JOÃO CARLOS FIGUEIREDO DE SOUSA

FACULDADE DE FARMÁCIA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

# ESTUDO DA MORFOGENÉSE DA ESPORULAÇÃO DO *BACILLUS SUBTILIS*

PORTO

1980

# ESTUDO DA MORFOGENÉSE DA ESPORULAÇÃO DO

# *BACILLUS SUBTILIS*

PORTO

1980

JOÃO CARLOS FIGUEIREDO DE SOUSA
Assistente da Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto

# ESTUDO DA MORFOGÉNESE DA ESPORULAÇÃO DO *BACILLUS SUBTILIS*

Dissertação de candidatura ao grau de Doutor em Farmácia (Microbiologia) apresentada à Faculdade de Farmácia da Universidade do Porto.

Porto - 1980

À memória de meu Tio

# A G R A D E C I M E N T O S

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a minha formação científica, e em especial:

- ao Doutor Manuel Teixeira da Silva que foi o meu orientador científico desde a primeira hora e a quem desejo manifestar a minha profunda gratidão;

- ao Doutor G. Balassa e à sua equipa pelos seus ensinamentos e facilidades concedidas no seu laboratório em Montpellier;

- ao Professor Correia Alves e Professor Castro e Melo pelas sugestões que me fizeram e que muito contribuíram para a melhoria do texto;

- ao Professor Carvalho Guerra e Professor Roberto Salema pela amizade e facilidades de trabalho que sempre me concederam nos Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e Centro de Microscopia Electrónica;

- ao Eng. Rui Pinto, Eng. Francisco Carvalho e Dr. Sousa Carvalho pelo auxílio que me deram na organização deste trabalho;

- ao falecido Professor António Costa pelas facilidades prestadas e aos meus colaboradores mais directos do Laboratório de Análises Clínicas da Faculdade de Farmácia do Porto, pelo muito que me ajudaram;

- a todo o pessoal do Centro de Microscopia Electrónica, particularmente à Sra. D. Irene Barros e Sra. D. Andrea Costa pela colaboração técnica que sempre me dispensaram;

- à Sra. D. Maria Margarida Oliveira pela disponibilidade e interesse que manifestou nos trabalhos de dactilografia;

- Agradeço ainda, muito em especial, à Fundação Calouste Gulbenkian e ao Instituto Nacional de Investigação Científica os subsídios que me concederam os quais tornaram possível a concretização do nosso trabalho e, finalmente agradeço à Upjohn Farmoquímica a bibliografia que me cedeu.

## LISTA DE ABREVIATURAS

| Abreviatura | Nome Completo |
|---|---|
| ACET | Acetona |
| ATP | 5'-trifosfato de adenosina |
| BENZ | Benzeno |
| BUT | n-Butanol |
| c-AMP | 3',5'-monofosfato de adenosina cíclico |
| c-GMP | 3',5'-monofosfato de guanosina cíclico |
| CLOR | Clorofórmio |
| $CLOR^R$ | Resistente ao tratamento com clorofórmio |
| CRP | Receptor proteico do c-AMP |
| DAP | Ácido diaminopimélico |
| DNA | Ácido desoxiribonucleico |
| DPA | Ácido dipicolínico |
| DIOX | Dioxano |
| EDTA | Ácido etilenodiaminotetracético(sal sódico) |
| ETA | Etanol |
| HPN | Nucleótido fosforilado |
| LYS | L-Lisina |
| Me | 2-mercaptoetanol |
| MET | Metanol |
| m-RNA | Ácido ribonucleico mensageiro |
| OCT | Octanol |
| $OCT^R$ | Resistente ao octanol |
| Pi | Fosfato inorgânico |
| PIR | Piridina |
| PMSF | Fenil-metil-sulfonil-fluoreto |
| RK | Técnica de Ryter-Kellemberger (fixação com $OsO_4$) |
| r-RNA | Ácido ribonucleico ribossómico |
| $Sco^+$ | Estirpes com os mecanismos reguladores da esporulação normais |

| Abreviatura | Nome Completo |
|---|---|
| SDS | Dodecilsulfato de sódio |
| $Spo^{+}$ | Estirpes com esporulação normal |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| $Termo^{R}$ | Resistente ao calor húmido ($80^{o}C/10'$) |
| $Termo^{S}$ | Sensíveis ao calor húmido ($80^{o}C/10'$) |
| to | Terminus de crescimento exponencial ou início da esporulação |
| TOL | Tolueno |
| t-RNA | Ácido ribonucleico de transferência |
| UV | radiações ultra-violeta |
| XIL | Xilol |

# INDICE


I - **INTRODUÇÃO** ..... 1

*ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA ESPORULAÇÃO BACTERIANA* ..... 3

*CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES ESTRUTURAIS DO ESPORO* ..... 12

Córtex e parede celular germinativa ..... 12

Estruturas membranosas ..... 13

Túnicas ..... 14

Exosporo ..... 15

*RESISTÊNCIA DOS ESPOROS AOS AGENTES AGRESSORES* ..... 15

*BIOQUÍMICA DO PROCESSO ESPORULATIVO* ..... 17

Substâncias específicas da esporulação ..... 20

Proteases extracelulares ..... 22

Fosfatases ..... 23

α-amilase ..... 24

Enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos ..... 24

Turnover de proteínas ..... 25

Turnover do RNA ..... 26

*MUTANTES DA ESPORULAÇÃO* ..... 27

*MECANISMOS REGULADORES E CONTROLO GENÉTICO DA ESPORULAÇÃO* ..... 29

II - **MATERIAL E MÉTODOS** ..... 33

Estirpes de Bacillus subtilis ..... 33

Meios de cultura ..... 34

Culturas ..... 35

Quantificação das células nas diferentes fases morfológicas durante o processo esporulativo ..... 36

Preparação de esporos livres ..... 36

Lisados das células em esporulação ..... 36

Determinação do número de células viáveis ..... 37

Tratamento das células por agentes químico e físicos ..... 37

Técnicas de microscopia electrónica (fixação) ..... 39

Doseamento das proteases extracelulares ..... 40
Doseamento de α-amilase ..... 41
Doseamento de DPA ..... 41
Doseamento de fosfatases alcalina ..... 41

**III - RESULTADOS**

*A-ESTIRPES SELVAGENS* ..... 43
Determinação de $t_0$ ..... 43
Sua caracterização morfológica ..... 46
Cinética do desenvolvimento morfológico ..... 62
Origem e desenvolvimento do exosporo ..... 80
Alterações ultraestruturais provocadas nas células vegetativas e nos esporos pelos agentes químicos e físicos ..... 80
Cinética da resistência dos esporos aos solventes orgânicos, TCA e ao aquecimento ..... 95
Efeitos dos tratamentos químicos na viabilidade e resistência dos esporos após tratamento com ureia-Me ..... 95

*B-ESTIRPES DPA⁻*
Introdução ..... 99
Caracterização das estirpes CB22 e AB12 .....102
Incorporação de DPA nos esporos DPA⁻ .....111
Condições de incorporação de DPA nos esporos DPA⁻ .....116

*C-MUTANTES DECADENTES*
Introdução .....121
Caracterização fenotípica das mutantes decadentes .....121

*D-ESTIRPES Sco*
Introdução .....133
Caracterização fenotípica das mutantes Sco e estirpes derivadas .....133

Cinética do desenvolvimento morfológico da mutante EV15 (ScoA1) e outras estirpes de comportamento semelhante ..... 145

**IV - DISCUSSÃO**

Morfocinética da esporulação das estirpes selvagens ..... 161

Esporulação das mutantes DPA$^-$ ..... 176

Esporulação das mutantes decadentes ..... 178

Esporulação das mutantes Sco ..... 180

**V - CONCLUSÕES** ..... 183

# ESTUDO DA MORFOGÉNESE DA ESPORULAÇÃO DO *BACILLUS SUBTILIS*

# I - INTRODUÇÃO

A maior parte dos resultados deste trabalho foram já publicados, ficando deste modo abrangidos pelo Decreto-Lei nº 388/70, Art. 8º, parágrafo 2 ("É admitido na elaboração da dissertação o aproveitamento total ou parcial, do resultado de trabalhos já publicados mesmo em colaboração, devendo neste caso, o candidato esclarecer qual a sua contribuição pessoal").

Assim, trabalhámos integrados numa equipa em que os estudos bioquímicos foram orientados por Bárbara Dod, os de genética por Georges Balassa e Pierre Milhaud e a investigação morfológica, principalmente de microscopia electrónica, esteve a nosso cargo, com a colaboração de M.T. Silva (268,280,281,282,283,284, 285).

Neste trabalho, para além da participação indirecta, em que os resultados de cada um dos sectores eram determinantes no curso da investigação dos outros, tivemos ocasião de colaborar activamente nos estudos de bioquímica (22,23,24,25).

Os microorganismos têm sido o material biológico ideal para a resolução dos problemas gerais da Biologia, nomeadamente no campo da Genética e da Bioquímica (16,140,153, 322,323).

Se bem que não seja possível extrapolar, com plenitude, observações feitas com microorganismos para os organismos superiores, o estudo da diferenciação nos organismos unicelulares apresenta numerosas vantagens, pois permite o seu estudo, numa população homogénea, simultaneamente dum ponto de vista morfológico, bioquímico e genético.

Actualmente os mecanismos de diferenciação celular constituem uma das maiores incógnitas da Biologia Molecular.

A morfogénese da esporulação tem sido utilizada como modelo para o estudo dos problemas da diferenciação celular (91,114). O processo esporulativo não tem, porém, apenas este interesse fundamental. Algumas das bactérias patogénicas para o Homem produzem esporos, o que, por um lado, lhes dá acrescida resistência mas, por outro, facilita a sua identificação (58,127,228,279); noutros casos é o próprio processo da esporulação que está ligado à síntese de produtos de grande interesse prático: antibióticos e enzimas (214,215,245) ou toxinas letais para insectos (8,9,43,55, 272).

O Bacillus subtilis tem sido o microorganismo esporogéneo mais estudado do ponto de vista genético, o que se deve ao facto de ser transformável e transductível (286,298), tendo muitos destes estudos contribuído para que a sua carta cromossómica seja bem conhecida (207).

Pareceu-nos que o estudo comparativo da morfogénese da esporulação em estirpes selvagens e em estirpes mutantes de Bacillus subtilis ajudaria a interpretar este processo complexo. Mutações que afectem determinadas fases da esporulação devem traduzir-se por alterações morfológicas e enzimáticas da célula, pelo que abordámos o estudo deste processo simultaneamente de um ponto de vista morfológico, bioquímico e genético.

## 1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS DA ESPORULAÇÃO BACTERIANA

1.1. As bactérias produzem três tipos de células dormentes: cistos nas bactérias do Gén. Azotobacter (211,246,248,330); mixosporos nas Mixobactérias (75,246,261,313,324), e endosporos nas bactérias do Gén. Bacillus (82,90,135,147,192,246,316,337),Gén.Clostridium (28, 74,83,172,233,234,235), Gén. Termoactinomyces (57,58,59,60,80,144) e Sporosarcina ureae (183,265,279).

Embora os mecanismos gerais implicados na formação destes três tipos de células dormentes sejam similares, a esporulação bacteriana tem características peculiares: o endosporo forma-se a partir de uma pequena célula existente no citoplasma da célula vegetativa que lhe deu origem, enquanto que a formação de cistos e mixosporos abrange a totalidade da célula vegetativa (58,248,261).

1.2. As primeiras observações de esporos bacterianos devem-se a Ehremberg em 1838 (76) e a Perty em 1852 (206). Pasteur, em 1870, correlacionou aquelas estruturas com a resistência aos agentes químicos (204). Cohn & Koch, em 1876, observaram que os esporos

tinham capacidade germinativa (53, 151). Haveria, assim, um ciclo vital:

BACTÉRIA $\xrightarrow{\text{esporulação}}$ ESPORO $\xrightarrow{\text{germinação}^*}$ BACTÉRIA

1.3. As bactérias esporogéneas, nomeadamente as espécies do Gén. Bacillus, podem, em adequadas condições fisiológicas (231), iniciar o processo esporulativo após o terminus do crescimento exponencial (311). Este início da fase estacionária, que Schaeffer arbitrariamente definiu por $t_0$, marca o começo da esporulação (256). A partir de $t_0$ as células vegetativas do Bacillus subtilis sofrem uma última divisão celular, atípica, originando ao fim de aproximadamente sete horas uma célula dormente – esporo (21,192,236).

O esporo difere da célula vegetativa que lhe deu origem quanto à actividade metabólica (51) e quanto à ultraestrutura (21,192); apresenta também maior resistência que as células vegetativas à acção deletéria de determinados compostos químicos, ao aquecimento, às radiações e à dessecação (21,152,186,192,224,236,256,310).

1.4. Embora a evolução geral do processo esporulativo possa ser acompanhado pela microscopia óptica, só a microscopia electrónica permite revelar os seus detalhes ultraestruturais. Estes tornaram possível que entre $t_0$ e $t_7$ sejam identificáveis seis fases morfológicas. Sucintamente, estas fases podem descrever-se como se segue, representando-se as mesmas esquematicamente na Figura 1.

1.4.1. FASE I - O nucleóide bacteriano, quando fixado pela técnica de Ryter-Kellemberger (técnica RK) (242) e observado em cortes ultrafinos, por microscopia electrónica de transmissão, apresenta uma estrutura fibrilar, densa aos electrões e em contacto íntimo com

---

*Neste trabalho abordaremos apenas o processo esporulativo, havendo no entanto a referir numerosas revisões sobre a germinação (92,104,125, 246,294,295).

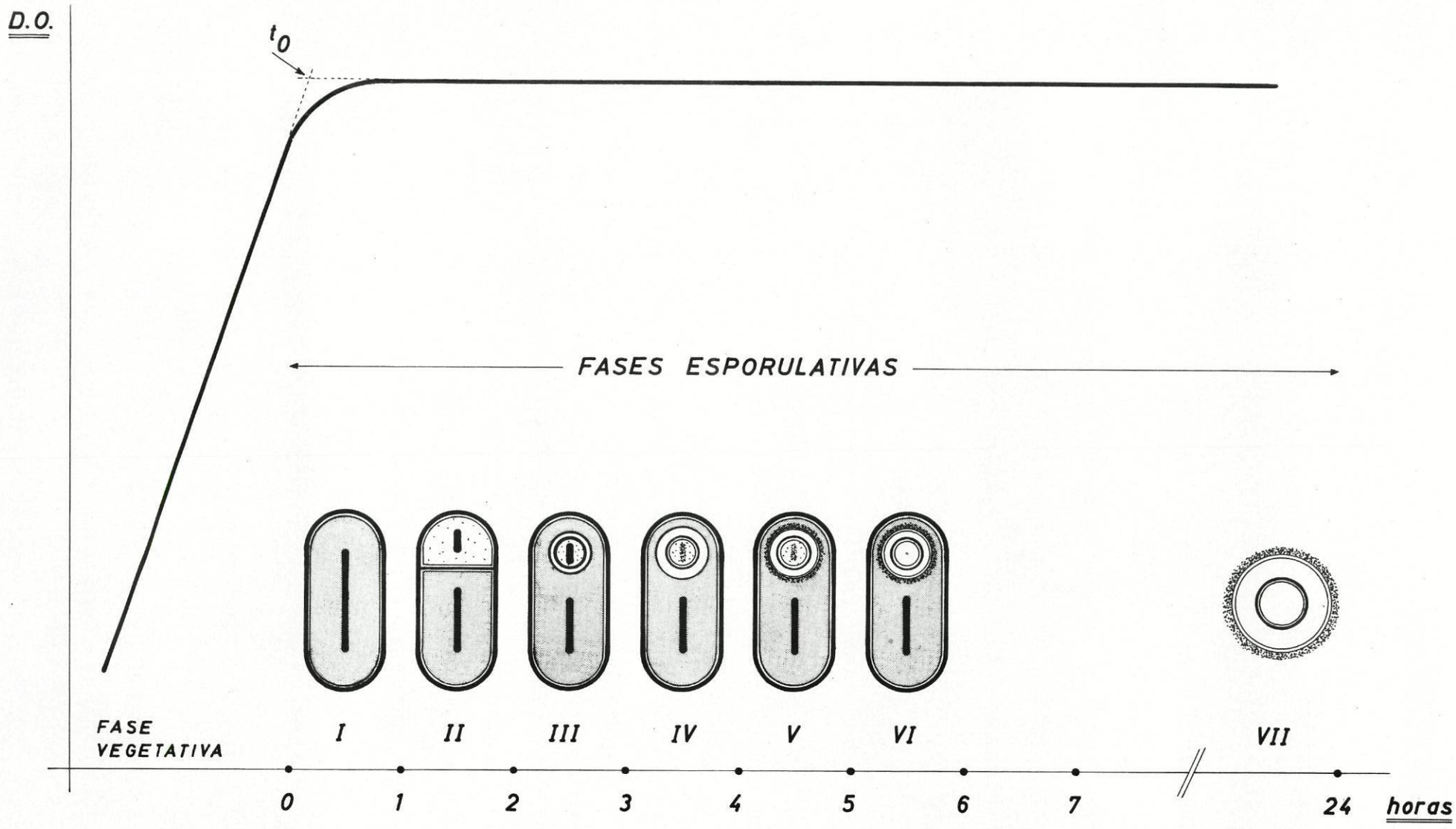



FIG. 1 - ESQUEMA DAS FASES MORFOLÓGICAS DA ESPORULAÇÃO BACTERIANA.

o citoplasma (Fig.4 ,pág.49). A maioria das células de Bacillus subtilis, durante a fase vegetativa em crescimento exponencial, apresenta dois núcleos, e em $t_0$ um único núcleo (15). O primeiro sinal morfológico da esporulação, característico da fase I, é o alongamento do material nuclear no sentido do eixo maior da célula formando o filamento axial nuclear (Fig.4 ,pág.49 ). Na vizinhança deste filamento nuclear foram observados mesossomas (21, 65, 236,240). A técnica de RK evidencia estas estruturas, principalmente em bactérias de Gram-positivo (264) e, frequentemente, aparenta associação com o nucleóide (236,237,241,243). Esta associação levou a atribuir ao mesossoma, entre muitas outras hipotéticas funções (238), a de ser a estrutura da ligação nucleóide-membrana citoplasmática que participa na segregação do material genético (141,236,237,241,243).

O significado do filamento axial não está esclarecido, apesar de ter sido descrito em Bacillus (21,78,240,338,339), Clostridium (83) e Sporosarcina ureae (279). Segundo Young & Fitz-James, o filamento axial traduz a fusão dos dois núcleos presentes nas células de B. cereus durante a fase exponencial (337), ao passo que para Ryter & Jacob aquele representaria uma última replicação nuclear não seguida de divisão celular (240). Estudos autorradiográficos realizados em Bacillus subtilis mostram que, após $t_0$, a síntese de DNA nas células em esporulação pára antes de estas atingirem a fase II, e nas células não esporulantes prossegue apenas até $t_3$ (15,239).

Embora Ryter refira a natureza episódica do filamento axial (236), o número de células que apresentam esta estrutura entre $t_0$ e $t_1$ não tem sido quantificado.

1.4.2. FASE II - A divisão celular em Bacillus e em outras Eubactériae de Gram-positivo caracteriza-se pela formação dum septo membranoso, equatorial, com crescimento centrípeto do material parietal (128,129,130). A fase II caracteriza-se pela formação de um septo, constituído por duas membranas, representando uma última divisão celular, atípica, dada a sua localização não equatorial e visto não haver a concomitante deposição de material parietal entre os dois sistemas membranosos (21,91,192,236,246).

Nas células de Bacillus e Clostridium foram observadas, nesta fase, mesossomas de localização polar, aos quais tem sido atribuído papel preponderante na formação do septo esporulativo (21,65,78,82, 83,88,146,200,236,316,332).

Nas células de Bacillus subtilis observou-se a formação de invaginações anelares da parede com localização nos dois polos, que nos cortes aparecem como protuberâncias dispostas simetricamente nos dois lados da célula e viradas para o citoplasma. Esta estrutura é a primeira indicação morfológica definitiva da esporulação (21,236,332; Fig.5 ,pág.49 ). A invaginação da membrana citoplasmática, para a formação do septo esporulativo, far-se-ia em correspondência com aquelas protuberâncias (21,192,236,332; Fig. 6 ,pág.49 ). O mecanismo justificativo da posição não equatorial do septo esporulativo não é evidente (21). A formação bipolar dos septos esporulativos ou a presença de material parietal nestes septos, quando ocorrem, é seguido da paragem do processo esporulativo (88,217,236). A formação do septo normal não requer a síntese de mucopeptídeo, havendo evidência bioquímica de que

este só é sintetizado posteriormente e incorporado no córtex (209). O septo divide a célula em dois compartimentos assimétricos, futuro pré-esporo e esporângio, o que é precedido de uma distribuição equitativa do material nuclear (192,240). As protuberâncias parietais anexas ao pré-esporo persistem até à fase IV, enquanto que as do polo oposto persistem até ao fim do processo esporulativo (236).

1.4.3. FASE III - Após a formação do septo membranoso, este começa a aumentar em área, fazendo protusão no sentido do polo não esporal, aumentando assim o volume do futuro pré-esporo (Fig.8 , pág.49 ). A zona anular de origem do septo esporulativo na membrana citoplasmática desloca-se na direcção do polo mais próximo, reduzindo o seu perímetro e acabando por fundir-se (21,192,236 ; Fig.9 ,pág.50). Forma-se assim o pré-esporo, delimitado por duas membranas, de polaridade oposta e sem qualquer contacto físico com a membrana citoplasmática do esporângio (85,192; Fig.12 ,pág.57 ). Nas células de Bacillus thuringiensis, antes da formação do pré-esporo, começa a organizar-se uma estrutura de natureza glico-proteica, cristal parasporal (31,42,222,278), dotado de grande toxicidade para os insectos (8,9,43,55,272). Nas células de Bacillus subtilis e estirpes mutantes têm sido descritas estruturas do tipo cristalino (145,252), em que a formação do esporo e do cristal parecem ser mutuamente exclusivas, ao contrário do que sucede no Bacillus thuringiensis, onde as duas estruturas coexistem (98,338).

1.4.4. FASE IV - A fase IV caracteriza-se, exclusivamente, pela formação, no espaço intermembranoso, de uma camada mucopeptídica,

transparente aos electrões, o córtex (21,88,146,147,192,200,236, 339). O córtex representa uma barreira à penetração dos corantes utilizados para a microscopia óptica e dos fixadores utilizados para a microscopia electrónica, o que tem servido de explicação para que a estrutura fibrilar do DNA do pré-esporo não seja visível após a formação do córtex (236; Fig. 13, pág. 57). A partir desta fase não são visíveis, na célula, mesossomas proeminentes (236). O córtex é uma estrutura importante para a integridade do esporo, sendo, no entanto, de salientar que a não formação desta estrutura, verificada em algumas estirpes mutantes, não impede a posterior formação de túnicas esporais, a síntese de DPA ou a incorporação de $Ca^{++}$ (205). Entre a membrana interna do pré-esporo e a camada cortical observa-se uma pequena camada com densidade electrónica, a parede celular germinativa (21,192,236; Fig. 13, pág. 57). Dada a existência de duas células com a mesma informação genética, não tem sido possível atribuir, com clareza, a responsabilidade da génese daquelas estruturas; segundo Murrell, o pré-esporo é responsável pela formação da parede celular germinativa e o esporângio pela formação do córtex (192), enquanto Sadoff responsabiliza ambas as células pela síntese do material mucopeptídico (246). Fenómeno semelhante ocorre com a formação de outras enzimas (6,14).

1.4.5. FASES V e VI - É geralmente aceite que a organização das túnicas esporais se faz envolvendo a membrana externa do pré-esporo e com um aspecto morfológico característico de cada espécie bacteriana (11,136).

As túnicas dos esporos de Bacillus subtilis organizam-se em

duas camadas morfologicamente distintas e com diferente densidade electrónica, túnica interna e túnica externa. A túnica interna apresenta uma estrutura lamelar, enquanto que a túnica externa não é estratificada e possui grande densidade electrónica Figs. 15-17, pág.58). O número de lamelas da túnica interna é característico da espécie bacteriana; assim, por exemplo, nos esporos de Bacillus subtilis esta túnica tem uma estrutura multilamelar (21), enquanto que nos esporos do Clostridium histolyticum é constituída, somente, por uma única lamela (28). O aparecimento destes invólucros caracteriza a fase V da esporulação (21,192, 236,246). Nesta fase deixa de ser visível a membrana externa do pré-esporo, desconhecendo-se, no entanto, apesar de Murrell referir a sua diferenciação numa nova estrutura (194), o destino que tem (21).

Com base em estudos cinéticos, foi estabelecida uma correlação entre a fase V e a aquisição da resistência ao octanol e o início da refringência dos esporos em microscopia de contraste de fase (236).

A fase VI caracteriza-se pela maturação das túnicas e do córtex, impermeabilizando totalmente o esporo aos fixadores utilizados para a microscopia electrónica (21,192,236,246). Assim, enquanto que na fase IV o córtex dificulta apenas a observação da estrutura fibrilar do DNA, nesta fase não são também visíveis, por falta de preservação, os ribossomas (Fig. 17, pág.58). Nesta fase morfológica a refringência dos esporos é máxima e são já termo-resistentes (21). Como o DPA é sintetizado entre $t_5$-$t_{6,5}$, tem sido estabelecida uma correlação entre este composto e a ter-

mo-resistência (147), sendo esta adquirida gradualmente durante a esporulação (186).

Nas células de algumas espécies bacterianas, durante a fase IV, tem sido descrito o aparecimento simultâneo do córtex e das lamelas da túnica interna, ficando a fase V reduzida, portanto, à formação da túnica externa (11,28,233,234,235).

1.5. Além destas camadas, algumas espécies de Bacillus e Clostridium apresentam uma estrutura mais externa cercando completamente o esporo, o exosporo (30,78,86,99,192,193,201,225,226,300,316).

A estrutura desta camada foi descrita em Bacillus cereus e Bacillus anthracis por Gerhardt & Ribi, com base no uso simultâneo de técnicas de difracção ao Raios X e de microscopia electrónica, como sendo uma membrana de estrutura complexa constituída por uma camada base exibindo estrutura cristalina e uma camada externa com projecções pilosas ("hair-like") (99). Segundo Rensen, com base em estudos de "freeze-etching", o exosporo seria constituído apenas por uma única camada (216). Nos esporos de Bacillus subtilis o exosporo não tem sido observado em microscopia electrónica pela técnica dos cortes ultrafinos (21,146,147,192,236), apesar da sua possível existência ter sido sugerida pelo emprego da técnica do "freeze-etching" (136).

A função do exosporo não é bem conhecida e parece não ser vital para a viabilidade do esporo (136), embora Sommerville refira a sua participação na síntese do cristal parasporal e na síntese das túnicas esporais (276,278).

1.6. Aproximadamente doze horas após a maturação do esporo a parede celular do esporângio entra em lise devido à acção de enzimas autolíticas, formando-se um esporo livre (291). É a fase VII da esporulação (Fig. 18, pág. 58).

1.7. À superfície de alguns esporos, principalmente nas bactérias anaeróbias, têm sido descritos numerosos tufos de apêndices, cuja função é desconhecida (155,227,250).

## 2. CONSTITUIÇÃO QUÍMICA DOS COMPONENTES ESTRUTURAIS DO ESPORO

2.1. Córtex e parede celular germinativa - O mucopeptídeo (mureína), principal componente da parede celular das bactérias (46,181), também é componente do esporo e está localizado no córtex (292,320). Este composto é constituído por dois aminoaçúcares, a N-acetilglucosamina e o ácido N-acetilmurâmico, alternando-se numa cadeia linear em ligação glicosídica β-1,4 (138,249). Ao grupo carboxílico do ácido N-acetilmurâmico está ligada uma cadeia de quatro aminoácidos, os quais estabelecem ligações peptídicas com os resíduos de aminoácidos da cadeia linear vizinha. O estabelecimento destas ligações transpeptídicas confere rigidez a esta molécula (249).

As diferenças quanto à composição química entre os mucopeptídeos vegetativos e esporal foram claramente demonstradas em Bacillus subtilis e Bacillus sphaericus (301,321). Dadas as diferenças estruturais entre estes dois tipos de mucopeptídeo,

admite-se o aparecimento, durante a morfogénese, de enzimas específicas para a biossíntese do mucopeptídeo esporal, embora os mecanismos enzimáticos e o seu controle não estejam esclarecidos (167,301). Nas células das estirpes mutantes de Bacillus megaterium $DAP^-$ $LYS^-$ a incorporação de DAP exógeno no mucopeptídeo vegetativo termina no fim do crescimento exponencial, enquanto que a síntese do mucopeptídeo esporal começa quando a maioria das células atingem a fase III (208).

2.2. Estruturas membranosas - A participação da membrana citoplasmática dos mesossomas nas fases iniciais da esporulação foi claramente demonstrada (21,65,78,82,88,146,193,200,236,316,332). A síntese "de novo" de fosfolipídeos verifica-se entre $t_1$-$t_3$ e diminui durante a maturação do esporo, não havendo síntese de mureína durante este período de tempo (209). Felix & Lundgren não detectaram diferenças, quanto à composição fosfolipídica, entre células vegetativas e células em esporulação de Bacillus cereus, havendo, no entanto, menor concentração de citocromos e enzimas transportadoras de electrões nas membranas do pré-esporo (81). Resultados idênticos foram obtidos por Tochikubo (302). Estudos realizados com Bacillus megaterium indicam que as membranas do pré-esporo e esporângio têm, essencialmente, a mesma composição fosfolipídica, diferindo apenas quanto à composição proteica (79). No entanto, foram observadas diferenças significativas quanto à composição fosfolipídica, nomeadamente em cardiolipina, entre as membranas do esporo e as membranas vegetativas (79).

Durante o processo esporulativo verifica-se também uma alte-

ração da permeabilidade da membrana do esporângio, especialmente de $Ca^{++}$ (77).

2.3. Túnicas - Os esporos de Bacillus têm duas túnicas, morfologicamente distintas (11,136). Estas duas camadas são quase exclusivamente constituídas por proteínas com estrutura cristalina, (131), tendo as da túnica externa uma composição em aminoácidos que as tornam mais hidrofóbicas (11,13,308). A electroforese, em gel de poliacrilamida, das proteínas das túnicas de esporos do Bacillus subtilis, revelou a presença de dois tipos de polipeptídeos com elevado teor em tirosina (11). A síntese das subunidades proteicas, precursoras destas túnicas, começa na fase II ou III (10,11,328). As proteínas das túnicas já organizadas são muito ricas em cistina (11,308), coincidindo a montagem destas estruturas com o início da incorporação de cistina nos esporos (11,307,308). Admite-se que os polipeptídeos da túnica interna estejam unidos por ligações dissulfureto e que a organização da túnica externa acarrete uma modificação destas, que são do tipo predominantemente hidrofóbico (11).

Há evidência muito sugestiva de que as proteínas dos cristais parasporais têm considerável grau de homologia com as proteínas das túnicas. Assim, no Bacillus thuringiensis e também no Bacillus medusa os cristais parasporais são sintetizados na fase II, sugerindo Fitz-James que estas estruturas resultam da deposição anormal de proteínas membranosas (84). Dado o contacto físico entre cristais parasporais e o exosporo existente na fase III da esporulação de Bacillus thurigiensis, Sommerville sugere também uma correlação entre as proteínas do cristal e as das túnicas para a qual

apresenta apoio de ordem bioquímica e imunológica (276,277,278). Neste sentido é também significativo o ter-se observado uma idêntica actividade farmacológica entre os esporos isolados e cristais parasporais de Bacillus thuringiensis (42,259). Por outro lado, células de certas estirpes mutantes de Bacillus subtilis apresentam, no citoplasma do esporângio, em adição ao esporo, inclusões morfologicamente semelhantes às da túnica do esporo (333; Figs.81-83, pag.140). Uma relação de homologia análoga à descrita existe entre a enterotoxina e as proteínas estruturais do esporo do Clostridium perfringens (94).

2.4. Exosporo - Esta formação tem sido considerada como uma membrana diferenciada (29,30). A sua composição química é idêntica à de uma membrana: proteínas, polissacarídeos, fosfolipídeos (cardiolipina) e sais minerais (180,300). Nas células do Bacillus cereus esta estrutura parece formar-se após a fase IV, a partir de uma vesícula em conexão com a membrana externa do pré-esporo (193).

## 3. RESISTÊNCIA DOS ESPOROS A AGENTES AGRESSORES

Desde há muito que os esporos têm sido caracterizados pela sua resistência à acção de agentes agressores para as células vegetativas (21,186,192,236,311). A resistência do esporo aos vários agentes não surge globalmente mas ocorre de acordo com uma sequência bem definida de aquisição das várias resistências ao longo do processo esporulativo (21). Assim, as resistências às ra-

diações (311), ao octanol e ao clorofórmio (236,256), aparecem antes de o esporo se tornar resistente ao calor. Milhaud & Balassa (186) verificaram, durante a esporulação de Bacillus subtilis, a seguinte sequência de aquisição de resistências (designadas pelos respectivos agentes): xileno → tolueno → benzeno → octanol → butanol → metanol → etanol → acetona → clorofórmio → dioxano → piridina → ácido tricloroacético, fenol, aquecimento pelo calor húmido a 80°C durante 10 minutos.

Embora os mecanismos de aparecimento das resistências nas células em esporulação sejam desconhecidos, admite-se que no caso dos solventes orgânicos as resistências estão relacionadas com o desenvolvimento das túnicas, as quais impediriam a penetração destes compostos no pré-esporo (186). A resistência ao tolueno situa-se entre as fases III-IV (186); a resistência ao clorofórmio verifica-se entre as fases V-VI (186); a resistência ao octanol coincide com a fase V (236).

O estudo de certas estirpes mutantes permite confirmar a ordem de aparição das resistências, visto que estirpes deficientes para uma dada resistência são-no também para todas as resistências de aquisição posterior. Assim, a estirpe mutante CB 22 do Bacillus subtilis é resistente ao clorofórmio (e a todos os solventes para os quais a resistência surge anteriormente a esta), mas não é resistente ao aquecimento (26). Os radicais -SH existentes nas túnicas parecem desempenhar um papel importante na radio-protecção das proteínas (309) e a resistência ao calor tem sido atribuída ao DPA-Ca (194), embora tenham sido isolados esporos $DPA^-$ resisten-

tes ao aquecimento (120). Uma alternativa a esta teoria baseia-se na alta desidratação do esporo, o que aumentaria a estabilidade das proteínas e ácidos nucleicos frente ao aquecimento e às radiações (72,147).Lewis, Snell & Burr propõem o conceito do córtex contráctil para explicar a desidratação do esporo (165). A natureza química da mureína, em Bacillus, reforça esta teoria (320).

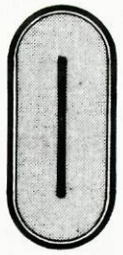
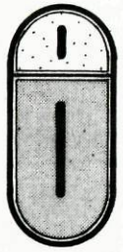
## 4. BIOQUÍMICA DO PROCESSO ESPORULATIVO

4.1. As alterações estruturais verificadas durante a génese do esporo são a contrapartida morfológica de acontecimentos bioquímicos sequenciais sob controle genético. A interpretação das alterações bioquímicas (212) durante o processo esporulativo é,por isso, incompleta se não se estabelecer a sua correlação com a morfogénese. No Quadro 1 inscrevem-se alguns aspectos da cronologia desta correlação.

Estudos cinéticos em estirpes selvagens e mutantes da esporulação permitem associar às diferentes fases morfológicas a síntese de diversas substâncias específicas da esporulação. Assim, por exemplo, a produção de proteases e antibióticos parece estar ligada à fase I (255), enquanto que a produção de fosfatase alcalina corresponde à transição da fase II-III (315). A par disto um grande número de enzimas vegetativas são também encontradas nos esporos (21,115,192,247).

QUADRO 1

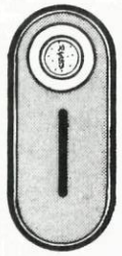
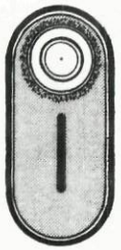
# CORRELAÇÃO MORFOGÉNESE/ACONTECIMENTOS BIOQUÍMICOS

| FASE | T | MORFOLOGIA/BIOQUÍMICA | REFERÊNCIAS |
|---|---|---|---|
| I  | $t_0 - t_1$ | 1-FORMAÇÃO DO FILAMENTO AXIAL | |
| | | 2-PRODUÇÃO DE PROTEASES ($t_0$-$t_3$) | 21, 62, 148, 163, 166, 185, 187, 214, 218, 257, 113, 178 |
| | | 3-SÍNTESE DE ANTIBIÓTICOS | 21, 35, 33, 39, 112, 179, 229, 258, 274, 36 |
| | | 4-"TURNOVER" DE PROTEÍNAS | 21, 257, 287, 289, 154 |
| | | 5-PRODUÇÃO DE $\alpha$-AMILASES | 195, 255, 290 |
| | | 6-RNA POLIMERASE | 45, 150, 161, 168, 169, 170, 297 |
| II  | $t_1 - t_2$ | 1-FORMAÇÃO DO SEPTO ESPORULATIVO | |
| | | 2-SÍNTESE DE FOSFOLIPÍDEOS ($t_1$-$t_3$) | 81, 88, 209 |
| | | 3-SÍNTESE DE ENZIMAS CICLO KREBS | 123, 121, 192, 302 |
| | | 4-SÍNTESE DE FOSFATASE ALCALINA | 3, 48, 102, 192, 323, 329 |
| | | 5-SÍNTESE DE ALANINA DESIDROGENASE | 192 |
| III  | $t_2 - t_3$ | 1-FORMAÇÃO DO PRÈ-ESPORO | |
| | | 2-SÍNTESE DE SUB-UNIDADES PROTEICAS DAS TÚNICAS | 10, 11, 246 |
| | | 3-SÍNTESE DO MUCOPEPTÍDEO ESPORAL | 208, 209 |
| | | 4-SÍNTESE DE GLUCOSE DESIDROGENASE | 192 |
| | | 5-SÍNTESE DE CATALASE TERMORESISTENTE | 157 |

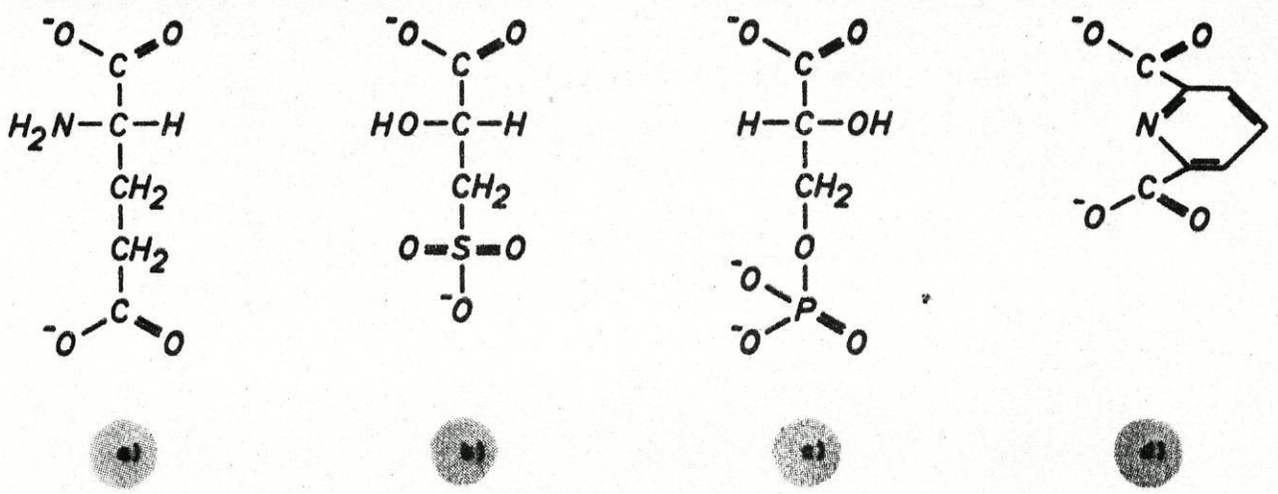
(CONTINUA)

## QUADRO 1

(CONTINUAÇÃO)

| FASE | T | MORFOLOGIA/BIOQUÍMICA | REFERÊNCIAS |
|---|---|---|---|
| IV  | $t_3 - t_4$ | 1-FORMAÇÃO DO CÓRTEX | |
| | | 2-REFRACTIBILIDADE DO ESPORO | 21, 339 |
| | | 3-RESISTÊNCIA AO TOLUENO | 186 |
| V  | $t_4 - t_5$ | 1-FORMAÇÃO DAS TÚNICAS | |
| | | 2-RESISTÊNCIA AO OCTANOL, CLOROFÓRMIO | 21, 186, 236 |
| | | 3-INCORPORAÇÃO DE CISTINA | 10, 306, 307 |
| | | 4-PRODUÇÃO DE SINTETASE DO DPA | 17, 49 |
| VI  | $t_5 - t_6$ | 1-MATURAÇÃO DO ESPORO | |
| | | 2-SÍNTESE DPA | 21, 49, 86, 119, 121, 124, 134, 196, 213, 296, 342 |
| | | 3-RESISTÊNCIA AO TCA | 186 |
| | | 4-TERMORESISTÊNCIA | 1, 21, 72, 105, 120, 147, 194, 342 |
| | | 5-SÍNTESE DE PEQUENAS MOLÉCULAS | 196 |

4.2. Substâncias específicas da esporulação - Há substâncias que aparecem, exclusivamente, durante a esporulação e que, por isso, têm sido usadas como marcadores da morfogênese (121). Hanson & col. referem como específicas da esporulação: DPA, mureína esporal, proteínas das túnicas e as enzimas implicadas na síntese destes componentes (121). Além do DPA, outras moléculas pequenas são exclusivas dos esporos, nos quais estão presentes em altas concentrações: ácido sulfoláctico, ácido glutâmico e o ácido fosfoglicérico (38,196).



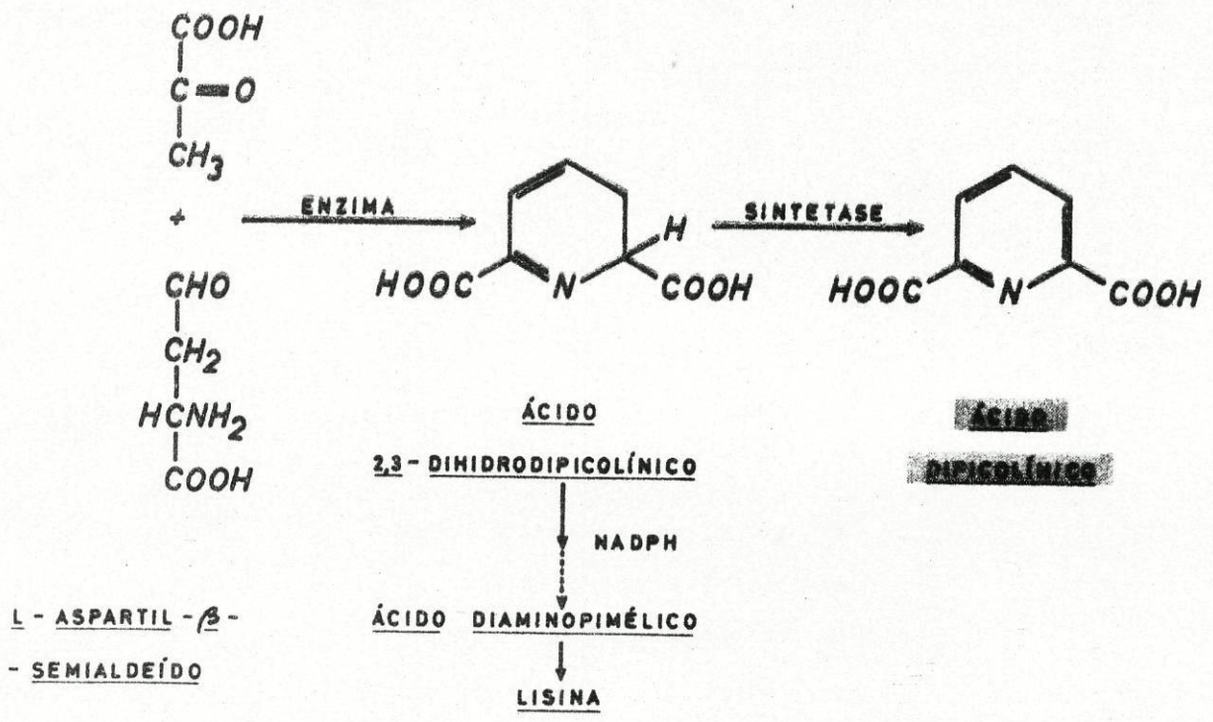
a) ÁCIDO L-GLUTÂMICO

b) ÁCIDO L-SULFOLÁCTICO

c) ÁCIDO D-FOSFOGLICÉRICO

d) ÁCIDO DIPICOLÍNICO (DPA)

Estas moléculas têm em comum dois grupos acídicos nas extremidades da cadeia carbonada e quelatam iões bivalentes, nomeadamente os iões $Ca^{++}$ (199,296), e são todas acumuladas no esporo nas fases tardias da esporulação (196). O DPA existe no citoplasma do esporo em cerca de 15% (159). O seu metabolismo está intimamente ligado ao da lisina, formando-se a partir de um precursor desta, o ácido dihidrodipicolínico (12,49,342). A transformação deste composto em DPA faz-se espontaneamente por oxidação ou pela acção de uma enzima própria da esporulação, a sintetase do DPA (17,49), a qual aumenta de maneira específica durante a esporulação (134).



