growth at a concentration of 3,0 mg%.

Correlation between the rate of glucose and the time of sporogenesis of *B. licheniformis* was found in strain 2390, when  $Mn^{2+}$  was 1,0 mg%. The critical glucose concentration was about 12,5% of the total amount added initially to the culture media.

The author also suggests the possibility of dipicolinic acid synthesis being activated by  $Mn^{2+}$  and  $Mg^{2+}$ .

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a Dra. R. E. GORDON do Instituto de Microbiologia da Retgers University — The State University of New Jersey, por haver gentilmente identificado a nossa amostra como sendo de *Bacillus licheniformis*. Agradecemos, também, ao Dr. F. B. Ubatuba pelas sugestões apresentadas.

## REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

- ARONSON, A. I.; E. HENDERSON & A. TINCHER, 1967. — Participation of the lysine Pathway in Dipicolinic Acid synthesis in *B. cereus* T. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 26: 454-460.
- BACH, M. L. & C. GILVARG, 1936. — Biosynthesis of Dipicolinic Acid in Sporulating *B. megaterium*. *J. Biol. Chem.*, 240: 4710-4710,
- CHASIN, L. A. & J. SZULMAJSTER, 1967. — Biosynthesis of Dipicolinic Acid in *B. subtilis*. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 29: 648-654.
- CHURCH, B. D.; H. HALVORSON & H. O. HALVORSON, 1954. — Studies on Spore germination; its independence from alamine racemase activity. *J. Bact.*, 68: 393-399.
- CHURCH, B. D. & H. HALVORSON, 1959 — Dependence of the heat resistance of Bacterial endospores on their dipicolinic acid content. *Nature*, 183: 124-125.
- CURRAN, H. R. & F. R. EVANS, 1954. — The influence of iron or manganese upon the formation of spores by mesophilic aerobes in fluid organic media. *J. Bacteriol.*, 67: 489-497.
- DIXON, M. & E. C. WEBB, 1964. — *Enzymes*, Longmans, Green and Co. Ltd., London.
- DONNELLAN, J. E., E. H. BAGS & H. S. LEVINSON, 1964. — Chemically defined, synthetic media for sporulation and for germination and growth of *B. subtilis*. *J. Bacteriol.*, 87: 332-336.
- FOLIN, O. & H. WU, 1920. — A simplified and improved method for determination of sugar. *J. Biol. Chem.*, 41: 367-374.
- GRELET, N., 1946b. — Culture du *B. megatherium* en milieu synthétique glucose. *Ann. Inst. Pasteur*, 72: 153-155.
- GRELET, N., 1950. — Culture d'une souche de *B. megatherium* en milieu synthétique glucose sporulation par penurie de zinc en presence de calcium. *Ann. Inst. Pasteur*, 78: 423-424.
- LINNETT, P. E. & D. J. TIPPER, 1970. — Synthesis of spore and vegetative peptidoglycans in sporulating *B. sphaericus*. *Bacteriol. Proc.*, G. 74 pág. 26.
- PORTELLADA, P. C. L., 1959. — Estudos sobre esporogênese. I - Formação de esporos e curva de crescimento. *An. Microbiol.*, 7: 63-70.
- FOWELL, J. F. & R. E. STRANGE, 1953 — Biochemical changes occurring during the germination of bacterial spores. *Biochem. J.*, 54: 205-209.
- RABINOVITCH, L., 1970. — Nota sobre o efeito indutor do  $Mn^{2+}$  na esporulação de *Bacillus*. *Rev. Bras. Farm.* 4: 205-208.
- SPUDICH, J. A., 1970. — Biochemical studies of spore core and coat protein synthesis. *J. Appl. Bact.* 33: 25-33.
- YUGARI, Y. & C. GILVARG, 1965. — The condensation step in Diaminopimelate synthesis. *J. Biol. Chem.* 240: 4710-4716.