

VITAMINA B₁₂ (CIANOCOBALAMINA) E OXIDAÇÃO DA GLICOSE PELA *ESCHERICHIA COLI*

VITAMIN B₁₂ (CIANOCOBALAMIN) AND OXIDATION OF GLUCOSE BY *ESCHERICHIA COLI*

Recebido em 10/Jan/76
Aprovado em 20/Jan/76

GILBERTO G. VILLELA(*)

INTRODUÇÃO

A oxidação aeróbica da glicose pela *Escherichia coli* se mostrou sensível ao efeito estimulante da vitamina B₁₂, conforme foi demonstrado anteriormente (4,10). A ativação se faz no sistema enzimático responsável pela reação total. O corante de óxido-redução, cloreto de trifeniltetrazólio (TFT) foi por nós usado como indicador da reação; na sua forma reduzida é vermelho pela transformação em formazana, medida espectrofotometricamente (3,9). A oxidação foi, também, medida pelo consumo de oxigênio no respirômetro de Warburg.

MATERIAL E MÉTODOS

Os microrganismos usados foram a *E. coli* amostra ATCC N.º 9637 e o mutante 113-3 da *E. coli*, ambas cultivadas em cinco passagens sucessivas no meio sintético de Davis e Mingioli e, também, em caldo simples sem aeração durante 18 a 24 horas (2). Para o mutante 113-3 adicionaram-se ao meio 20 microgramas de D-L-metionina por mililitro de meio ou 10 milimicrogramas de vitamina B₁₂ por mililitro de meio.

As suspensões de *E. coli* e do mutante foram centrifugadas e lavadas 3 vezes com água destilada e ressuspensas ajustando o volume para que a absorbância ficasse em 0,6 medida no fotolorímetro e correspondendo a 9,2 mg de células secas por mililitro. A padronização foi, também, feita pelo método do biureto de Stickland (7).

(*) Laboratório de Bioquímica do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ.

As experiências foram realizadas com diluições recentes desta suspensão. As soluções padrão de vitamina B₁₂ foram obtidas de E. Merck & Co., Rahway, N. J. e preparadas semanalmente por diluição para conter 4 a 18 milimicrog/ml, mantidas na geladeira até serem usadas.

As bactérias lavadas, mantidas na geladeira a 4°C durante 3 dias ("resting cells"), deram respostas positivas com bom estímulo pela cobalamina, se bem que a capacidade de oxidação fôsse diminuída quando medida no manômetro de Warburg, confirmando a observação de Aubel *et alii* (1). No caso de se usar o acetato como substrato, as amostras envelhecidas até 5 dias são mais ativas (5); a explicação deste fato ainda é desconhecida.

Os ensaios foram feitos em tubos Pyrex de 16mm em que se pipetaram 0,2 ml da solução tampão de fosfato 0,3M + 0,3ml da suspensão de *E. coli* + 0,2ml da solução recentemente preparada de cloreto de trifeniltetrazólio a 0,1% e quantidades variáveis de cobalamina (0,05 a 0,3ml) contendo 4 a 12 milimicrog. e, finalmente, 0,2 ml da solução de glicose 0,1M, sendo o volume completado para 2ml com água destilada. O pH do sistema deve ficar em torno de 7,6. Os tubos, imediatamente, agitados são colocados em banho a 37°C. O período de incubação variou com o tipo da experiência. No caso em que se desejava medir a velocidade da oxidação interrompia-se a reação pela adição de uma gota de formaldeído a 40%, depois dos intervalos regulares de tempo.

Os resultados foram expressos em microgramas de formazana produzida pela redução do trifeniltetrazólio. O corante reduzido toma a cor vermelha e é extraído com 2ml de toluol, depois da adição de 3ml de ácido acético glacial (10). A camada vermelha, límpida, de toluol é isolada em funil de separação e a cor medida no espectrofotômetro de Zeiss PQMII em 480nm e cuba de 10mm. As leituras de absorbância foram convertidas em microgramas de formazana por meio da curva padrão, preparada com doses crescentes de formazana dissolvidas em toluol.

As medidas de consumo de oxigênio foram obtidas no manômetro de Warburg no volume de 3ml, (em frascos contendo de 0,05 a 0,2 ml da solução de cobalamina (0,01 microgramas por ml) (8). Outra série de frascos sem a vitamina serviu de controle (11). Os resultados foram expressos em microlitros de O₂ consumidos em 30 minutos.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

As Figuras 1 e 2 indicam o efeito estimulante da vitamina B₁₂ avaliado pela formação de formazana e pelo consumo de oxigênio. Em ambas as Figuras, as curvas de número 1 correspondem ao estímulo produzido pela cobalamina (concentração expressa em milimicrog.) e as curvas de número 2 correspondem à oxidação de glicose na ausência de cobalamina.

Oginsky *et alii* (4, 5, 6) verificaram que, na presença de acetato, a cobalamina aumentava a velocidade da reação pelas células bacterianas de *E. coli*, lavadas e em repouso ("resting cells"). As medidas foram realizadas, manometricamente, no aparelho de Warburg, após 30 minutos de contacto entre as células e 70 microg de vitamina B₁₂. As células recentemente preparadas são pouco sensíveis, ao passo que dão melhores respostas quando envelhecidas. Estes autores empregaram os mutantes 113-3 da *Escherichia coli*, que necessita de metionina ou de cobalamina para o crescimento.