A acumulação de DPA parece ser um dos elementos responsáveis pela termo-resistência (124,147), tese que é suportada pelo facto de a maioria das mutantes DPA$^-$ serem termo-sensíveis (327), embora existam mutantes DPA$^-$ que produzem esporos termo-resistentes (120,342). Esporos de mutantes DPA$^-$ não se mantêm no estado de dormência e têm uma germinação defeituosa, pelo que se admite que o DPA seja também requerido para este processo (119).

4.3. Proteases extracelulares - Células de Bacillus subtilis 168, em processo esporulativo, produzem, predominantemente, dois tipos de proteases: metaloproteases neutras (inibidas pelo EDTA) e as serilproteases alcalinas (inibidas pelo PMSF) (63,187,214). Estas proteases não são sintetizadas durante a fase exponencial (187).

4.3.1. As serilproteases parecem ter uma intervenção directa na esporulação. Assim, mutantes deficientes na produção de serilproteases têm a sua esporulação bloqueada na fase 0 (62); do mesmo modo, mutantes termo-sensíveis quanto à expressão da posse desta actividade enzimática, têm a sua esporulação bloqueada na fase 0 a temperaturas restritivas mas exibem uma esporulação normal a temperaturas permissivas (163). Por outro lado, a inibição química específica destas enzimas por PMSF também impede a esporulação do Bacillus subtilis (218). As serilproteases são requeridas entre $t_0$ e $t_3$ e parecem catalizar a modificação específica da polimerase do RNA vegetativo (163) e desempenhar um papel relevante no "turnover" das proteínas (177,255) e do RNA (19). Possivelmente participam também na degradação dos repressores catabólicos da es-

porulação (207) e na síntese de antibióticos peptídicos (312).

4.3.2. Quanto às metaloproteases, parece que, embora sejam específicas do processo esporulativo (148,166),não lhe são indispensáveis Mutantes de Bacillus subtilis deficientes na produção de metaloproteases esporulam normalmente (185).

4.3.3. O papel das esterases, que também são produzidas simultaneamente com as proteases extracelulares, não é claro durante o processo esporulativo (23, 176).

4.4. Fosfatases - Embora se saiba que numerosas espécies bacterianas produzem fosfatases alcalinas, esta enzima foi particularmente estudada na Escherichia coli (97,173,174). Nesta bactéria a produção desta enzima, induzida em meios deficientes em fósforo inorgânico (48,304), inicia-se pela formação,no citoplasma, de monómeros inactivos que depois transpõem a membrana citoplasmática e se dimerizam,tornando-se activos no espaço periplasmático (258). Esta localização, bem como o papel da membrana externa da parede celular na retenção desta e doutras enzimas nesse espaço foram amplamente demonstradas (4,56,175,198). Células do Bacillus subtilis sintetizam dois tipos de fosfatases: fosfatase alcalina vegetativa (3) e fosfatase alcalina esporulativa (319), que se distinguem por só a primeira ser repressível pelo fosfato. A fosfatase esporulativa é produzida durante as fases II-III (315) e está firmemente unida à parede celular ou à membrana citoplasmática,sendo no entanto removida por soluções de $MgCl_2$ 1 M (102,329). Algumas estirpes de Bacillus subtilis excretam fosfatases para o

meio de cultura (48). A fosfatase é uma enzima inductível tendo o operão fosfatase sido particularmente bem estudado em Escherichia coli (96). A genética e a regulação da fosfatase alcalina do Bacillus subtilis é mal conhecida.

4.5. α-amilase - No Bacillus subtilis existem dois tipos de α-amilase: uma enzima extracelular e outra associada à membrana citoplasmática (195). Ambas as enzimas estão sobre o controle do gene amyE e mutações neste gene afectam a produção das duas enzimas (215). A α-amilase extracelular é produzida pelo Bacillus subtilis só durante a esporulação (210), embora não pareça estar envolvida na morfogénese (254,255). Sintetizada ao mesmo tempo que as outras enzimas extracelulares (255), é activada por $Ca^{++}$ (290).

4.6.Enzimas do ciclo dos ácidos tricarboxílicos - Células de Bacillus crescendo aerobiamente em meio de esporulação (com glucose, extracto de levedura e sais minerais) obtêm energia oxidando a glucose preferencialmente pela via glicolítica até piruvato e acetato. Embora a via glicolítica (Embden-Meyerhoff) seja a preferencial, a via hexose monofosfato também é usada (103,340). Outras espécies utilizam também a via Entner-Doudoroff (50,107). Deste modo a oxidação fermentativa da glucose durante o crescimento pode avaliar-se, indirectamente, pela descida do pH do meio de cultura até ao seu completo consumo. Durante este período as enzimas do ciclo de Krebs não são requeridas (91,115). Durante a transição do crescimento vegetativo para o crescimento esporulativo ocorrem certas mudanças metabólicas (122). Assim, os produtos finais do catabolismo fermen

tativo da glucose que se acumularam durante o crescimento vegetativo são oxidados no ciclo dos ácidos tricarboxílicos e, por fosforilação oxidativa, ao longo da cadeia respiratória. Isto relaciona-se com um maior consumo de oxigénio e consequente produção de ATP durante a esporulação e ocorre ao mesmo tempo que aumentam os teores em aconitase, desidrogenase succínica, desidrogenase málica, fumarase e nos transportadores de electrões da cadeia respiratória (121,123,192). A oxidação dos catabolitos da fermentação da glucose traduz-se pela subida do pH no meio de cultura. A energia produzida nesta respiração aeróbia vai ser utilizada para as sínteses "de novo" que ocorrem durante o processo esporulativo (21,192). A correlação entre a actividade do ciclo de Krebs e a esporulação é evidente numa estirpe mutante de Bacillus subtilis, que sendo aconitase$^-$, não entra em esporulação (117). Do mesmo modo estirpes mutantes bloqueadas na produção de citocromos são também incapazes de esporular normalmente (91).

4.7. "Turnover" de proteínas - Num esporo temos a considerar as proteínas solúveis (20%), localizadas principalmente no citoplasma do esporo, e as proteínas insolúveis (80%), localizadas nas túnicas esporais (289).

Após $t_0$ as células em esporulação degradam as suas próprias proteínas para obtenção de precursores que usam nas sínteses "de novo" e as quais se realizam durante o processo esporulativo (19). Globalmente estas degradações e sínteses traduzem-se por um "turnover" das proteínas a um ritmo de 20%/hora (19). Estudos cinéticos da

síntese proteica, usando fenilalanina marcada, indicam que a síntese das proteínas do citoplasma esporal precede a síntese das proteínas das túnicas (289), as quais parecem ser sintetizadas no esporângio (21,255). Segundo Spudich & col., 75% das proteínas solúveis do citoplasma esporal, 48% das proteínas do esporângio e 95% das proteínas das túnicas dos esporos são sintetizadas "de novo " durante o processo de esporulação (287,288,289).

4.8. "Turnover" do RNA - Os r-RNA que são solúveis durante o crescimento exponencial, vão ser preferencialmente degradados durante a esporulação, a fim de fornecerem precursores para a síntese "de novo" de m-RNA, t-RNA e r-RNA, os quais são sintetizados nas mesmas proporções que durante a fase vegetativa. Esta degradação depende da formação de ribonucleases extracelulares (91) que, embora sintetizadas durante a esporulação, não parecem ser específicas desta fase (156). O "turnover" que lhe corresponde é de, aproximadamente, 20%/hora (19,21).

4.9. Antibióticos - Os antibióticos peptídicos são produzidos, somente mente, pelos microorganismos produtores de esporos e uma perda mutacional na síntese de antibióticos é muitas vezes associada à asporogenia (255). Estirpes mutantes que não produzem antibióticos em quantidades detectáveis são capazes de esporular normalmente (112). Tem sido sugerido que os antibióticos são componentes estruturais dos esporos (35), mas tem sido posto em dúvida no caso da bacitracina (179,274), polimixina (39) e mycobacilina (36). Nas concentrações em que estes antibióticos são produzidos inibem o crescimento vegetativo mas não a esporulação, pelo que se lhe tem atribuído

um papel regulador na transição da fase vegetativa para a fase esporulativa (275,334). Dois antibióticos são produzidos pelo Bacillus subtilis: surfactina e bacylisina (33,229).

## 5. MUTANTES DA ESPORULAÇÃO

5.1. A morfogénese da esporulação poderá ser definida como o conjunto de acontecimentos morfológicos, bioquímicos e genéticos interdependentes que promovem a transformação de uma célula vegetativa num esporo.

O estudo comparativo da morfogénese esporulativa realizada com estirpes selvagens e nas mutantes, simultaneamente dum ponto de vista genético, bioquímico e morfológico, ajudará a desvendar este processo tão complexo. O bom conhecimento da genética do Bacillus subtilis levou a que este tenha sido usado, preferencialmente, nos estudos da morfogénese da esporulação. O isolamento de mutantes da esporulação da estirpe Marburg de Bacillus subtilis foi facilitado pelo facto do fenótipo selvagem desta estirpe produzir, em meio sólido, colónias castanhas, enquanto que as mutantes da esporulação produzem colónias não pigmentadas facilmente distinguíveis (256). A pigmentação das colónias selvagens é devida à presença de melanina produzida durante a esporulação (256).

5.2. As estirpes mutantes espontâneas ou obtidas por mutagénese classificam-se em asporogénicas ($Spo^-$) e oligosporogénicas (Osp) (256). As asporogénicas são incapazes de formar esporos termo-resistentes, enquanto que as oligosporogénicas são capazes de formar esporos termo-resistentes, embora com taxas de esporulação variáveis

(21,256). O estudo ultramicroscópico das estirpes mutantes não pigmentadas pôs em evidência o aparecimento de mutantes bloqueadas nas diferentes fases da esporulação (244). Estas estirpes mutantes classificam-se, morfologicamente, de acordo com a última fase atingida por um número significativo de células dado o assincronismo da esporulação. Foi possível isolar mutantes da fase 0, I, II, III, IV, V e VI (21,28,88,244). As mutantes bloqueadas entre as fases 0-III designam-se por mutantes precoces, e às bloqueadas nas fases posteriores, mutantes tardias (21,28). As estirpes mutantes asporogénicas de Bacillus subtilis podem ser isoladas também por selecção das resistentes ao clorofórmio (188). Esta resistência surge nas fases tardias e, portanto, este método leva ao isolamento preferencial de mutantes tardias, em contraste com o método da pigmentação, que selecciona predominantemente mutantes precoces (188). Têm sido descritas mutantes que produzem, durante a esporulação células anormais com septos esporulativos, contendo umasmaterial parietal e outras diafragmas múltiplos, pré-esporos hemisféricos, esporos sem córtex (28,88,188,332). Um outro grupo de estirpes mutantes de Bacillus subtilis, conhecido recentemente, produz, durante a esporulação, numerosas inclusões no esporângio, mutantes LAD ("late abnormal derepressed mutants") (26,333,Figs,81-83 pag.140). Estas estruturas foram explicadas pela superprodução edeposição irregular dos componentes do córtex ou das túnicas (26, 333).

Piggott & Coote não fazem qualquer diferenciação entre mutantes asporogénicas e oligosporogénicas, usando a seguinte nomenclatura para as caracterizar: Spo0, SpoI, SpoII, SpoIII, SpoIV e

SpoV. Spo é usado para referir os loci genéticos cujas mutações afectam a formação do esporo mas não afectam o crescimento vegetativo (207).

## 6. MECANISMOS REGULADORES E CONTROLE GENÉTICO DA ESPORULAÇÃO

6.1. Nas bactérias que esporulam o nucleóide contém, além dos genes vegetativos, os genes que governam a esporulação.

No Bacillus subtilis estes genes, identificados em número de cerca de 40 (por experiências de transformação e transdução), estão dispersos ao longo do cromossoma e parecem submetidos a um mecanimo comum de controle genético, em que cada gene interviria na expressão dos genes, com papel ulterior na sequência esporulativa mas não na dos genes que participam em estádios anteriores, pleiotropia unidireccional (20). Ao grupo de genes ou operões envolvidos na esporulação deu-se o nome de "Esporulão" (21).

6.2. Células de Bacillus durante o crescimento vegetativo, em meios de cultura sintéticos complexos, não produzem esporos (21). Os genes da esporulação, durante o crescimento vegetativo, parecem estar submetidos a uma repressão catabólica, admitindo-se que o repressor seria um composto contendo carbono e azoto. O esgotamento de substratos rapidamente metabolizáveis no terminus do crescimento exponencial provocaria uma diminuição na concentração intracelular do repressor, permitindo a expressão dos genes esporulativos (109,257). Tal mecanismo poderá explicar, também, a repressão das enzimas do ciclo de Krebs durante o crescimento exponencial (118). As alterações morfológicas e enzimáticas que após $t_0$ aparecem de uma maneira

sequencial pressupõem o aparecimento de novos m-RNA que não foram detectados em células vegetativas (21,68,70,71). No entanto, a maior parte dos m-RNA sintetizados durante o crescimento exponencial aparece também durante a morfogénese (64,71). O aparecimento de novos m-RNA pressupõe uma transcrição selectiva do DNA e neste processo parece ser determinante a especificidade da polimerase do m-RNA, quer durante a esporulação de Bacillus subtilis (170), quer noutras situações em bactérias e bacteriófagos (45). Assim, a polimerase do RNA de Bacillus subtilis (holoenzima $\alpha_2 \beta \beta' \gamma$), obtida a partir de células vegetativas, é capaz de copiar o DNA do fago $\phi$e, enquanto que a mesma enzima obtida a partir de células em esporulação é incapaz de o fazer (170). O aparecimento de estirpes mutantes da polimerase do m-RNA, resistentes à rifampicina e simultaneamente com uma esporulação alterada, parece confirmar a importância desta enzima na morfogénese (161). A modificação da polimerase do RNA da fase esporulativa foi atribuída a uma clivagem de subunidades $\beta$ dessa molécula; no entanto, há dados que parecem mostrar que esta clivagem é um artefacto das técnicas de purificação da enzima (150,297) e com base nestes dados Losick sugere que a modificação da polimerase resulta da perda de actividade da subunidade $\gamma$ (168). A modificação da especificidade da polimerase do RNA durante a morfogénese far-se-ia de um modo sequencial (40). Contraditoriamente, a polimerase do RNA não parece desempenhar um papel relevante durante a diferenciação celular observada com outros microorganismos (32,47). O aparecimento sequencial de novas estruturas, de novas enzimas e novos antigénios durante a esporulação indica uma activação sequencial dos genes ou operões esporulativos (20,21). O exame de grande número de mutantes

parece confirmar esta hipótese (21). A natureza pleiotrópica das mutantes que não são capazes de esporular normalmente torna difícil a identificação do seu genótipo (137).

6.3. Dado o papel universal do cAMP como regulador na repressão catabólica (52), particularmente bem estudada em Escherichia coli (223), levantou-se a possibilidade da sua participação na regulação da expressão dos genes esporulativos. No entanto, o facto de cAMP e adenilciclase não terem sido nunca isolados em Bacillus subtilis parece desmentir essa hipótese (116,139).

6.4. Por outro lado, a desrepressão que ocorre no início da esporulação foi atribuída a uma diminuição de cGMP. Esta molécula tem um efeito inibidor na transcrição do m-RNA no Escherichia coli e no Bacillus thuringiensis (34,341), parecendo actuar por inibição da ligação cAMP ao CRP (341).

6.5. O papel regulador do HPN e outras pequenas moléculas no processo esporulativo foi também defendido (116,219,220,221). Para além destes mecanismos actuando ao nível da transcrição, outros foram propostos actuando na translação. Durante a morfogénese do Bacillus subtilis (143,162,314) foram descritos novos tipos de t-RNA susceptíveis de explicar certos aspectos da diferenciação que ocorre durante a esporogénese. Alterações estruturais e funcionais têm sido encontradas entre os ribossomas vegetativos e esporulativos nas células de Bacillus subtilis (89,111). Alterações na subunidade 30S têm sido observadas no Bacillus subtilis durante a esporulação, enquanto que estirpes mutantes asporogénicas não apresentam essas modificações nos ribossomas (111).

# II - MATERIAL E MÉTODOS

1. ESTIRPES DE BACILLUS SUBTILIS

As estirpes utilizadas neste trabalho foram as seguintes:

1.1. Estirpes selvagens: 168,PM6,PM9,SB5-2,AA1,AA4,BD68

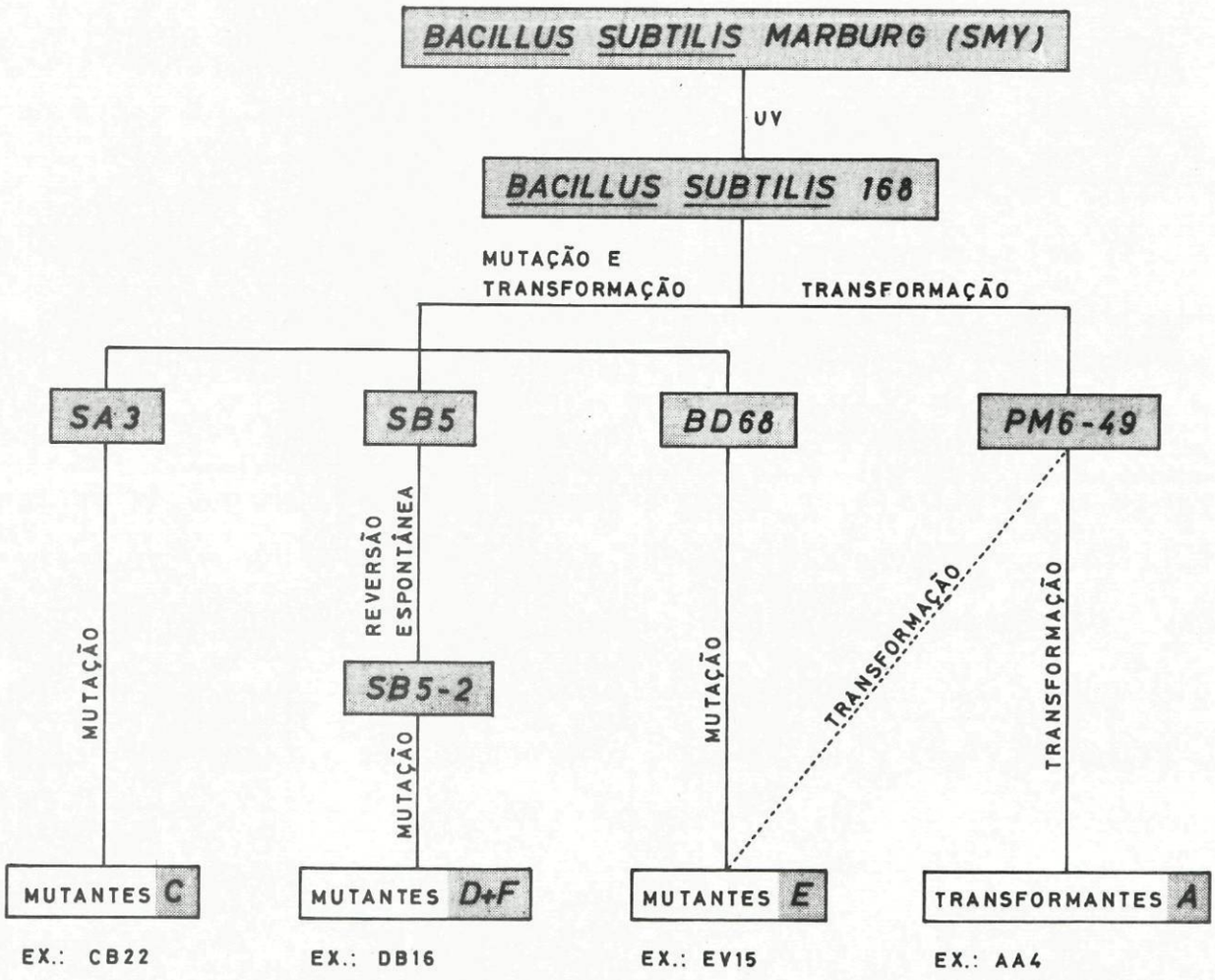
1.2. Estirpes DPA⁻: AB12,CB22.

1.3. Estirpes Sco: EV15(ScoA1),EC21(ScoB2),AA5(ScoA1),AA64(ScoA1), FA20(Sco13),FE10(ScoC4),AC33(ScoC3) e AA2(ScoC1).

1.4. Estirpes atenuadas: DB16,FA10,FD10,FE9,SE10,SE11,SE12,SE13,SE16.

1.5. Outras estirpes: AB35,AB53,AB72,AB73, AA16,AA57,AC31,AD19,FF15.

A filiação das estirpes de Bacillus subtilis mencionadas é a seguinte:



As estirpes utilizadas neste trabalho foram fornecidas pelo Dr. George Balassa, Departamento de Bioquímica Macromolecular, Faculdade de Ciências da Universidade de Montpellier, França. As estirpes SE10,11,12,13,16 foram obtidas a partir da estirpe Marburg por tratamento com radiações UV, tendo sido isoladas por Millet & Ryter (188).

## 2. MEIOS DE CULTURA

### 2.1. Meios de cultura líquidos:

2.1.1. Meio Stock concentrado: Caldo nutritivo (Difco)- 80g; cloreto de potássio - 10g; sulfato de magnésio (0,01M); água destilada q.b.p. 1.000 ml. O pH foi ajustado para 7,4 com NaOH 10M.

2.1.2. Meio de pré-cultura: Meio stock diluído 3 vezes com água destilada e esterilizada.

2.1.3. Meio de esporulação: Meio stock diluído 10 vezes com água destilada e esterilizada e suplementado com: cloreto de cálcio ($10^{-3}$M); cloreto de magnésio ($10^{-5}$M) e cloreto ferroso ($10^{-6}$M). As soluções dos sais minerais foram conservadas na geleira e adicionadas ao meio de cultura assepticamente no momento de emprego. Esterilização do meio de cultura e da solução de sais foi feita por autoclavagem a 121°C durante 20 minutos.

2.1.4. Meio de diluição para a determinação do número de células viáveis: Sulfato de magnésio ($10^{-3}$M); cloreto de potássio ($5x10^{-3}$M); glucose - 5g; fosfato monopotássico ($7,7x10^{-3}$M); fosfato dipotássico ($1,8x10^{-3}$M) e água destilada q.b.p. 1.000 ml.

A autoclavagem foi feita a 121°C durante 20 minutos.

2.2. Meios de cultura sólidos para esporulação: Caldo nutritivo (Difco) - 4g; cloreto de potássio ($0,67x10^{-2}M$); sulfato de magnésio ($5x10^{-5}M$); ácido glutâmico ($3x10^{-4}M$); glucose - 0,1g; cloreto de cálcio ($5x10^{-3}M$); cloreto de manganês ($5x10^{-5}M$); cloreto ferroso ($5x10^{-6}M$); agar - 22g; água destilada q.b.p. 1.000 ml.

As soluções de sais minerais, glucose e restantes elementos foram autoclavadas separadamente a 121°C durante 20 minutos, e após arrefecimento até à temperatura de 60°C, as três soluções foram misturadas assepticamente e distribuídas em placas de Petri.

## 3. CULTURAS

As culturas foram geralmente efectuadas à temperatura de 37°C e nos meios líquidos o seu volume nunca excedeu 1/10 do volume do recipiente. As culturas foram incubadas em banho-maria (Biolafite AT640) e agitadas com reciprocação de 40 ciclos por minuto. Todas as culturas foram feitas no meio referido em 2.1.3. e inoculadas na proporção de 1/100 (volume/volume) com uma cultura de 12-15 horas em meio de cultura referido em 2.1.2. O crescimento foi avaliado por turbidimetria a 550 nm, usando um espectrofotómetro Safas 1.700. O início da esporulação, $t_0$, foi determinado como fim da fase exponencial, na curva semi-logarítmica (Fig.2, pág. 44).

## 4. QUANTIFICAÇÃO DAS CÉLULAS NAS DIFERENTES FASES MORFOLÓGICAS, DURANTE O PROCESSO ESPORULATIVO

Amostras colhidas na fase exponencial e em $t_0$, $t_1$,....$t_n$ foram preliminarmente observadas em microscopia de contraste de fase e depois em microscopia electrónica (vidé 9.). Em cada observação contavam-se as células nas diferentes fases morfológicas num total estatisticamente significativo. Simultaneamente, como controle fisiológico do processo esporulativo, determinava-se, em cada amostra, o número de células resistentes a agentes químicos e físicos (contagem de células viáveis) (vidé 8.).

## 5. PREPARAÇÃO DE ESPOROS LIVRES

Os esporos das culturas em $t_{24}$-$t_{48}$, do meio líquido de esporulação, foram colhidos por centrifugação a 9.000 G durante 15 minutos à temperatura de 0°C. A activação dos esporos foi feita por aquecimento a 80°C durante 10 minutos e conservados no frigorífico a +4°C, em presença de clorofórmio. Em algumas experiências os esporos foram purificados por tratamento com lisozima (100-200 µg/ml, a 37°C durante 2 horas, em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,5) e lavados com água destilada e esterilizada, repetidas vezes.

## 6. LISADOS DAS CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO

Após os tratamentos com lisozima as células foram lisadas por vários ciclos de congelação/descongelação.

## 7. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS

A determinação das células viáveis durante o processo esporulativo e após os tratamentos com solvente, TCA e calor húmido, fez-se por contagem de unidades formadoras de colónias em meio sólido, à temperatura de incubação de 37°C durante 72 horas. A determinação do número de esporos fez-se, após a sua activação por aquecimento a 80°C durante 10 minutos, por contagem de unidades formadoras de colónias.

## 8. TRATAMENTO DAS CÉLULAS POR AGENTES QUÍMICOS E CALOR HÚMIDO

8.1. Solventes orgânicos não miscíveis com a água (XIL,TOL,BENZ, OCT,BUT,CLOR): A 4,5 ml da cultura para esporulação, contendo aproximadamente $5x10^8$ células/ml, adicionava-se 0,5 ml do solvente orgânico e, após agitação vigorosa (com Vortex), deixava-se repousar durante 10 minutos à temperatura ambiente. A determinação do número de células resistentes aos tratamentos fez-se pelo método da contagem das células viavéis.

8.2. Solventes orgânicos miscíveis com a água (MET, ETA, ACET, DIOX, PIR): a 0,5 ml da cultura adicionava-se 4,5 ml do solvente orgânico e deixava-se em contacto durante 10 minutos à temperatura ambiente, antes da sementeira para contagem das células viáveis.

8.3. TCA e fenol: a 0,5 ml da cultura adicionou-se 4,5 ml da solução aquosa de fenol ou TCA a 5% (p/v) e deixou-se actuar durante 10 minutos à temperatura de +4°C. A mistura foi diluída 10 vezes antes das sementeiras para a contagem das células viáveis.

8.4. Tratamento dos esporos com ureia-mercaptoetanol (ureia-Me): Os esporos preparados e lavados conforme indicado em 5., foram suspensos em: tampão Tris-HCl 0,1M contendo ureia (8M) e mercaptoetanol (1%), pH 8,5, durante 2 horas, à temperatura de 37°C. O tratamento foi detido por 3 lavagens sucessivas dos esporos com uma solução tampão de cacodilato 0,01M de pH 7.

8.5. Tratamentos subsequentes à reacção com ureia-mercaptoetanol: Em alguns tratamentos, após as lavagens, as células foram tratadas com água destilada saturada de octanol e clorofórmio, conforme indicado em 8.1. Noutros casos, à mistura ureia-Me adicionou-se SDS (1,5%) Noutros casos ainda, após a reacção com ureia-Me, os esporos foram lavados com tampão cacodilato e tratados com lisozima (100-200 µg/ml em tampão Tris-HCl 0,1M com pH 8,5 e contendo NaCl (0,15M) EDTA (0,1M)), à temperatura de 37°C, durante 1 hora e com pronase (sol. aquosa a 1%).

8.6. Tratamento dos esporos com NaOH: Os esporos são suspensos em NaOH 0,1M durante 2 horas à temperatura de 37°C.

8.7. Tratamento dos esporos com pronase: Cortes das células, colhidos sobre grelhas de ouro, foram oxidados com $H_2O_2$ a 3% durante 10 minutos, à temperatura ambiente (5,189,190,262), lavados em água destilada e tratados com solução aquosa de pronase a 1%, à temperatura de 37°C durante 1 hora. Após a digestão enzimática, foram corados com solução de acetato de chumbo (306). Como controle, cortes das células de igual espessura trataram-se do mesmo modo, excepto quanto à solução de pronase, que foi inactivada por aquecimento a 100°C durante 4 minutos.

8.8. Tratamento das células pelo calor húmido: As culturas eram aquecidas a 80°C durante 10 minutos, após o que as células foram colhidas por centrifugação e fixadas para microscopia electrónica.

## 9. PROCESSAMENTO DAS CÉLULAS PARA MICROSCOPIA ELECTRÓNICA PELA TÉCNICA DOS CORTES ULTRAFINOS

As amostras colhidas foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos, à temperatura de 0°C e fixadas pelos seguintes processos:

9.1. Fixação glutaraldeído-ósmio: Aos sedimentos das células ou dos lisados juntava-se glutaraldeído a 2,5% em tampão cacodilato 0,1M, pH 7, suplementado com 10 mM de $CaCl_2$. Após 14-72 horas as células foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 10 minutos à temperatura de 0°C e lavadas 3 vezes com tampão cacodilato. A seguir procedeu-se à fixação com $OsO_4$ pela técnica RK (sem pré-fixação) e à pós-fixação com acetato de uranilo (266). As amostras fixadas eram desidratadas com concentrações crescentes de etanol, mergulhadas em óxido de propileno e incluídas em Epon (171). As secções das células realizaram-se em ultramicrotomo Ultratome LKB III, com faca de diamante, montadas em grelhas de 400 mesh e fazendo-se contraste com solução de acetato de chumbo durante 5 minutos (306). As fotografias obtiveram-se por meio de microscópio electrónico Siemens Elmiskope 1A, a 80 KV, com duplo condensador e objectiva de abertura 50 µm.

9.2. Fixação com $OsO_4$ pela técnica de Ryter-Kellemberger (RK) (242): As células foram submetidas aos seguintes passos: pré-fixação - a

10 volumes de cultura foi adicionado 1 volume de fixador RK e deixado actuar durante 10 minutos à temperatura ambiente; fixação principal - as células pré-fixadas foram centrifugadas e suspensas num pequeno volume de caldo de triptona (Difco) e adicionados 10 volumes de fixador RK. Deixou-se actuar durante 4-16 horas à temperatura ambiente; pós-fixação - após a acção do fixador principal as células foram centrifugadas e tratadas, durante 2 horas, à temperatura ambiente com acetato de uranilo em tampão de acetato de veronal.

Para as células tratadas por agentes químicos (solventes, TCA, fenol) e pelo calor húmido omitiu-se a pré-fixação. A fim de garantir uma boa fixação o $OsO_4$ foi substituído aos 15 minutos de fixação, por novo fixador e deixado actuar durante cerca de 16 horas à temperatura ambiente.

9.3. Traçados densitométricos e avaliação da espessura do exosporo: Os traçados densitométricos foram obtidos com recurso a um microdensitómetro Joyce Loeble modelo MKIIICS. A medição da espessura dos invólucros esporais foi feita em fotografias ampliadas 200.000 vezes, utilizando uma lupa amplificadora Lomb.

## 10. DOSEAMENTO DAS PROTEASES EXTRACELULARES

A determinação foi feita no sobrenadante das culturas em esporulação, com azocaseína como substrato, pela técnica de Millet (187), adaptada por Dod & col. (69).

10.1. Doseamento diferencial das proteases extracelulares: A 0,5 ml do sobrenadante adicionaram-se 0,005 ml de uma solução etanólica

de PMSF 0,1M. Após incubação a 0°C durante 2 horas, a actividade proteásica foi determinada.

## 11. DOSEAMENTO DE α-AMILASE

A determinação efectuou-se segundo a técnica de Moselay & Keay (191).

## 12. DOSEAMENTO DE DPA

Porções alíquotas da cultura em esporulação foram centrifugadas e o sedimento ressuspenso em 2 ml de água destilada. A suspensão foi autoclavada a 121°C, durante 15 minutos, e depois procedeu-se à sua centrifugação. A 1 ml do sobrenadante misturaram-se 0,25ml do reagente de Janssen (142). Os resultados foram obtidos por extrapolação, a partir de uma curva padrão de DPA.

## 13. DOSEAMENTO DE FOSFATASES ALCALINAS

Porções alíquotas da cultura (5 ml) foram centrifugadas; o sedimento foi lavado com tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,4, ressuspenso no mesmo tampão adicionado de lisozima (100 µg/ml) e incubado durante 30 a 60 minutos à temperatura de 37°C. Para o doseamento foi seguida a técnica de Glenn & Mendelstam (102).

# III-RESULTADOS

# ESTIRPES SELVAGENS ($SPO^+$)

## A - ESTUDO DA ESPORULAÇÃO DO BACILLUS SUBTILIS 168 E OUTRAS ESTIRPES SELVAGENS ($Spo^+$)

A esporulação bacteriana é um processo de diferenciação celular bastante complexo, sob o controle de um grande número de genes (21,207). A natureza dos mecanismos reguladores da actividade genética da esporulação não está esclarecida (21). Pareceu-nos que o estudo comparativo da morfogénese da esporulação em estirpes selvagens e estirpes mutantes de Bacillus subtilis, ajudaria a interpretar este processo complexo. Mutações que afectem determinadas fases esporulativas devem traduzir-se por alterações morfológicas e enzimáticas das células. Com a finalidade de interpretar as características das mutantes que fazem parte deste trabalho, procedemos primeiramente à caracterização exaustiva das estirpes selvagens do Bacillus subtilis. Assim, por exemplo, o perfeito conhecimento do desenvolvimento morfológico e da aquisição das resistências aos agentes químicos, observadas nas estirpes selvagens, permite-nos avaliar melhor o comportamento das mutantes esporulativas que fazem parte deste trabalho.

### 1. DETERMINAÇÃO DE $t_0$

O crescimento das células de Bacillus subtilis 168 e outras estirpes em meio de cultura líquido para esporulação foi avaliado por métodos turbidimétricos e o terminus do crescimento exponencial ($t_0$) foi determinado conforme indicado na Fig. 2 . A partir de $t_0$ foram colhidas amostras hora a hora, e utilizadas nos diferentes ensaios. Em todas as experiências a evolução do pro-

cesso esporulativo foi seguido à microscopia óptica e o número de células viáveis após os diferentes tratamentos foi determinado com a finalidade de só utilizar resultados de experiências que decorreram normalmente. Indicamos apenas os resultados de uma única experiência com a estirpe 168, pois a sua descrição, em todos os ensaios, pareceu-nos desnecessária (Quadro 2 )

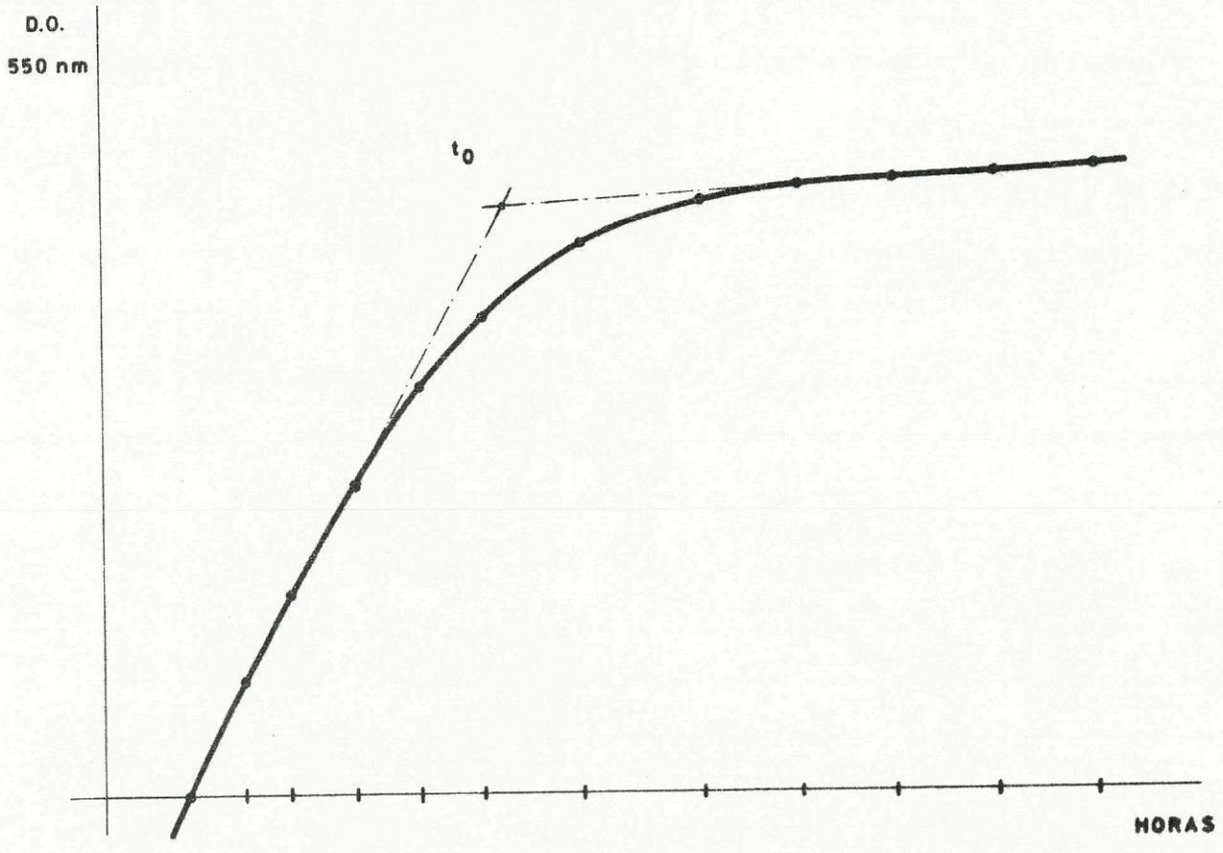



Fig. 2 - Curva do crescimento bacteriano e determinação do início do processo esporulativo ($t_0$).

QUADRO 2

CÉLULAS DE BACILLUS SUBTILIS 168 RESISTENTES AOS SOLVENTES ORGÂNICOS E AO AQUECIMENTO (VIÁVEIS/ml)

| T | S/ TRATAMENTOS | TRATAMENTOS COM: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | TOL | OCT | CLOR | AQUECIMENTO (80°C/10') |
| $t_1$ | $2.10^8$ | | | | |
| $t_2$ | | $2.10^4$ | | | |
| $t_{2,5}$ | | $7.10^4$ | $2.10^3$ | $1,5.10^3$ | |
| $t_3$ | $3.10^8$ | $2.10^6$ | $2.10^4$ | $7.10^3$ | |
| $t_{3,5}$ | | $7.10^7$ | $5.10^5$ | $6.10^4$ | $2.10^3$ |
| $t_4$ | | $1,3.10^8$ | $6.10^7$ | $2.10^6$ | $8.10^4$ |
| $t_{4,5}$ | | | $8.10^7$ | $4.10^7$ | $9.10^6$ |
| $t_5$ | $6.10^8$ | $4.10^8$ | $3.10^8$ | $1.10^8$ | $2.10^8$ |
| $t_6$ | | $4.10^8$ | $6.10^8$ | $4.10^8$ | $3.10^8$ |
| $t_{24}$ | $8.10^8$ | $6.10^8$ | $8.10^8$ | $7.10^8$ | $7.10^8$ |

Controle do processo esporulativo. Em todas as culturas em esporulação, indicadas neste trabalho, estes ensaios foram sempre realizados.

## 2. CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA DAS CÉLULAS DAS ESTIRPES SELVAGENS DE BACILLUS SUBTILIS

2.1. Células vegetativas de Bacillus subtilis fixadas pela técnica RK e observadas à microscopia electrónica pela técnica dos cortes ultrafinos, apresentam o aspecto ultraestrutural habitualmente descrito para os outros Bacillus (93) (Fig.3): i - a parede celular é constituída por uma camada electronodensa não estratificada; ii - a membrana citoplasmática exibe uma estrutura tripla de perfil assimétrico; iii - o núcleo exibe a sua estrutura fibrilar; iv - a presença de mesossomas depende das condições de fixação utilizadas: quando as células são fixadas pela técnica RK com pré-fixação os mesossomas são mais proeminentes (Fig.3 ), do que quando há omissão da pré-fixação (Fig.36, pág. 87), embora os resultados não sejam tão evidentes como os observados em outros Bacillus (264).

2.2. Ultraestrutura das células de Bacillus subtilis 168 em esporulação e de outras estirpes selvagens ($Spo^+$)

2.2.1. FASE I - Nesta fase as células apresentam, ocasionalmente, um alongamento do material nuclear no sentido do eixo maior da célula (Fig.4 ). A presença desta estrutura foi quantificada, nas diferentes estirpes selvagens e estirpes mutantes e transformantes (Quadro 3).

Fig. 3 - Célula vegetativa de B. subtilis 168 fixada pela técnica RK (com pré-fixação). 74.000X.

Fig. 4 - Célula de B. subtilis 168 na fase I e colhida em $t_1$. 53.000X.

