

# INVESTIGAÇÕES SOBRE O ACÚMULO ENDOMICELAR DE FÓSFORO PELO *Streptomyces aureofaciens* EM MEIO QUÍMICAMENTE DEFINIDOS.

S. HILST RIBEIRO\*  
R. MOLINARI\*\*

**RESUMO:** Foram estudadas as condições que levam o *Streptomyces aureofaciens* a acumular fósforo endomicelar em meios de cultivo quimicamente definidos. A principal variável condicionadora do processo é a limitação da disponibilidade de nitrogênio assimilável nos meios.

**UNITERMOS:** Polifosfato microbiano; *Streptomyces aureofaciens*.

## INTRODUÇÃO

Fosfato polimerizado acumula-se em espécie microbianas, na forma de grânulos metacromáticos (volutina), tanto em microrganismos aeróbicos como anaeróbicos, possivelmente envolvendo reação de transforilação reversível entre o polímero inorgânico e trifosfato de adenosina (ATP) e em condições de cultivo não satisfatoriamente elucidadas (1).

A presença de polifosfato foi detectada em bactérias, algas, levedos e fungos (2). Na bactéria filamentosa *Streptomyces aureofaciens* a função do fosfato polimérico foi relacionada à produção de clortetraciclina (3).

Supõe-se que as funções dos grânulos de fosfato polimérico sejam a de reserva de energia (1) e de reserva de fosfato (4).

O objetivo deste trabalho foi investigar relações entre nutrientes e condições que levam linhagem não produtora de te-

tracilinas do *S. aureofaciens* ao acúmulo endomicelar de fosfato, em meios de cultura quimicamente definidos.

## MATERIAIS E MÉTODOS

**Microorganismo** — *Streptomyces aureofaciens*, linhagem NRRL — 1286

**Inóculos** — Constituídos por culturas do microrganismo, crescido por 40 horas, em meio, quimicamente definido, de composição: Sacarose 50,0 g/l; (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,030M; K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0,0075M; CaCO<sub>3</sub> 4,0 g/l; MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,20 g/l; FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,010 g/l; ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,010 g/l; MnSO<sub>4</sub>·H<sub>2</sub>O 0,010 g/l e CoSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0,005 g/l (\*), nas condições especificadas, abaixo, em técnica de cultura.

Após o crescimento a cultura é homogenizada, em condições assépticas, em liquidificador de copo de alumínio, transferida, em porções de 30 ml, para frascos

\* Bolsista da FAPESP.

\*\* Professor Titular de Bioquímica junto ao Departamento de Química Tecnológica e de Aplicação do Instituto de Química de Araraquara, UNESP.

(\*) Estes últimos cinco componentes minerais serão denominados "Minerais menores" e referidos, com esse nome e nas concentrações do meio de inóculo, nos demais meios do trabalho.



estéreis de 50 ml (tipo "Penicilina"), fechados e congelados a 20°C abaixo de zero, até o momento de uso.

**Técnica de cultivo** — Utilizou-se a técnica de cultura submersa descontínua, na qual o crescimento se dá em frascos de Erlenmeyer submetidos à rotação em mesa agitadora, cuja plataforma oscilante descreve círculos de cerca de 2,5 cm de diâmetro a 250 rpm. Utilizou-se frascos de 125 ml com 20,0 ml de meio, semeados com 1,0 ml de inóculo. O fechamento dos frascos foi feito com placas de espuma de poliuretano de 1 cm de espessura, presas aos frascos por elásticos. A temperatura foi de 29-30°C, obtida pelo emprego de câmara termostata. A esterilização dos meios e materiais foi feita pelo aquecimento, em autoclave, por 20 minutos efetivos a 121°C. Se necessário, após autoclavagem, o pH dos meios foi ajustado a 6,5-7,0 em condições estéreis.

As experiências foram constituídas por duplicatas, isto é, todos os parâmetros são constituídos pelas médias obtidas com dois frascos preparados e analisados paralela e independentemente.

As condições de assepsia foram obtidas pelo emprego de capela de fluxo laminar dotada de filtro absoluto.