É interessante verificar que quantidades muito pequenas de cobalamina são suficientes para causar o efeito estimulante (Figuras 1 e 2). A densidade das suspensões bacterianas influencia a velocidade da reação, como se pode observar nas Tabelas I e II. A absorção da vitamina pelas bactérias deve ser considerada (11).

TABELA I

Influência da densidade de células
Resultados expressos em microg de formazana

ml de células densidade = 20	adição de 12 mili- microg de vitamina B ₁₂	sem vitamina
0,1	14	0
0,2	21	7
0,3	25	11
0,4	27	16

TABELA II

Influência da vitamina B₁₂ sobre a oxidação da glicose
pela *Escherichia coli*

Vitamina B ₁₂ adicionada em milimicrog/2 ml	Formazana produzida em microg Densidade da suspensão bacteriana	
	D = 12	D = 60
4	3	33
8	6	46
12	8	54
16	17	72
0	0	22

Tempo de incubação = 15 minutos a 37°C

O efeito estimulante é melhor percebido quando se faz a observação em diferentes intervalos de tempo, pois a vitamina só influencia a velocidade de oxidação da glicose e não a quantidade total oxidada.

A oxidação do acetato pela *E. coli* mutante 113-3 é estimulada tanto pela vitamina B₁₂ como pela B_{12a} e não pelo 5,6-dimetil-benzimidazol ou outros derivados similares da cobalamina. Este fato indica que só a parte da molécula unida ao cobalto é responsável pelo efeito estimulante. As bactérias trituradas com alumina ou desintegradas pelo ultra-som, durante 2 minutos, forneceram material bastante ativo, na presença da cobalamina.

As suspensões densas de *E. coli*, sendo tratadas pela acetona gelada, deram precipitados que, depois de lavados, secos e extraídos com solução tampão de fosfato 0,05M pH 7,4, se mostraram ativos na oxidação da glicose, na presença de cobalamina (Tabela III). Estes extratos acetônicos, obtidos da precipitação das suspensões de bactérias lavadas, mostraram-se ativos acima de 0,05 ml.

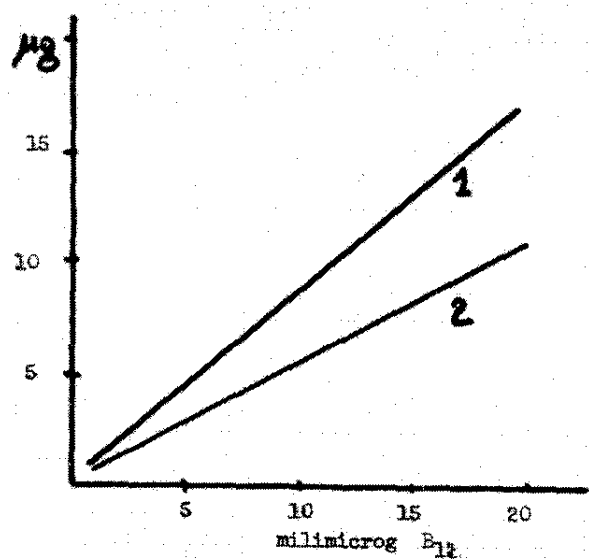


Fig. 1 - Efeito estimulante sobre a oxidação da glicose avaliado pela produção de formazana. Curva 1 = na presença de cobalamina. Curva 2 = na ausência cobalamina.

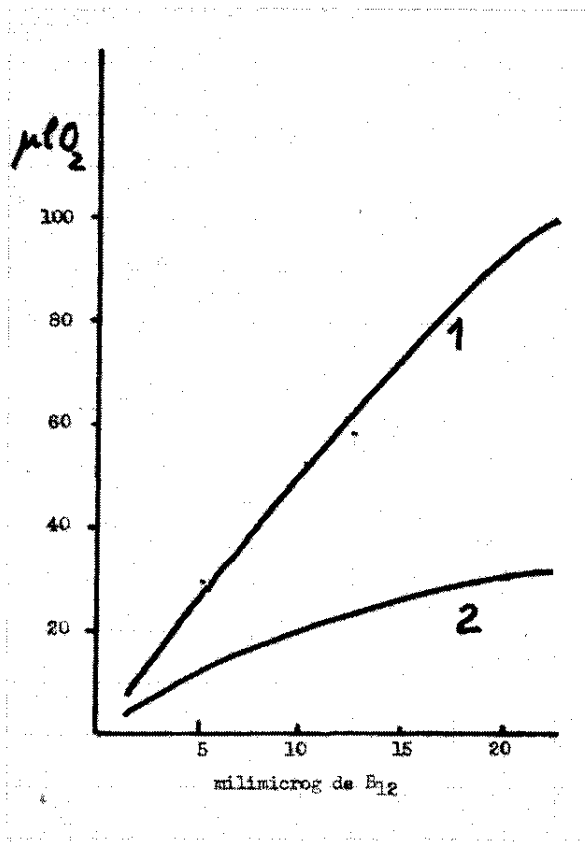


Fig. 2 — Consumo de oxigênio estimulado pela presença de cobalamina, medido no manômetro de Warburg. Curva 1 = com B_{12} . Curva 2 = sem B_{12} .