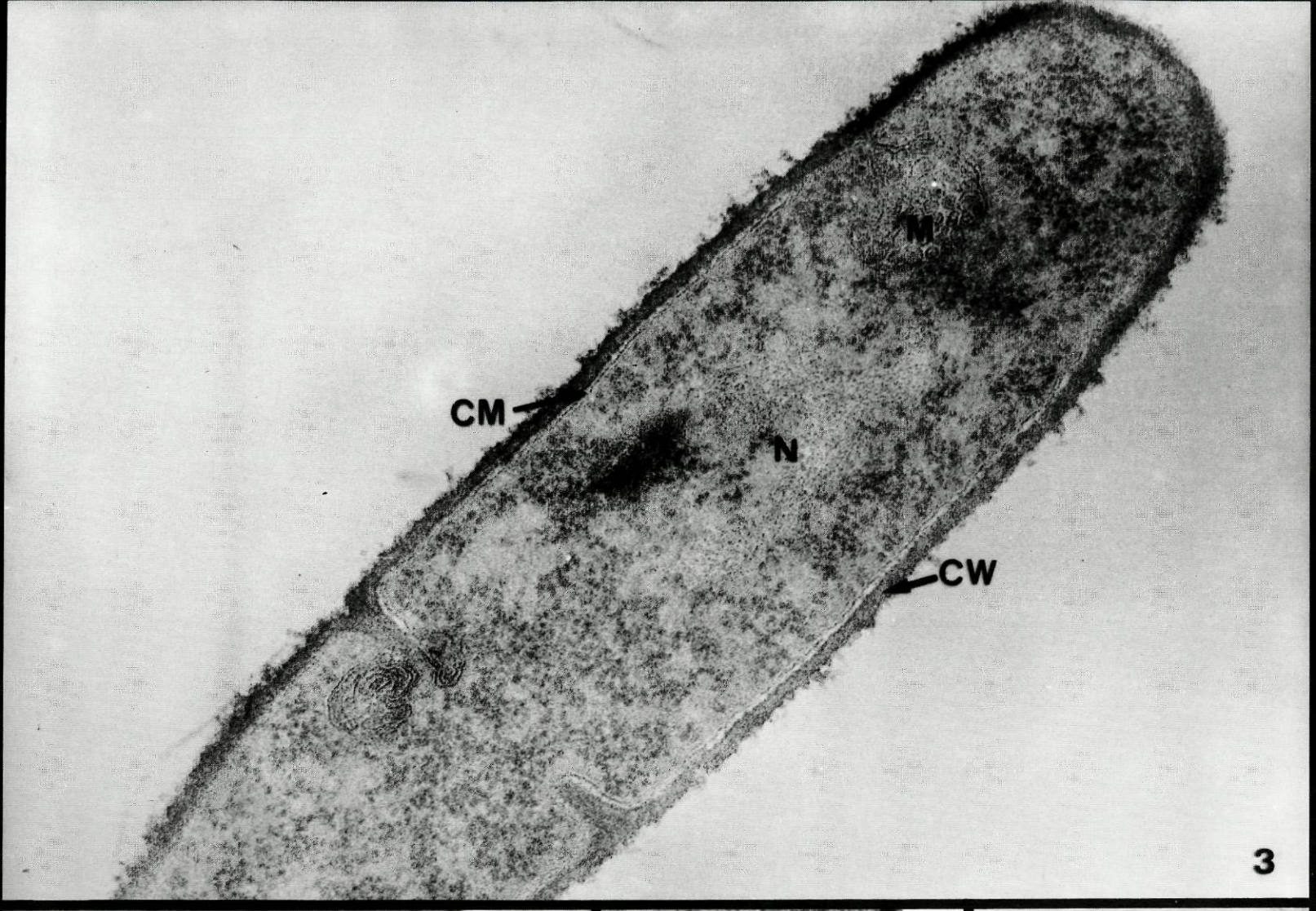
Fig. 5 - Célula de B. subtilis 168, colhida em $t_1$, apresentando protuberancias parietais de localização polar (setas). 64.000X.

Fig. 6 - Célula de B. subtilis 168, na fase II e colhida em $t_2$. Notar a presença de material electronodenso no septo esporulativo e em conexão com a camada interna da parede celular. 60.000X

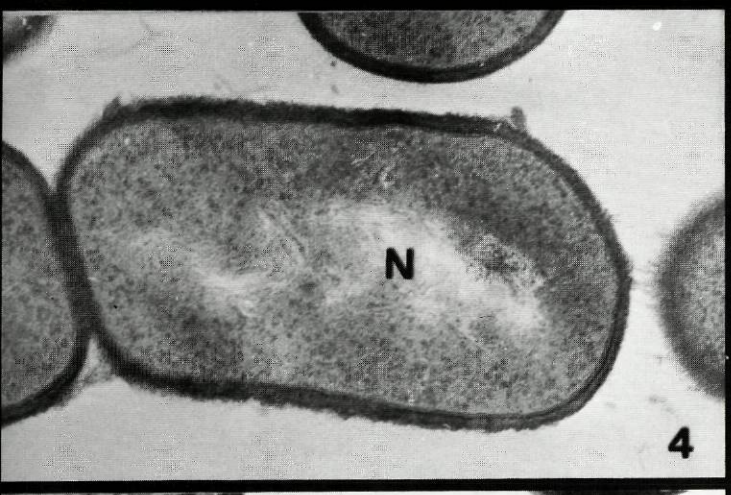
Fig. 7 - Célula de B. subtilis 168 na fase II com o material polissacarídico da parede celular evidenciado pela técnica de Thiery (299). 64.000X.

Fig. 8 - Célula de B. subtilis 168 na fase II, colhida em $t_2$. O septo esporulativo apresenta uma protusão no sentido do polo não esporal da célula. 99.000X.

CW - Parede celular
CM - membrana citoplasmática
N - Núcleo
R - Ribossomas
M - Mesossomas



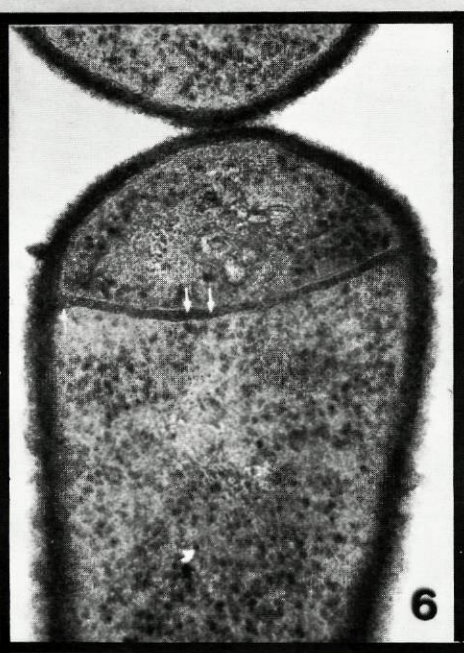

3



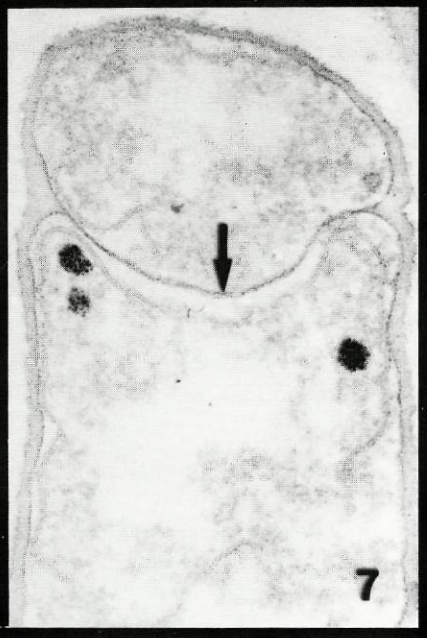

4



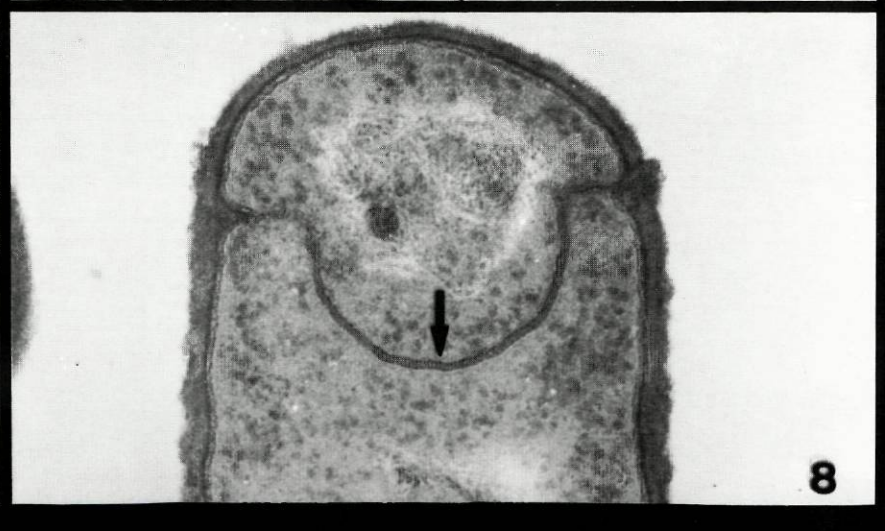
5



6



7



8



9




10



11

Fig. 9 - Células de B. subtilis 168 colhidas em $t_2$. A zona anular de origem do septo esporulativo na membrana citoplasmática desloca-se na direcção do polo mais próximo. 77.000X.

Fig. 10- Células de B. subtilis 168 na fase III colhida em $t_3$ e fixada pela técnica RK (com pré-fixação). Notar a presença de mesossomas (M) no pré-esporo. 64.000X.

Fig. 11- Células de B. subtilis 168 na fase II colhidas em $t_2$. 73.000X.

QUADRO 3 — CÉLULAS NA FASE I

| ESTIRPE | % DE CÉLULAS | ESTIRPE | % DE CÉLULAS |
|---|---|---|---|
| 168 | 1-1-3 | DB16 | 0 |
| AA4 | 0 | EV15 | 0 |
| AA5 | 0 | FA10 | 0 |
| AA57 | 0 | FA20 | 0 |
| AB35 | 0 | FD10 | 0 |
| AB53 | 0 | FE10 | 0 |
| AB72 | 0 | PM6 | 0-1 |
| AB73 | 0 | PM9 | 1 |
| AD19 | 0 | SB5-2 | 0 |
| BD68 | 0-0 | | |

As % foram avaliadas em relação ao número total de células contadas, tendo sido somente utilizadas secções longitudinais das células.

2.2.2. FASE II - É geralmente aceite que a fase II é caracterizada pela formação de um septo esporulativo com localização assimétrica (Fig. 6 ). Ocasionalmente, em alguns cortes, foram observadas células exibindo, antes da formação do septo, protuberâncias parietais de localização polar (Fig.5 ). As protuberâncias anexas ao pré-esporo persistem até ao fim da fase V (Fig.16 ), sendo menos frequentes durante a fase VI (Figuras 17,52,54). No espaço intermembranoso do septo esporulativo é visualizável material electronodenso em conexão com a camada interna da parede celular (Figs. 6-8).

2.2.3. FASE III - Caracteriza-se pela existência de um protoplasto de dupla membrana mergulhado no citoplasma esporangial sem

qualquer ponto de contacto com a membrana citoplasmática do esporângio (Figs.10,12). As membranas do pré-esporo quando fixadas pela técnica RK exibem o perfil assimétrico. A membrana interna e externa do pré-esporo têm polaridades opostas, com os respectivos folhetos mais densos virados para o espaço intermembranoso (Fig.12 a). No espaço intermembranoso do pré-esporo é particularmente evidente a existência de material electronodenso semelhante, morfologicamente, ao descrito no septo esporulativo na fase II (Figs. 12,14). No citoplasma do esporângio, no espaço para onde vão ser sintetizadas as túnicas esporais nota-se a ausência de ribossomas (Figs.12,14).

2.2.4. FASE IV - A síntese do material cortical organiza-se no espaço intermembranoso do pré-esporo e não apresenta densidade electrónica (Figs. 13,14). Junto à membrana interna do pré-esporo observa-se uma camada electronodensa (Figs.13,14,26,27,30,33). Frequentemente foram observadas na vizinhança do pré-esporo estruturas lamelares com localização sub-polar e lateral (Figs. 14,27,30). O DNA já não exibe, nesta fase, a estrutura fibrilar embora os ribossomas sejam ainda claramente visualizáveis (Fig 13).

2.2.5. FASE V - As túnicas formam-se no lado de fora da membrana externa do pré-esporo, exibindo a túnica interna uma estrutura lamelar e a túnica externa apresenta grande densidade em electrões e sem qualquer estratificação (Figs. 15, 16). Só ocasionalmente foi possível detectar a estrutura tripla da membrana externa do pré-esporo (Fig.15, dupla seta). O citoplasma do esporo apresenta

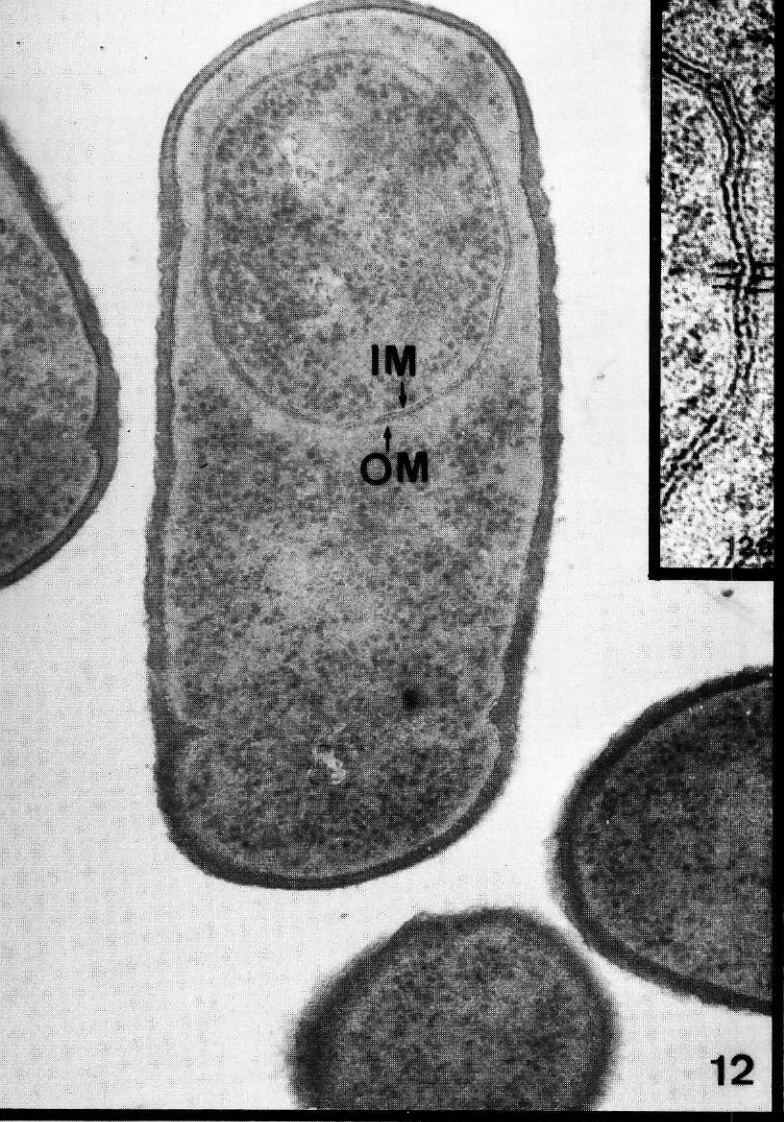
Células de B. subtilis 168 colhidas durante o processo esporulativo

Fig. 12,12a - Célula na fase III, colhida em $t_{3,5}$. Notar a presença de 2 sistemas membranosos cercando o citoplasma do pré-esporo. As duas membranas apresentam polaridades opostas, com os folhetos mais densos virados para o espaço intermembranoso. 66.000X.

Fig.13 - Célula na fase IV, colhida em $t_4$. Notar a presença do material cortical (Cx) sem densidade electrônica, no espaço intermembranoso do esporo e a presença de material electronodenso (GCW) aderente à membrana interna (IM) do esporo. 72.000X.

Fig.14 - Células nas fases III e V, colhidas em $t_4$. Na célula da fase V observar na vizinhança do pré-esporo estruturas lamelares com localização sub-polar e lateral (setas). Notar a ausência de ribossomas no espaço circundante do pré-esporo (dupla seta). 72.000X.

IM - Membrana interna
OM - Membrana externa
Cx - Cortex
GCW- Parede celular germinativa
N - Núcleo
R - Ribossoma
IC - Túnica interna
OC - Túnica externa




12







13



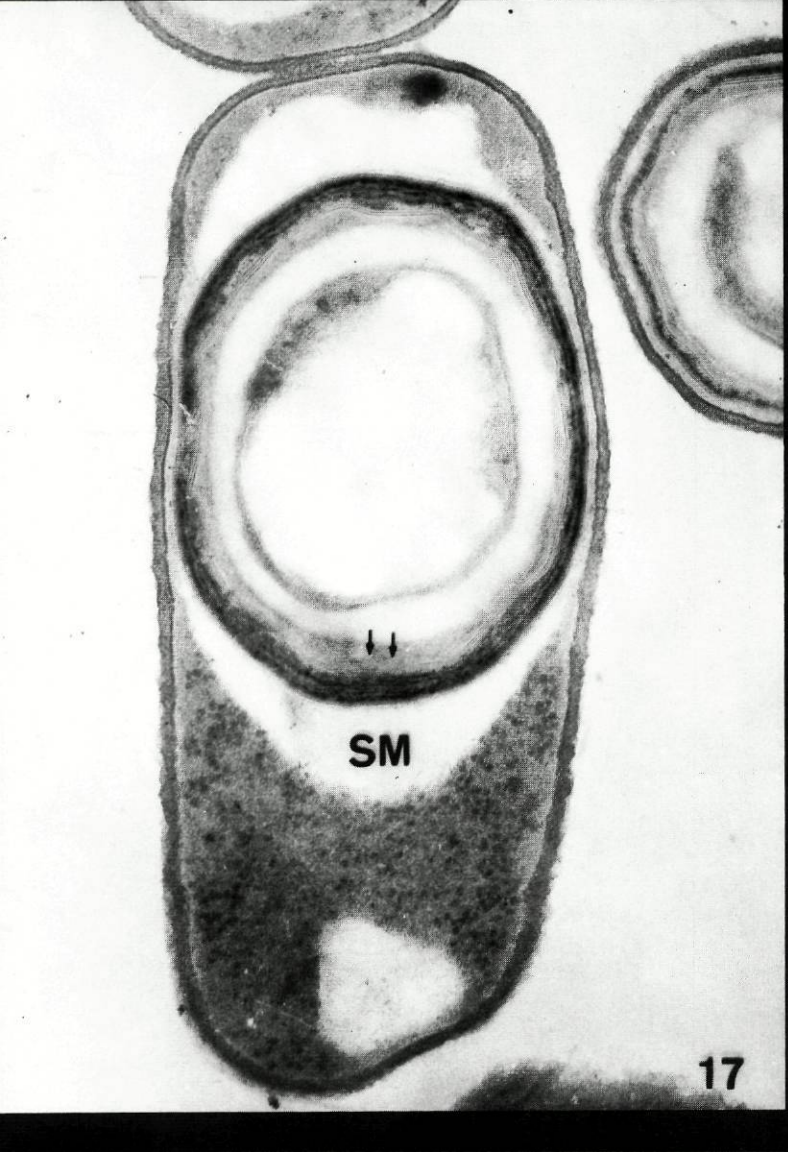
14



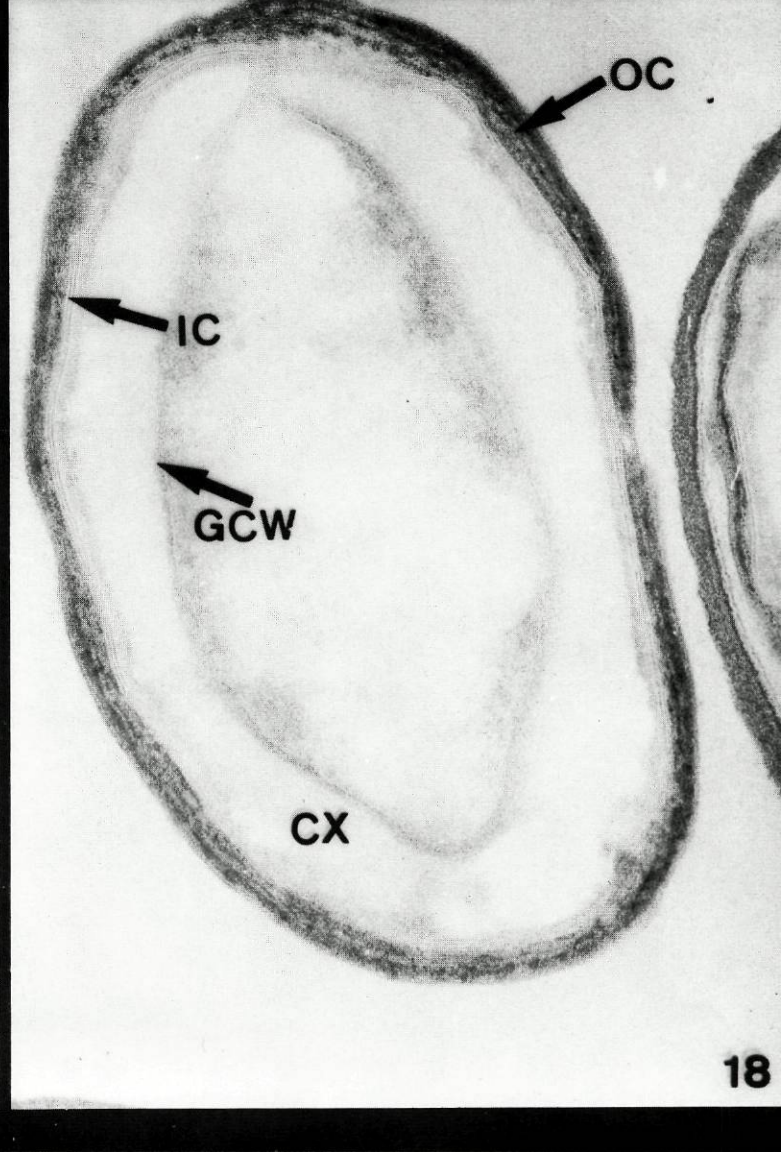

15




16




17




18

Fig.15 - Célula de B. subtilis 168 na fase V precoce. Notar a estrutura trilamelar da membrana externa do pré-esporo (dupla seta). 72.000 X.

Fig.16 - Célula de B.subtilis 168 na fase V tardia. Notar a presença de protuberâncias parietais (setas). 69.000X.

Fig.17 - Célula de B. subtilis 168 na fase VI. Notar a má visualização do citoplasma esporal e a presença ocasional de "spongy material" (SM) no citoplasma esporangial. Observar a presença de material citoplasmático entre o córtex e a túnica interna (setas). 70.000 X.

Fig.18 - Esporo livre de B. subtilis 168. Notar a má visualização do citoplasma esporal. 94.000 X.

IC - túnica interna
OC - túnica externa
CX - córtex
GCW- parede celular germinativa
N - nucleóide

o perfil morfológico já descrito na fase IV (Figs.15, 16).

2.2.6. FASE VI - Esta fase tem sido caracterizada pelo amadurecimento dos invólucros esporais. O citoplasma esporal já não é visualizável (Figs.17, 19 ). As túnicas apresentam a ultraestrutura descrita na fase V exibindo a túnica interna duas lamelas. Em alguns cortes foi visualizada uma camada exterior, aderente à túnica externa do esporo e com densidade electrónica ligeiramente inferior à da túnica externa (Figs.19, 20, 35).

2.2.7. Esporos livres e exosporo - As seguintes camadas podem ser vistas nos esporos livres de Bacillus subtilis 168: parede celular germinativa, córtex, túnica interna, túnica externa (Fig.18 ). Uma camada mais externa aderente à túnica externa foi ocasionalmente observada pela técnica dos cortes ultrafinos (Figs.21, 22).
Esta camada está encostada à túnica externa do esporo e frequentemente aparece como: uma camada simples, menos electronodensa que a camada adjacente (Figs.19, 20 ) e com uma espessura de 8-9nm; raramente apresenta uma estrutura tipo "unit membrane" (Fig.21 ), o que aliás foi confirmado por densitometria (Fig.21 ); em pequenas porções desta estrutura foi observada também uma estrutura periódica (Figs.22,23,26 ). Nenhumas projecções pilosas ("hair-like") ou outros apêndices foram observados nessa estrutura, mesmo quando as secções se coraram com acetato de chumbo durante 45 minutos. Dado que as estruturas acabadas de descrever não aparecem sistematicamente, foram usados processos artificiais para melhor visualizar esta estrutura. Tratamentos feitos com ureia-mercaptoetanol ou com NaOH-ureia-Me não afectam significativamente a túnica in-

terna do esporo, mas a túnica externa é fortemente desorganizada (Fig. 24). Nos esporos tratados a estrutura acabada de descrever destaca-se da túnica externa e aparece como uma estrutura bem individualizada (Fig. 24 ), fazendo lembrar o exosporo de Bacillus cereus. O exosporo após os tratamentos com ureia-Me aparece algumas vezes com estrutura tripla, tipo "unit membrane" (Fig.24,seta) A estrutura periódica nunca foi observada nos esporos tratados. Por este processo o exosporo foi visualizado em Bacillus subtilis 168 e PM9 e com as estirpes EV15, CB22 e AB12. Os tratamentos com SDS, lisozima, octanol e clorofórmio não afectam a morfologia do exosporo . Contudo, o tratamento com SDS desorganiza a túnica externa que aparece destacada da túnica interna (Fig.25a). O tratamento com NaOH também desorganiza a estrutura das túnicas e permite a visualização do exosporo (Fig.25b), embora ele permaneça ligado à túnica externa do esporo.

2.3. Cinética do desenvolvimento morfológico - A morfogénese da esporulação foi seguida à microscopia electrónica, observando amostras colhidas após $t_0$. Células nas diferentes fases foram contadas (Quadro 4). Uma vez que a frequência esporulativa das células de Bacillus subtilis, varia de uma experiência para a outra, os resultados são mais comparáveis se somente a frequência máxima das células que atingem as últimas fases esporulativas for tomada em consideração. Assim, as percentagens indicadas no Quadro 4 foram corrigidas de acordo com a fórmula:

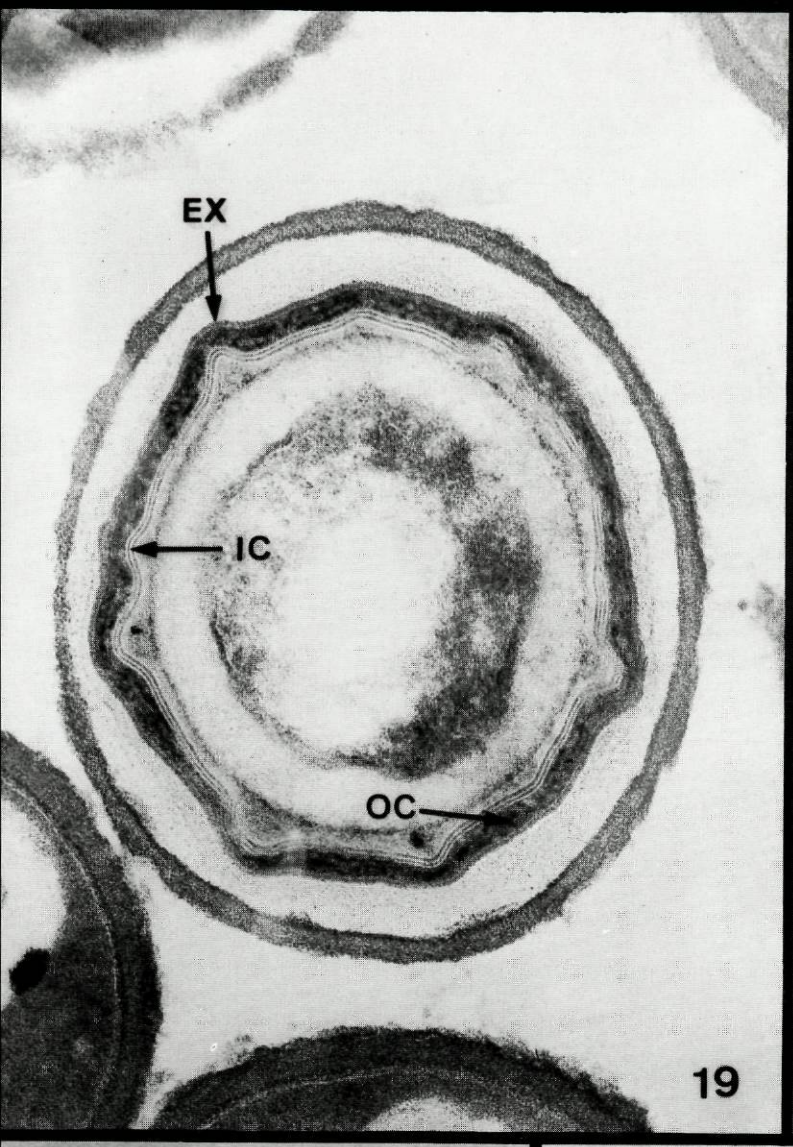
$$\%(\text{FASE X}) = \frac{\text{Nº DE CÉLULAS NA FASE X}}{\text{Nº TOTAL DE CÉLULAS CONTADAS}} \cdot \frac{1}{\text{FREQUÊNCIA MÁXIMA ESPORULATIVA}}$$

Fig.19,20 - Célula de B. subtilis 168, colhido em $t_{20}$, na fase VI. Notar a presença de uma camada mais externa (EX) justaposta à túnica externa (OC). O traçado densitométrico corresponde à zona marcada com seta.Fig. 19 :116.000 X; Fig. 20 :198.000X.

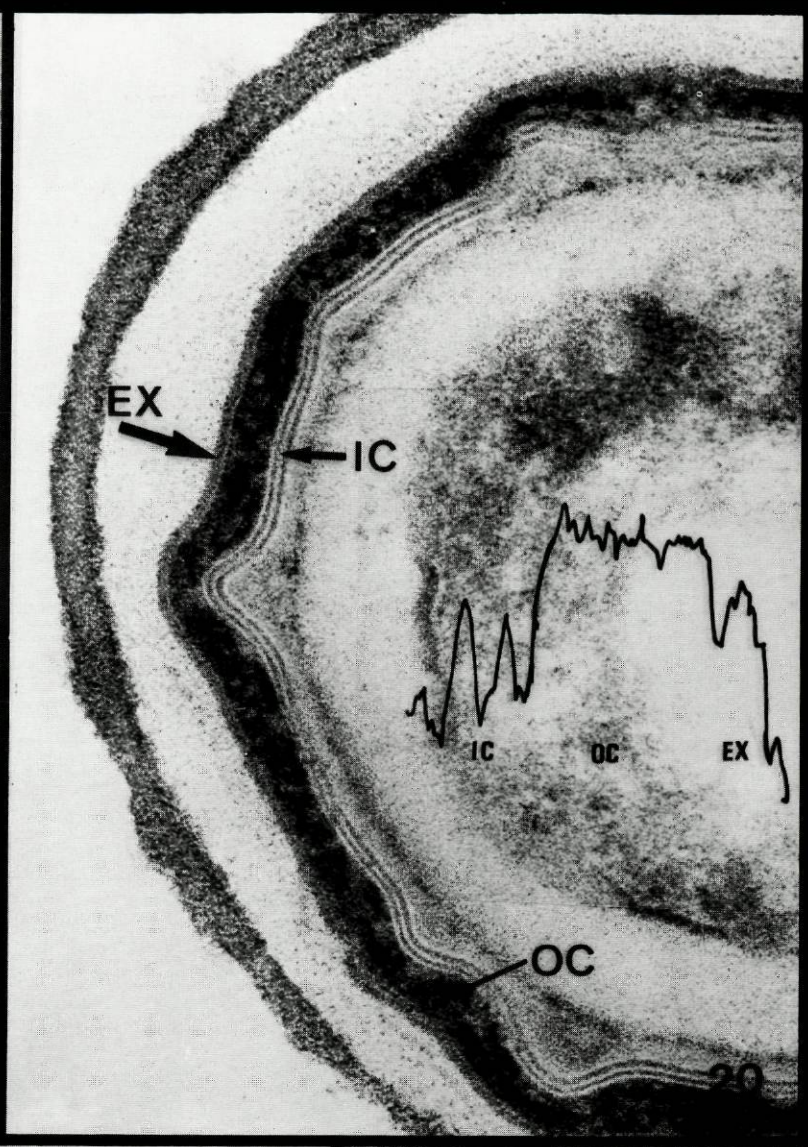
Fig.21 - Esporo livre do B. subtilis 168.Notar a estrutura tripla do exosporo (EX). O traçado densitométrico corresponde à zona marcada com seta. Notar a presença de dois picos, comprovando a estrutura tripla do exosporo. 168.000 X.

Fig.22 - Esporo livre do B. subtilis 168. O exosporo apresenta uma estrutura periódica. OC - túnica externa. 148.000 X.

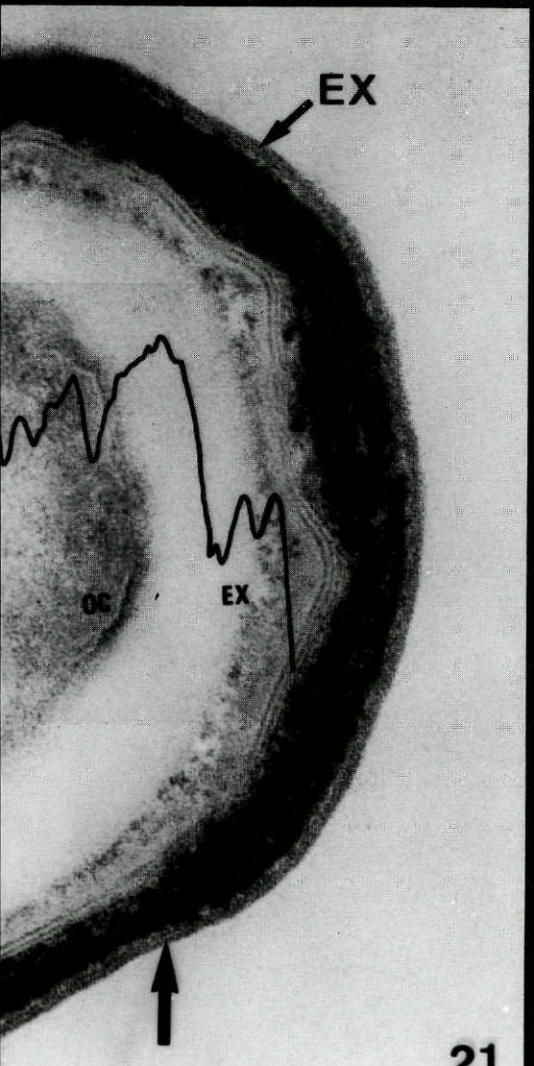
Fig.23 - Esporos do B. subtilis 168 na fase VI. O exosporo (EX) apresenta uma estrutura periódica. 166.000 X.



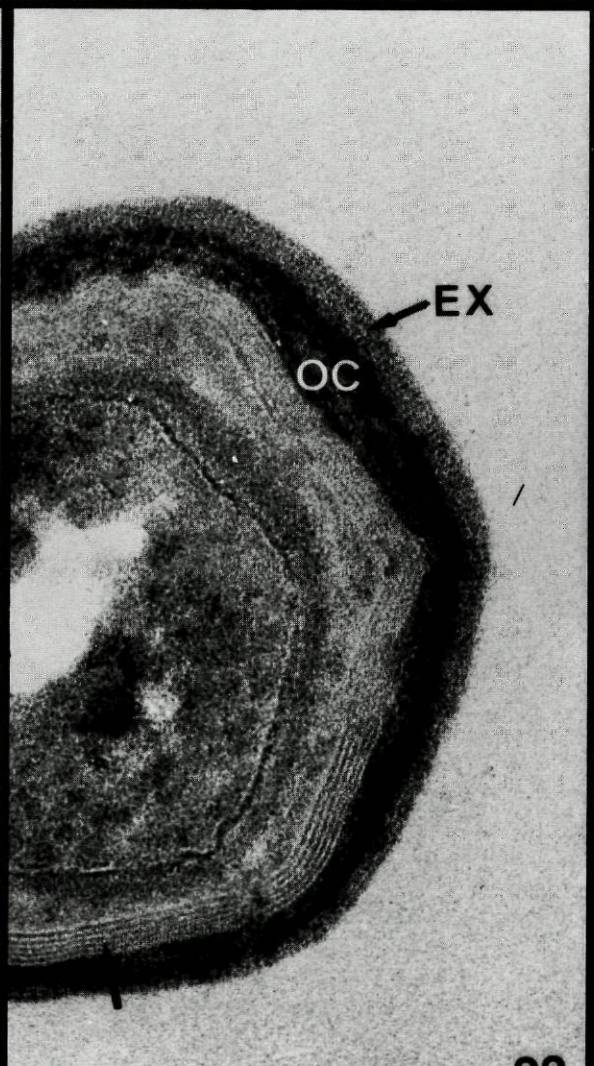

19



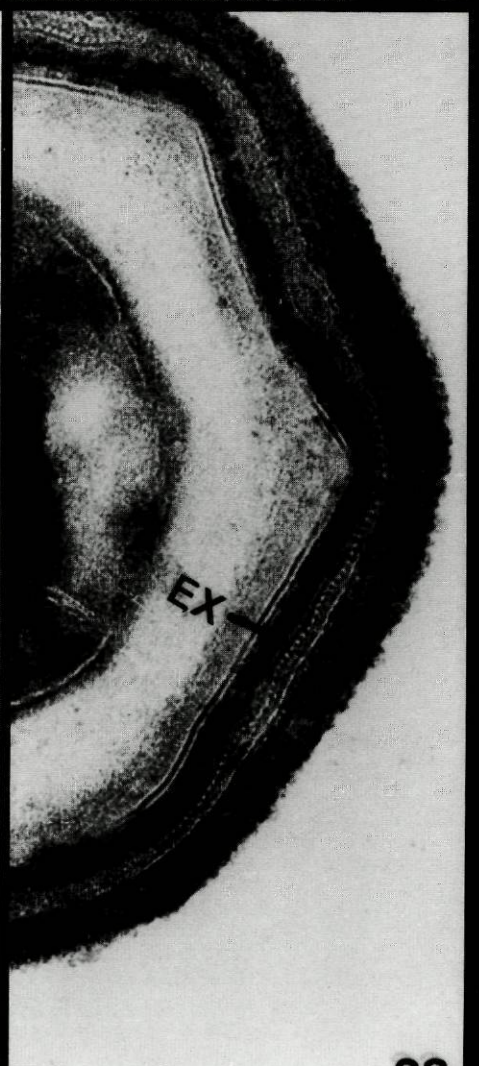

20



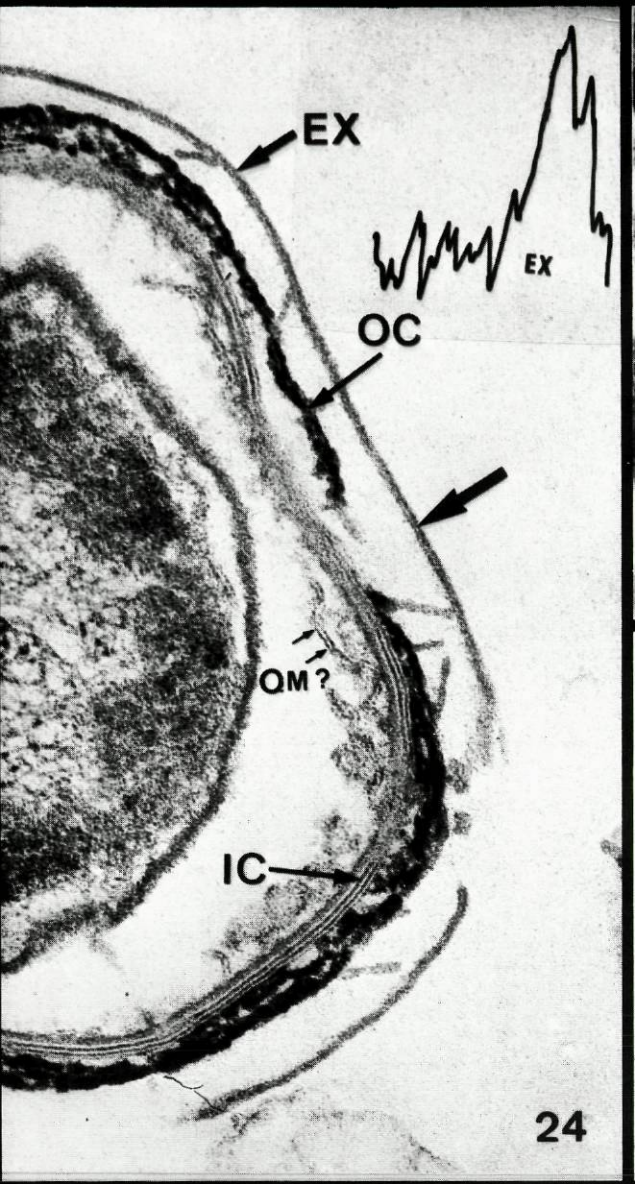

21



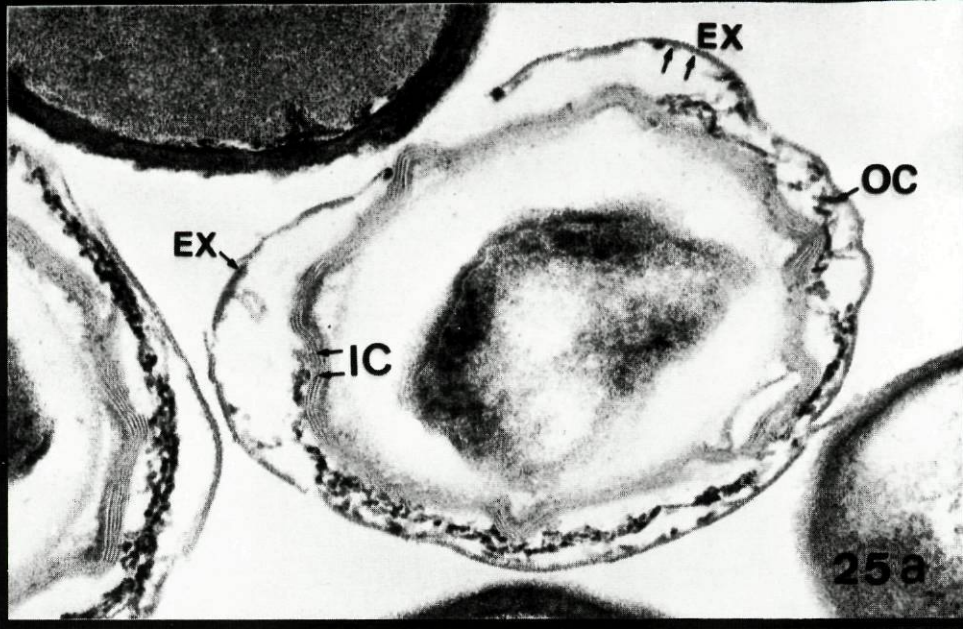

22



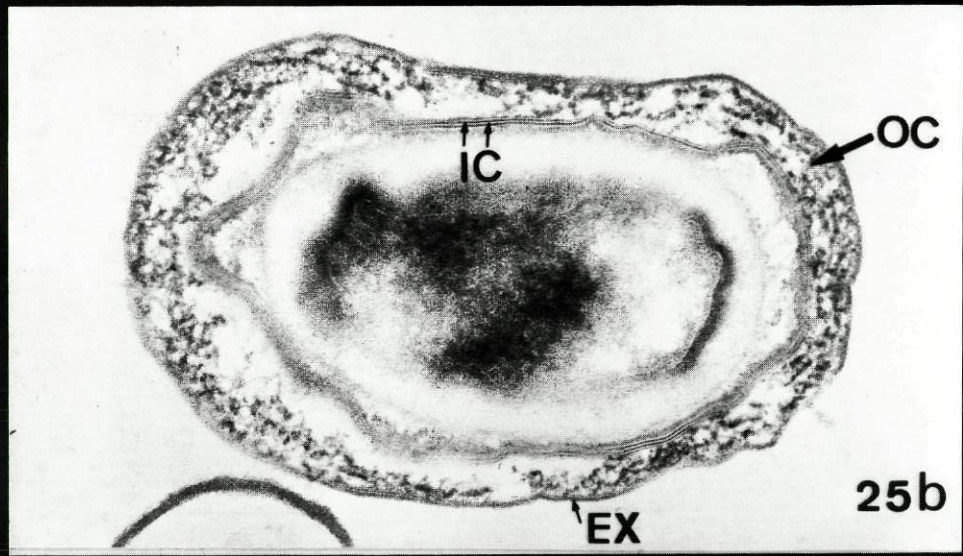

23



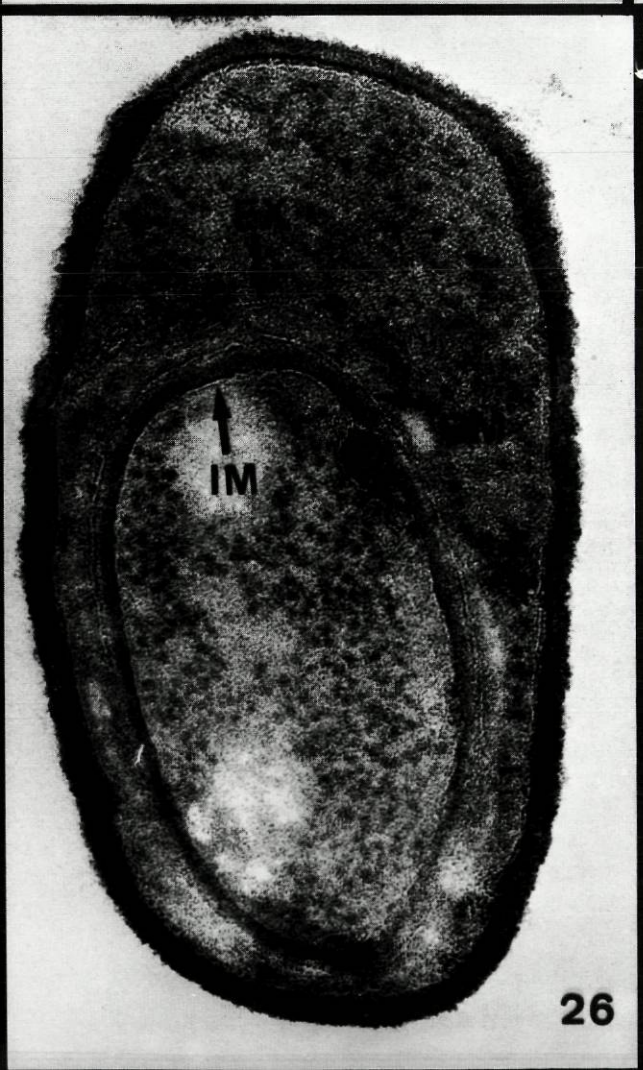

24



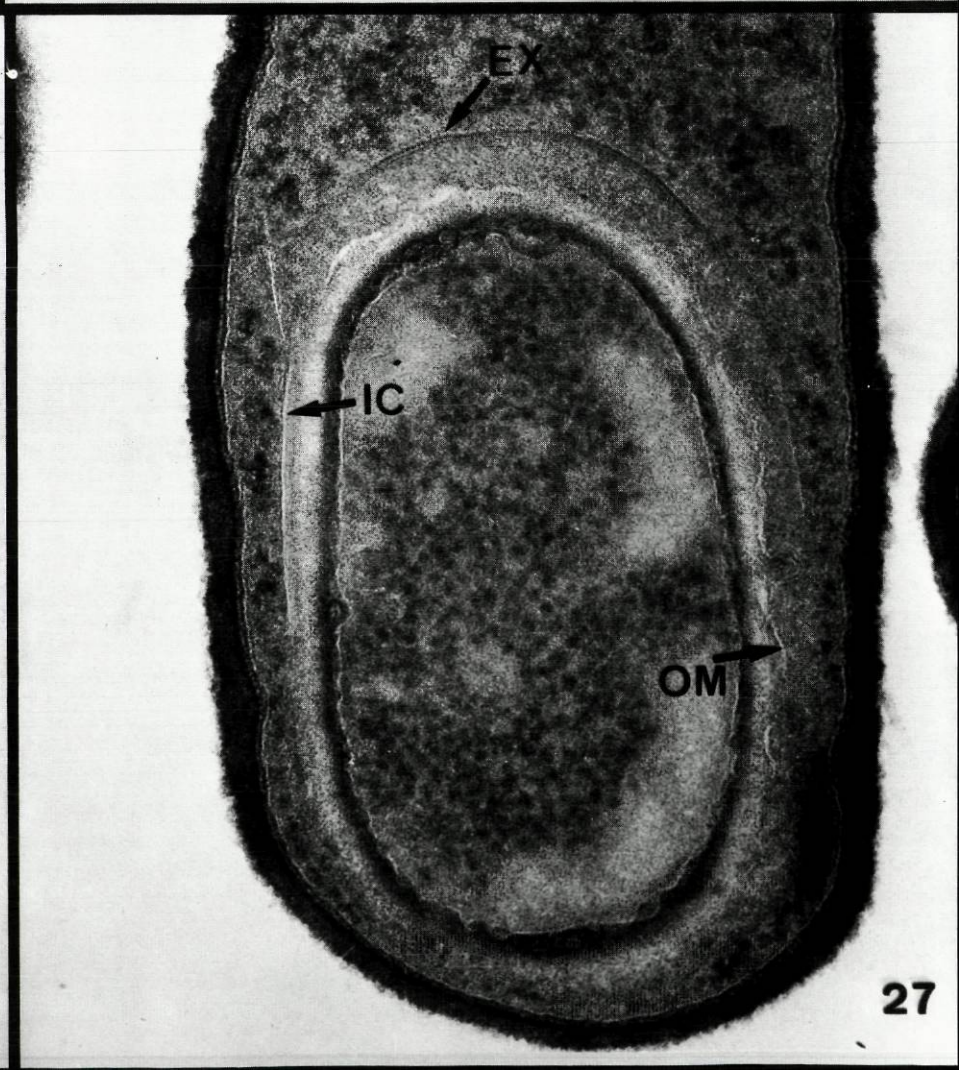

25a




25b




26




27

Fig.24 - Esporo livre do B. subtilis 168 tratado com ureia-Me. O tratamento desorganizou a túnica externa (OC) e permite a visualização do exosporo (EX). O exosporo apresenta em algumas porções uma estrutura tripla (seta), o que é comprovado pelo traçado densitométrico. Junto à túnica interna (IC) observa-se uma estrutura tipo "unit membrane" (OM). 116.000 X.