**Avaliação do crescimento** — O crescimento foi avaliado pela determinação de massa seca de micélio lavado. Os agregados micelares, da bactéria filamentososa, foram homogenizados pela desagregação das culturas totais em homogenizadores de vidro, com pistilo de "Teflon", tipo Potter. Amostras (4 a 10 ml de culturas homogenizadas) foram lavadas, em tubos de centrifuga cônica com HC10<sub>4</sub>, na concentração final 0,15M, seguidas de duas lavagens com água destilada. As massas secas foram obtidas pelo aquecimento a 96-98°C em estufa, por 16 horas. Os resultados foram expressos em miligramas de micélio seco por mililitro da cultura analisada.

**Fracionamento de micélio em frações sub-celulares** — Micélio, lavado com HC1 0,05N e água destilada, analogamente ao descrito na lavagem de micélio para massa seca, foi desintegrado, por moagem mecânica em almofariz de porcelana, resfriado a -20°C, de maneira a se utilizar a própria massa congelada como abrasivo. Logo após a fusão do gelo o processo foi repetido mais duas vezes. A massa desintegrada foi suspensa em água e fracionada por centrifugação a 20.000 x g por 30 minutos, em: "extrato micelar solúvel" e "resíduo". Parte do extrato solúvel foi precipitado pela adição de ácido tricloroacético a 0,92M e separado por centrifugação, em: "extrato desproteínizado" e "resíduos da desproteínização". Ao contrário do "extrato micelar", o "desproteínizado" não apresentou absorção ótima em 260 e 280 nm. Todas as frações foram referidas, para análise, ao seu conteúdo original de micélio seco.

**Dosagens de fósforo** — As dosagens de fósforo total em micélio integral foram realizadas em micélio lavado com HC10<sub>4</sub> 0,05N e água, analogamente ao descrito no preparo de micélio para massa seca. Aliquotas convenientes, de suspensão do mesmo em água, foram submetidos ao processo de digestão com ácido sulfúrico e água oxigenada, conforme descrito na referência (5) e tiveram seu conteúdo de fósforo dosado pelo método de Fiske e Subbarow, descrito na referência (6). As frações do item anterior foram igualmente digeridas e dosadas em seus teores de fósforo total. Os resultados foram expressos em microgramas de fósforo por mililitro da cultura original, no primeiro caso ou em termos da razão miligramas de fósforo por grama de micélio seco, calculados, em ambos os casos.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela I contém os resultados de crescimento do *S. aureofaciens* e dos teo-

res de fósforo micelar em vários meios de cultura, obtidos ao se procurar uma primeira correlação entre esses teores com a composição dos meios.

TABELA I — Crescimento do *S. aureofaciens* e acúmulo endomicelar de fósforo em meios complexos e quimicamente definidos.

| COMPONENTES (*)  | MEIOS |      |      |      |      |      |
|--|-------|------|------|------|------|------|
|  | MC1   | MC2  | MC3  | MC4  | MD1  | MD2  |
| Sacarose (g/l)   | 50,0  | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> ) | 30,0  | -    | -    | 30,0 | 30,0 | 30,0 |
| Extr. de levedo (g/l)  | 6,0   | 6,0  | 6,0  | 6,0  | -    | -    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> )                 | 7,5   | 7,5  | 15,0 | 15,0 | 7,5  | 15,0 |
| CaCO <sub>3</sub> (g/l)  | 2,0   | 2,0  | 2,0  | 2,0  | 2,0  | 2,0  |
| CRESCIMENTO (40h) (mg/ml)  | 6,8   | 3,1  | 3,1  | 6,0  | 5,0  | 5,1  |
| FÓSFORO TOTAL (µm/ml)  | 144   | 138  | 113  | 104  | 126  | 126  |
| RAZÃO P/MASSA (mg/g)   | 21    | 45   | 36   | 17   | 25   | 25   |

(\*) — Além dos componentes indicados todos os meios contêm "minerais menores", como definido em materiais e métodos.

Observa-se que o *S. aureofaciens* pode acumular, nos meios investigados, de 1,7 a 4,5% de fósforo total em sua massa micelar. O exame citológico das hifas de micélio, obtidas com os meios MC1 e MC2 por técnica de coloração específica para grânulos metacromáticos (7), mostrou a ocorrência de volutina em ambos, com nitida presença qualitativa mais intensa para o micélio crescido no meio MC2. A presença de sulfato de amônio,

nos meios com extrato de levedo, reduz o fósforo acumulado, enquanto que, em todos os tipos de meios, o aumento do fósforo inorgânico oferecido não interfere no acúmulo endomicelar do elemento.