TABELA III

Efeito estimulante da cobalamina sobre o extrato acetônico

ml do extrato	cobalamina em milimicrog	formazana produzida em microg
0,05	—	0
0,1	—	0
0,2	—	8
0,3	—	22
0,05	8	16
0,1	8	34
0,2	8	31

RESUMO

Estudando-se a oxidação aeróbica da glicose pela **Escherichia coli**, em diferentes condições experimentais, observou-se que a vitamina B₁₂ estimulou a atividade do sistema enzimático responsável pela reação total.

Os resultados foram expressos em microgramas de formazana produzida pela redução do trifeniltetrazólio, sendo a determinação do teor de formazana feita eletrofotocolorimetricamente.

A oxidação também foi medida pelo consumo de oxigênio pelo respirômetro de Warburg. A cobalamina estimulou o processo de oxidação sem determinar aumento do consumo de oxigênio.

Palavras chave: vitamina B₁₂, cobalamina, oxidação, glicose, **E. coli**.

SUMMARY

In studying the aerobic oxidation of glucose by **Escherichia coli** in different experimental conditions it was observed that vitamin B₁₂ enhanced the activity of the enzyme system responsible for the overall reaction. The redox dye triphenyltetrazolium chloride was used as an indicator of the oxidation process and the results expressed in microg. of the red formazan produced which is easily determined spectrophotometrically.

Oxidation was also measured by oxygen consumed in a Warburg respirometer. Cobalamin showed to stimulate the rate of oxidation, not the amount of oxygen uptake.

Key words: vitamin B₁₂, cobalamin, oxidation, glucose, **E. coli**.

RÉSUMÉ

D'après une étude de l'oxydation de la glucose en aérobose par *Escherichia coli*, suivant plusieurs conditions d'expérimentation, il a été vérifié que la vitamina B₁₂ stimule l'activité du système enzymatique de la réaction d'oxydation.

Les résultats ont été exprimés en microgrammes de formazane produite par réduction du trifeniltetrazolium; les déterminations des teneurs de formazane ont été faites par électrophotocolorimétrie.

L'oxydation a été mesurée par la consommation d'oxygène par le respiromètre de Warburg. La cobalamine stimule le processus d'oxydation sans augmentation de l'utilisation de l'oxygène.

Mots clés: vitamine B₁₂, cobalamine, oxydation, glucose, *E. coli*.

AGRADECIMENTOS

O autor deseja consignar os seus agradecimentos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (C.N.Pq.) pelo auxílio recebido durante o preparo do presente trabalho.

BIBLIOGRAFIA

- 1 — AUBEL, E.; ROSENBERG, A. J.; SZUIMAYSTER, J. Contribution à l'étude de la fermentation et la respiration de *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta.*, Amsterdam, 5(2):228-254, 1950.
- 2 — KUN, E. & ABOOD, L. G. Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by or vitamin B₁₂. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 60(1):17-28, 1950.
- 3 — KUN, E. & ABOOD, L. G. Colorimetric estimation of succinic dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Science*, Washington, 109: 144-145, 1949.
- 4 — OGINSKY, E. L. Uptake of vitamin B₁₂ by *Escherichia coli*. *Arch. Biochem. Biophys.*, New York, 36(1):71-79, 1952.
- 5 — OGINSKY, E. L. & SMITH, P. H. Effect of vitamin B₁₂ derivatives on oxidation and vitamin B₁₂ uptake by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 65(2):183-186, 1953.
- 6 — OGINSKY, E. L.; SMITH, P. H.; TONHAZY, N. E.; UMBREIT, W. W.; LICHSTEIN, H. C., CARSON, S. F. The influence of vitamin B₁₂ on oxidation by a mutant strain of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.*, Baltimore, 61(5):581-590, 1951.
- 7 — STICKLAND, L. H. The determination of small quantities of bacteria by means of the biuret reaction. *J. Gen. Microbiol.*, London, 5:698-703, 1951.
- 8 — UMBREIT, W. W.; BURRIS, R. H.; STAUFFER, J. F. *Manometric techniques and tissue metabolism*. Burgess Publ. Co., Minneapolis, 1949.
- 9 — VILLELA, G. G. Determination of rat liver xanthine dehydrogenase by triphenyltetrazolium chloride. *Rev. Bras. Biol.*, Rio de Janeiro 14(4):455-458, 1954.
- 10 — VILLELA, G. G. Efeito da vitamina B₁₂ sobre a oxidação da glicose pela *E. coli*. V Congresso Bras. Microbiologia, Rio de Janeiro, 25 de julho de 1974.
- 11 — VILLELA, G. G. & ABREU, L. A. Absorção da vitamina B₁₂ por suspensões bacterianas e homogenizados de fígado. *O Hospital*, Rio de Janeiro, 44(6):725-730, 1953.