Fig.25a- Esporo livre da mutante EV15 após tratamento com ureia-Me-SDS. Notar a desorganização da túnica externa (OC) e a visualização do exosporo (EX). A túnica interna (IC) apresenta o perfil morfológico habitual. 116.000 X.

Fig.25b- Esporo livre da estirpe AA5 após tratamento com NaOH. A túnica externa (OC) apresenta um aspecto desorganizado e permite a visualização do exosporo (EX). A túnica interna parece indiferente ao tratamento com NaOH. 106.000 X.

Fig.26 - Célula do B. subtilis 168 colhida em $t_5$. O primórdio do exosporo (EX) pode ser visto na região não polar do pré-esporo e apresenta uma estrutura periódica. As membranas interna (IM) e externa (OM) do esporo são nitidamente visualizáveis. 106.000 X.

Fig.27 - Célula do B. subtilis 168 colhida em $t_{3.5}$. O primórdio do exosporo (EX) é constituído por uma camada simples, a membrana externa do esporo (OM) começa a desorganizar-se e observa-se também o início da formação da túnica interna (IC). 116.000 X.

QUADRO 4

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DO BACILLUS SUBTILIS 168

| T | | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_{0,5}$ | L+T | 435 | 32 | 7,4 | 31 | 7,2 | 1 | 0,2 | | | | | | |
| | L | 467 | 42 | 9, | 42 | 9, | | | | | | | | |
| $t_1$ | L+T | 484 | 103 | 21,3 | 92 | 19, | 11 | 2,3 | | | | | | |
| | L | 313 | 154 | 49,2 | 139 | 44,4 | 15 | 4,8 | | | | | | |
| $t_{1,5}$ | L+T | 417 | 158 | 37,9 | 97 | 23,3 | 61 | 14,6 | | | | | | |
| | L | 416 | 181 | 43,5 | 101 | 24,3 | 80 | 19,2 | | | | | | |
| $t_{2,5}$ | L+T | 490 | 279 | 56,9 | 51 | 10,4 | 227 | 46,3 | 1 | 0,2 | | | | |
| | L | 415 | 236 | 56,9 | 55 | 13,2 | 181 | 43,4 | | | | | | |
| $t_{3,5}$ | L+T | 495 | 402 | 81,2 | 5 | 1, | 338 | 68,3 | 37 | 7,5 | 22 | 4,4 | | |
| | L | 482 | 369 | 76,6 | 32 | 6,6 | 289 | 60, | 24 | 5, | 24 | 5, | | |
| $t_{4,5}$ | L+T | 539 | 451 | 83,7 | 5 | 0,9 | 90 | 16,7 | 92 | 17,1 | 264 | 49, | | |
| | L | 444 | 397 | 89,4 | 16 | 3,6 | 94 | 21,2 | 52 | 11,7 | 226 | 50,9 | 9 | 2, |
| $t_{5,5}$ | L+T | 308 | 295 | 95,8 | | | 23 | 7,5 | 19 | 6,2 | 187 | 60,7 | 66 | 21,4 |
| | L | 328 | 305 | 93, | | | 32 | 9,8 | 15 | 4,6 | 186 | 56,7 | 72 | 22, |
| $t_{6,5}$ | L+T | 451 | 431 | 95,6 | 1 | 0,2 | 6 | 1,3 | 15 | 3,3 | 116 | 25,7 | 293 | 65, |
| | L | 329 | 316 | 96, | | | 5 | 1,5 | 11 | 3,3 | 86 | 26,1 | 214 | 65, |
| $t_{20}$ | L+T | 575 | 480 | 83,5 | | | | | 3 | 0,5 | 10 | 1,7 | 467 | 81,2 |
| | L | 634 | 584 | 92,1 | | | 1 | 0,2 | 1 | 0,2 | 10 | 1,6 | 572 | 90,2 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas. Os valores indicados na fase VI ($t_{20}$) incluem também o número de esporos livres.

L - contagens efectuadas nas secções longitudinais das células.
L + T - contagens efectuadas nas secções longitudinais e transversais das células.

Procedemos de igual modo em todas as experiências referidas neste trabalho. Estes valores corrigidos permitiram-nos fazer as curvas do desenvolvimento morfológico em função do tempo (Fig. 28).

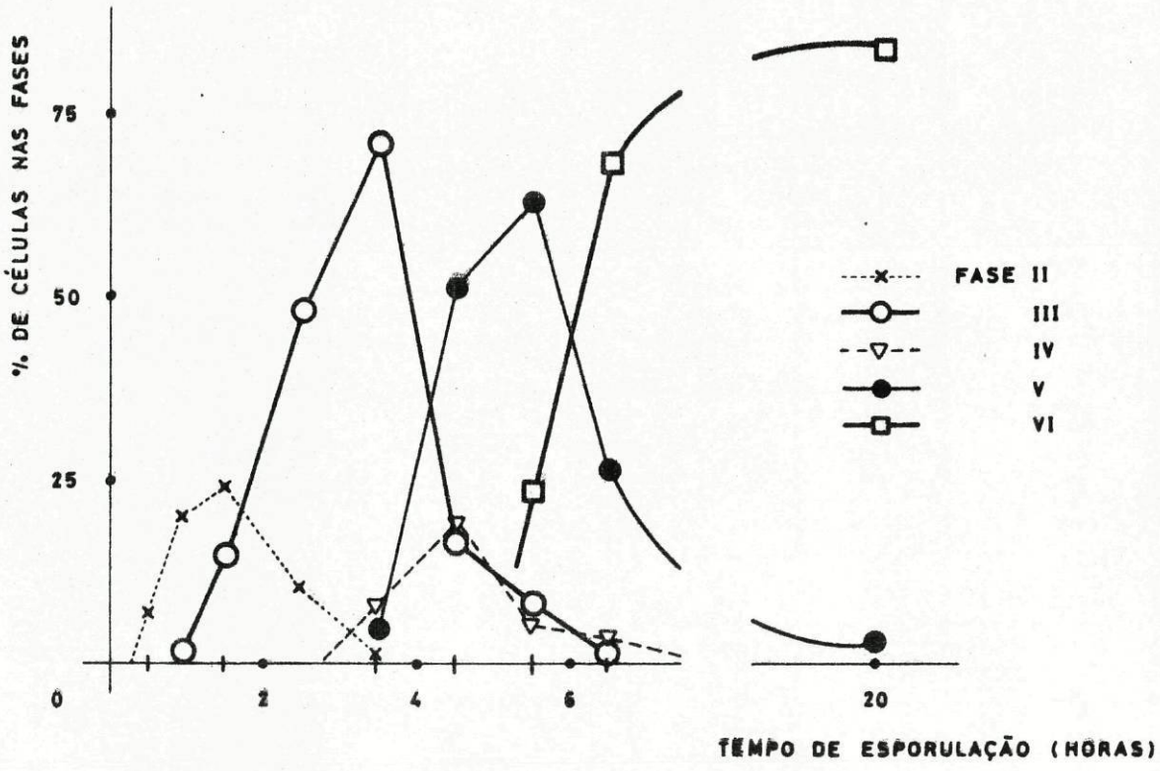



Fig.28 - Cinética do desenvolvimento morfológico do B. subtilis 168, entre $t_0$ e $t_{20}$. Utilização dos valores L + T, após correcção, referidos no Quadro 4.

As fases III e V constituem as fases predominantes e atingem a sua frequência máxima em $t_{3,5}$ e $t_{5,5}$ respectivamente. As fases II e IV parecem ser bastante curtas atingindo como frequências máximas os valores de 24,3% e 17,8% respectivamente, quando no estudo quantitativo foram incluídas as secções longitudinais e transversais das células (Quadro 4 ). Em $t_{0,5}$ os estudos quantitativos feitos apenas com secções longitudinais das células

deram resultados mais significativos no que diz respeito à fase II (Quadro 4). Nos dois tipos de contagens o número de células na fase I é insignificante pelo que não são considerados nas representações gráficas. As partes ascendentes das curvas correspondentes às fases III, V e VI são perfeitamente paralelas. Isto indica que a heterogeneidade da população no processo esporulativo tem a sua origem antes de as células atingirem a fase III. Provavelmente as células iniciam o processo esporulativo a diferentes tempos. As curvas correspondentes às fases III e V apresentam uma cauda para o lado direito, havendo assim uma pequena fracção de células que esporula com algum atraso. O tempo dispendido por cada célula, numa dada fase morfológica, foi determinado e expresso em horas (Quadro 5). Estes valores foram obtidos por adição das frequências das células numa dada fase, hora a hora.

**QUADRO 5**

**TEMPO (EM HORAS) DISPENDIDO EM CADA FASE**

| EXP | II | III | IV | V |
|---|---|---|---|---|
| 1 | 0,7 | 1,6 | 0,5 | 1,3 |
| 2 | 0,6 | 1,6 | 0,4 | 1,5 |

Estes valores foram calculados conforme indicado no texto.

Microscopia quantitativa foi realizada também com as estirpes selvagens PM9, AA4, AA1 e SB5-2 (Quadro 6 ). Os resultados foram idênticos para o Bacillus subtilis 168. As estirpes PM6 e BD68 apresentam uma morfogénese ligeiramente diferente das outras estirpes selvagens, visto que, os picos máximos correspondentes às fases morfológicas aparecem com ligeiro atraso e as curvas são menos simétricas (Fig 29 ). Isto é particularmente evidente para a fase V. As estirpes PM6 e BD68 produzem também maiores quantidades de proteases extracelulares do que a estirpe selvagem 168.

2.4. Cinética da formação das estruturas membranosas - A septação esporulativa só ocorre junto a um dos pólos da célula, independentemente da existência de protuberâncias parietais (Fig. 6 ). Raramente o septo aparece como uma estrutura rectilínea dividindo a célula em pré-esporo e esporângio (Fig. 6 ). Frequentemente o septo esporulativo apresenta uma estrutura em balão (Fig.8 ). As origens do septo começam a deslocar-se em direcção do pólo da célula (Fig. 9), acabando por se fundirem originando o pré-esporo (Fig.10). As membranas interna e externa do pré-esporo, com perfil assimétrico,são claramente visualizáveis (Fig.12 a). A membrana interna do pré-esporo será a membrana citoplasmática da futura célula vegetativa, após a germinação do esporo. A evolução da membrana externa é controversa e será discutida juntamente com a cinética da formação do exosporo. A evolução das membranas até à completa formação do pré-esporo ocorre rapidamente e as células permanecem, bastante tempo, na fase III antes de formarem o córtex e as túnicas.

Tem sido atribuído papel preponderante aos mesossomas nas fases iniciais da esporulação (21). Dado que a formação dos mesossomas está dependente das condições de fixação, a evolução destas estruturas foi seguida no pré-esporo e esporângio durante a morfogénese, utilizando a técnica de RK com e sem pré-fixação. O comportamento da membrana citoplasmática do esporângio, durante a esporulação, é análogo ao das células vegetativas perante a fixação RK, embora a partir de $t_{2,5}$ o número de mesossomas seja semelhante, independentemente do método fixativo utilizado (Quadro 9). A percentagem de mesossomas nos esporos parece ser independente do processo fixador utilizado, mas ao longo do processo esporulativo nota-se uma diminuição na percentagem de mesossomas tanto no esporângio como no esporo (Quadro 9). Peculiares são os resultados obtidos em $t_{1,5}$ em que se verifica um aumento significativo no número de mesossomas. Mesossomas anexos às protuberâncias parietais foram observados esporadicamente e são visíveis no pré-esporo durante a fase III (Fig. 10). Após a formação do córtex, mesmo quando a pré-fixação foi utilizada, só foram observadas pequenas vesículas membranosas no citoplasma do esporo (Fig.14). Durante as fases V e VI não foram observadas invaginações membranosas no esporo (Figs.15-17).

2.5. Cinética da formação do córtex e túnicas - A formação exclusiva do córtex entre as membranas interna e externa do pré-esporo ocorre com baixa frequência (Quadro 10). Em simultâneo com a formação do córtex aparecem, lateralmente, no citoplasma do esporângio, lamelas (Figs.14,26,27,30) que progressivamente envolvem o esporo constituíndo a túnica interna (Figs.14,15).

QUADRO 6

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE SB5-2

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 259 | 156 | 60,2 | 46 | 17,8 | 106 | 40,9 | | | 3 | 1,2 | 1 | 0,4 |
| $t_3$ | 215 | 134 | 62,3 | 6 | 2,8 | 126 | 58,6 | 2 | 0,9 | | | | |
| $t_4$ | 271 | 156 | 57,6 | | | 71 | 26,2 | 27 | 10, | 58 | 21,4 | | |
| $t_5$ | 220 | 166 | 75,5 | | | 17 | 7,7 | 15 | 6,8 | 121 | 55, | 13 | 5,9 |
| $t_6$ | 250 | 219 | 87,6 | | | 2 | 0,8 | 4 | 1,6 | 90 | 36, | 123 | 49,2 |
| $t_7$ | 159 | 132 | 83, | | | | | 3 | 1,9 | 29 | 18,2 | 100 | 62,9 |
| $t_8$ | 298 | 251 | 84,2 | | | | | | | 25 | 8,4 | 226 | 75,8 |
| $t_9$ | 267 | 252 | 94,4 | | | 2 | 0,7 | | | 5 | 1,9 | 245 | 91,8 |
| $t_{10}$ | 210 | 201 | 95,7 | | | | | | | 10 | 4,8 | 191 | 91, |
| $t_{20}$ | 246 | 217 | 88,2 | | | 2 | 0,8 | 2 | 0,8 | 10 | 4,1 | 146 | 59,3 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{20}$ havia 57 esporos livres (23,2%).

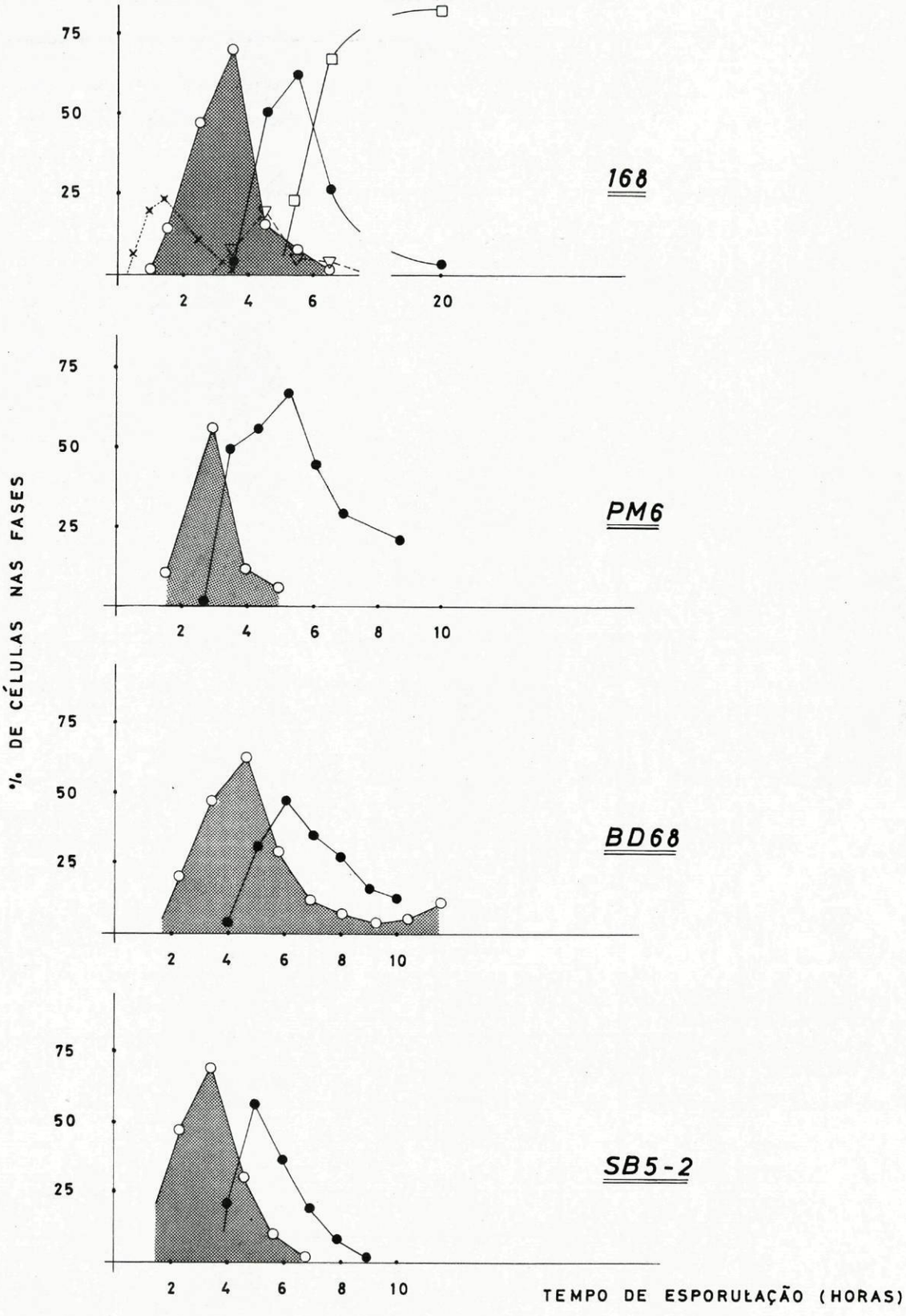



Fig. 29. Morfogénese da esporulação das estirpes selvagens: 168, PM6, BD68 e SB5-2. Os valores utilizados para estes gráficos estão representados nos Quadros 4, 6, 7 e 8 e referem apenas as fases III e V.

QUADRO 7

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE BD68

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 188 | 71 | 37.8 | 41 | 21,8 | 30 | 16. | | | | | | |
| $t_3$ | 169 | 82 | 48.5 | 19 | 11.2 | 63 | 37.3 | | | | | | |
| $t_4$ | 158 | 114 | 72.2 | 10 | 6.3 | 76 | 48.1 | 21 | 13.3 | 7 | 4.4 | | |
| $t_5$ | 211 | 124 | 58.8 | 7 | 3.3 | 46 | 21.8 | 10 | 4.7 | 58 | 27.5 | 3 | 1.4 |
| $t_6$ | 174 | 147 | 84.5 | 5 | 2.9 | 16 | 9.2 | 12 | 6.9 | 73 | 42. | 41 | 23.6 |
| $t_7$ | 221 | 183 | 82.8 | 2 | 0.9 | 13 | 5.9 | 6 | 2.7 | 70 | 31.7 | 92 | 41.6 |
| $t_8$ | 286 | 251 | 87.8 | | | 9 | 3.1 | 7 | 2.4 | 72 | 25.2 | 163 | 57. |
| $t_9$ | 253 | 221 | 87.4 | | | 12 | 4.7 | 4 | 1.6 | 39 | 15.4 | 164 | 64.8 |
| $t_{10}$ | 286 | 249 | 87.1 | 1 | 0.4 | 26 | 9.1 | 5 | 1.8 | 35 | 12.2 | 171 | 59.8 |
| $t_{20}$ | 232 | 190 | 81.9 | | | 2 | 0.9 | 1 | 0.4 | 9 | 3.9 | 138 | 59.5 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas. Em $t_9$ havia 2 esporos livres (0,8%), em $t_{10}$ 11 esporos livres (3,8%) e em $t_{20}$ 40 esporos livres (17,2%).

QUADRO 8

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE PM6

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II Nº | % | III Nº | % | IV Nº | % | V Nº | % | VI Nº | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_{1,5}$ | 174 | 85 | 48.9 | 65 | 37.4 | 19 | 10.9 | 1 | 0.6 | | | | |
| $t_3$ | 171 | 114 | 66.7 | 7 | 4.1 | 98 | 57.3 | 7 | 4.1 | 2 | 1.2 | | |
| $t_4$ | 162 | 112 | 69.1 | | | 20 | 12.3 | 2 | 1.2 | 90 | 55.6 | | |
| $t_5$ | 123 | 106 | 86.2 | | | 8 | 6.5 | 14 | 11.4 | 77 | 62.6 | 7 | 5.7 |
| $t_6$ | 117 | 101 | 86.3 | | | 2 | 1.7 | | | 89 | 76.1 | 10 | 8.5 |
| $t_7$ | 155 | 143 | 92.3 | 1 | 0.6 | 2 | 1.3 | | | 77 | 49.7 | 63 | 40.6 |
| $t_8$ | 159 | 146 | 91.8 | | | 3 | 1.9 | | | 53 | 33.4 | 84 | 52.8 |
| $t_{10}$ | 156 | 151 | 96.8 | | | 3 | 1.9 | | | 38 | 24.4 | 80 | 51.3 |
| $t_{20}$ | 84 | 82 | 97.6 | | | 5 | 6. | | | 4 | 4.8 | 44 | 52.4 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas. Em $t_8$ havia 6 esporos livres (3,8%), em $t_{10}$ 30 esporos livres (19,2%) e em $t_{20}$ 29 esporos livres (34.5%).

QUADRO 9

# CINÉTICA DA FORMAÇÃO DOS MESOSSOMAS

| FIXAÇÃO RK | T | % MESOSSOMAS (esporângio) | % MESOSSOMAS (esporo) |
|---|---|---|---|
| P.F. | $t_1$ | 34,5 | 24 |
| S/P.F. | | 18 | 20 |
| P.F. | $t_{1,5}$ | 44,5 | 31 |
| S/P.F. | | 30 | 30 |
| P.F. | $t_{2,5}$ | 23,5 | 23 |
| S/P.F. | | 24 | 22 |
| P.F. | $t_{3,5}$ | 24,5 | 22 |
| S/P.F. | | 23 | 19 |
| P.F. | $t_{4,5}$ | 19,8 | 6 |
| S/P.F. | | 18 | 2 |
| P.F. | $t_{5,5}$ | 11,5 | 2 |
| S/P.F. | | 11 | 2 |

A % foi avaliada em relação ao número de células em esporulação. As células vegetativas do B. subtilis 168 também foram afectadas pelo processo fixador.

Antes da completa organização da túnica interna que, inicialmente apresenta uma lamela, deposita-se do lado de fora desta, material electronodenso disperso (Fig. 15). Essa deposição ocorre durante a fase V precoce e mais tarde coalesce formando a túnica externa (Fig. 16).Porções do citoplasma esporangial ficam incluídas entre o córtex e as túnicas em formação (Fig.17 ). Durante a fase VI não são visíveis alterações morfológicas nesses invólucros embora ocasionalmente, a túnica externa revele a existência de subcamadas (Figs.17, 35). Conquanto, só o estudo morfológico com cortes seriados permita confirmar as nossas observações a espessura do córtex parece aumentar, progressivamente, da fase IV para a fase VI. Não foi detectado durante a fase VI uma menor densidade do córtex em relação ao da fase IV e V, como é geralmente descrito na literatura (21,236).

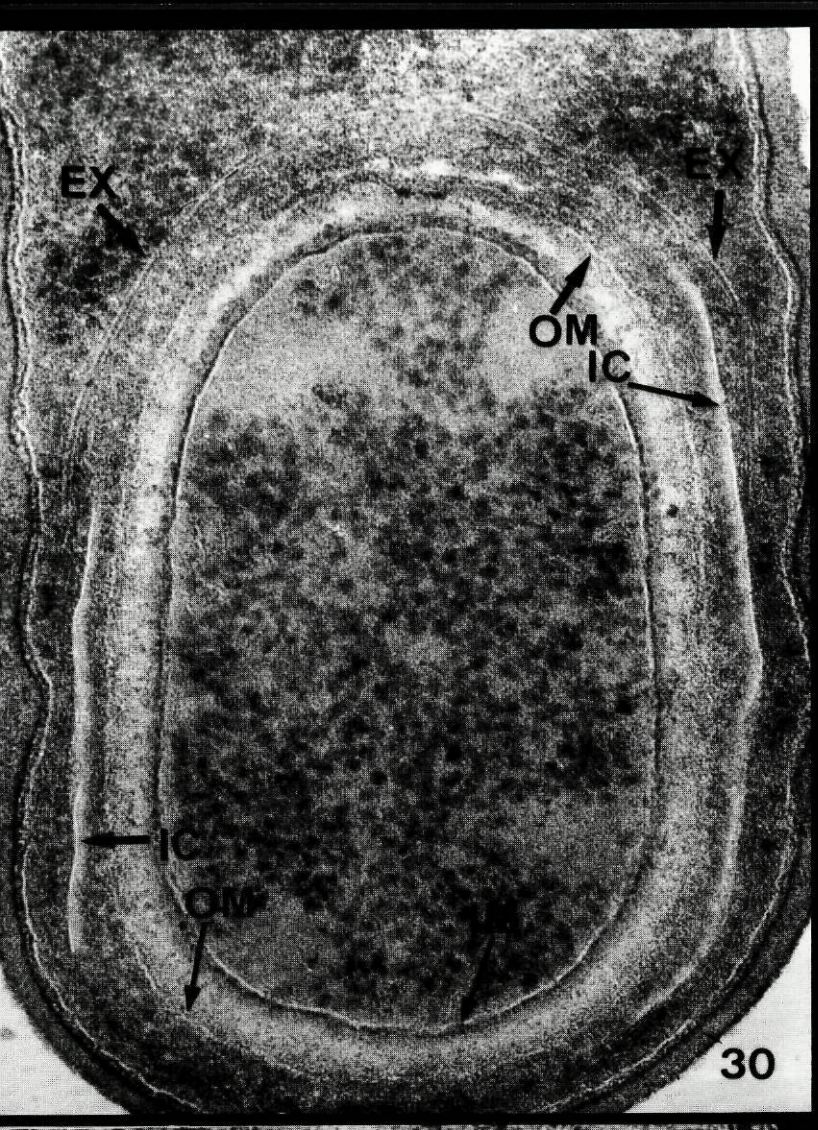
**QUADRO 10** — **CÉLULAS NA FASE IV**

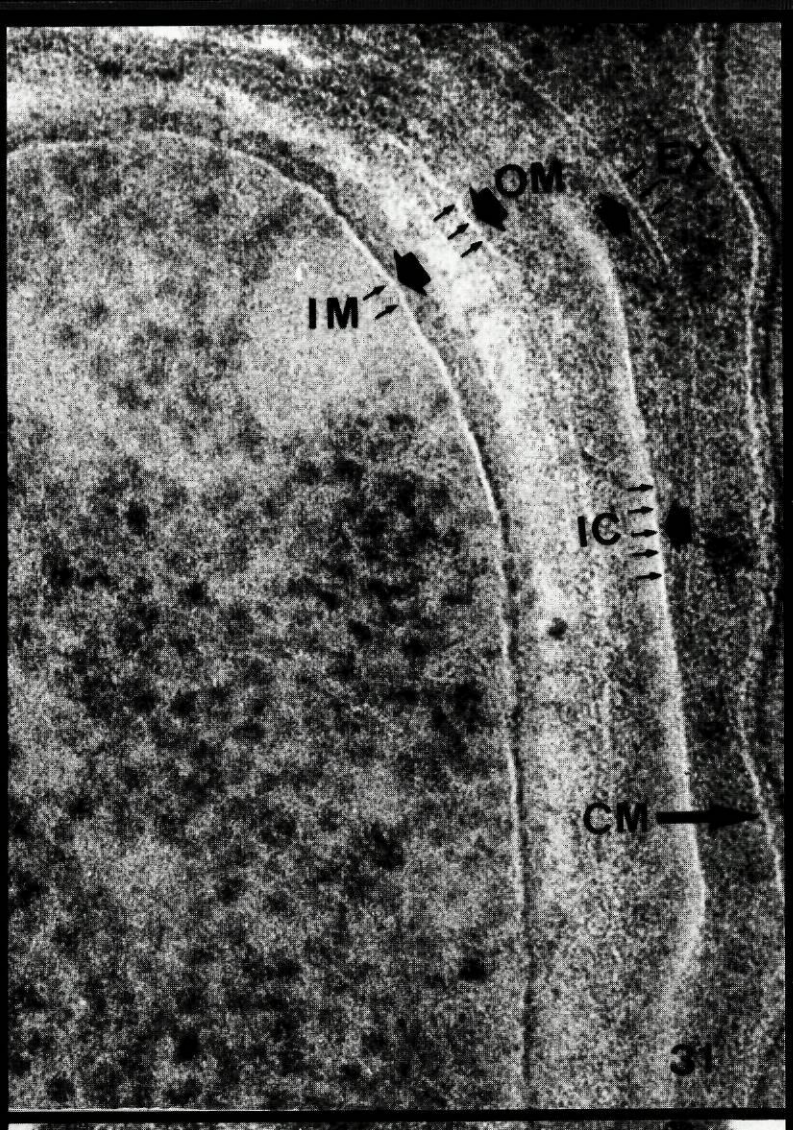
| ESTIRPE | % DE CÉLULAS | ESTIRPE | % DE CÉLULAS |
|---|---|---|---|
| 168 | 12. -17 | DB16 | 24. -26,5 |
| AA4 | 18. | EC21 | 8. |
| AA5 | 11,5 | EV15 | 28. |
| AB35 | 9,5 | FA20 | 19,5 |
| AB53 | 5,5 | FE10 | 20. |
| AB72 | 9,8 | FF15 | 25. |
| AB73 | 7,1 | PM6 | 11,4 |
| BD68 | 13,3-18 | SB5-2 | 10. -17,5 |
| CB22 | 6. -10 | | |

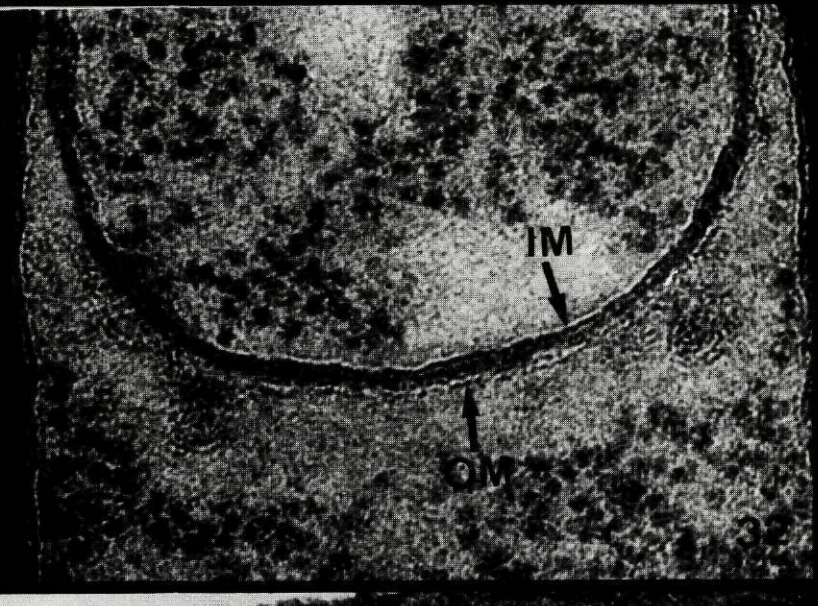
A % foi avaliada em relação ao número total de células contadas.

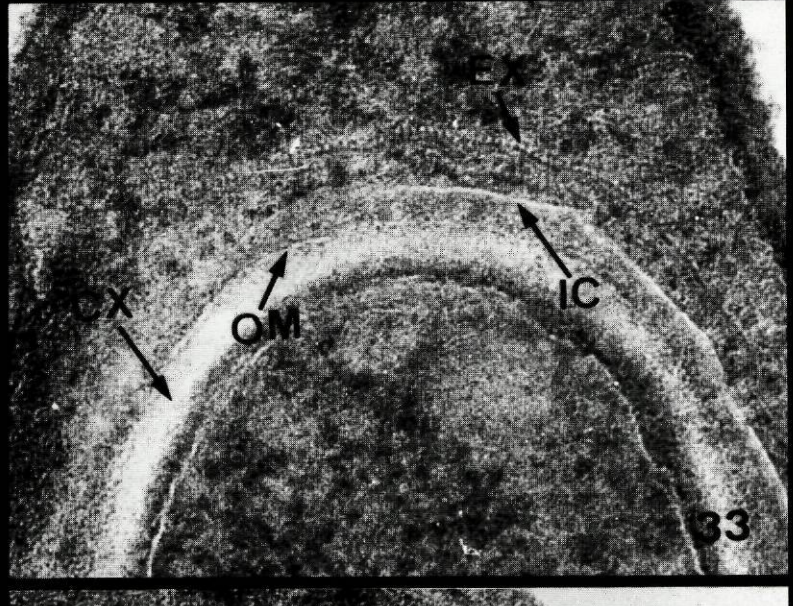
2.6. Origem e desenvolvimento do exosporo - No decurso de estudos cinéticos do processo esporulativo nas estirpes selvagens 168 e PM9, o desenvolvimento do exosporo foi seguido com pormenor. Os primórdios do exosporo foram visualizados na fase IV da esporulação (Fig. 26). Na fase V o exosporo é frequentemente visualizado no citoplasma do esporângio, destacado das túnicas do esporo (Figs. 27,30,31,34). Em alguns casos exibe estrutura periódica (Figs. 23,27,34) enquanto que, em outros, aparece como homogénea (Figs. 19,30) ou apresenta uma estrutura tripla (Fig. 21). Estas características e a sua localização permitem identificar esta estrutura como sendo exosporo. Os primórdios do exosporo aparecem na extremidade não polar, cercando progressivamente o esporo até à maturação do exosporo, que ocorre durante a fase VI. Murrell (194) sugere que o exosporo deriva da membrana externa do pré-esporo. As observações que efectuámos demonstram claramente que não é assim: a membrana externa do pré-esporo, claramente visível como "unit membrane" até à fase III (Fig. 32) persiste, embora em desagregação progressiva até à fase V, altura em que já é possível observar-se, como estrutura distinta morfológica e topologicamente, o exosporo em formação (Figs. 27,30,31,34). A coexistência destas duas estruturas põe de parte qualquer possível identidade entre elas.

2.7. Alterações ultraestruturais provocadas nos esporos pelos agentes químicos e pelo calor - A cinética do aparecimento das resistências das células em esporulação do Bacillus subtilis está definida, tendo sido atribuída a responsabilidade dessas resis-

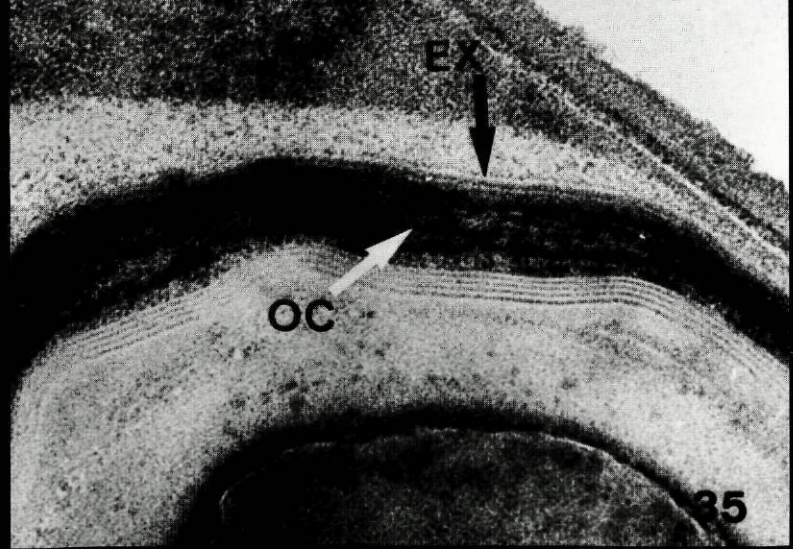

EX
EX
OM
IC
IC
OM
30


OM
EX
IM
IC
CM
31


IM
OM
32


EX
IC
EX
OM
33


OM
IM
C
34


EX
OC
35

Figs. 30 , 31 - Célula de B. subtilis 168 na fase V. São observáveis, como estruturas independentes, o exosporo (EX), a membrana externa (OM) e interna (IM) do pré-esporo e os primórdios da túnica interna (IC). CM - membrana citoplasmática do esporângio. Fig.30 : 130.000 X e da Fig. 31 : 222.000X.

Figs. 32 - 35 - Evolução morfológica da membrana externa do esporo e do exosporo nas células em esporulação do B. subtilis 168.

Fig.32 - Fragmento de uma célula na fase III. São nitidamente distinguíveis as membranas interna (IM) e externa (OM) de pré-esporo. 160.000 X.

Fig.33 - Fragmento de uma célula na fase IV. As duas membranas do esporo são ainda claramente vizualizáveis. 162.000 X.

Fig.34 - Fragmento de uma célula na fase V. São observáveis como estruturas autônomas: a membrana externa do esporo (OM) e os primórdios da túnica interna (IC) e do exosporo (EX). 160.000 X.

Fig.35 - Fragmento de uma célula na fase VI. Aspecto final do exosporo (EX) justaposto à túnica externa (OC). 160.000 X.

tências a algumas das estruturas do esporo, de acordo com a coincidência, no tempo, do aparecimento de uma dada resistência e o predomínio de células numa fase em que surge uma determinada estrutura. Com a finalidade de correlacionar, directamente, o desenvolvimento dessas resistências com a morfogénese esporulativa, procedemos ao estudo ultraestrutural das células esporulativas de Bacillus subtilis antes e após os referidos tratamentos, tomando como termo de comparação o efeito destes agentes sobre as células vegetativas.

2.7.1. Células vegetativas de Bacillus subtilis tratadas com solventes orgânicos - XIL, TOL, OCT, e CLOR dissolvem parcialmente as membranas e modificam o seu perfil de assimétrico para simétrico (Fig 37b-e). A eficácia dos diferentes solventes quanto à solubilização das membranas é diferente e seguem a seguinte ordem: CLOR (Fig. 37e, 38 ) > OCT (Figs. 37d, 41 ) > XIL (Figs. 37b, 39) e TOL (Figs. 37c, 40). O citoplasma das células não parece ser afectado na sua ultraestrutura pela acção dos solventes.

2.7.2. Células de Bacillus subtilis tratadas com TCA - O TCA praticamente não afecta a membrana e a sua acção ocorre essencialmente no citoplasma onde se formam blocos densos, sensíveis à digestão enzimática pela pronase, enquanto os ribossomas desaparecem totalmente (Fig. 37f). Pequenas vesículas membranosas surgem no interior das células, sendo também visíveis fibrilas de DNA nas áreas coaguladas (Fig. 42 )

2.7.3. Células de Bacillus subtilis tratadas pelo calor húmido - A membrana citoplasmática é particularmente afectada pelo aquecimento a 80°C, durante 10 minutos, apresentando numerosas fracturas

e um perfil simétrico (Figs. 37g, 43 ). O citoplasma apresenta também blocos densos, sensíveis à pronase e os ribossomas não são evidentes. O DNA mantém a sua estrutura fibrilar (Fig. 43).