TABELA II — Distribuição do fósforo total nas frações de micélios derivados dos meios MC1, MC2 e MC4.

| FRAÇÕES                  | MICÉLIOS       |     | Micélio MC2    |     | Micélio MCI    |     | Micélio MC4    |     |
|--------------------------|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|----------------|-----|
|                          | Fósforo (mg/g) | %   | Fósforo (mg/g) | %   | Fósforo (mg/g) | %   | Fósforo (mg/g) | %   |
| Micélio integral         | 36,8           | 100 | 21,2           | 100 | 17,3           | 100 | 17,3           | 100 |
| Extrato micelar solúvel  | 23,9           | 83  | 11,0           | 52  | 6,3            | 37  | 6,3            | 37  |
| Resíduo da extração      | 12,0           | 15  | 10,0           | 47  | 11,0           | 63  | 11,0           | 63  |
| Extrato micelar          | 44,5           | 100 | -              | -   | 6,3            | 100 | 6,3            | 100 |
| Extrato desproteínizado  | 36,8           | 65  | -              | -   | 3,9            | 62  | 3,9            | 62  |
| Resíduo da desproteíniz. | 6,4            | 33  | -              | -   | 2,4            | 38  | 2,4            | 38  |

Nota-se uma desigual distribuição da relação entre extrato solúvel e resíduo nas três amostras de micélio. Quanto mais rico o micélio, maior é a proporção de fósforo solúvel e menor a de fósforo insolúvel. É possível que nos micélios mais ricos seja maior a proporção de fosfatos de baixa polimerização. A análise da distribuição desse material entre a fração livre de proteínas e o resíduo da desproteínização, tanto no caso do micélio mais rico, como no mais pobre, mostra que 60 a 65% do fósforo, aí presente, é solúvel em ácido tricloroacético 0,92M, provavelmente, de baixa polimerização e, seguramente, distinto de ácidos nucleicos.



A Tabela III mostra a correlação inversa entre a concentração inicial de nitrogênio assimilável e fósforo acumulado pelo *S. aureofaciens*. Na tabela estão apresentados quatro meios quimicamente de-

finidos, com sulfato de amônio variando de  $2,5 \times 10^{-3}M$  a  $2,0 \times 10^{-2}M$  e outros quatro com L-asparagina, variando no mesmo intervalo.

TABELA III — Correlação entre fósforo total acumulado em micélio e concentração da fonte nitrogenada, em meios definidos quimicamente.

| COMPONENTES(*)   | MEIOS | MD3  | MD4  | MD5  | MD6  | MD7  | MD8  | MD9  | MD10 |
|--|-------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| Sacarose (g/l)   | 50,0  | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> ) | 20,0  | 10,0 | 5,0  | 2,5  | —    | 20,0 | 10,0 | 5,0  | 2,5  |
| L-Asparagina (M x 10 <sup>3</sup> )                                    | —     | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> )                 | 2,0   | 2,0  | 2,0  | 2,0  | —    | —    | —    | —    | —    |
| CaCO <sub>3</sub> (g/l)  | —     | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    | —    |
| CRESCIMENTO (48h) (mg/ml)  | 4,6   | 2,5  | 1,4  | 0,8  | 4,5  | 2,3  | 1,3  | 0,9  | —    |
| FÓSFORO TOTAL (µg/ml)  | 140   | 94   | 72   | 58   | 122  | 62   | 52   | 41   | —    |
| RAZÃO P/MASSA (mg/g)   | 30    | 38   | 51   | 73   | 27   | 27   | 40   | 46   | —    |

(\*) — Além dos componentes indicados todos os meios contêm "minerais menores", como definido em materiais e métodos.