2.8. Células esporulativas de Bacillus subtilis tratadas com solventes TCA e calor húmido - O esporângio em qualquer fase esporulativa apresenta o mesmo tipo de lesões acabadas de descrever nas células vegetativas (Figs. 44-54).

2.8.1. Xileno - O pré-esporo apresenta alterações até à fase III, surgindo as membranas interna e externa parcialmente dissolvidas e com perfil simétrico (Fig. 44 ). Após a fase III o pré-esporo parece não ser afectado (Fig.45).

2.8.2. Tolueno - A membrana interna, até ao início da fase V, parece ser alterada (Fig. 47,48 ) enquanto que,quando o esporo apresenta túnica interna e externa, parece já não ser afectada (Fig.49).

2.8.3. Octanol e clorofórmio - Alteram a membrana interna do pré-esporo,durante a fase V tardia, mesmo quando há uma formação completa das túnicas (Figs. 46,50).

2.8.4. TCA - Coagula o citoplasma do pré-esporo até ao fim da fase V (Fig 51 ), mas já não afecta o citoplasma dos esporos na fase VI (Fig. 52).

2.8.5. Aquecimento - Afecta a estrutura do esporo até ao início da fase VI (Fig. 53 ), enquanto que o citoplasma dos esporos maduros não parece ser afectado (Fig. 54).

Fig36- Célula vegetativa de B. subtilis 168, fixado pela técnica RK sem pré-fixação. A membrana citoplasmática (CM) apresenta um perfil assimétrico; o nucleóide (N) apresenta uma estrutura fibrilar; os ribossomas (R) são evidentes no citoplasma da célula; a parede celular (CW) é constituída por uma camada electronodensa não estratificada; pequenos mesossomas (M) são evidentes. 98.000 X.

Fig37a-g- Grande ampliação da membrana citoplasmática (CM) de células vegetativas de B.subtilis 168, antes e após os tratamentos referidos abaixo.

a. Célula não tratada, apresentando a membrana citoplasmática o seu perfil assimétrico. 194.000 X.

b,c,d. Célula tratada, respectivamente com XIL, TOL e OCT. Observar a dissolução parcial das membranas e o seu perfil simétrico. Fig. b: 184.000 X; Fig. c: 194.000 X; Fig. d: 185.000 X.

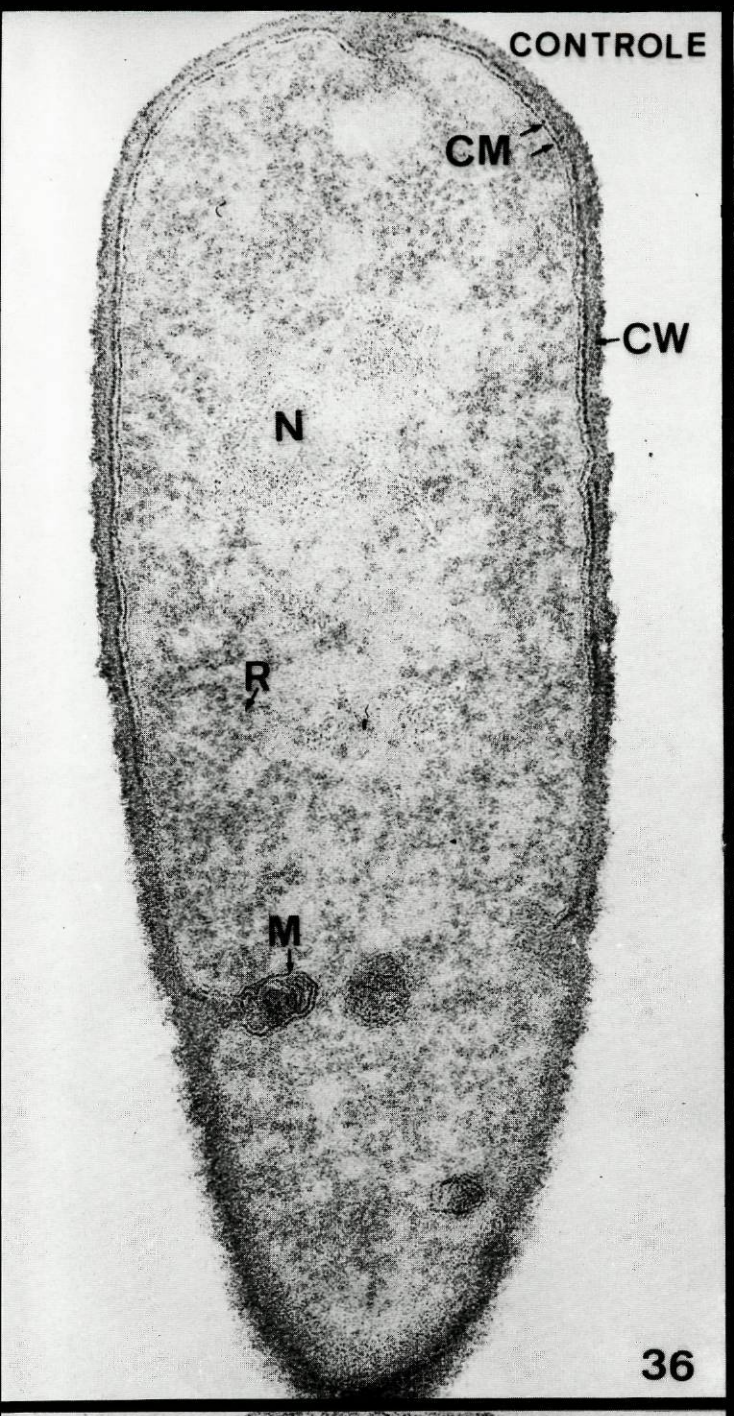
e. Célula tratada com CLOR. A membrana está quase totalmente dissolvida e as pequenas porções preservadas exibem um perfil simétrico. 184.000 X.

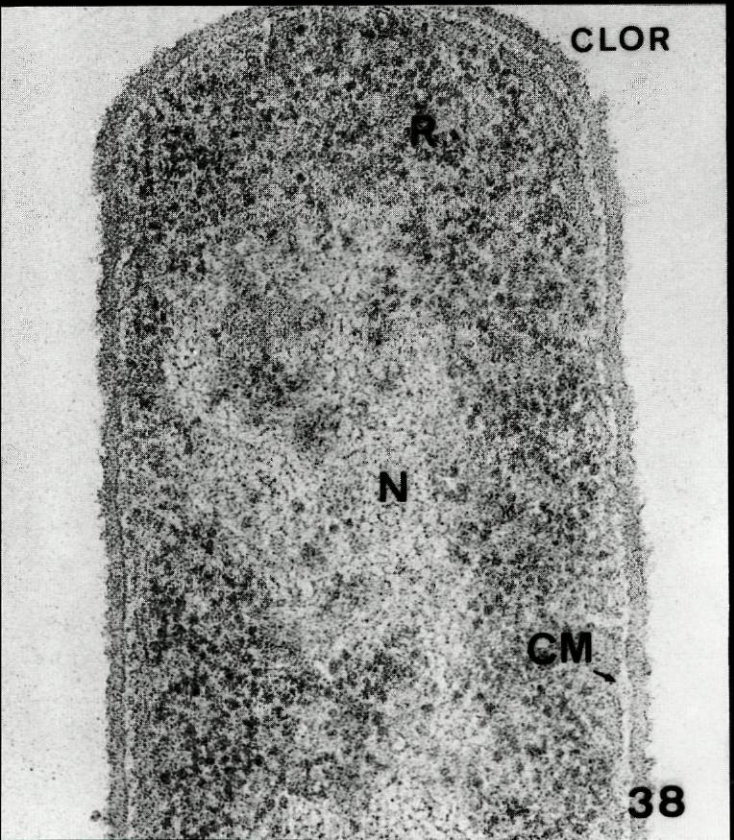
f. Célula tratada com TCA. A membrana é assimétrica e totalmente preservada. O citoplasma apresenta blocos densos. 184.000X.

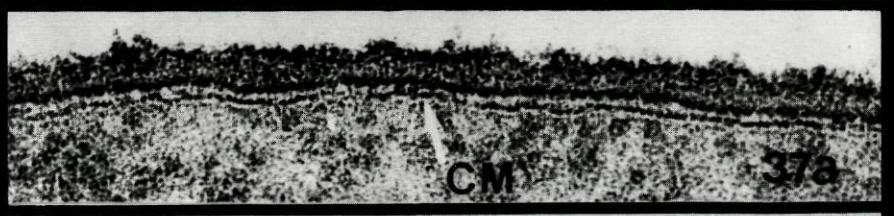
g. Célula tratada pelo calor húmido. A membrana é simétrica e apresenta vários pontos de fractura. 184.000 X.

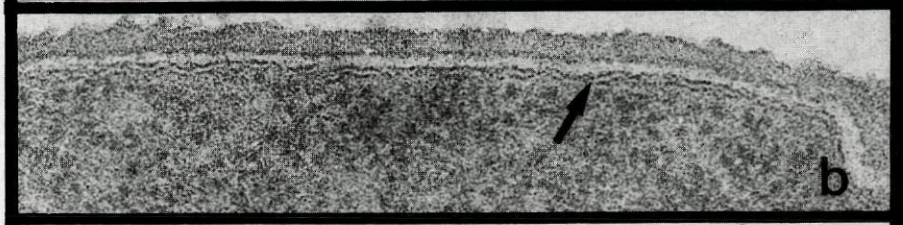
Fig38- Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratada com CLOR. A membrana citoplasmática (CM) está profundamente afectada e apresenta largas zonas de dissolução. Os ribossomas (R) e o núcleo (N) não parecem afectados. 98.000X

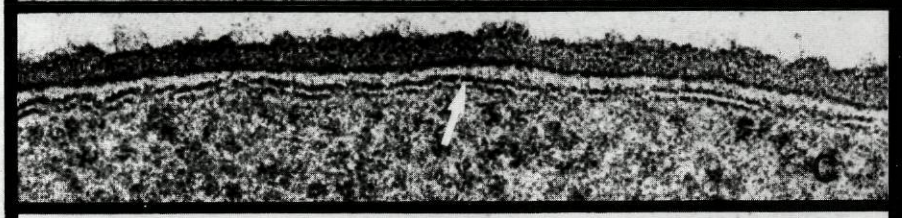
Fig39- Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratada com XIL. A membrana citoplasmática (CM) apresenta um perfil simétrico. Os ribossomas e o núcleo não parecem afectados. 98.000X

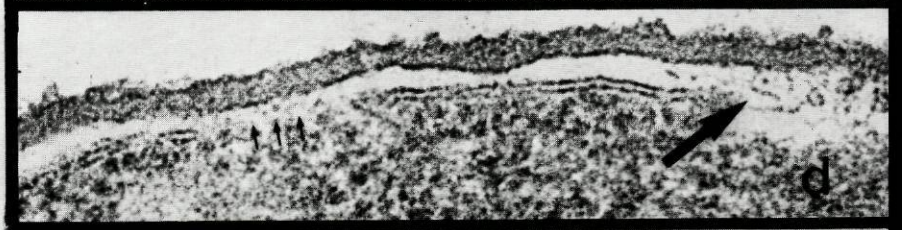

CONTROLE
CM
CW
N
R
M
36


CLOR
R
N
CM
38

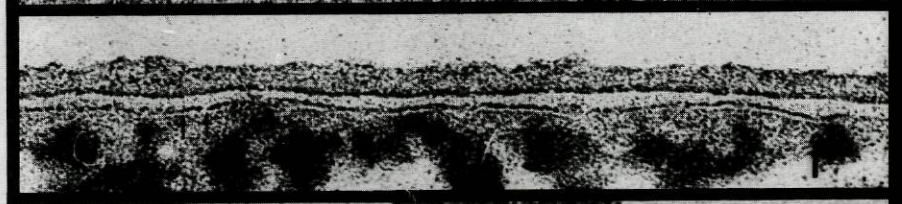

CM
37a


b


c


d


e


f


g

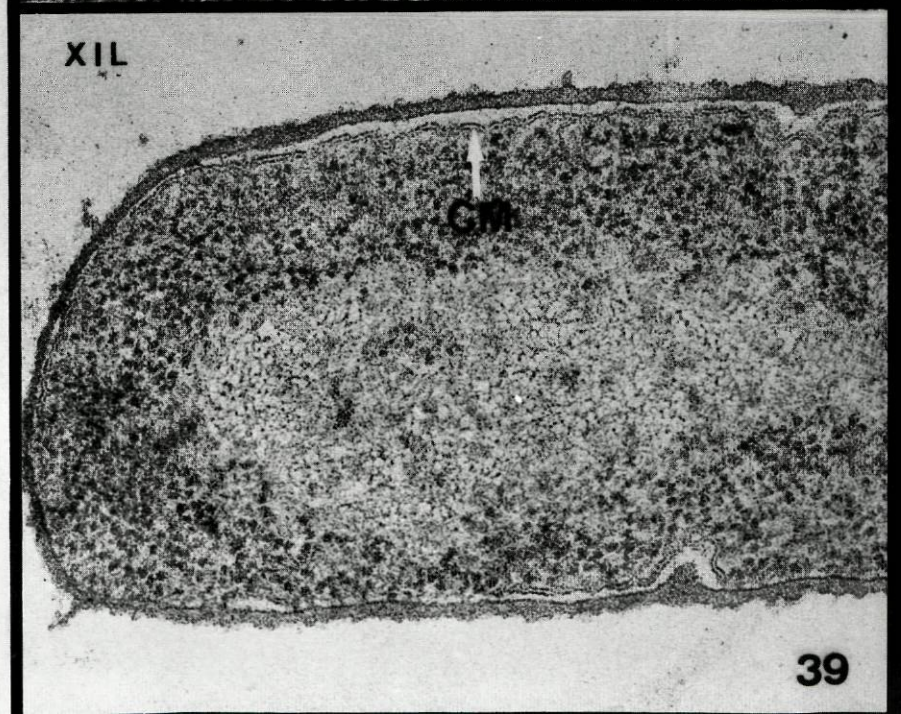
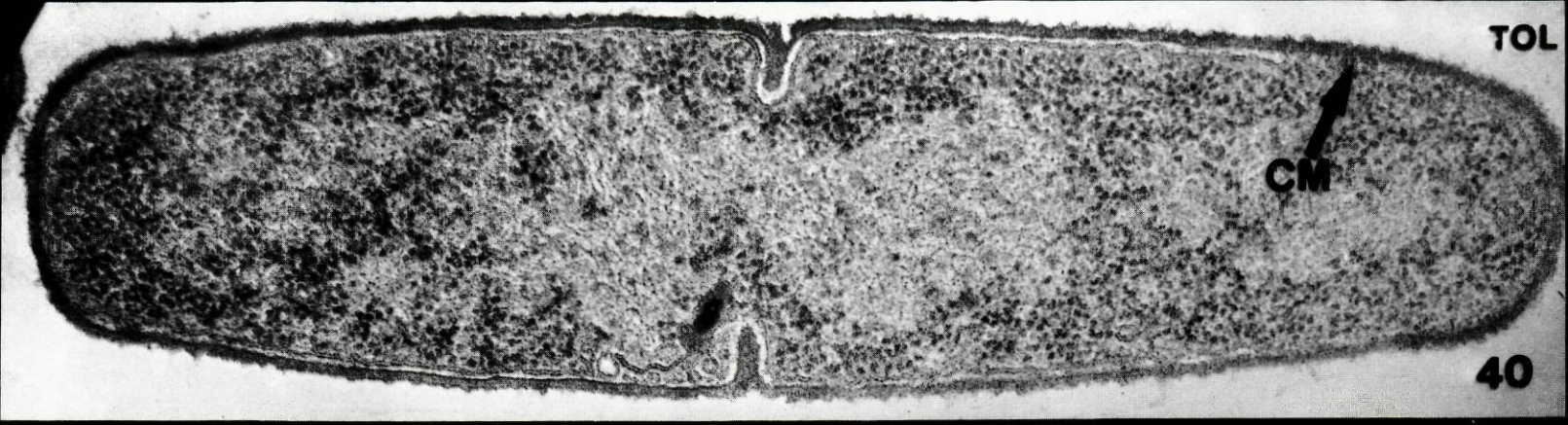

XIL
CM
39

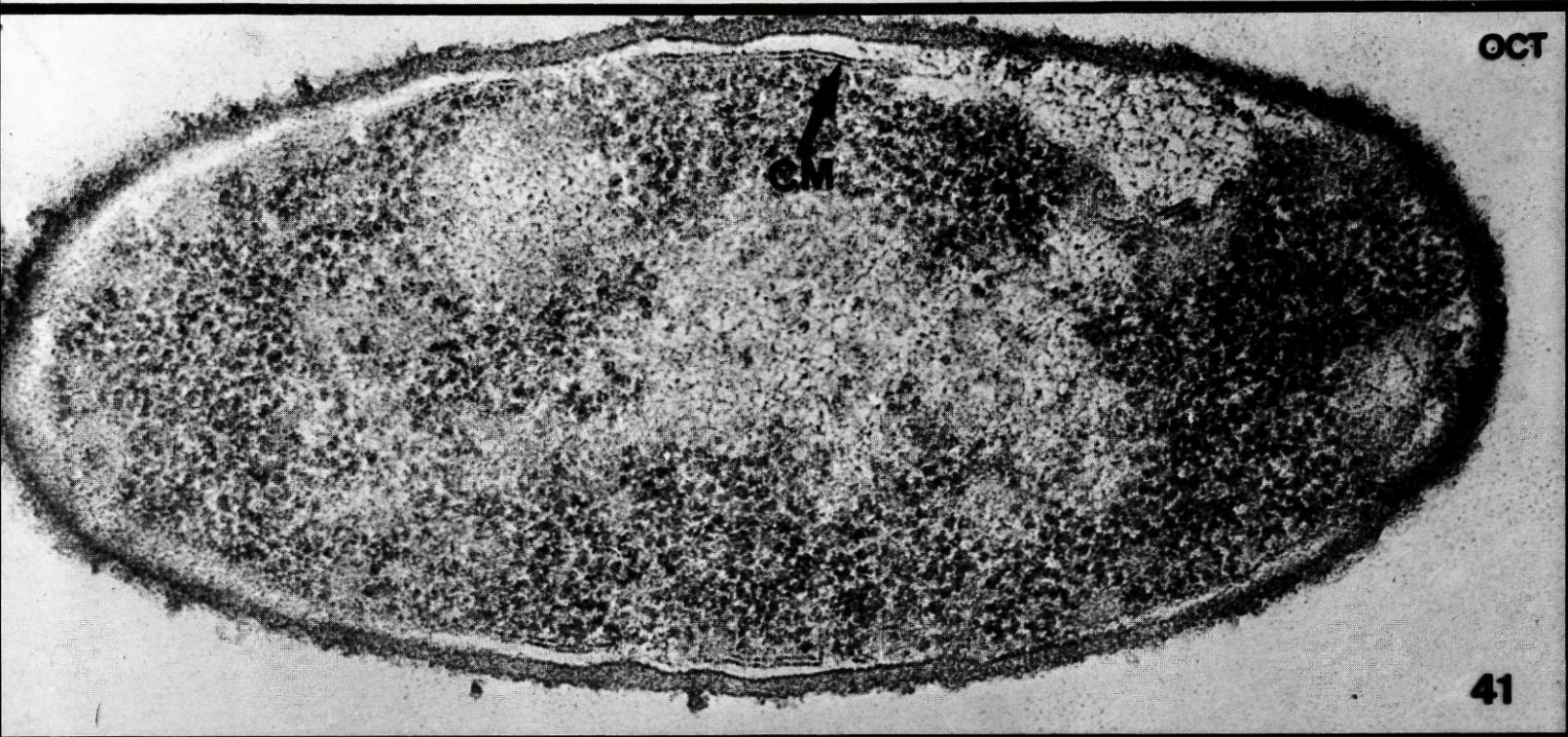
Fig.40 - Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratada com TOL. A membrana citoplasmática (CM) está parcialmente dissolvida e apresenta um perfil simétrico. 74.000X.

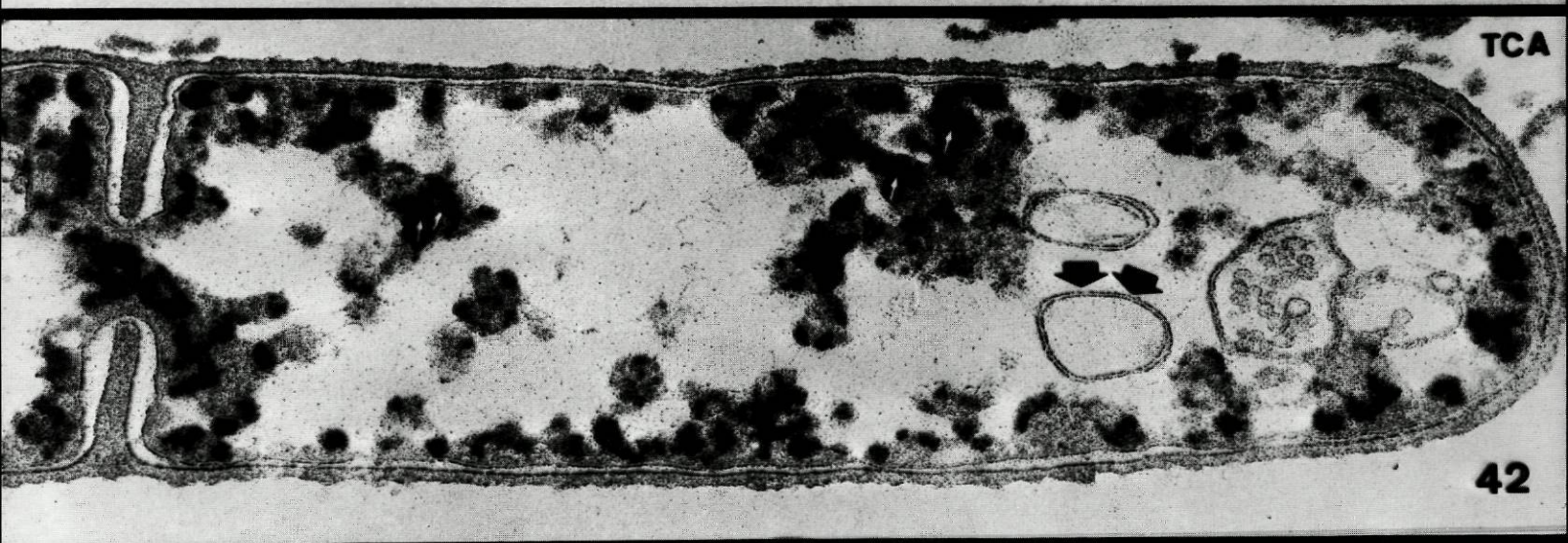
Fig.41 - Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratada com OCT. A membrana citoplasmática (CM) apresenta um perfil simétrico e está parcialmente dissolvida. 116.000X.

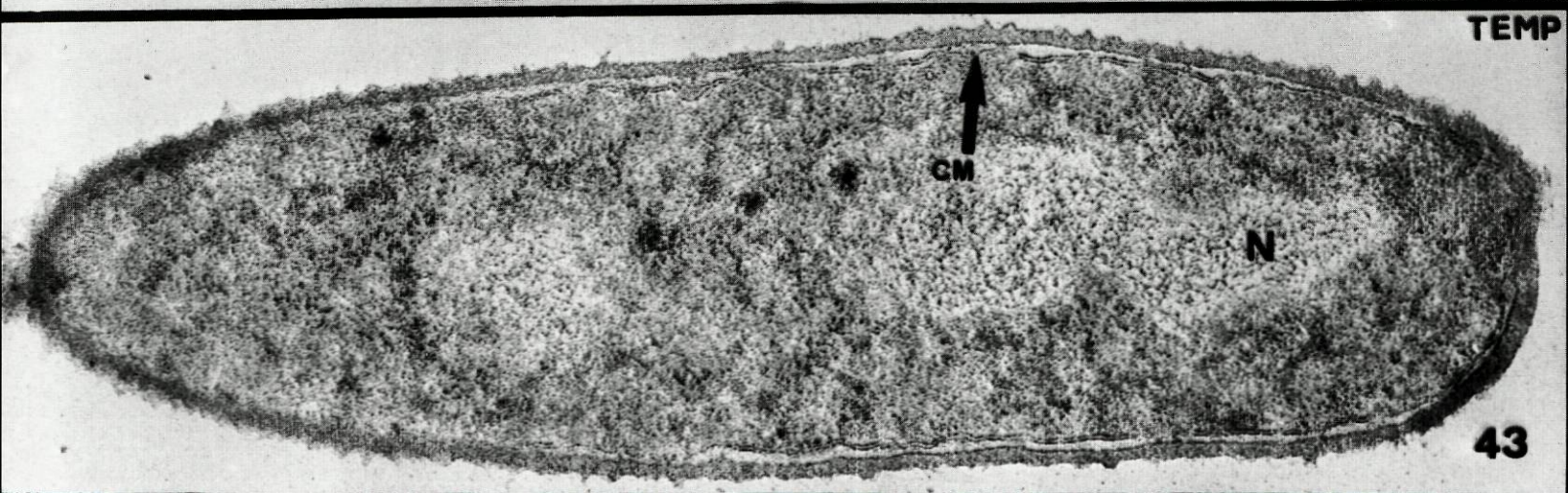
Fig.42 - Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratado com TCA. O citoplasma apresenta áreas coaguladas (setas) e os ribossomas não são evidentes. Pequenas vesículas membranosas são evidentes no citoplasma (dupla seta). 80.000X.

Fig.43 - Célula vegetativa de B. subtilis 168 tratada pelo aquecimento a 80°C/10'. A membrana citoplasmática (CM) apresenta zonas de fractura. O citoplasma não apresenta ribossomas, notando-se no entanto a estrutura fibrilar do DNA (N) e a presença de blocos coagulados no citoplasma. 100.000X.

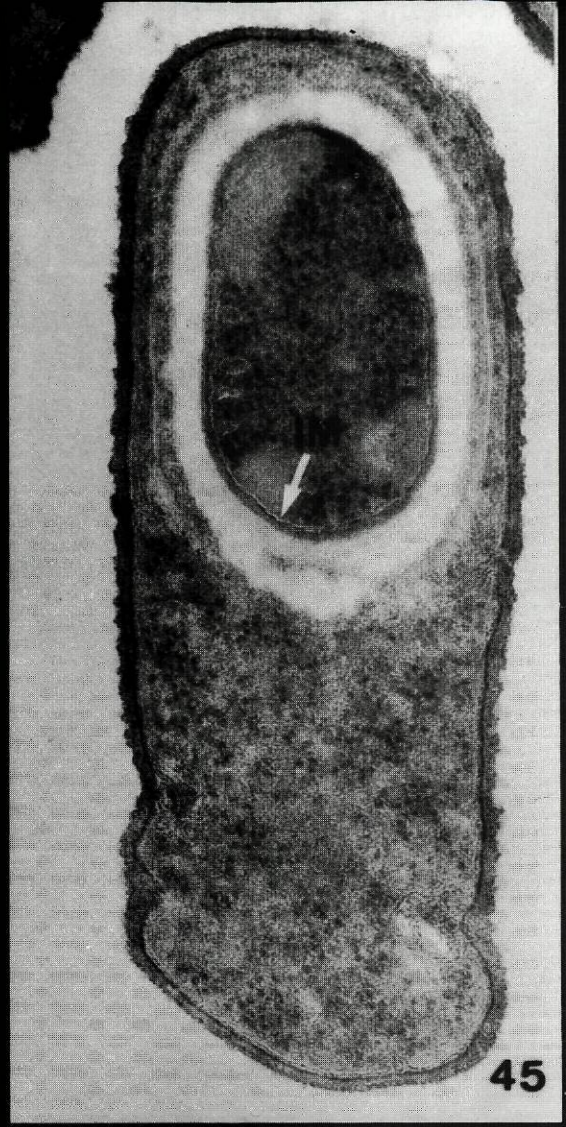

TOL
CM
40


OCT
CM
41

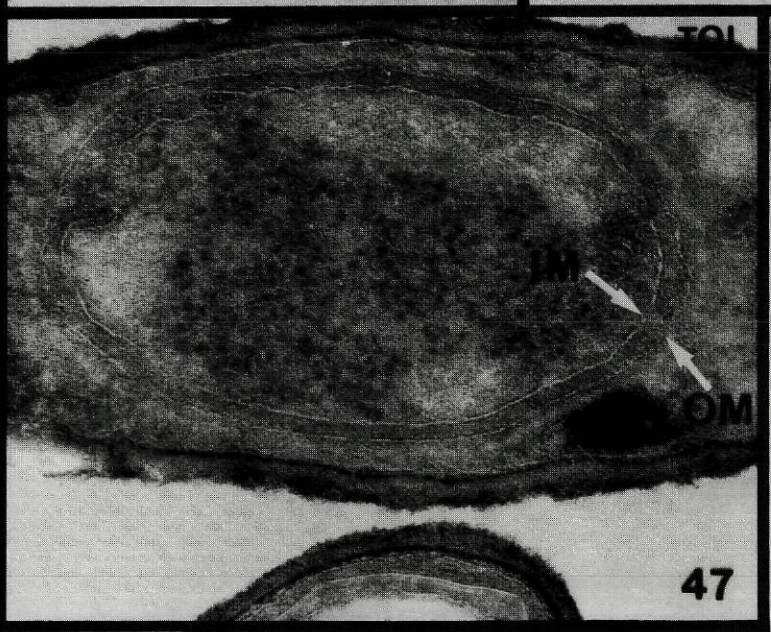

TCA
42

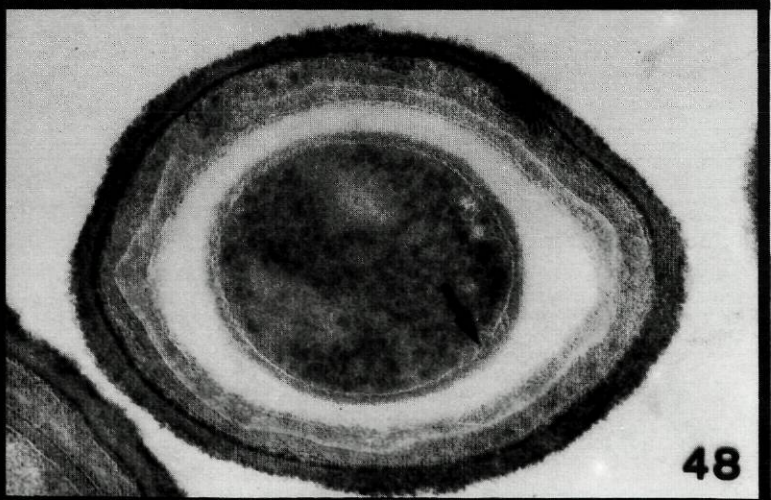

TEMP
CM
N
43

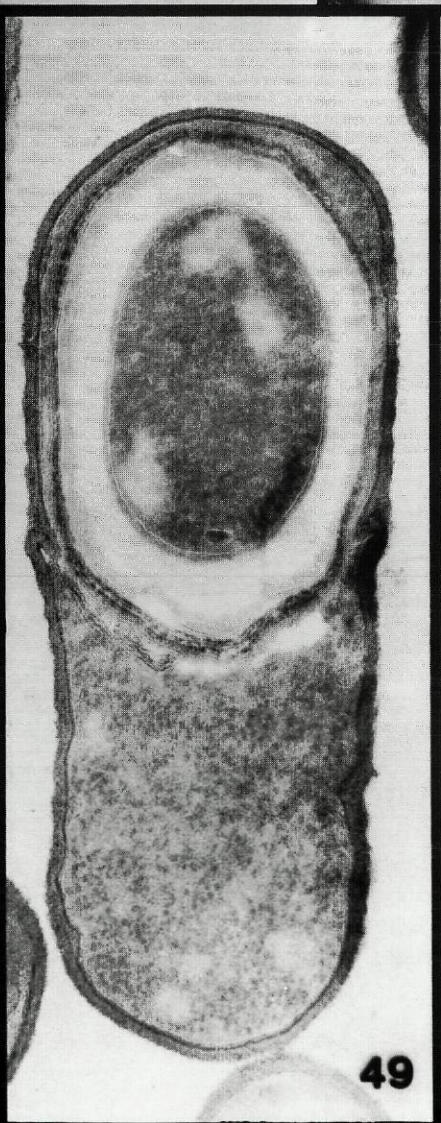

XIL
44


IM
45


OCT
IM
46


IM
OM
47


48


49

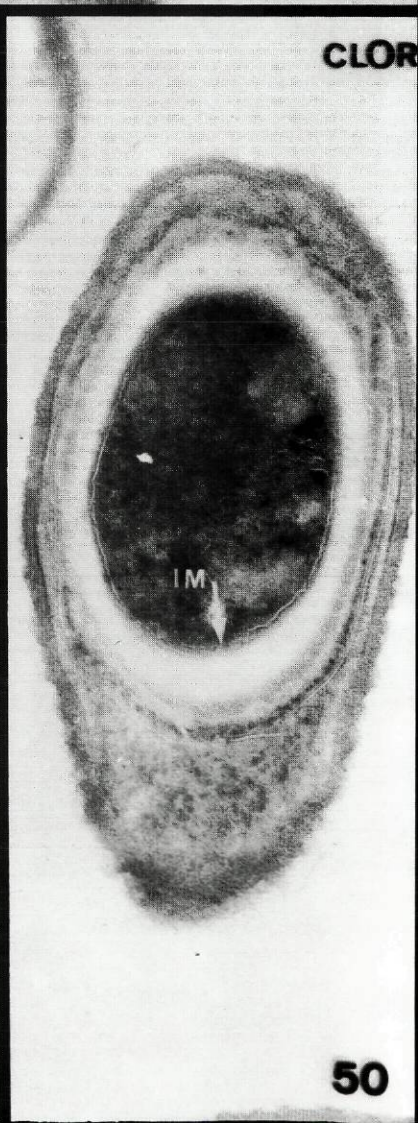

CLOR
IM
50

Fig.44- Célula de B. subtilis 168 na fase III, colhidos em $t_2$, tratada com xilol (XIL). A membrana interna (IM) e a membrana externa (OM) do pré-esporo estão mal preservadas. 84.000 X.

Fig.45- Célula de B. subtilis 168 na fase V recente, tratada com XIL e colhida em $t_{3.5}$. A membrana interna (IM) do pré-esporo está preservada. 84.000 X.

Fig.46- Célula de B. subtilis 168 na fase V tardia, colhida em $t_5$. A membrana interna (IM) do esporo apresenta zonas de dissolução após o tratamento com OCT. 74.000 X.

Fig.47- Célula de B. subtilis 168 na fase III e colhida em $t_3$. A membrana interna (IM) e a membrana externa (OM) parecem afectadas após o tratamento com TOL. 98.000 X.

Fig.48- Célula de B. subtilis 168, na fase V recente e colhida em $t_4$. A membrana interna (IM) após o tratamento com TOL parece afectada. 98.000 X.

Fig.49- Célula de B. subtilis 168 na fase V tardia, colhida em $t_5$. A membrana interna (IM), após o tratamento com TOL não parece afectada. 64.000 X.

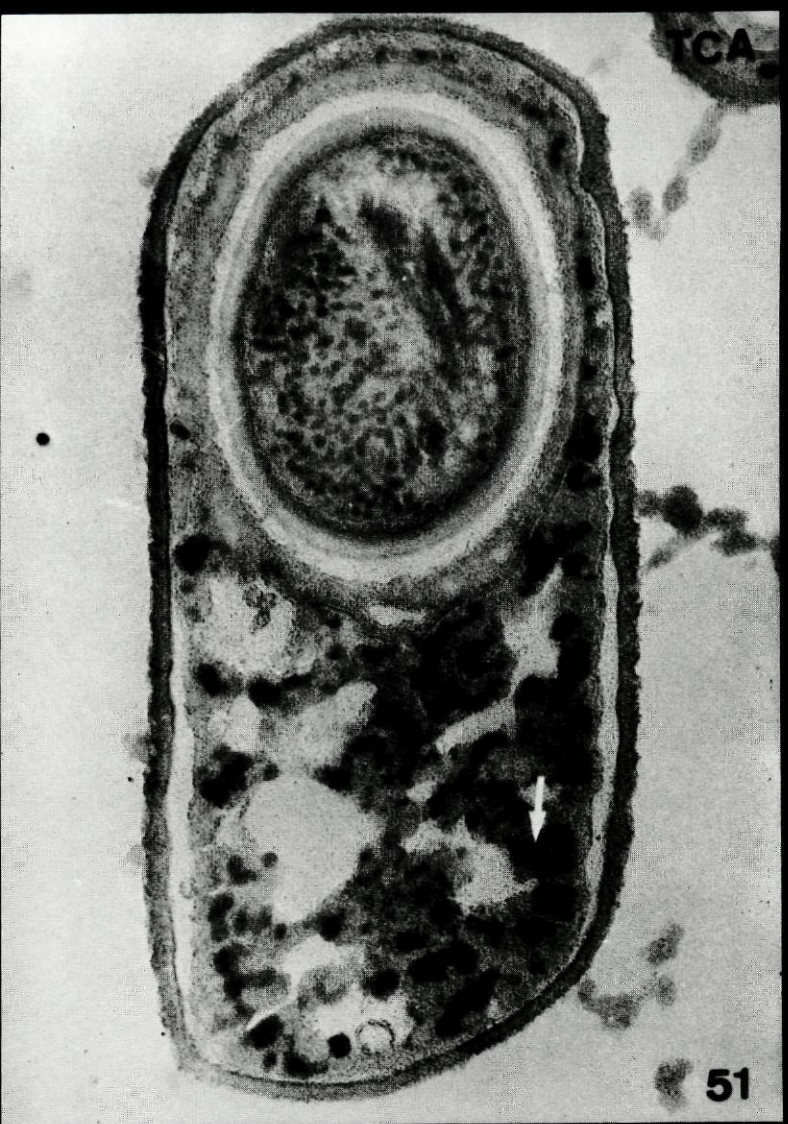
Fig.50- Célula de B. subtilis 168 na fase V tardia, colhida em $t_5$. A membrana interna (IM) do esporo parece profundamente afectada apresentando zonas de dissolução, após os tratamentos com CLOR. 76.000X.

Fig.51- Célula de B. subtilis 168 na fase V, colhido em $t_5$ e tratada com TCA. O citoplasma do esporo apresenta blocos densos (seta). 84.000 X.

Fig.52- Célula de B. subtilis 168 na fase VI, colhida em $t_5$ e tratada com TCA. O citoplasma do esporo não parece afectado. 78.000X.

Fig.53- Célula de B. subtilis 168 na fase V, colhido em $t_5$ e tratada por aquecimento a 80°/10'. O citoplasma do esporo parece afectado, notando-se blocos densos (setas). 84.000 X.

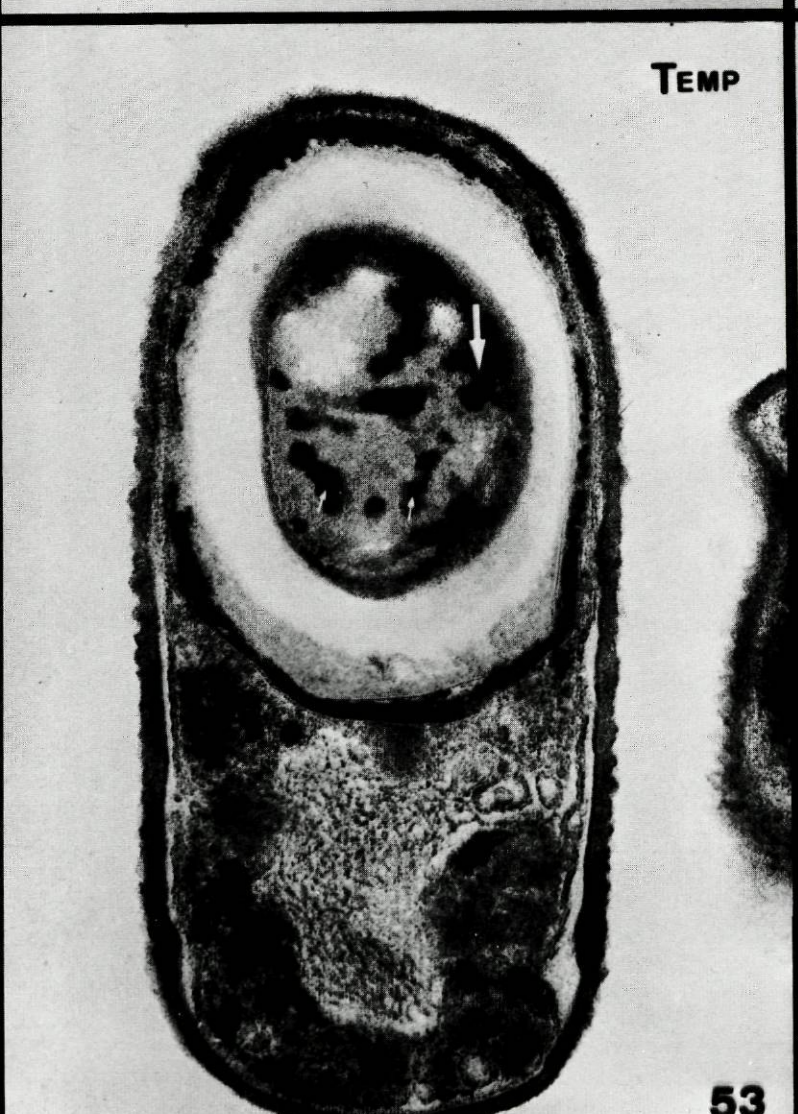
Fig.54- Célula de B. subtilis 168, na fase VI, colhido em $t_7$ e aquecida a 80°/10'. O esporo não parece afectado. 82.000 X.




51



52




53



54

Uma tentativa de correlação entre a morfogénese esporulativa e o desenvolvimento das resistências químicas está representada no Quadro 11.

## 3. CINÉTICA DA RESISTÊNCIA DOS ESPOROS AOS SOLVENTES ORGÂNICOS, TCA E AO AQUECIMENTO

A partir da cultura esporulativa, entre $t_2$ e $t_6$, foram colhidas amostras de hora a hora e tratadas com TOL, CLOR, OCT, TCA e aquecidas a 80°C, durante 10 minutos, conforme indicado em Material e Métodos. Uma amostra colhida em $t_{24}$ foi tratada nas mesmas condições. O número de células viáveis após os tratamentos foi determinado. Os resultados expressos na Fig. 55 permitem concluir que, no início da esporulação, as células não resistem à acção deletéria dos compostos químicos, adquirindo essa resistência ao longo do processo esporulativo. Os esporos livres resistem a todos os tratamentos utilizados (Fig. 56).

## 4. EFEITOS DOS TRATAMENTOS QUÍMICOS NA VIABILIDADE E RESISTÊNCIA DOS ESPOROS APÓS TRATAMENTO COM UREIA-MERCAPTOETANOL

O tratamento dos esporos com ureia-Me foi feito para visualizar, por desorganização controlada, o exosporo. Dado que a função do exosporo não está esclarecida, tentámos averiguar qual o efeito dos solventes e aquecimento, após a desorganização parcial dos esporos com ureia-Me. Os resultados obtidos (Quadro 12) mostram que nenhum dos tratamentos afectou a viabilidade ou a resistência dos esporos.

QUADRO 11 — CORRELAÇÃO ENTRE A MORFOGÉNESE E A AQUISIÇÃO DAS RESISTÊNCIAS DURANTE A ESPORULAÇÃO DO *BACILLUS SUBTILIS* 168

| FASE III | FASE IV | FASE V | | FASE VI |
|---|---|---|---|---|
| FORMAÇÃO DO PRÉ-ESPORO | FORMAÇÃO DO CÓRTEX | FORMAÇÃO DA TÚNICA INTERNA; MATURAÇÃO DO CÓRTEX+EXOSPORO | FORMAÇÃO DA TÚNICA EXTERNA | MATURAÇÃO DAS TÚNICAS; SÍNTESE DO DPA |
| RESISTÊNCIAS: | XIL | TOL | OCT CLOR | TCA AQUECIMENTO |

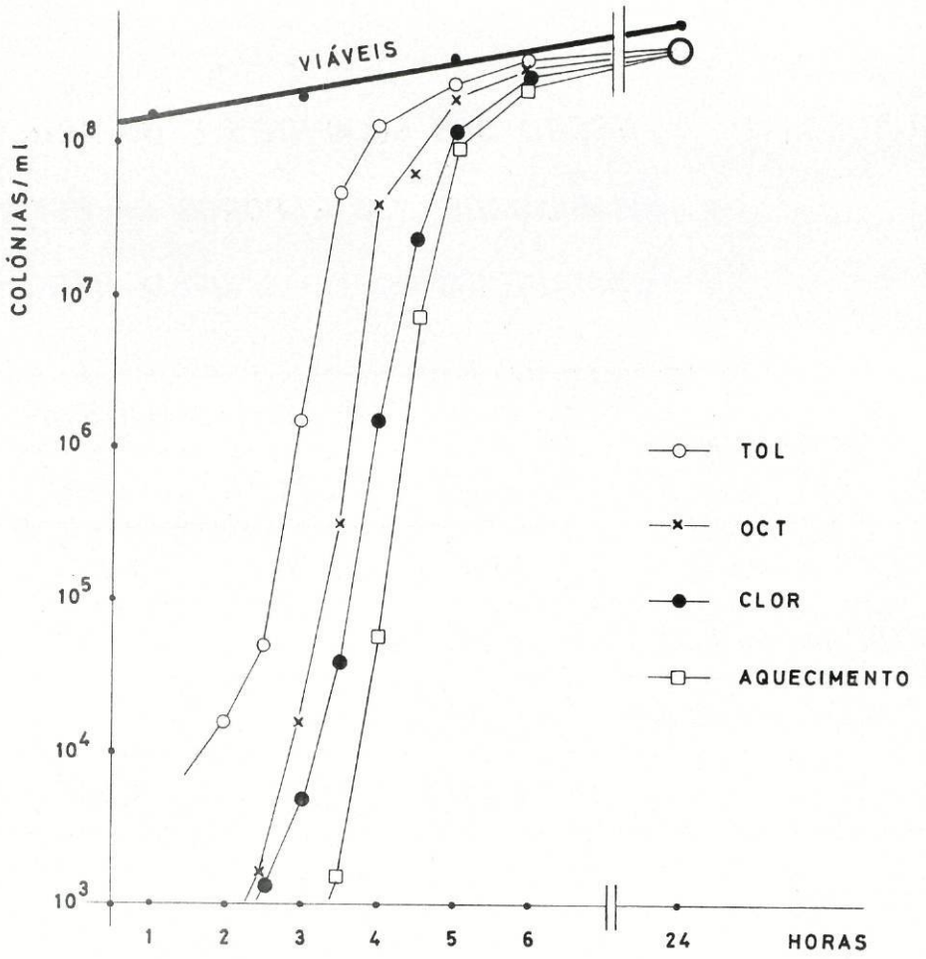



Fig. 55 - Cinética da aquisição das resistências aos solventes orgânicos e ao aquecimento (80°C/ /10'), durante o processo esporulativo.

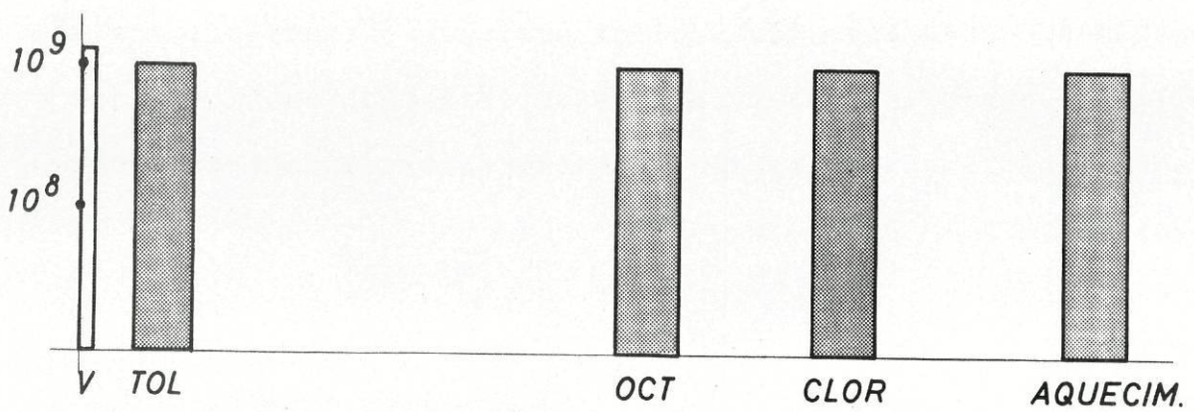



Fig. 56 - Diagrama representativo do número de células do B. subtilis 168, colhidas em $t_{24}$, resistentes aos agentes químicos e físicos. Cada coluna representa o nº de células viáveis após os referidos tratamentos e as distâncias em abcissas são proporcionais ao tempo de aquisição das resistências.

**QUADRO 12** *EFEITO DOS SOLVENTES E DO AQUECIMENTO NA VIABILIDADE DOS ESPOROS DA ESTIRPE PM9 APÓS TRATAMENTO PRÉVIO C/ UREIA-MERCAPTOETANOL*

| TRATAMENTOS | CÉLULAS VIÁVEIS/ml | | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $OCT^R$ | $CLOR^R$ | TEMP |
| UREIA-Me | $3.10^8$ | $3.10^8$ | $3.10^8$ | $3.10^8$ |
| UREIA-Me+OCT | $3.10^8$ | | $3.10^8$ | $3.10^8$ |
| UREIA-Me+CLOR | $3.10^8$ | | | $3.10^8$ |
| NULO | $4.10^8$ | $4.10^8$ | $4.10^8$ | $3.10^8$ |

As amostras foram colhidas em $t_{20}$

## 5. ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ESTIRPES SELVAGENS DE BACILLUS SUBTILIS

A produção de proteases, α-amilases e fosfatases alcalina durante o processo esporulativo foi avaliada e esses valores são utilizados como padrões para a caracterização fenotípica das estirpes utilizadas neste trabalho e estão referidos nos respectivos capítulos.

ESTIRPES DPA

## B - ESTUDO DA ESPORULAÇÃO DE ESTIRPES QUE NÃO SINTETIZAM ÁCIDO DIPICOLÍNICO (Estirpes DPA$^-$)

Tem-se atribuído ao DPA a responsabilidade da termo-resistência do esporo bacteriano. Isto deve-se ao facto de aquele composto ser um constituinte específico dos esporos e a sua síntese coincidir com o aparecimento da termo-resistência (105). Contrariando esta hipótese têm sido descritas mutantes DPA$^-$ termo-resistentes (119,341). No entanto, o facto de certas estirpes mutantes DPA$^-$ de Bacillus e Clostridium, termo-sensíveis, apenas adquirirem a termo-resistência, após a adição exógena de DPA ao meio de cultura esporulativo, parece atribuir a este composto papel preponderante no processo da aquisição da resistência ao calor (95,260). Não têm sido descritas mutantes de Bacillus subtilis com estas características.

Balassa & Yamamoto verificaram que os esporos da mutante CB22 do Bacillus subtilis eram resistentes ao clorofórmio e sensíveis ao calor (26), não apresentando qualquer diferença estrutural em relação aos esporos normais. Com a finalidade de interpretar o significado destas observações procedemos ao reexame da mutante CB22 e de outra estirpe obtida desta por transformação. Verificamos que a mutante CB22 e esta estirpe tinham em comum um baixo teor em DPA presente nos seus esporos, tendo sido, por isso, designadas estirpes DPA$^-$.

1. A estirpe mutante CB22, em meio de esporulação líquido, forma esporos CLOR$^R$ com alta frequência, mas só menos de 1% desta população atinge a resistência ao calor (Quadro 13). A adição exógena de DPA às culturas em esporulação permitiu que todos os esporos

$CLOR^R$ atingissem a $Temp^R$ (Quadro 13).

**QUADRO 13** — **RESISTÊNCIA DOS ESPOROS DA MUTANTE CB22 AO CLOROFÓRMIO E À TEMPERATURA**

| | | SEM ADIÇÃO DE DPA | | COM ADIÇÃO DE DPA | |
|---|---|---|---|---|---|
| EXP. | T | $CLOR^R$ | $TEMP^R$ | $CLOR^R$ | $TEMP^R$ |
| 1 | $t_{48}$ | $1.7.10^8$ | $1.2.10^5$ | $2.10^8$ | $4.10^8$ |
| 2 | $t_{20}$ | $3.10^7$ | $2.10^5$ | $3.10^8$ | $2,6.10^8$ |
| 3 | $t_{30}$ | $1.10^8$ | $6.10^5$ | $3.10^8$ | $2.10^8$ |

Os esporos de CB22 foram tratados com CLOR e aquecidos a 80°C /10'. Na exp.1 o DPA foi adicionado em $t_9$ (250 µg/ml); na exp.2 o DPA foi adicionada em $t_6$ (50 µg/ml); na exp.3 o DPA foi adicionado na fase exponencial (50 µg/ml). Os números indicados representam o número de esporos/ml. As culturas de CB22 antes dos tratamentos continham aproximadamente $5x10^8$ esporos/ml.

Como a mutante CB22 foi obtida por mutagénese com N-metil-N'--nitro-N''-nitrosoguanidina, havia interesse em demonstrar que o fenotipo dos esporos desta mutante era devido a uma mutação simples. Com essa finalidade foram obtidas transformantes usando CB22 como dadora e a estirpe selvagem PM9 como receptora (24). A estirpe AB12 usada neste trabalho é uma dessas transformantes. Verificou-se que o fenotipo dos esporos de AB12 era semelhante ao dos esporos de CB22, quanto à sua resistência e aos efeitos da adição de DPA a células em esporulação (Quadro 14).

**QUADRO 14** RESISTÊNCIA DOS ESPOROS DA ESTIRPE AB12 AO CLOROFÓRMIO E À TEMPERATURA

| | | SEM ADIÇÃO DE DPA | | COM ADIÇÃO DE DPA | |
|---|---|---|---|---|---|
| EXP. | T | $CLOR^R$ | $TEMP^R$ | $CLOR^R$ | $TEMP^R$ |
| 1 | $t_{30}$ | $8.10^7$ | $6.10^5$ | $4.10^8$ | $5.10^8$ |
| 2 | $t_{30}$ | $8.10^7$ | $6.10^4$ | $7.10^8$ | $1.10^9$ |
| 3 | $t_{30}$ | $1.10^8$ | $1,5.10^5$ | $6.10^8$ | $4.10^8$ |

DPA foi adicionado às culturas de AB12 durante a fase exponencial (50 µg/ml) e os esporos foram tratados por CLOR e pelo aquecimento a 80°C/10'. As culturas de AB12 antes do referido tratamento continham aproximadamente $5x10^8$ esporos/ml.

## 2. CARACTERIZAÇÃO DAS ESTIRPES CB22 E AB12

2.1. Proteases - A produção de exoproteases, que ocorre normalmente nas estirpes selvagens entre $t_0$ e $t_3$-$t_5$ (23,69), foi avaliada também nas estirpes CB22 e AB12. A mutação DPA$^-$ não afecta a produção de proteases, as quais atingem valores análogos aos das estirpes selvagens (Quadro 15).

**QUADRO 15 SÍNTESE DE EXOPROTEASES (MÉDIA DE 5 ENSAIOS)**

| ESTIRPE | ACTIVIDADE PROTEÁSICA |
|---|---|
| CB22 | 0,15 |
| AB12 | 0,15 |
| 168 | 0,11 |
| PM9 | 0,12 |

A actividade proteásica foi determinada nos sobrenadantes das culturas em esporulação, entre $t_{20}$ e $t_{30}$, pela técnica de Millet (187).

2.2. Resistências aos solventes orgânicos, fenol, TCA e aquecimento - O comportamento das estirpes DPA$^-$ frente à acção de vários agentes foi estudado e comparado com o da estirpe selvagem (Quadro 16 ). Do exame do Quadro 16 é aparente que estas estirpes são susceptíveis à acção deletéria dos agentes para os quais surge resistência na estirpe selvagem, posteriormente à resistência ao clorofórmio.

O tratamento a 80°C durante 10 minutos não representa a última resistência dos esporos bacterianos, pois à medida que se vai com-

**QUADRO 16** RESISTÊNCIA DOS ESPOROS DA ESTIRPE CB22 AOS AGENTES QUÍMICOS E FÍSICOS

| AGENTE | ESPOROS RESISTENTES/ml | | | |
|---|---|---|---|---|
| TOLUENO | $1.10^8$ | | | |
| BENZENO | $1.10^8$ | | | |
| OCTANOL | $8.10^7$ | | | |
| BUTANOL | $1.10^8$ | | | |
| CLOROFÓRMIO | $4.10^7$ | | | |
| CLOROFÓRMIO | $3.10^8$ | $5.10^7$ | $1,1.10^8$ | $1,4.10^8$ |
| ETANOL | - | $1,2.10^7$ | $1.10^8$ | $1,3.10^7$ |
| PIRIDINA | $6.10^7$ | $7.10^6$ | $1,2.10^8$ | - |
| FENOL | $6.10^7$ | $1,8.10^5$ | $1,1.10^8$ | $2.10^8$ |
| TCA | $6.10^7$ | $8.10^6$ | $2,8.10^7$ | $1,4.10^8$ |
| 80°C/10' | $1.10^6$ | $2.10^5$ | $7.10^4$ | $2,3.10^6$ |

Culturas colhidas em $t_{24}$ ($\simeq 5.10^8$ esporos/ml) foram tratadas as culturas com os agentes indicados. Os agentes referidos no Quadro estão pela ordem de aparecimento da aquisição das resistências durante a esporulação nas estirpes selvagens.

pletando a maturação do esporo a termo-resistência aumenta gradualmente para 80°-90°C durante 1 hora (186). Os esporos da estirpe DPA⁻ foram tratados pelo calor húmido a diferentes temperaturas, durante tempos variáveis, e comparados os resultados com os da estirpe selvagem (Quadro 17).

**QUADRO 17** — **RESISTÊNCIA DOS ESPOROS DPA⁻ AO AQUECIMENTO A 80°-90°C**

| ESTIRPE | T | ESPOROS VIÁVEIS/ml | | |
|---|---|---|---|---|
| | | 80°C/10 min. | 80°C/30 min. | 90°C/10 min. |
| 168 | $t_{20}$ | $4.10^8$ | $4.10^8$ | $4.10^8$ |
| CB22 | $t_{30}$ | $1,5.10^8$ | $6.10^4$ | $7.10^3$ |
| CB22 | $t_{20}$ | $1.10^5$ | $1,7.10^2$ | 0 |
| AB12 | $t_{30}$ | $3.10^6$ | $4.10^4$ | $1,5.10^4$ |

Os tratamentos e o número de esporos viáveis foi determinado conforme indicado em Material e Métodos.

2.3. Cinética da resistência dos esporos aos agentes químicos e físicos - Procedendo do mesmo modo ao descrito para as estirpes selvagens, determinámos, após os tratamentos citados, o número de células viáveis. Os resultados estão expressos na Fig.57 .Comparando estes resultados com os obtidos com a estirpe selvagem 168, nas mesmas condições, podemos concluir que: a aquisição da resistência surge mais tardiamente na estirpe CB22 do que nas estirpes selvagens, sendo particularmente evidente o atraso na aqui-

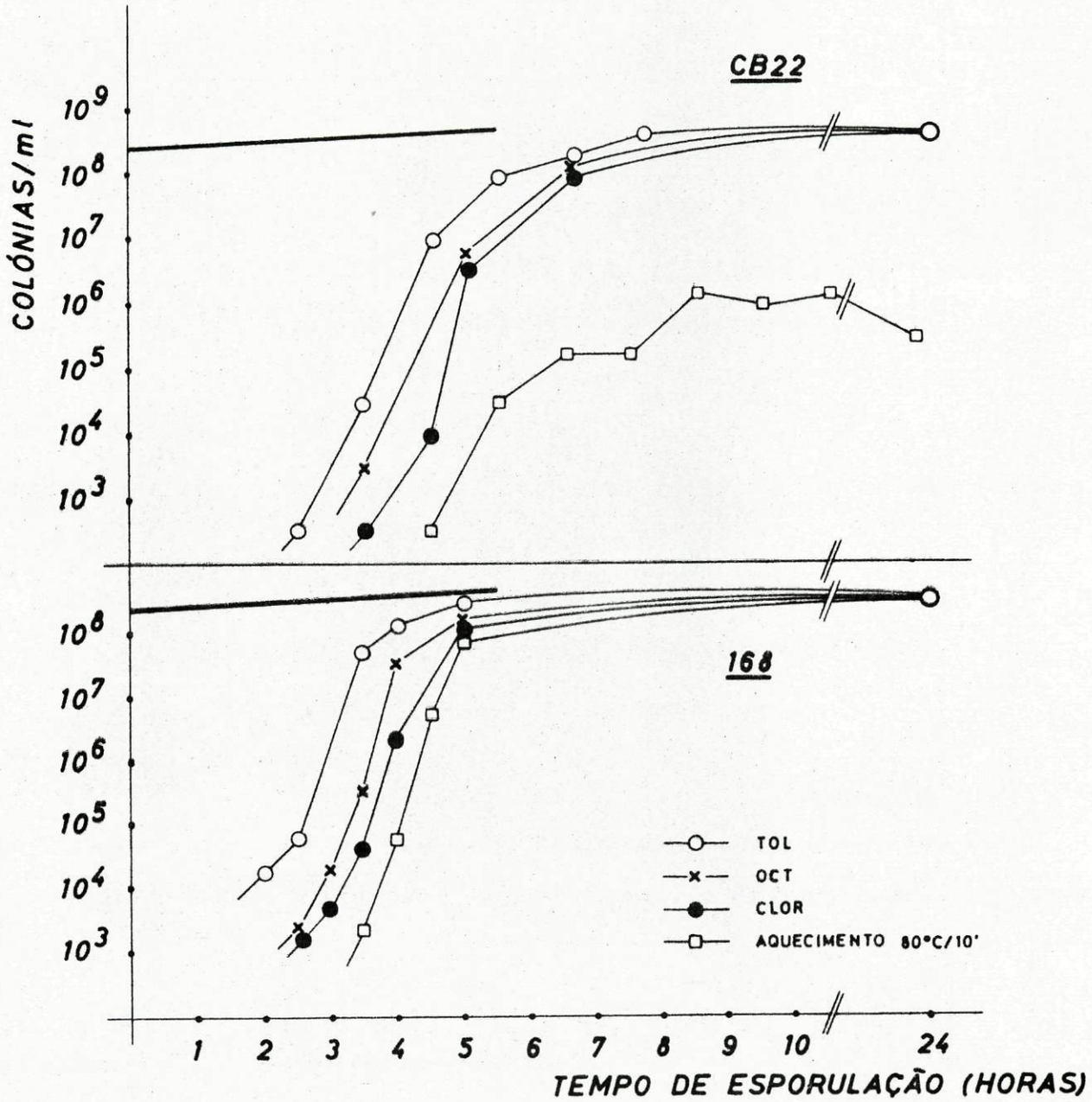



Fig. 57 - Cinética da aquisição das resistências. Amostras colhidas, hora a hora, durante a esporulação foram tratadas com TOL, OCT, CLOR, e pelo aquecimento (80°C/10'). A barra indica o número de células viáveis antes de cada tratamento.

sição da termo-resistência.

2.4. Cinética do desenvolvimento morfológico - Procedendo conforme descrito para as estirpes selvagens, determinámos o número de células nas diferentes fases morfológicas (Quadro 18). Com estes valores, após correcção, fizemos as curvas do desenvolvimento morfológico em função do tempo (Fig. 58 ). A análise comparativa destes resultados com os obtidos para as estirpes selvagens, permite-nos concluir que: as células da mutante CB22 demoram mais tempo a atingir a fase III e as células persistem mais tempo nessa fase; o aparecimento de células na fase V também surge com atraso em relação ao que acontece com as estirpes selvagens. Estes resultados morfológicos estão de acordo com os obtidos na aquisição das resistências, mostrando claramente que as estirpes DPA$^-$ têm uma esporulação atrasada em relação às estirpes selvagens, principalmente nas fases tardias. Resultados idênticos foram obtidos com a estirpe AB12.

2.5. Ultraestrutura das estirpes DPA$^-$ - Diferenças ultraestruturais entre esporos normais e esporos DPA$^-$ não foram descritas em publicações anteriores (26). Nas células em esporulação das estirpes selvagens, nas fases tardias a membrana citoplasmática e os ribossomas esporais não são evidentes (Fig. 59 ), sendo este facto atribuído à fraca penetração dos fixadores para microscopia electrónica. Os esporos das estirpes DPA$^-$ apresentam um perfil morfológico diferente, sendo visíveis aquelas estruturas (Fig. 60 ). Após adição exógena de DPA às culturas em esporulação da estirpe AB12, o aspecto morfológico dos esporos varia e três tipos de população foram

QUADRO 18

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE CB22

| T | N° TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO N° | % | II | % | III | % | IV | % | V+VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 269 | 102 | 37.9 | 32 | 11.9 | 70 | 26. | | | | |
| $t_3$ | 314 | 149 | 47.5 | 36 | 11.5 | 110 | 35. | 3 | 1. | | |
| $t_4$ | 277 | 146 | 52.7 | 13 | 4.7 | 100 | 36.1 | 15 | 5.4 | 18 | 6.5 |
| $t_5$ | 265 | 174 | 65.7 | 11 | 4.2 | 82 | 30.9 | 6 | 2.3 | 75 | 28.3 |
| $t_6$ | 275 | 198 | 72. | 5 | 1.8 | 49 | 17.8 | 13 | 4.7 | 131 | 47.6 |
| $t_7$ | 253 | 200 | 79. | 2 | 0.8 | 46 | 18.2 | 9 | 3.6 | 143 | 56.5 |
| $t_8$ | 410 | 349 | 85.1 | 7 | 1.7 | 52 | 12.7 | 10 | 2.4 | 280 | 70.3 |
| $t_9$ | 260 | 232 | 89.2 | 1 | 0.4 | 9 | 3.5 | 4 | 1.5 | 218 | 83.8 |
| $t_{10}$ | 324 | 263 | 81.2 | | | 6 | 1.9 | 2 | 0.6 | 255 | 78.7 |
| $t_{24}$ | 373 | 308 | 82.6 | | | 1 | 0,3 | | | 202 | 65.6 |
| $t_{48}$ | 300 | 245 | 81.7 | | | 5 | 1.7 | 2 | 0.7 | 88 | 36. |

A % das células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{24}$ havia 105 esporos livres (28,2%) e em $t_{48}$ 150 esporos livres (50%)

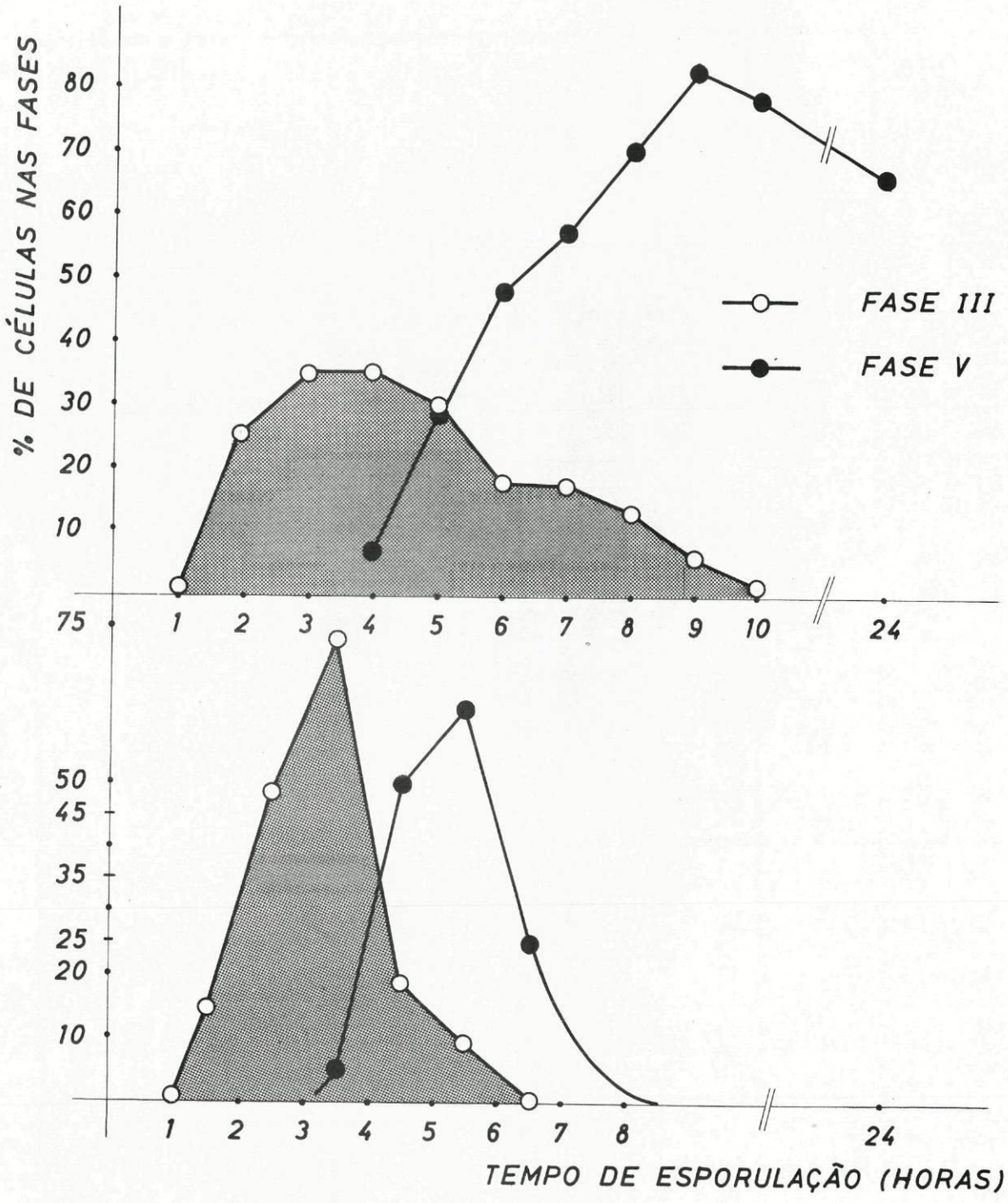
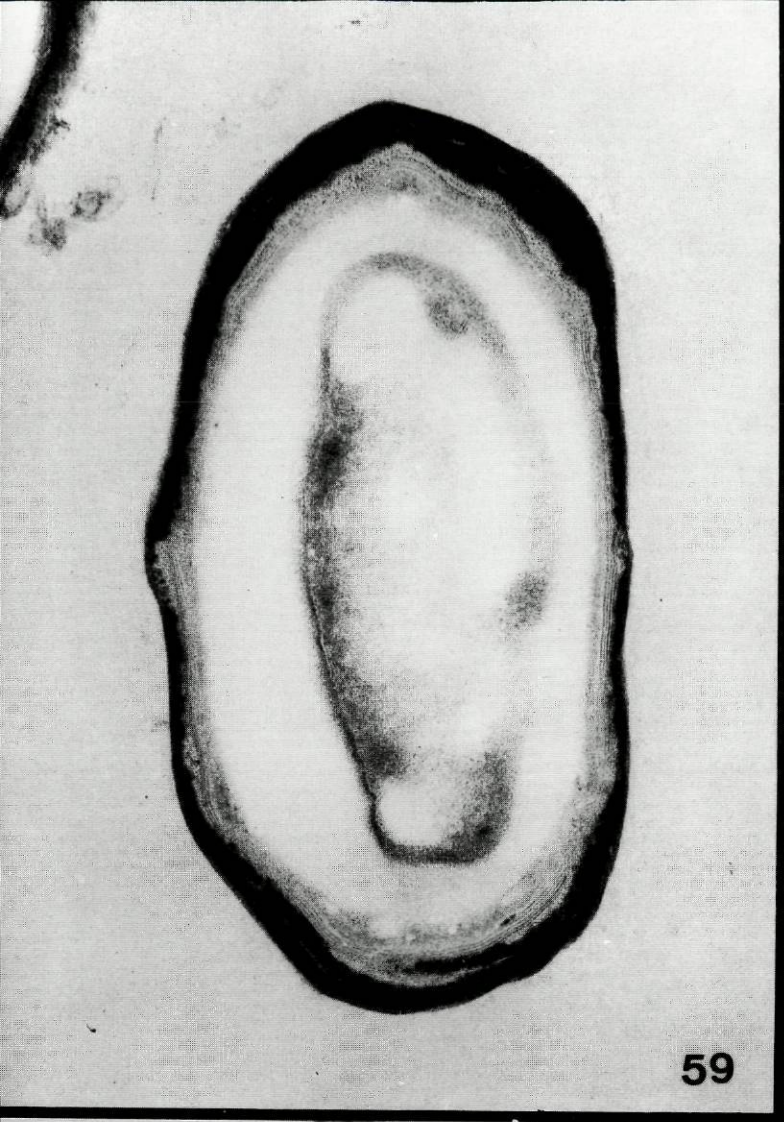
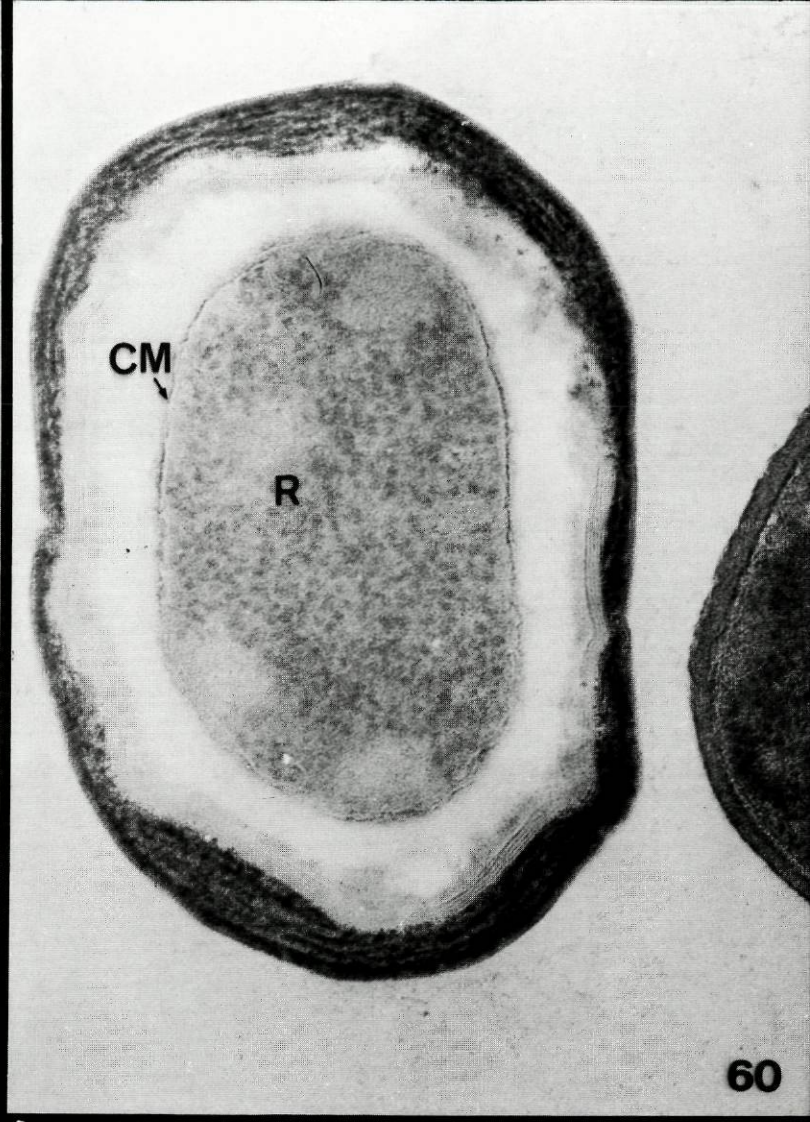



Fig. 58 - Cinética do desenvolvimento morfológico da mutante CB22 ($t_0 - t_{24}$).
Para comparação utilizámos os dados da Fig. 28, referentes à estirpe selvagem 168.



59




60



61



62

Cortes ultrafinos de esporos colhidos em $t_{20}$:

Fig.59 - Esporo de PM9 sem DPA. O citoplasma esporal apresenta um aspecto difuso, não sendo visíveis os ribossomas e a membrana citoplasmática. 78.000 X.

Fig.60 - Esporo de AB12 sem DPA. Os ribossomas (R) e a membrana citoplasmática (CM) estão visíveis. 100.000 X.

Fig.61 - Esporo de AB12 com DPA (50 µg/ml, adicionada em $t_{1.5}$). O citoplasma esporal apresenta um aspecto difuso, não sendo visíveis os ribossomas (R) e a membrana citoplasmática (CM). 98.000 X.

Fig.62 - Esporo de AB12 com DPA (50 µg/ml, adicionado em $t_{1.5}$). Os ribossomas são visíveis, embora não apresentem a nitidez observada na Fig. 60. 80.000X.

observados: i - esporos com as estruturas descritas visíveis (como Fig. 60); ii - esporos com as estruturas descritas completamente invisíveis (Fig. 61); iii - esporos com perfil morfológico intermédio (Fig. 62). A quantificação das células nestas três fases está indicada no Quadro 19.

**QUADRO 19** — **PERFIL MORFOLÓGICO DOS ESPOROS DPA⁻**

| ESTIRPE | ADIÇÃO DPA | % DE ESPOROS COM MEMBRANA + RIBOSSOMAS | | |
|---|---|---|---|---|
| | | VISÍVEIS | INTERMÉDIO | INVISÍVEIS |
| AB12 | - | 92 | 8 | 0 |
| | $t_{1,5}$ | 31 | 50 | 19 |
| | $t_{7,5}$ | 18 | 60 | 22 |
| PM9 | - | 0 | 0 | 100 |

A % foi avaliada em relação ao número de células em esporulação. Em cada ensaio foram contados 60-200 esporos. DPA foi adicionado às culturas, nos tempos indicados, na concentração de 100 µg/ml.

## 3. INCORPORAÇÃO DE DPA NOS ESPOROS DPA⁻

3.1. O teor em DPA dos esporos das estirpes DPA⁻ é aproximadamente 1/10 do observado nos esporos normais (Quadro 20). DPA exógeno adicionado às culturas em esporulação das estirpes DPA⁻ é incorporado e leva à produção de esporos com quantidades qua-

se normais de DPA, enquanto que o teor em DPA dos esporos normais não é influenciado por essa adição (Quadro 21).

**QUADRO 20**

**TEOR EM DPA**

| ESTIRPE | DPA (µg/ml) |
|---|---|
| AB12 | 3 |
| CB22 | 4 |
| 168 | 40 |
| PM9 | 31 |

Ensaios realizados em 1 ml da cultura esporulativa, colhida em $t_{20}$.

**QUADRO 21 INCORPORAÇÃO DE DPA NOS ESPOROS**

| ESTIRPE | DPA (µg/ml) (CULTURA) | DPA (µg/ml) (ESPOROS) |
|---|---|---|
| CB22 | 0<br>50 | 3<br>18 |
| AB12 | 0<br>50 | 3<br>31 |
| PM9 | 0<br>50 | 31<br>33 |

DPA foi adicionado às culturas, durante a fase exponencial e os esporos foram colhidos em $t_{20}$.

3.2. Após a incorporação de DPA, os esporos $DPA^-$ comportam-se como esporos normais e adquirem, portanto, as resistências posteriores à resistência ao clorofórmio com maior frequência (Quadro 22), e sobrevivem à incubação a 80°C, durante 10-120 minutos, ou a 90°C, durante 10-30minutos (Quadro 23).

3.3. A incorporação de DPA em esporos $DPA^-$ varia linearmente com a concentração de DPA exógeno no meio de cultura até atingir a saturação quando a concentração daquele atinge 50 µg/ml (Fig 63).

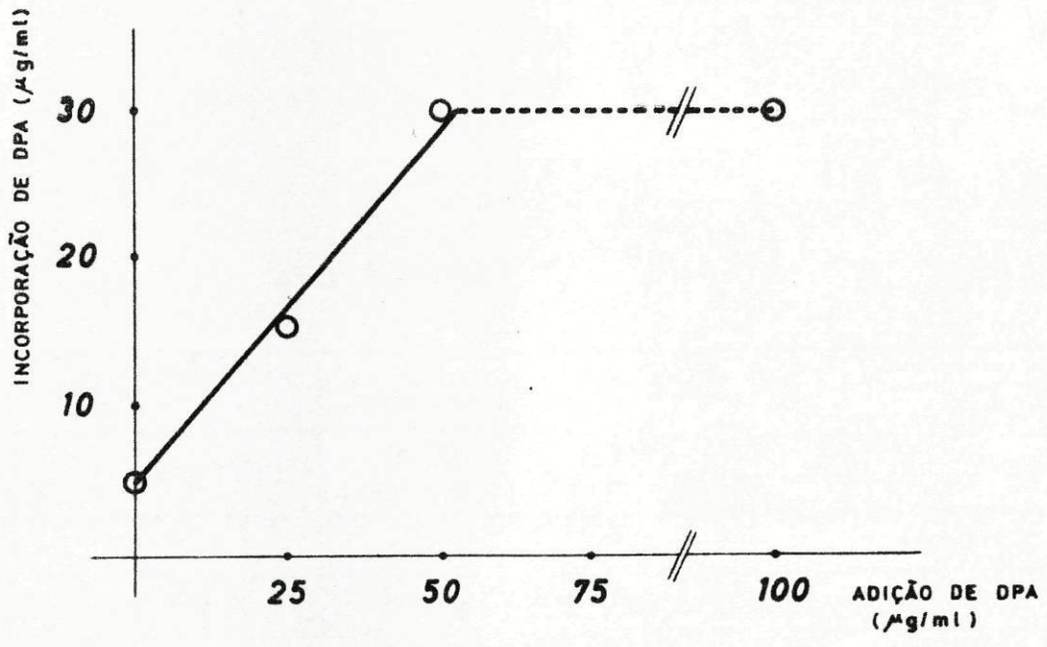



Fig. 63- Teor de incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$, após adição de DPA ao meio de cultura líquido esporulativo, em $t_1$. As dosagens de DPA nos esporos foram feitas em $t_{20}$.

**QUADRO 22** — EFEITO DO DPA NAS RESISTÊNCIAS DE AQUISIÇÃO TARDIA

| AGENTE | ESTIRPE CB22 | | ESTIRPE AB12 | |
|---|---|---|---|---|
| | CULTURA SEM DPA | CULTURA COM DPA | CULTURA SEM DPA | CULTURA COM DPA |
| CLOROFÓRMIO | $1.10^8$ | $3.10^8$ | $1.10^8$ | $6.10^8$ |
| PIRIDINA | $3.10^7$ | $2.10^8$ | $5.10^7$ | $5.10^8$ |
| FENOL | $2.10^7$ | $2.10^8$ | $2.10^7$ | $3.10^8$ |
| TCA | $2.10^6$ | $3.10^8$ | $6.10^5$ | $3.10^8$ |
| AQUECIMENTO (80°C/10') | $6.10^7$ | $2.10^8$ | $1,5.10^7$ | $4.10^8$ |

DPA (50 µg/ml) foi adicionado às culturas, durante a fase exponencial. Os esporos foram colhidos em $t_{30}$.

**QUADRO 23** — $TERMO^R$ DOS ESPOROS $DPA^-$ APÓS ADIÇÃO DE DPA

| TEMPERATURA | CB22 | AB12 | PM9 | |
|---|---|---|---|---|
| | DPA (50µg/ml) | DPA (50µg/ml) | SEM DPA | DPA (50µg/ml) |
| 80°C/10' | $2.10^8$ | $4.10^8$ | $1.10^9$ | $1.10^9$ |
| 80°C/60' | $3.10^8$ | $6.10^8$ | $1.10^9$ | $1.10^9$ |
| 80°C/120' | $3.10^8$ | $3.10^8$ | $1.10^9$ | $1.10^9$ |
| 90°C/10' | $2.10^8$ | $3.10^8$ | $2.10^8$ | N.D. |
| 90°C/30' | $3.10^8$ | $3.10^8$ | N.D. | N.D. |

DPA (50 µg/ml) foi adicionado às culturas durante a fase exponencial. Os esporos foram colhidos em $t_{20}$.

A termo-resistência destes esporos nessas condições (i.e., o número de células termo-resistentes na população), é também função linear da concentração do DPA exógeno, atingindo, no entanto, a saturação para valores muito inferiores deste último (Fig.64).

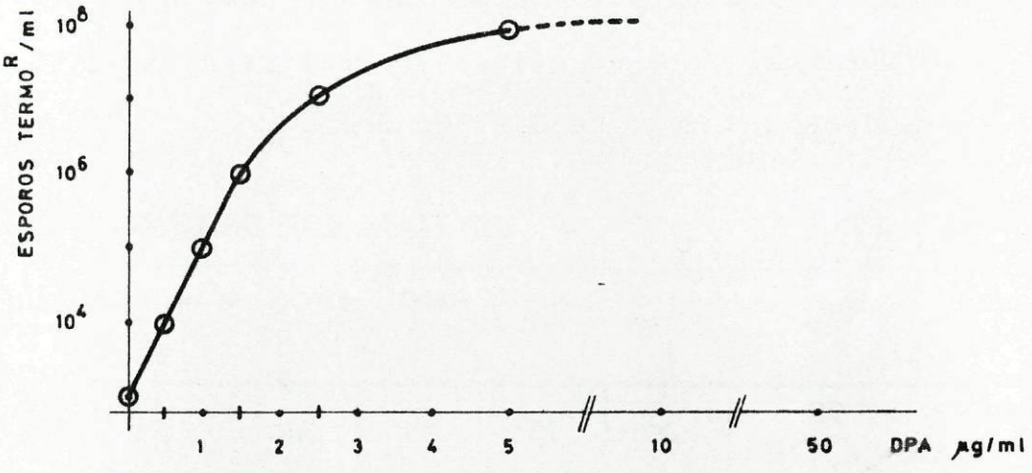



Fig. 64 - Correlação entre a Termo$^R$ dos esporos DPA$^-$ e a adição exógena de DPA. O DPA foi adicionado às culturas em $t_2$ e a Termo$^R$ foi avaliada em $t_{20}$.

3.4. DPA exógeno adicionado entre $t_o$ e $t_6$ é incorporado em quantidades normais pelos esporos e permite-lhes tornarem-se termo-resistentes, provando que não há um período de tempo limitado para esta incorporação (Quadro 24).

**QUADRO 24** — **INCORPORAÇÃO DE DPA NOS ESPOROS DPA$^-$ (EM TEMPOS DIFERENTES)**

| | S/ DPA | DPA ADICIONADO EM: | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | $t_0$ | $t_2$ | $t_4$ | $t_6$ | $t_{20}$ |
| DPA INCORPORADO (µg/ml) | - | 27 | 32 | 25 | 26 | 19 |
| Nº ESPOROS TERMO$^R$/ml | $2.10^4$ | $2,2.10^8$ | $1,7.10^8$ | $1,9.10^8$ | $2,4.10^8$ | $1,2.10^8$ |

DPA (250 µg/ml) foi adicionado às culturas nos tempos indicados e a Termo$^R$ foi avaliada em $t_{20}$.

Se o DPA é adicionado em $t_{20}$ (longo tempo após a formação do esporo), todos os esporos se tornam Termo$^R$ e o seu conteúdo em DPA atinge 50-65% dos valores dos esporos normais. Isto permite seguir a incorporação de DPA de uma maneira indirecta, pela determinação do número de esporos Termo$^R$ após a adição de DPA. A incorporação de DPA é lenta e só atinge valores significativos cerca de 10 horas após a adição de DPA (Quadro 25).