A correlação inversa é nítida para ambas as fontes nitrogenadas, e como seria esperável, o crescimento microbiano é proporcional à disponibilidade de nitrogênio, essencial à biossíntese de macromoléculas fundamentais. A carência nitrogenada é estímulo marcante para o acúmulo endomicelar de fósforo, sugerindo um desvio da energia utilizável nas biossínteses de macromoléculas nitrogenadas, para o acúmulo de fósforo polimerizado, como reserva, da energia não utilizada. A não necessidade de carbonato de cálcio nos meios L-asparagina, ao contrário dos meios com sulfato de amônio, nos quais o carbonato é essencial à manutenção de pH favorável ao crescimento, bem como a lavagem prévia do micélio com ácido perclórico exclui a possibilidade de falsos resultados, que poderiam ser atribuídos à presença de fosfatos alcalino-terrosos, insolúveis, contaminando o micélio analisado.

A tabela IV contém os resultados da substituição da sacarose pela maltose, em meios com sulfato de amônio e da substituição do sulfato de amônio por outros compostos nitrogenados, utilizáveis, em meios com sacarose, sobre o acúmulo de fósforo pela bactéria.

TABELA IV — Relação entre fósforo acumulado pelo *S. aureofaciens* e a natureza da fonte nitrogenada e da fonte de carbono e energia.

| COMPONENTES(*)   | MEIOS | MD5  | MD9  | MD11 | MD12 | MD13 |
|--|-------|------|------|------|------|------|
| Sacarose (g/l)   | 50,0  | 50,0 | 50,0 | 50,0 | 50,0 | —    |
| Maltose (g/l)  | —     | —    | —    | —    | —    | 50,0 |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> ) | 5,0   | —    | —    | —    | —    | 5,0  |
| L-Asparagina (M x 10 <sup>3</sup> )                                    | —     | 5,0  | —    | —    | —    | —    |
| Uréia (M x 10 <sup>3</sup> )   | —     | —    | 5,0  | —    | —    | —    |
| KNO <sub>3</sub> (M x 10 <sup>3</sup> )                                | —     | —    | —    | 10,0 | —    | —    |
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (M x 10 <sup>3</sup> )                 | 7,5   | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  | 7,5  |
| CaCO <sub>3</sub> (g/l)  | 2,0   | 2,0  | —    | —    | —    | 2,0  |
| pH final do sobrenadante da cultura                                    | 5,0   | 4,9  | 4,7  | 3,7  | —    | 5,2  |
| CRESCIMENTO (48h) (mg/ml)  | 1,9   | 2,0  | 1,2  | 1,0  | —    | 1,2  |
| FÓSFORO TOTAL (µg/ml)  | 89    | 80   | 46   | 45   | —    | 35   |
| RAZÃO P/MASSA (mg/g)   | 47    | 40   | 38   | 45   | —    | 29   |

(\*) — Além dos componentes indicados todos os meios contêm "minerais menores", como definido em materiais e métodos.

TABELA V — Curva de crescimento do *S. aureofaciens* e de acúmulo de fósforo micelar no meio quimicamente definido MD5.

| TEMPO (h) | Crescimento (mg/ml) | FÓSFORO TOTAL (µg/ml) |    | Razão (mg/g) |
|-----------|---------------------|-----------------------|----|--------------|
|           |                     | —                     | —  |              |
| 0         | 0,7                 | 2                     | 3  | —            |
| 16        | 1,3                 | 25                    | 19 | —            |
| 24        | 1,4                 | 38                    | 27 | —            |
| 48        | 1,7                 | 86                    | 51 | —            |
| 72        | 1,7                 | 77                    | 45 | —            |
| 96        | 1,5                 | 48                    | 32 | —            |
| 120       | 1,9                 | 58                    | 31 | —            |
| 144       | 1,7                 | 44                    | 26 | —            |

que o inóculo prontamente inicia seu crescimento com concomitante acúmulo de fósforo. A marcha, praticamente paralela, entre as curvas de crescimento e de fixação de fósforo, até 48 horas, sugere que o acúmulo de fósforo é processo ativo e metabolicamente associado ao crescimento nos meios com sulfato de amônio limitado. A redução dos níveis de fósforo micelar entre 48 e 144 horas sugere um consumo do fósforo acumulado, provavelmente para manter a fase estacionária do crescimento, com o desdobramento do polímero e devolução do fósforo inorgânico (ortofosfato?) ao meio.

Finalmente, na Tabela VI, investigou-se, no meio MD5, o efeito da

adição de inibidores metabólicos, após 24 horas de crescimento, sobre a fixação de fósforo pelo *S. aureofaciens*, avaliada 48 horas após a adição (72 horas de crescimento).