**QUADRO 25** — **CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO DA TERMO$^R$ APÓS A ADIÇÃO DE DPA**

| TEMPO APÓS ADIÇÃO DE DPA | 0' | 15' | 45' | 100' | 2.5 h | 5 h | 10 h |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Nº ESPOROS TERMO$^R$ /ml | $8.10^5$ | $7.10^6$ | $7.10^6$ | $1.10^7$ | $1.10^7$ | $2.10^7$ | $2.10^8$ |

DPA (100 µg/ml) foi adicionado, em $t_{20}$, às culturas de AB12.

## 4. CONDIÇÕES DE INCORPORAÇÃO DE DPA NOS ESPOROS DPA$^-$

A incorporação de DPA é dependente da temperatura de incubação (Quadro 26), é inibida pelo KCN e pelo clorofórmio, mas não o é pelo cloranfenicol (Quadro 27 ). Uma vez que a síntese proteica no pré-esporo é inibida pelo cloranfenicol até à maturação do esporo (19), estes resultados sugerem que a incorporação de DPA é um processo activo, requerendo energia, mas não síntese proteica. A presença de catiões $Ca^{++}$, $Fe^{++}$ ou $Mn^{++}$ não é necessária para a

incorporação do DPA (Quadro 28). Células em esporulação excretam DPA (260), e, como era de esperar, a estirpe CB22, quando co-cultivada com a estirpe 168, desenvolve Termo$^R$ (Quadro 29).

**QUADRO 26** EFEITO DA TEMPERATURA NA INCORPORAÇÃO DE DPA

| DPA INCORPORADO | CONDIÇÕES INCUBAÇÃO | ESPOROS TERMO$^R$/ml |
|---|---|---|
| - | 37°C | $2.10^5$ |
| 50µg/ml | 37°C | $2,6.10^8$ |
| | 4°C | $1,6.10^5$ |

Adição de DPA às culturas de CB22 em $t_6$. Após 14 h de incubação foram avaliadas o número de células Termo$^R$.

**QUADRO 27** INIBIÇÃO DA INCORPORAÇÃO DE DPA

| ADIÇÕES | ESPOROS TERMO$^R$/ml |
|---|---|
| - | $2.10^5$ |
| DPA | $2,6.10^8$ |
| DPA+CLORANFENICOL | $1,3.10^8$ |
| DPA+CLOROFÓRMIO | $4,5.10^3$ |
| DPA+KCN | $2.10^5$ |

Em $t_6$, às culturas de CB22, adicionou-se: DPA (50 µg/ml), cloranfenicol (100 µg/ml) e clorofórmio (saturação). Às culturas de AB12 ($t_{7,5}$), adicionou-se KCN ($10^{-2}$). O número de esporos Termo$^R$ foi determinado em $t_{20}$.

**QUADRO 28** — EFEITO DOS SAIS MINERAIS NA INCORPORAÇÃO DE DPA

| ESPOROS COLHIDOS EM | TEMPO INCUBAÇÃO | ESPOROS TERMO$^R$/ml APÓS ADIÇÃO DE: | | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | - | DPA | DPA+$Ca^{++}$ | DPA+$Ca^{++}$+$Fe^{++}$+$Mn^{++}$ |
| $t_{20}$ | 4 h | $7.10^5$ | $3.10^7$ | $5.10^7$ | $7.10^7$ |
| $t_7$ | 13 h | $3.10^5$ | $1,2.10^8$ | $1.10^8$ | $1.10^8$ |

Os esporos foram ressuspensos em tampão Tris 0,05 M pH 8,0 e o DPA (100 µg/ml) foi adicionado às culturas de AB12. A incubação foi feita a 37ºC em presença de $Ca^{++}$ ($CaCl_2 10^{-2}$ M) ou na mistura $Ca^{++}$ ($CaCl_2 10^{-2}$ M), $Fe^{++}$ ($FeCl_2$ $10^{-5}$ M) e $Mn^{++}$ ($MnCl_2 10^{-4}$ M).

QUADRO 29 — ESPORULAÇÃO DE CB22 EM CULTURAS MISTAS

| PROPORÇÃO DE CÉLULAS DE CB22 (CULTURAS INICIAIS) | 1,0 | 0,9 | 0,8 | 0,5 | 0,2 | 0,1 |
|---|---|---|---|---|---|---|
| % CÉLULAS VIÁVEIS DE CB22 EM $t_{20}$ | 100 | 86 | 78 | 57 | 17 | 8 |
| Nº CÉLULAS VIÁVEIS DE CB22 /ml EM $t_{20}$ | N.D. | $1.10^9$ | $1,2.10^9$ | $6.10^8$ | $1,7.10^8$ | $1.10^8$ |
| Nº ESPOROS DE CB22 $TERMO^R$/ml EM $t_{20}$ | $2.10^4$ | $3.10^7$ | $1,1.10^7$ | $6,5.10^7$ | $1,3.10^8$ | $1,2.10^8$ |

Culturas exponenciais de CB22 e 168 foram misturadas nas proporções indicadas. O número de células viáveis e $Termo^R$ foram determinadas em $t_{20}$ (como critério de contagem usou-se a ausência de pigmentação das colónias). Nas culturas mistas mais de 50% das células da estirpe selvagem 168 são $Termo^R$:

# MUTANTES DECADENTES

## D - ESTUDO DA ESPORULAÇÃO DAS MUTANTES DECADENTES

Têm sido isoladas numerosas mutantes do Bacillus subtilis bloqueadas nas diferentes fases esporulativas. Para uma dada população, considera-se que há bloqueio numa fase quando a maioria das células atinge, mas não ultrapassa, essa fase. Esta definição não é, obviamente, absoluta porque, tal como uma população de células de tipo selvagem em esporulação, uma população dessas mutantes é heterogénea, incluindo células simultaneamente em diferentes fases morfológicas. Assim, quando há bloqueio numa fase são muito pouco frequentes as células em fases mais tardias (21,244).

Dentre estas mutantes, foram particularmente estudadas aquelas em que o bloqueio se situa antes das fases tardias, isto é, populações em que são pouco frequentes as células nestas fases (27). Isto foi tentativamente explicado como a consequência de uma activação genética atenuada, em que as células teriam dificuldade em atingir as fases tardias da esporulação. Com a finalidade de explicar melhor o comportamento destas mutantes (inicialmente chamadas "mutantes atenuadas" (23)), procedemos à sua caracterização fenotípica. Na sequência deste estudo passamos a designá-las de "mutantes decadentes" (25).

### 1. CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA DAS MUTANTES DECADENTES

1.1. Espectro das resistências aos solventes e aquecimento - Nas células que esporulam normalmente, o tratamento de amostras sequenciais, de culturas em esporulação, com os diversos agentes

permite-nos avaliar o número de células que atingiram uma dada fase esporulativa. Células de nove estirpes mutantes "decadentes", colhidas em $t_{24}$, foram tratadas com solventes orgânicos e pelo calor e o número de células viáveis foi determinado (conforme descrito em Material e Métodos).

Após os vários tratamentos verifica-se que o número de células viáveis varia com cada tratamento, sendo progressivamente menor quanto mais tardia é a fase em que, numa estirpe selvagem, surge a resistência ao agente utilizado (Figura 65). Mais precisamente, esta variação obedece a uma relação aproximadamente exponencial, o que justifica a designação de decadência e de mutantes "decadentes". A decadência é muito acentuada na mutante SE12, não havendo células $OCT^R$ e é bastante atenuada na mutante SE11 (Fig. 65). Nas mutantes DB16 e FD10 observa-se uma decadência acentuada entre a $OCT^R$ e a $CLOR^R$ (Fig. 65). Como entre a $OCT^R$ e a $CLOR^R$ as células com esporulação normal adquirem, progressivamente, resistências a outros agentes, procedemos também à caracterização fenotípica, pormenorizada da mutante DB16 com estes outros compostos (Quadro 30). Estes resultados confirmam a sequência de aquisição das resistências descritas para as estirpes selvagens.

1.2. Teor em DPA - Nas mutantes "decadentes" poucas células atingem a Termo $^R$. Dada a correlação entre estas resistências e a síntese de DPA, determinámos o seu teor em células destas mutantes, em esporulação. Células de DB16 e FE9 colhidas em $t_{24}$, contêm, respectivamente, 8 e 6 µg/ml, o que é bastante inferior ao teor das estirpes selvagens (40 µg/ml). A adição exógena de DPA, nas con-

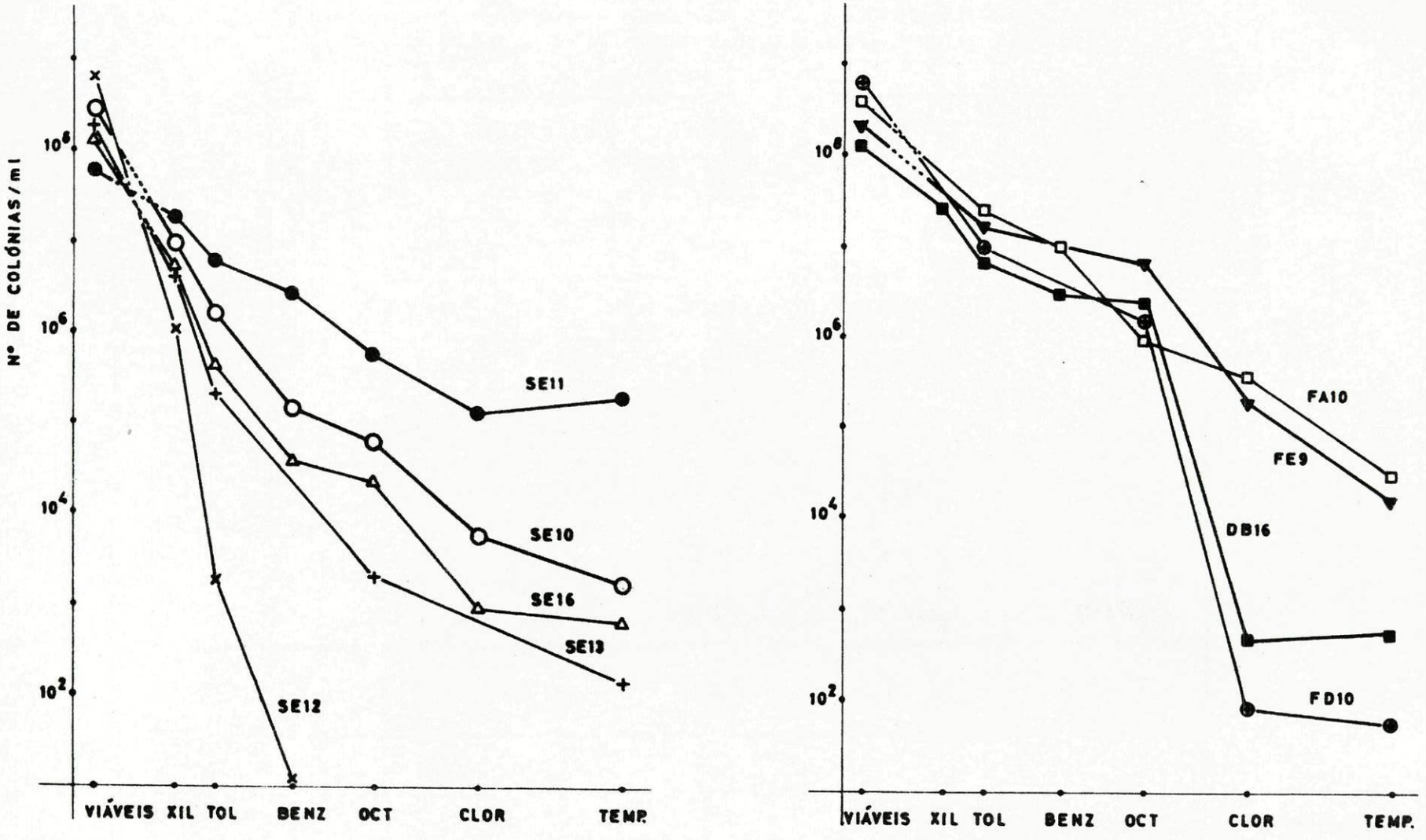



Fig. 65 - Espectro das resistências das estirpes decadentes. Culturas em $t_{24}$ foram ensaiadas com XIL, TOL, BENZ, OCT, CLOR e aquecidas a 80°C/10'. As distâncias nas abcissas entre os agentes são proporcionais ao tempo da aquisição das resistências na estirpe 168.

QUADRO 30

# ESPECTRO DA AQUISIÇÃO DAS RESISTÊNCIAS DA MUTANTE DB16

| TRATAMENTO | EXP. 1 | EXP. 2 | EXP. 3 |
|---|---|---|---|
| OCTANOL | $2,9.10^7$ | $4.10^6$ | $5.10^6$ |
| BUTANOL | $3,6.10^6$ | $1,5.10^5$ | $2,4.10^6$ |
| METANOL | $3,7.10^5$ | $7.10^3$ | $3.10^4$ |
| ETANOL | $3,2.10^5$ | $7.10^3$ | $3.10^4$ |
| ACETONA | $4.10^5$ | $8,5.10^3$ | $1.10^4$ |
| DIOXANO | $7,5.10^4$ | $2,5.10^3$ | $4.10^3$ |
| CLOROFÓRMIO | $6,3.10^4$ | $5.10^2$ | $4.10^2$ |
| TCA | $5,2.10^4$ | N. D. | $3.10^2$ |
| AQUEC. (80°C/10') | $2.10^3$ | $6.10^2$ | $6.10^2$ |

Amostras colhidas em $t_{24}$ foram tratadas pelos agentes referidos. Os resultados indicam o número de células viáveis/ml após os tratamentos. N.D.-ensaio não determinado.

condições descritas para as mutantes DPA$^-$, às culturas das mutantes "decadentes", não modifica as suas características fenotípicas.

1.3. Produção de proteases extracelulares - A actividade proteolítica dos sobrenadantes das culturas de DB16 e FD10, colhidas em $t_{24}$, atingem valores equivalentes aos da estirpe selvagem, observando-se, no entanto, um teor mais elevado para a mutante FE9 (Quadro 31).

**QUADRO 31** **PRODUÇÃO DE PROTEASES**

| ESTIRPE | ACTIVIDADE PROTEÁSICA (unid./ml) |
|---|---|
| DB16 | 0,10 |
| FD10 | 0,13 |
| FE9 | 0,20 |
| 168 | 0,10 |

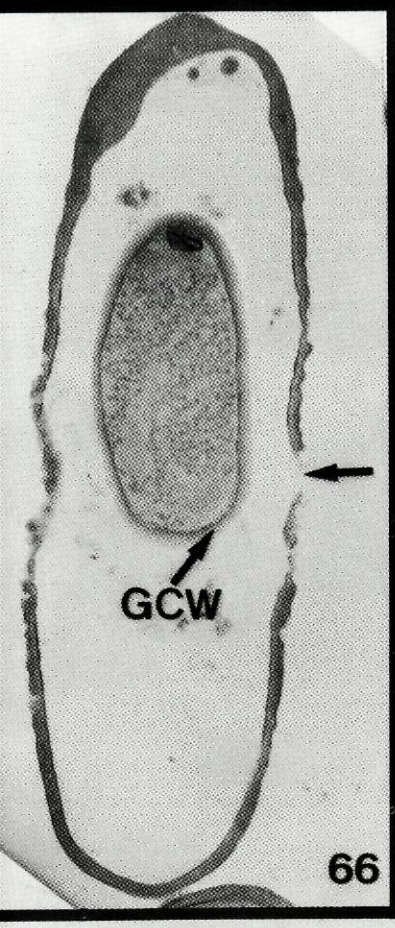
1.4. Caracterização morfológica - As células nas diferentes fases morfológicas foram quantificadas em amostras de $t_6$, $t_{10}$ e $t_{24}$, em culturas de 4 destas mutantes (Quadro 32). Com culturas do Bacillus subtilis 168, apesar do assincronismo da esporulação, aparece, em $t_6$, uma percentagem elevada de células na fase VI, enquanto, por exemplo, culturas de DB16 e FD10 não atingem esta fase e as células estão distribuídas por todas as fases anteriores. Em $t_6$ a maioria das células de DB16 estão na fase III, apresentando o pré-esporo uma parede celular germinativa espessa, en-

quanto o esporângio mostra sinais de lise (Fig.66); em $t_{10}$ somente 37% das células atingiram a fase IV e 15% a fase V. A fase V é anormal, apresentando as células, córtex e túnicas formadas incompletamente (Fig. 67). Células de FD10 apresentam as mesmas características morfológicas. Nas estirpes FA10 e FE9 uma fracção considerável de células atinge as fases mais tardias e em $t_{24}$ a maioria das células encontram-se nas fases V e VI (Quadro 32). Os ribossomas do citoplasma esporal são visualizáveis, conforme foi descrito nas estirpes $DPA^-$ (Figs. 68,69,70). Cerca de 70% das células de FA10 na fase V, colhidas em $t_{24}$, não possuem córtex. Nunca foram observados esporos livres nestas estirpes mutantes.

**QUADRO 32** **FREQUÊNCIA DAS FASES MORFOLÓGICAS**

| ESTIRPE | T | % DE CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO | II | III | IV | V | VI |
|---|---|---|---|---|---|---|---|
| DB16 | $t_6$ | 33 | 3 | 84 | 13 | - | - |
| | $t_{10}$ | 30 | 7 | 41 | 37 | 15 | - |
| FA10 | $t_{24}$ | 69 | 1 | 8 | 3 | 58 | 30 |
| FD10 | $t_6$ | 44 | 1 | 62 | 35 | 2 | - |
| FE9 | $t_{24}$ | 74 | 2 | 6 | 4 | 57 | 31 |
| 168 | $t_6$ | 99 | - | 1 | 3 | 27 | 68 |
| | $t_{20}$ | 92 | - | - | 1 | 2 | 94 |

A % de células nas diferentes fases esporulativas foram calculadas em relação ao número total de células em esporulação. Os resultados da Fase VI incluem também o número de esporos livres.



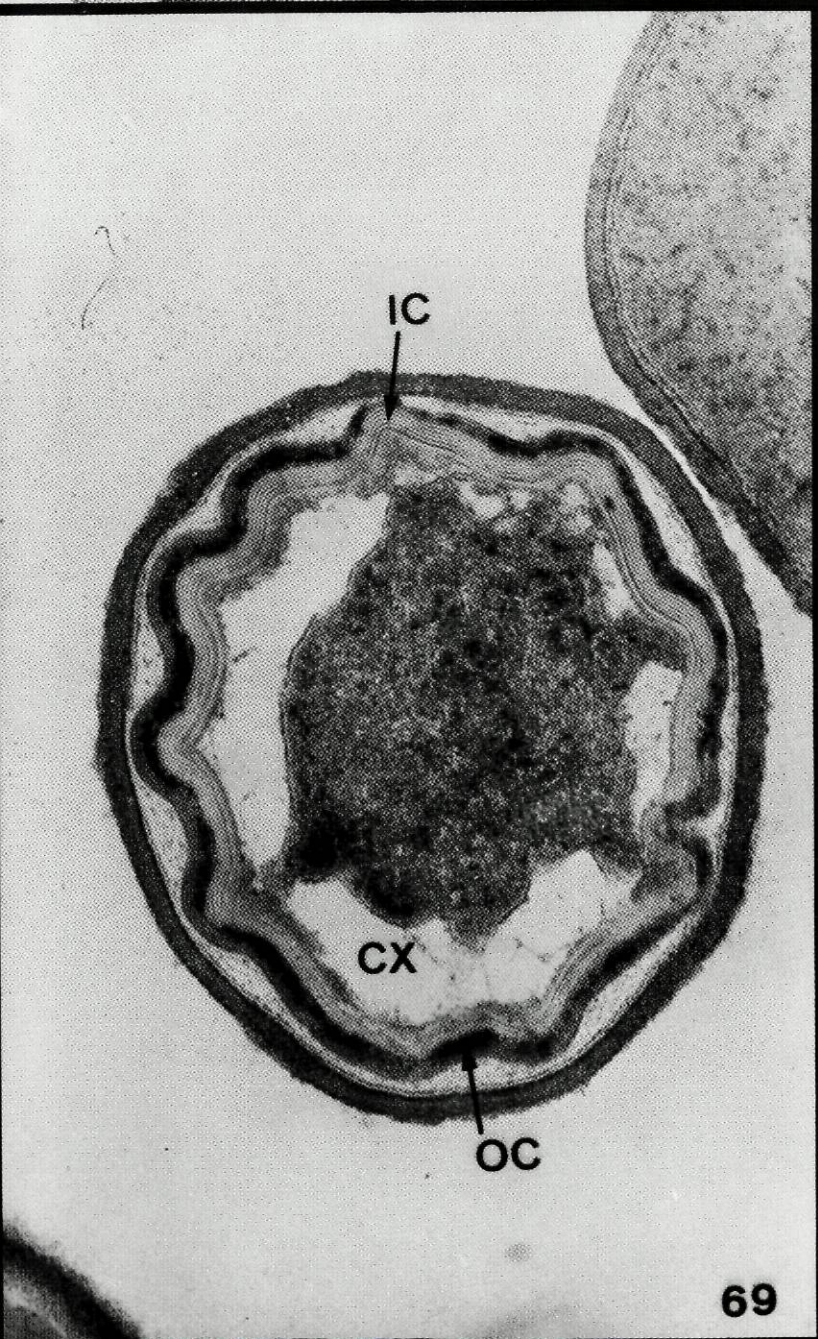

66



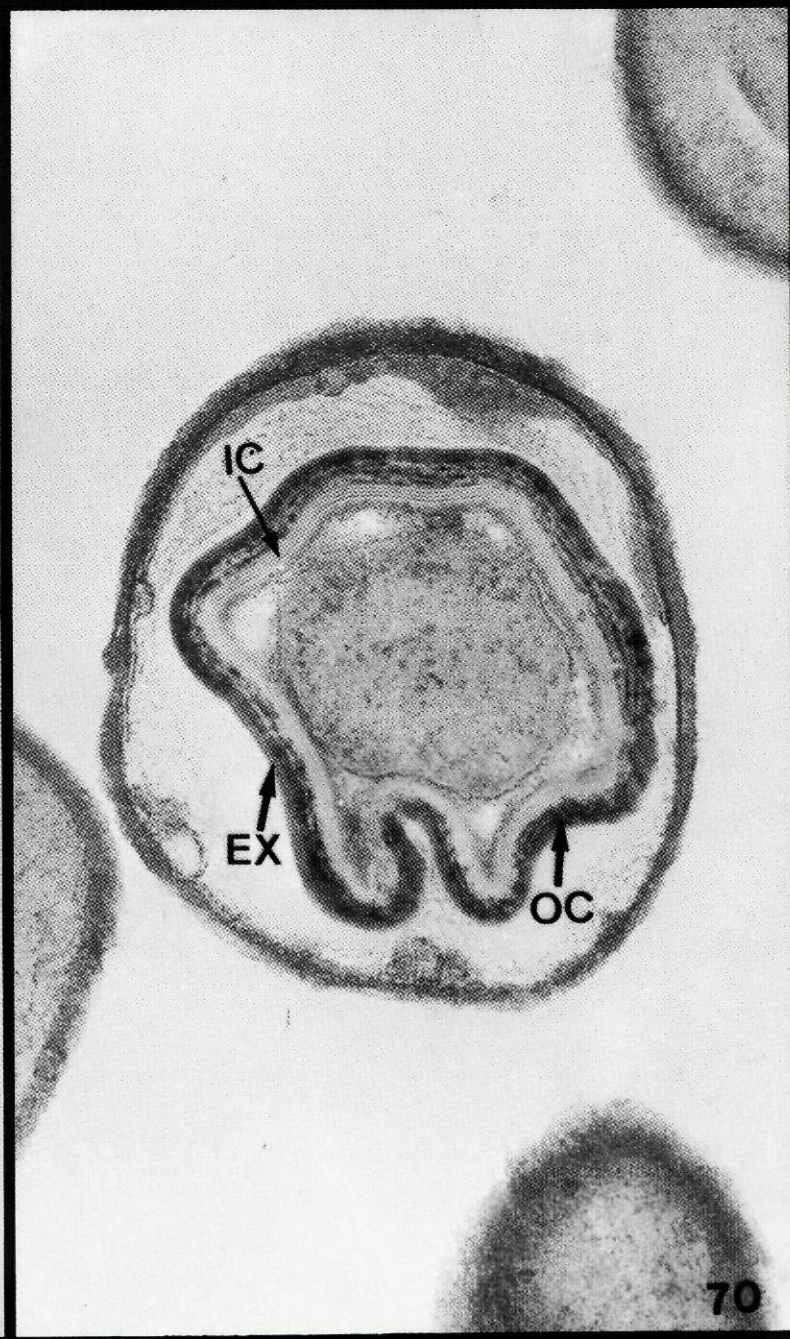
67



68




69




70

Fig.66 - Célula de DB16 na fase III. Notar a espessura da parede celular germinativa (GCW), a lise do esporângio e a ruptura da parede celular do esporângio (seta). 44.000X.

Fig.67 - Célula de DB16 na fase V recente, com córtex e túnicas esporais incompletamente formadas. 50.000X.

Fig.68 - Célula de FE9 na fase V. Notar a presença das túnicas com o córtex incompletamente formado. 66.000X.

Figs.69,70 - Células de FE9 na fase V-VI. O córtex parece lisado ou imaturo e o citoplasma esporal aparente os ribossomas visíveis. Fig. 69:112.000X; Fig. 70: 95.000X.

QUADRO 33

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE DB16

| T | N° TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO N° | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_3$ | 307 | 23 | 7,5 | 14 | 4,6 | 9 | 2,9 | | | | | | |
| $t_4$ | 316 | 86 | 27,2 | 37 | 11,7 | 48 | 15,2 | 1 | 0,3 | | | | |
| $t_5$ | 258 | 98 | 38, | 29 | 11,2 | 60 | 23,3 | 9 | 3,5 | | | | |
| $t_6$ | 236 | 77 | 32,6 | 2 | 0,8 | 65 | 27,5 | 10 | 4,2 | | | | |
| $t_7$ | 170 | 63 | 37,1 | | | 51 | 30, | 10 | 5,9 | 2 | 1,2 | | |
| $t_8$ | 238 | 89 | 37,4 | 4 | 1,7 | 62 | 26,1 | 21 | 8,8 | 2 | 0,8 | | |
| $t_9$ | 239 | 91 | 38,1 | 2 | 0,8 | 57 | 23,8 | 21 | 8,8 | 11 | 4,6 | | |
| $t_{10}$ | 249 | 75 | 30,1 | 5 | 2, | 31 | 12,4 | 28 | 11,2 | 11 | 4,4 | | |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.

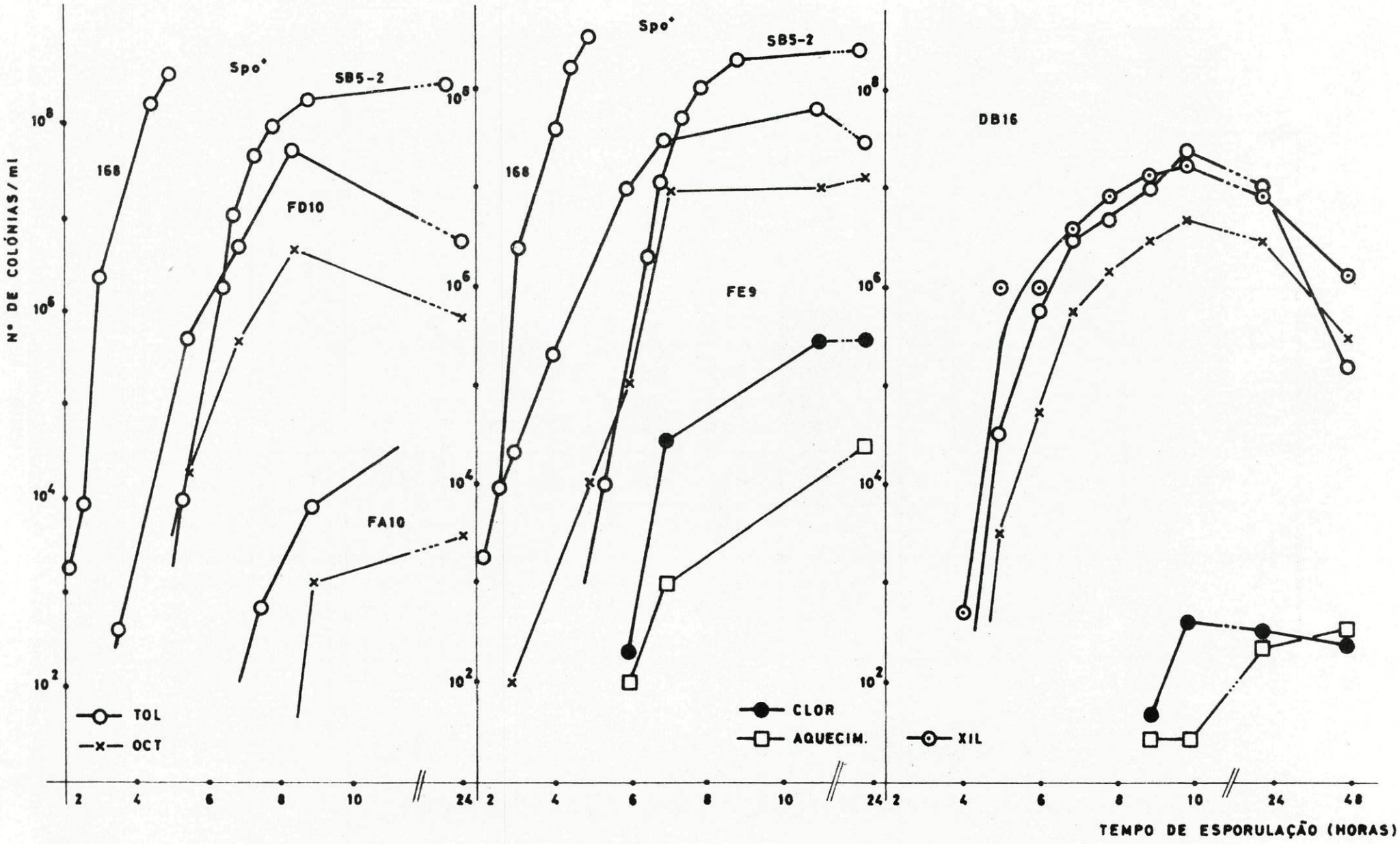



Fig.71- Desenvolvimento da aquisição das resistências nas estirpes DB16, FA10, FD10 e FE9. Para controle são referidas na Figura as estirpes selvagens 168 e SB5-2.

1.5. Cinética do desenvolvimento esporulativo nas mutantes "decadentes"- A sequência de aparecimento das resistências aos agentes descritos anteriormente foi estudada em culturas esporulativas de DB16, FA10, FD10 e FE9 (Fig. 71).

A morfogénese esporulativa da estirpe mutante DB16 foi também seguida quantitativamente por microscopia electrónica (Fig.72).

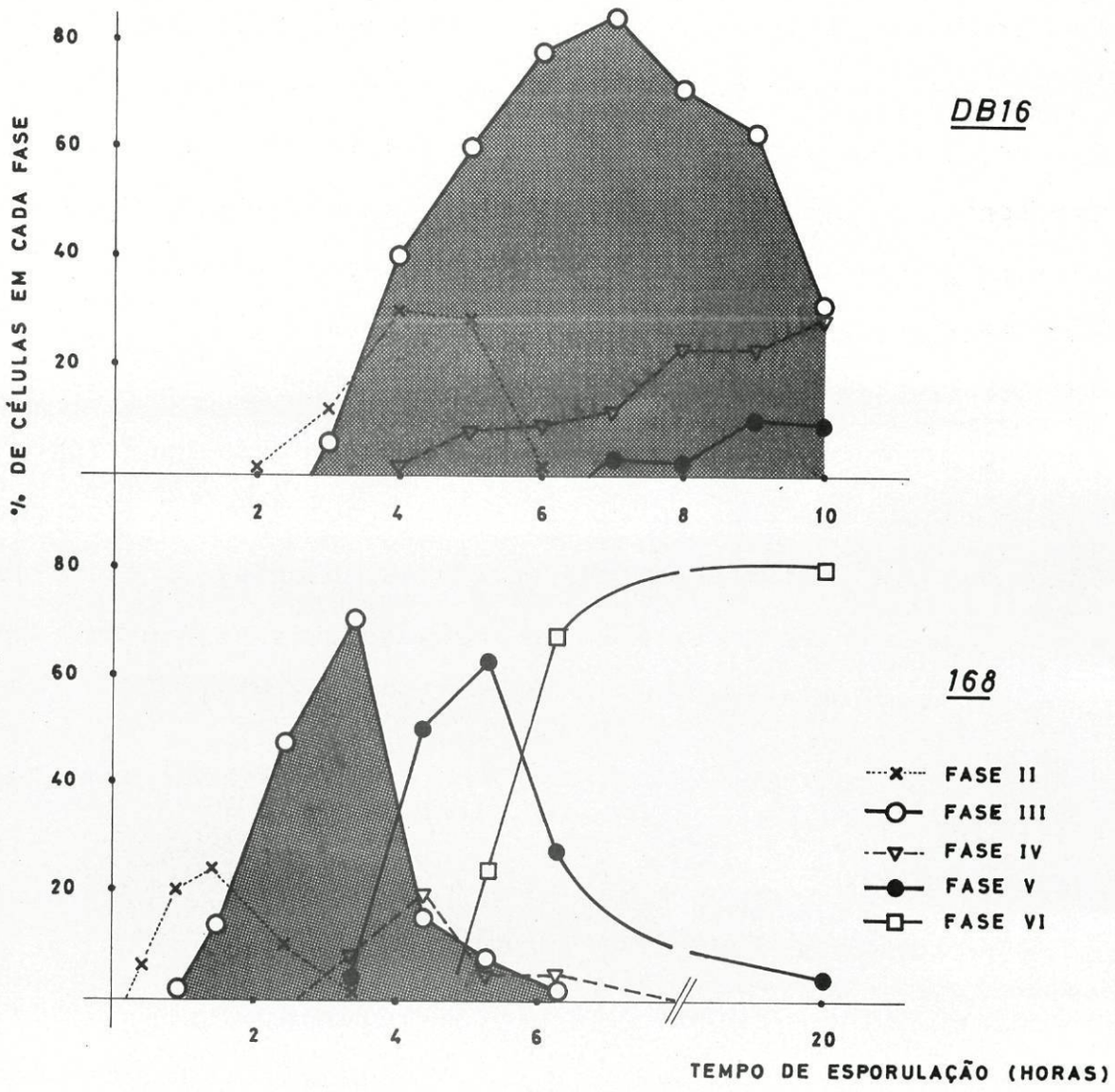



Fig. 72 - Cinética do desenvolvimento morfológico da mutante DB16, Os valores correspondentes às % de células nas diferentes fases estão indicados no Quadro 33.

A análise dos resultados deste estudo mostra que os tempos de predomínio de uma dada fase são mais tardios do que os da estirpe selvagem. Assim, as células de DB16 na fase III acumulam-se entre $t_3$ e $t_{10}$, com um pico de frequência em $t_7$; as células na fase IV surgem entre $t_4$ e $t_{10}$, enquanto que as células na fase V só surgem a partir de $t_7$. Por outro lado, a fracção máxima de células em cada fase diminui das fases iniciais para as tardias, indicando que durante a sequência esporulativa diminui o número de células capaz de passar de uma fase para a seguinte. Em conclusão, e relativamente à estirpe selvagem 168, a estirpe DB16 apresenta: i - atraso no aparecimento das fases morfológicas e ii - progressiva dificuldade na transposição dessas fases.

Dado que o estudo morfológico das diversas estirpes mutantes "decadentes" revela a coexistência de células em diferentes fases haveria que excluir a hipótese de heterogeneidade genética. De facto, um estudo sistemático da resistência aos agentes descritos, efectuado com culturas obtidas de vários colónias isoladas de mutantes "decadentes", revelou que essas células tinham um comportamento idêntico entre si e ao da estirpe original.

## ESTIRPES Sco

## C. ESTUDO DA ESPORULAÇÃO DAS MUTANTES REGULADORAS PLEIOTRÓPICAS (Mutantes Sco).

Foi descrito um grupo de mutantes do Bacillus subtilis, desreprimidas na produção de elastase (27,333). Uma dessas mutantes, a EV15, além de formar esporos maduros Termo$^R$ com alta frequência, apresenta no citoplasma do esporângio numerosas inclusões. Foi sugerido que estas estruturas poderiam resultar da deposição anárquica das proteínas das túnicas esporais (27,333). Estas características, aliadas a uma produção supranormal de proteases, também observada, levaram-nos a admitir que a mutação em causa afectava os mecanismos reguladores da esporulação.

Essas mutantes, inicialmente designadas de LAD ("late abnormal derepressed")(27 ), com base principal nos dados morfológicos, foram objecto de estudo mais completo, a seguir descrito, que levou a denominá-las de mutantes Sco ("Spore control mutants").

### 1. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS DAS MUTANTES Sco E ESTIRPES DERIVADAS

1.1. Síntese das proteases extracelulares - A actividade global das proteases extracelulares foi medida no sobrenadante das culturas líquidas em esporulação. Embora os valores obtidos variem de estirpe para estirpe, de um modo geral têm uma actividade proteásica muito mais intensa que a das estirpes selvagens (Quadro 34).

A cinética da síntese de proteases também foi estudada nas diversas estirpes Sco. Nas estirpes Sco A1 e Sco12 a produção de proteases é inicialmente do mesmo teor que na estirpe selvagem 168, persistindo depois na mesma taxa, por várias horas, contrariamente ao

que ocorre nas estirpes selvagens (Fig.73).

Nas estirpes ScoC a taxa de produção de proteases é, desde o início, muito superior à da estirpe selvagem (Fig.73 ).

Ensaios de inibição com PMSF, feitos para todas as estirpes, ao longo do processo esporulativo, revelaram que em todos os casos as serilproteases representam cerca de 70% da actividade proteásica global, o que demonstra que todas as estirpes produzem também metaloproteases.

**QUADRO 34** **ACTIVIDADE ENZIMÁTICA DAS ESTIRPES Sco**

| ESTIRPE | GENOTIPO | PROTEASES (1) | α-AMILASES (1) | FOSFATASES ALCALINAS (2) |
|---|---|---|---|---|
| 168 | $Sco^+$ | 0,17 | 31 | 570 |
| EV15 | ScoA1 | 0,36 | 47 | 1510 |
| EC21 | ScoB2 | 0,20 | 52 | 1140 |
| AC33 | ScoC3 | 2,47 | 35 | 1147 |
| AA16 | Sco12 | 1,90 | N. D. | 1035 |
| FA20 | Sco13 | 0,90 | 43 | 327 |

(1) - Actividade enzimática determinada nos sobrenadantes das amostras colhidas em $t_{24}$ ; (2) - actividade medida em $t_7$.

1.2. Síntese de α-amilase - Embora a produção de α-amilase não seja específica da esporulação (21, 255), ela é produzida em quantidades superiores às observadas na estirpe selvagem 168 (Quadro 34).

1.3. Síntese de fosfatases alcalinas - As mutantes Sco (com excepção de FA20) também produzem maior quantidade de fosfatases do que a estirpe selvagem (Quadro 34), provando que as mutações Sco têm efeitos pleiotrópicos.

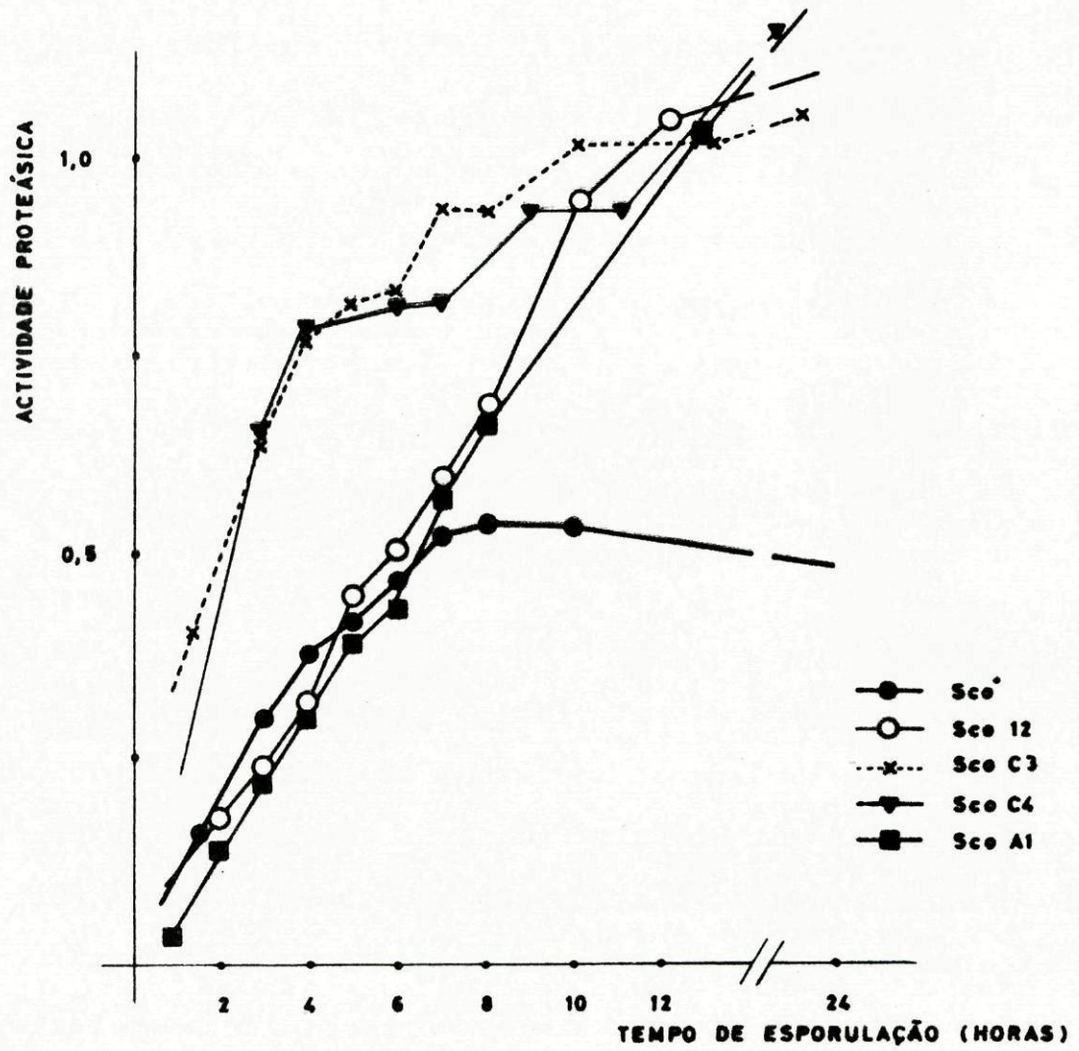



Fig.73- Cinética da actividade proteásica (unidades/ml) da estirpe selvagem 168 e das estirpes ScoA1 (EV15), Sco12 (AA16), ScoC3 (AC33) e ScoC4 (AC31).

1.4. Ultraestrutura das mutantes ScoA1 (EV15) e ScoB2 (EC21) -

1.4.1. Ultraestrutura dos esporos maduros - O citoplasma dos esporos maduros das estirpes Sco apresenta-se mal fixado (Figs. 75, 76), do mesmo modo que o das estirpes selvagens. Em relação à estirpe selvagem, o córtex destas mutantes não apresenta diferenças morfológicas, nem de espessura (Figs.75, 76). Os esporos das mutantes EV15 e EC21 apresentam uma túnica interna com uma espessura de 26 µm, constituída por 4-6 lamelas (Figs.75,76), enquanto que na estirpe selvagem esta túnica é mais delgada (13 µm) e compreende apenas 2-3 lamelas; além disso, nas mutantes as mais periféricas destas lamelas apresentam zonas de descontinuidade (Figs. 76,77), o que não se observa na estirpe selvagem (Fig.74).