Os resultados, com três inibidores distintos são também distintos. O arsenito, inibidor clássico das descarboxilações oxidativas (8), bloqueia tanto o crescimento como o acúmulo de fósforo no nível das 24 horas, sugerindo que a glicose, obtida da sacarose do meio, é utilizada pelo *S. aureofaciens* pela via glicolítica e pelo ciclo do ácido cítrico, como principal caminho metabólico gerador de ATP, tanto necessário ao crescimento como à síntese de polifosfato. O fluoreto, inibi-



TABELA VI — Efeito de inibidores metabólicos sobre o acúmulo de fósforo pelo *S. aureofaciens* no meio quimicamente definido MD5.

| TEMPO (h) | Inibidor adicionado às 24 horas | Crescimento (mg/ml) | FÓSFORO TOTAL |      |     |
|-----------|---------------------------------|---------------------|---------------|------|-----|
|           |                                 |                     | µg/ml         | mg/g | %   |
| 24        | —                               | 1,3                 | 34            | 26   | —   |
| 72        | —                               | 1,6                 | 51            | 32   | 100 |
| 72        | NaF 0,050M                      | 1,9                 | 82            | 43   | 134 |
| 72        | NaAsO <sub>2</sub> 0,010M       | 1,4                 | 35            | 25   | 78  |
| 72        | Cloranfenicol 10 µg/ml          | 1,4                 | 53            | 38   | 119 |

dor, menos específico, de todos os processos metabólicos que dependem de magnésio, é de efeito surpreendente tanto sobre o crescimento do microorganismo como sobre o acúmulo de fosfato, ativando-os. O crescimento é estimulado em cerca de 19% e o acúmulo em aproximadamente 34%. Essa ação é de difícil interpretação, embora tenha sido confirmada com o meio MD3, mais rico em sulfato de amônio, quando os mesmos estímulos foram observados. O cloranfenicol, inibidor da biossíntese protéica (9), reduz o crescimento a, praticamente, o mesmo nível de 24 horas enquanto estimula a fixação de fósforo em cerca de 19%. Essa ação é condizente com a hipótese formulada ao

#### AGRADECIMENTO:

Um dos autores (SHR) agradece à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pela concessão de uma Bolsa (Processo 16-Química 78/1328) que permitiu-lhe a participação no trabalho relatado.

RIBEIRO, S.H. & MOLINARI, R. Investigation about the endomycelial accumulation of phosphorus by *Streptomyces aureofaciens* in chemically defined media. *Ecl. Quím.*, São Paulo, 6:15-20, 1981

ABSTRACT: *Cultivation conditions and chemically defined media for endomycelial accumulation of phosphorus by Streptomyces aureofaciens* have been investigated and established. The main conditioning factor is the limitation of the nitrogen sources in the media.

KEY-WORDS: Microbial polyphosphate; *Streptomyces aureofaciens*.

#### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- GUNSALUS, I.C.; STANIER, R.Y. — "The Bacteria". New York, Academic Press, 1961, vol. II pp.48-9; 357-8.
- FRIEDBERG, I.; AVIGAD, G. — *J. Bacteriol.*, 1968, 96: 544.
- HOSTALEK, Z.; TOBEK, I.; BOBYK, M.A.; KULAYEV, I.S. — *Folia Microbiol. (Prague)*, 1976, 21:131.
- ALEXANDRE, M. — *Farmacia* (Bucharest), 1974, 22:57.
- HAWK, P.B.; OSER, B.L.; SUMMERSON, W.H. — "Practical Physiological Chemistry", New York, The Blakiston Co., 1951, 12th Ed., pp. 581-82.
- LINDBERG, O.; ERNSTER, L. In: GLICK, D. — "Methods of Biochemical Analysis", New York, Interscience Publish, Inc. 1956, Vol. III pp. 1-22.
- BIER, O. — "Bacteriologia e imunologia". Edições Melhoramentos, São Paulo, 1966, 13.ª Ed. p. 865.
- SILVERMAN, M.; WERKMAN, C.H. — *J. Biol. Chem.*, 1941, 138:35.
- VAZQUEZ, D. — *Pure Applied Chem.*, 1973, 35:355.