Por vezes (tanto em esporos livres, como nos intracelulares) as lamelas da túnica interna estão separadas por material electronodenso estruturalmente semelhante ao da túnica externa (Figuras 76, 79, 82). Noutros casos a túnica interna chega a passar através da túnica externa (Fig.83).

1.4.2. Inclusões - No citoplasma esporangial das estirpes mutantes Sco aparecem vários tipos de estrutura: "spongy material", "onions" e "rods" (Figs.78,80,81,84).Estas inclusões são essencialmente constituídas por material estruturalmente semelhante ao da túnica interna e externa do esporo (Figs.82 - 85). Estas estruturas não aparecem na estirpe selvagem, embora com alguma frequência tenhamos observado "spongy material" nas células em esporulação do Bacillus subtilis 168. Em alguns casos é óbvia a contiguidade entre estas estruturas e o esporo na fase VI (Fig. 83 ). Embora raramente, fo-

Fig. 74 - Células de B. subtilis 168 colhidas em $t_{20}$. A túnica interna (IC) dos esporos é constituído por 2-3 lamelas. 90.000X.

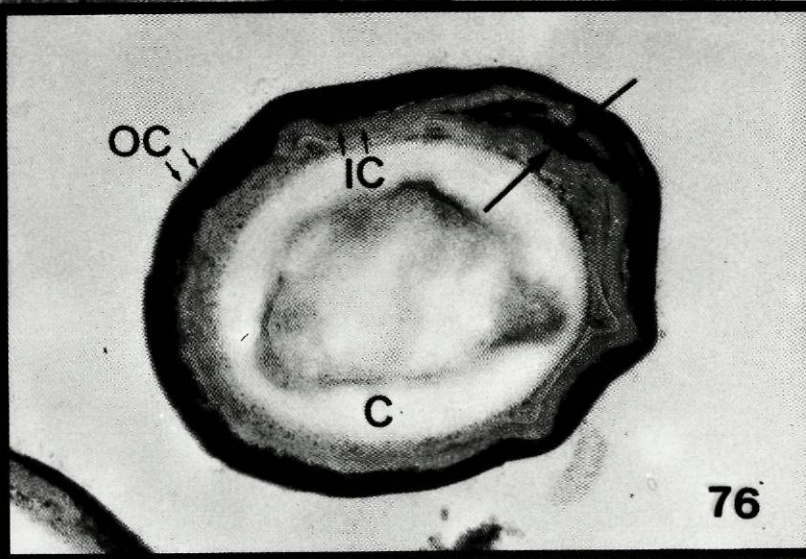
Fig. 75 - Esporo livre da mutante EV15 colhido em $t_{20}$. A túnica interna (IC) é constituída por 5-6 lamelas, sendo as mais externas descontínuas (duplas seta). OC - túnica externa. 154.000X.

Fig. 76 - Esporo livre da mutante EV15 colhido em $t_{20}$. Entre as lamelas da túnica interna (IC) observa-se material electronodenso e morfologicamente semelhante ao da túnica externa (OC). 96.000X.

Fig. 77 - Célula de EV15, colhida em $t_{20}$, com uma inclusão de estrutura complexa. Esta inclusão é constituída por lamelas, análogas às da túnica interna, sendo as mais exteriores descontínuas (seta). 253.000X.

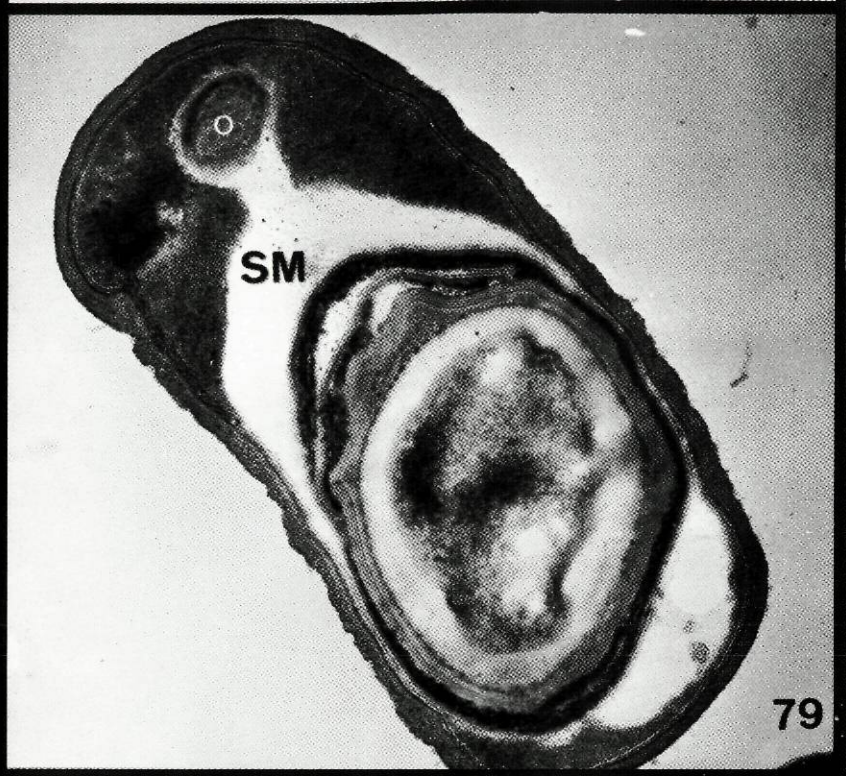

IC
74


OC
IC
75


OC
IC
C
76


77


78



79


80


81



82



83

Fig. 78 - Célula de EV15 colhida em $t_{24}$. Presença de inclusões no citoplasma da célula, com aparente ausência de esporo organizado. 77.000X.

Fig. 79 - Célula de EC21, na fase VI. No citoplasma esporangial observa-se a presença de "spongy material" (SM) e uma inclusão tipo "onion" (O). 77.000X.

Fig. 80 - Célula de EV15 colhida em $t_{24}$. Ausência de esporo organizado, notando-se, no entanto, numerosas inclusões no citoplasma da célula. 98.000X.

Fig. 81 - Célula de EC21, na fase V, com túnicas irregulares e inclusões complexas no citoplasma esporangial. 74.000X.

Fig. 82 - Célula da mutante EC21 colhida em $t_{12}$. O esporângio apresenta "onions" (O) constituídos por material estruturalmente semelhante ao que constitui as túnicas interna e externa. 73.000X.

Fig. 83.- Célula de EV15 colhida em $t_{20}$. O esporângio, contem "rods" (Ro) formados por material semelhante ao da túnica interna (IC) e "onion" (O) constituídos essencialmente por material tipo túnica externa (OC) 90.000X.

Fig.84 - Célula de EV15 na fase VI. O esporângio apresenta numerosas inclusões: SM -"spongy material"; O - "onions" e Ro - "rods". 80.000X.

Fig.85- Célula de EV15 em $t_{13}$. Observa-se um "onion" (O) constituído por material tipo túnica interna cercando completamente material tipo túnica externa. 144.000 X.

Figs.86.87.88- Lisados de EV15 em $t_{24}$. As inclusões livres mostram a firme aderência entre material tipo túnica interna e material tipo túnica externa. Na fig. 87 observa-se um "onion" (O) livre. Fig. 86, 121.000 X; Fig.87, 78.000 X; Fig.88, 80.000X.



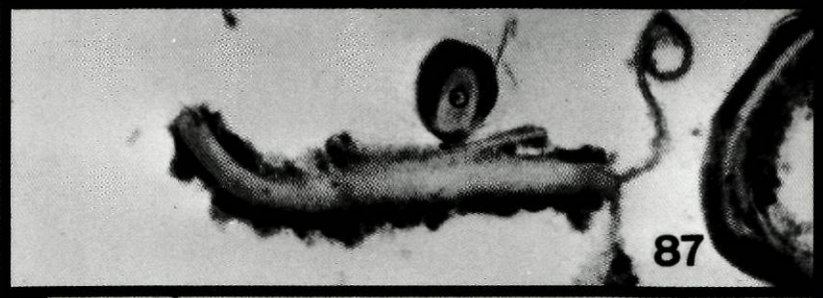

84




85



86



87



88

ram observadas células com inclusões mas sem haver esporo organizado (Figs. 78,80,85). Em lisados observou-se uma firme adesão entre o material tipo túnica interna e tipo túnica externa destas inclusões (Figs. 86,87,88).

## 2. CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA MUTANTE EV15 (ScoA1) E OUTRAS ESTIRPES DE COMPORTAMENTO SEMELHANTE

2.1. Células de EV15 colhidas ao longo do processo esporulativo, foram distribuídas por contagem (em microscopia electrónica) pelas várias fases (Quadro 35). Os tempos dos picos de frequência máxima de cada fase mostram que, relativamente à estirpe selvagem, a estirpe EV15 esporula com grande atraso, particularmente evidente nas fases III e V; os valores mais baixos destes picos e o seu alongamento (quase em planalto) indicam que há maior permanência em cada fase (Fig. 89).

Dado que as células de EV15 diferem, morfologicamente, das células esporulativas normais pelo facto de apresentarem uma túnica interna mais espessa e inclusões no citoplasma esporangial, acompanhámos a cinética da formação destas estruturas (Quadro 36). Como a mutante EV15 possui uma mutação ScoA1 e não deriva directamente da estirpe selvagem 168, haveria que averiguar se as anomalias estruturais observadas nesta mutante eram devidas àquela mutação. Com essa finalidade estudámos em pormenor o comportamento das estirpes isogénicas AA4 e AA5, AA1, AA2 e AA64, obtidas por transformação e diferindo entre si apenas pela mutação ScoA1. Os resultados confirmam que a mutação ScoA1 é a responsável pelas anomalias observadas nas estirpes ScoA1 (Quadro 37, Fig. 89).

QUADRO 35

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE EV15(ScoA1)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_3$ | 286 | 57 | 19.9 | 40 | 14. | 17 | 5.9 | | | | | | |
| $t_4$ | 298 | 60 | 20.1 | 22 | 7.4 | 36 | 12.1 | 2 | 0.6 | | | | |
| $t_5$ | 322 | 96 | 29.8 | 21 | 6.5 | 62 | 19.3 | 10 | 3.1 | 3 | 0.9 | | |
| $t_6$ | 322 | 113 | 35.1 | 12 | 3.7 | 78 | 24.2 | 12 | 3.7 | 11 | 3.4 | | |
| $t_8$ | 235 | 137 | 58.3 | 40 | 17. | 40 | 17. | 16 | 6.8 | 28 | 11.9 | 13 | 5.5 |
| $t_9$ | 312 | 193 | 61.9 | 2 | 0.6 | 58 | 18.6 | 54 | 17.3 | 44 | 14.1 | 35 | 11.2 |
| $t_{10}$ | 315 | 220 | 69.8 | 1 | 0.3 | 31 | 9.8 | 50 | 15.9 | 40 | 12.7 | 98 | 31.1 |
| $t_{13}$ | 225 | 171 | 76. | | | 11 | 4.9 | 6 | 2.7 | 18 | 8. | 116 | 51.6 |
| $t_{24}$ | 213 | 196 | 92. | | | 1 | 0.5 | 2 | 0.9 | 1 | 0.5 | 125 | 58.7 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas.
Em $t_{13}$ havia 20 esporos livres (8,9%) e em $t_{24}$ 67 esporos livres (31,5%).

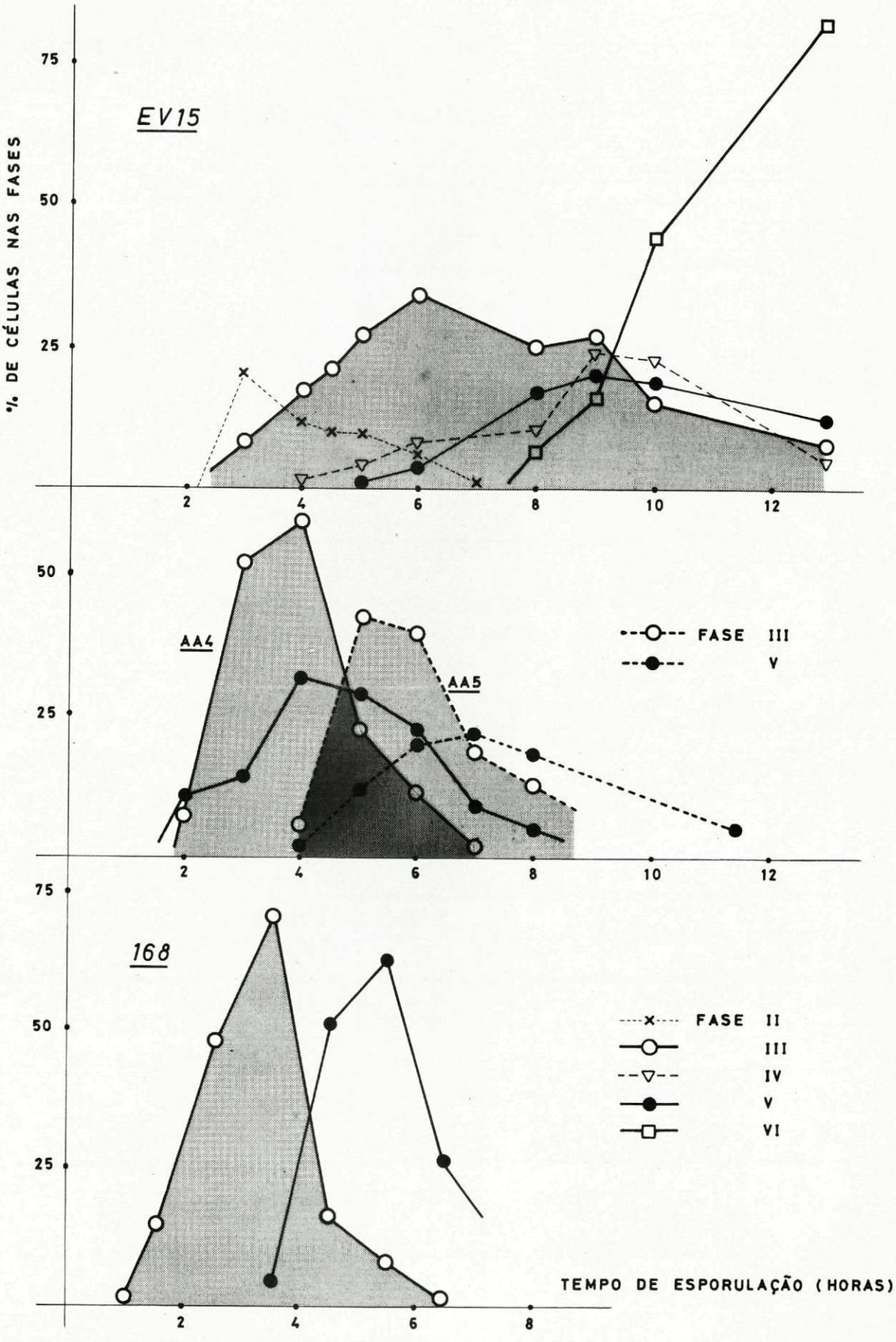



Fig. 89 - Cinética do desenvolvimento morfológico de : EV15, AA4 e AA5. Foram utilizados os dados dos Quadros 35, 38 e 39. Os valores da estirpe 168 são utilizados como controlo

**QUADRO 36** — CINÉTICA DA FORMAÇÃO DA TÚNICA INTERNA E INCLUSÕES

| T | Nº DE LAMELAS (TÚNICA INTERNA) | % INCLUSÕES (ESPORÂNGIO) |
|---|---|---|
| $t_6$ | 2 | 0 |
| $t_8$ | 2 | 0 |
| $t_9$ | 3 | 0 |
| $t_{10}$ | 4 | 5 |
| $t_{13}$ | 4 | 8,5 |
| $t_{24}$ | 4-6 | 30 |

- A % foi determinada em relação ao número de células em esporulação.

**QUADRO 37** — FREQUÊNCIA DAS FASES MORFOLÓGICAS NAS ESTIRPES $Sco^+$ E ScoA1

| ESTIRPE | GENOTIPO | % DE CÉLULAS NAS FASES | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | | II | III | IV | V | VI |
| PM9 | $Sco^+$ | 2 | 7 | 0 | 19 | 72 |
| AA1 | $Sco^+$ | 1 | 7 | 0 | 24 | 68 |
| AA2 | ScoA1 | 3 | 11 | 3 | 61 | 22 |
| AA64 | ScoA1 | 8 | 4 | 0 | 54 | 34 |

As amostras foram colhidas em $t_8$. Para cada ensaio foram contadas cerca de 100 células.

QUADRO 38

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE AA5(ScoA1)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 45 | 11 | 24,4 | 6 | 13,3 | 5 | 11,1 | | | | | | |
| $t_3$ | 135 | 35 | 27, | 17 | 12,6 | 18 | 13,4 | | | | | | |
| $t_4$ | 119 | 59 | 49,5 | 10 | 8,4 | 38 | 31,9 | 9 | 7,6 | 2 | 1,7 | | |
| $t_5$ | 127 | 71 | 56, | 6 | 4,7 | 37 | 29,1 | 11 | 8,7 | 15 | 11,8 | 1 | 0,8 |
| $t_6$ | 94 | 67 | 71,2 | 2 | 2,1 | 22 | 23,4 | 6 | 6,4 | 20 | 21,3 | 17 | 18,1 |
| $t_7$ | 86 | 61 | 70,9 | 2 | 2,3 | 8 | 9,3 | 2 | 2,3 | 17 | 19,8 | 32 | 37,2 |
| $t_8$ | 102 | 79 | 77,5 | 1 | 1, | 5 | 4,9 | 7 | 6,9 | 19 | 18,6 | 47 | 46,1 |
| $t_{11,5}$ | 130 | 90 | 69,2 | | | 4 | 3,1 | 2 | 1,5 | 5 | 3,8 | 76 | 58,5 |
| $t_{13}$ | 137 | 99 | 72,3 | | | 3 | 2,2 | | | 7 | 5,1 | 49 | 35,8 |
| $t_{22}$ | 111 | 64 | 57,7 | | | 6 | 5,4 | 1 | 0,9 | 2 | 1,8 | 43 | 38,7 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas.
Em $t_{13}$ havia 40 esporos livres (29,2%) e em $t_{22}$ 12 esporos livres (10,8%).

QUADRO 39

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE AA4(Sco+)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_1$ | 122 | 3 | 2,5 | | | | | | | | | | |
| $t_2$ | 114 | 40 | 35,1 | 31 | 27,2 | 9 | 7,9 | | | | | | |
| $t_3$ | 125 | 83 | 66,4 | 17 | 13,6 | 66 | 52,8 | | | | | | |
| $t_4$ | 94 | 65 | 69,1 | | | 52 | 55,3 | 7 | 7,4 | 6 | 6,4 | | |
| $t_5$ | 105 | 84 | 80, | 2 | 1,9 | 24 | 22,9 | 13 | 12,4 | 45 | 42,9 | | |
| $t_6$ | 97 | 92 | 94,8 | | | 12 | 12,4 | 6 | 6,2 | 39 | 40,2 | 35 | 36,1 |
| $t_7$ | 103 | 96 | 93,2 | 1 | 1, | 2 | 1,9 | 1 | 1, | 20 | 19,4 | 72 | 69,9 |
| $t_8$ | 86 | 72 | 83,7 | | | 2 | 2,3 | | | 11 | 12,8 | 59 | 68,6 |
| $t_{13}$ | 107 | 100 | 93,5 | | | 10 | 9,3 | 5 | 4,7 | 8 | 7,5 | 48 | 44,9 |
| $t_{22}$ | 87 | 81 | 93,1 | | | | | | | 1 | 1,1 | 56 | 64,4 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas.
Em $t_{13}$ havia 29 esporos livres (27%) e em $t_{22}$ 24 esporos livres (27,6%).

2.2. O efeito da mutação ScoA1 não é afectado pela temperatura de incubação. Células de EV15 esporulando à temperatura de 45°C não revelaram qualquer modificação relativamente às características acabadas de descrever, excepto quanto a uma aceleração do processo (Fig. 90).

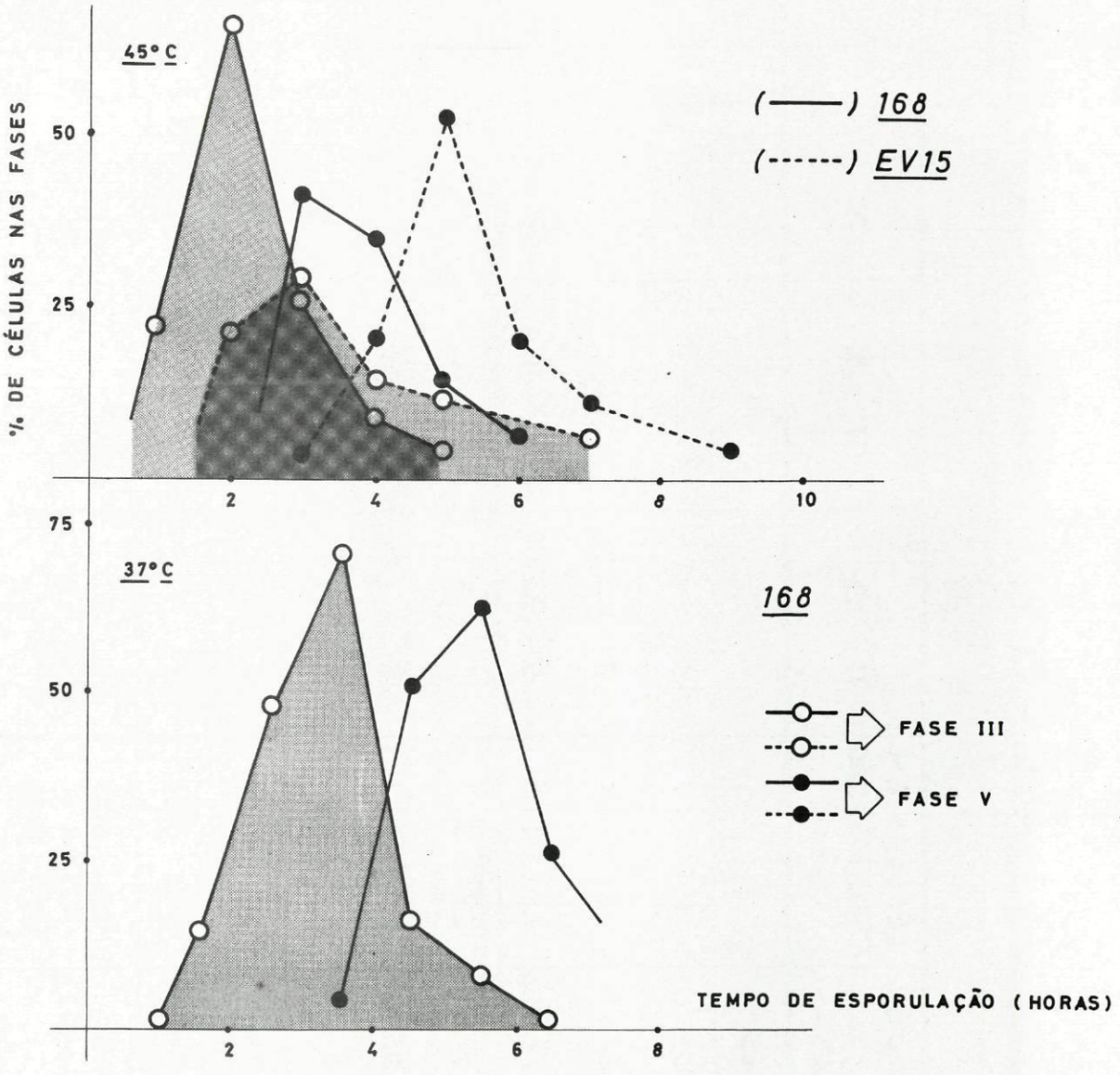



Fig. 90 - Cinética da esporulação das estirpes 168 e EV15, à temperatura de incubação de 45°C. As % utilizadas estão nos Quadros 40 e 41.

QUADRO 40

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE AA16 (Sco12)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II Nº | % | III Nº | % | IV Nº | % | V Nº | % | VI Nº | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_0$ | 80 | | | | | | | | | | | | |
| $t_1$ | 105 | 1 | 1, | 1 | 1, | | | | | | | | |
| $t_2$ | 91 | 4 | 4,4 | 3 | 3,3 | 1 | 1,1 | | | | | | |
| $t_3$ | 71 | 11 | 15,5 | 9 | 12,7 | 2 | 2,8 | | | | | | |
| $t_4$ | 97 | 22 | 22,7 | 5 | 5,2 | 16 | 16,5 | 1 | 1, | | | | |
| $t_5$ | 95 | 25 | 26,3 | 1 | 1,1 | 23 | 24,2 | | | 1 | 1, | | |
| $t_6$ | 100 | 32 | 32, | 1 | 1, | 19 | 19, | 5 | 5, | 6 | 6, | 1 | 1, |
| $t_7$ | 85 | 36 | 42,4 | | | 15 | 17,6 | 3 | 3,5 | 18 | 21,2 | | |
| $t_9$ | 84 | 44 | 52,4 | | | | | 1 | 1,2 | 22 | 26,2 | 21 | 25, |
| $t_{11}$ | 66 | 40 | 60,6 | | | | | 1 | 1,5 | 7 | 10,6 | 32 | 48,5 |
| $t_{20}$ | 55 | 37 | 67,3 | | | | | | | | | 28 | 51, |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas.
Em $t_{10}$ havia 45 esporos livres (59.2%).

QUADRO 41

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE EV15(ScoA1)

(TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO: 45°C)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 66 | 25 | 37.9 | 15 | 22.7 | 10 | 15.2 | | | | | | |
| $t_3$ | 54 | 21 | 38.9 | 7 | 13. | 11 | 20.4 | 2 | 3.7 | 1 | 1.8 | | |
| $t_4$ | 88 | 32 | 36.4 | 1 | 1.1 | 9 | 10.2 | 12 | 13.6 | 10 | 11.4 | | |
| $t_5$ | 86 | 60 | 69.8 | 1 | 1.2 | 9 | 10.5 | 1 | 1.2 | 33 | 38.4 | 16 | 18.6 |
| $t_6$ | 84 | 50 | 59.5 | 2 | 2.4 | 4 | 4.8 | 2 | 2.4 | 12 | 14.3 | 30 | 35.7 |
| $t_7$ | 83 | 44 | 53. | | | 3 | 3.6 | | | 6 | 7.2 | 35 | 27.7 |
| $t_8$ | 60 | 44 | 73.4 | | | 1 | 1.7 | | | | | 36 | 60. |
| $t_9$ | 65 | 31 | 47.7 | | | | | | | 2 | 3.1 | 22 | 33.8 |
| $t_{10}$ | 71 | 53 | 74.6 | | | 3 | 4.2 | | | 4 | 5.6 | 26 | 36.6 |
| $t_{23}$ | 59 | 38 | 64.4 | | | | | | | | | 3 | 5.1 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas. Em $t_8$ havia 7 esporos livres (11,7%); em $t_9$ 7 esporos livres (10,8%); em $t_{10}$ 20 esporos livres (28,2%) e em $t_{23}$ 35 esporos livres (59,3%).

2.3. Na mutante EC21 (ScoB2) as fases morfológicas também aparecem atrasadas e prolongadas, tendo a mutação ScoB2 repercursões mais marcadas que as da mutação ScoA1. Assim, na mutante EC21, as fases morfológicas aparecem com grande atraso e prolongadas, com picos de frequência baixos e largos (Fig. 91).

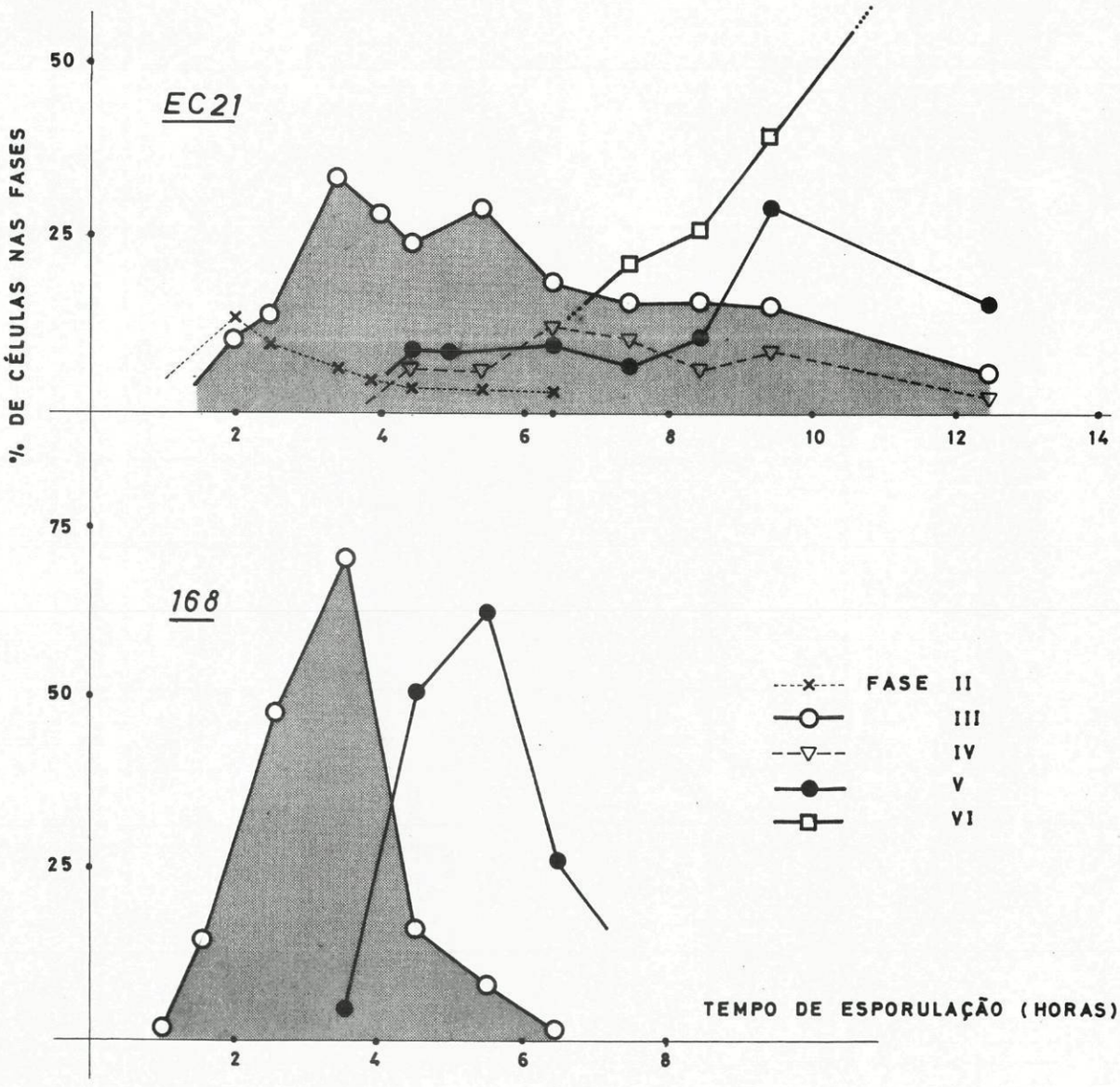



Fig. 91 - Cinética do desenvolvimento morfológico da mutante EC21. As % utilizadas estão no Quadro 42.

QUADRO 42

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DO BACILLUS SUBTILIS 168

(TEMPERATURA DE INCUBAÇÃO: 45°C)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_1$ | 86 | 45 | 52.3 | 30 | 34.9 | 15 | 17.4 | | | | | | |
| $t_2$ | 50 | 36 | 72. | 10 | 20. | 26 | 52. | | | | | | |
| $t_3$ | 79 | 63 | 79.7 | | | 16 | 20.3 | 22 | 27.8 | 25 | 31.6 | | |
| $t_4$ | 77 | 52 | 67.5 | | | 5 | 6.5 | 1 | 1.3 | 21 | 27.3 | 25 | 32.5 |
| $t_5$ | 75 | 60 | 80. | | | 2 | 2.7 | | | 8 | 10.7 | 50 | 66.7 |
| $t_6$ | 84 | 55 | 65.5 | | | | | | | 4 | 4.8 | 51 | 60.7 |
| $t_7$ | 65 | 57 | 87.7 | | | 2 | 3.1 | | | | | 55 | 84.6 |
| $t_8$ | 68 | 42 | 61.8 | 5 | 7.4 | 4 | 5.9 | | | 2 | 2.9 | 31 | 45.6 |
| $t_{10}$ | 76 | 50 | 65.8 | | | | | | | | | 5 | 6.6 |

. ₀ de células em esporulação foi avaliada em relação ao nº total de células contadas.
Em $t_{12,5}$ havia 6 esporos livres (3,4%) e em $t_{24,5}$ 36 esporos livres (15,5%)

2.4. Várias estirpes definidas como Sco, pela presença de inclusões e produção excessiva de proteases, mas em que o desenvolvimento da Termo$^{R}$ não está atrasado, foram também examinadas. Nestas estirpes as fases morfológicas aparecem em tempos e frequências máximas quase normais (Fig. 92 ). Os picos correspondentes à fase III, são contudo, assimétricos e observa-se um ligeiro desvio das curvas para a direita; as células na fase V também surgem ligeiramente atrasadas quando comparadas com a estirpe selvagem (Fig. 92 ). O atraso mais significativo foi observado com a estirpe Sco12, em que as células na fase III aparecem em $t_2$ e persistem até $t_7$; as células na fase V são mais frequentes entre $t_7$-$t_9$ e a fase VI aparece somente em $t_9$ (Fig 92).

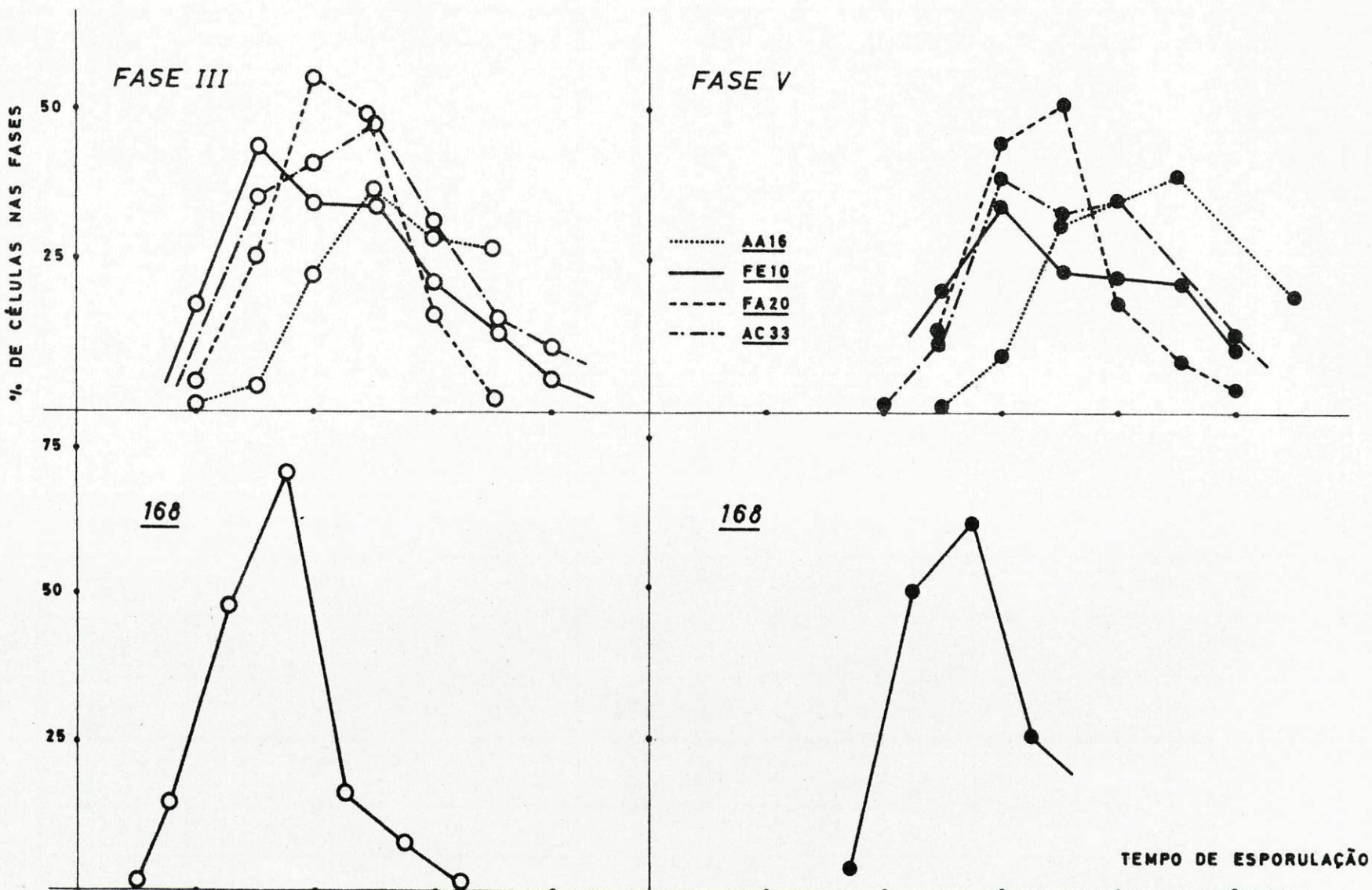



Fig. 92 - Morfogénese das estirpes: 168 ($Sco^+$), AC33 (ScoC3), FE10 (ScoC4), FA20 (Scol3) e AA16 (Scol2). Os gráficos da esquerda representam a fase III e os da direita a fase V. As % utilizadas estão representadas nos Quadros 43-46.

QUADRO 43

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE EC21(ScoB2)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 230 | 41 | 17,8 | 23 | 10, | 18 | 7,8 | | | | | | |
| $t_{2,5}$ | 230 | 38 | 16,5 | 16 | 7, | 22 | 9,5 | | | | | | |
| $t_{3,5}$ | 271 | 80 | 39,5 | 12 | 4,4 | 68 | 25,1 | | | | | | |
| $t_4$ | 193 | 48 | 24,9 | 6 | 13,1 | 40 | 20,7 | 2 | 1, | | | | |
| $t_{4,5}$ | 244 | 70 | 28,7 | 6 | 2,5 | 43 | 17,6 | 10 | 4,1 | 8 | 3,3 | 3 | 1,2 |
| $t_{5,5}$ | 144 | 52 | 36,1 | 3 | 2,1 | 32 | 22,2 | 6 | 4,2 | 7 | 4,9 | 4 | 2,8 |
| $t_{6,5}$ | 199 | 71 | 35,7 | 4 | 2, | 26 | 13,1 | 16 | 8, | 14 | 7, | 11 | 5,5 |
| $t_{7,5}$ | 187 | 75 | 40,1 | | | 22 | 11,8 | 14 | 7,5 | 9 | 4,8 | 30 | 16, |
| $t_{8,5}$ | 228 | 102 | 44,7 | 2 | 0,9 | 28 | 12,3 | 11 | 4,8 | 18 | 7,9 | 43 | 18,9 |
| $t_{9,5}$ | 290 | 145 | 50, | 1 | 0,3 | 15 | 5,2 | 20 | 6,9 | 40 | 13,8 | 69 | 23,8 |
| $t_{12,5}$ | 178 | 127 | 71,3 | | | 2 | 1,1 | 2 | 1,1 | 16 | 9, | 101 | 56,7 |
| $t_{24,5}$ | 232 | 173 | 74,6 | | | 2 | 0,9 | 2 | 0,9 | 5 | 2,2 | 138 | 55,2 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{10}$ havia 1 esporo livre (0,4%) e em $t_{20}$ 62 esporos livres (45,3%).

QUADRO 44

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE FE10(ScoC4)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 230 | 81 | 35,2 | 49 | 21,3 | 32 | 13,9 | | | | | | |
| $t_3$ | 221 | 109 | 49,3 | 30 | 13,6 | 79 | 35,7 | | | | | | |
| $t_4$ | 160 | 97 | 60,6 | 15 | 9,4 | 43 | 26,9 | 36 | 22,5 | 3 | 1,9 | | |
| $t_5$ | 228 | 146 | 64, | 17 | 7,5 | 63 | 27,6 | 32 | 14, | 34 | 14,9 | | |
| $t_6$ | 172 | 122 | 70,9 | 3 | 1,7 | 28 | 16,3 | 24 | 14, | 49 | 28,5 | 18 | 10,5 |
| $t_7$ | 203 | 151 | 74,4 | 8 | 3,9 | 23 | 11,3 | 4 | 2, | 36 | 17,7 | 80 | 39,4 |
| $t_8$ | 210 | 173 | 82,4 | 1 | 0,5 | 7 | 3,3 | 10 | 4,8 | 36 | 17,1 | 119 | 56,7 |
| $t_9$ | 231 | 187 | 81, | | | 2 | 0,9 | 5 | 2,2 | 39 | 16,9 | 141 | 61, |
| $t_{10}$ | 243 | 147 | 60,5 | | | 5 | 2,1 | 2 | 0,8 | 22 | 9, | 117 | 48,1 |
| $t_{20}$ | 137 | 100 | 73, | | | 2 | 1,5 | 2 | 1,5 | 9 | 6,6 | 25 | 16,2 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{20}$ havia 299 esporos livres (77,9%).

QUADRO 45

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE FA20(Sco13)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_2$ | 270 | 50 | 18,5 | 35 | 13. | 15 | 5,5 | | | | | | |
| $t_3$ | 207 | 76 | 36,7 | 22 | 10,6 | 54 | 26,1 | | | | | | |
| $t_4$ | 244 | 144 | 59. | 8 | 3,3 | 134 | 54,9 | 2 | 0,8 | | | | |
| $t_5$ | 234 | 148 | 63,2 | 1 | 0,4 | 114 | 48,7 | 10 | 4,3 | 23 | 9,8 | | |
| $t_6$ | 256 | 196 | 76,6 | | | 42 | 16,4 | 38 | 14,8 | 116 | 45,3 | | |
| $t_7$ | 372 | 283 | 76,1 | 1 | 0,3 | 3 | 0,8 | 13 | 3,5 | 194 | 52,2 | 72 | 19,4 |
| $t_8$ | 344 | 285 | 82,8 | 1 | 0,3 | 4 | 1,2 | 4 | 1,2 | 63 | 18,3 | 213 | 61,9 |
| $t_{10}$ | 228 | 210 | 92,1 | 1 | 0,4 | 2 | 0,9 | 1 | 0,5 | 9 | 3,9 | 197 | 86,4 |
| $t_{20}$ | 384 | 381 | 99,2 | | | 1 | 0,2 | 2 | 0,5 | 15 | 3,9 | 64 | 16,7 |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{13}$ havia 2 esporos livres (2,7%).

QUADRO 46

# CINÉTICA DO DESENVOLVIMENTO MORFOLÓGICO DA ESPORULAÇÃO DA ESTIRPE AC33(ScoC3)

| T | Nº TOTAL DE CÉLULAS | CÉLULAS EM ESPORULAÇÃO Nº | % | II | % | III | % | IV | % | V | % | VI | % |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| $t_3$ | 98 | 65 | 66,3 | 32 | 32,7 | 33 | 33,7 | | | | | | |
| $t_4$ | 107 | 67 | 62,6 | 19 | 17,8 | 43 | 40,2 | 4 | 3,7 | 1 | 0,9 | | |
| $t_5$ | 109 | 75 | 68,8 | 5 | 4,6 | 52 | 47,7 | 6 | 5,5 | 12 | 11, | | |
| $t_6$ | 95 | 79 | 83,2 | 3 | 3,2 | 29 | 30,5 | | | 36 | 37,9 | 11 | 11,6 |
| $t_7$ | 118 | 105 | 89, | | | 17 | 14,4 | 1 | 0,8 | 39 | 33, | 48 | 40,7 |
| $t_8$ | 83 | 73 | 88, | 2 | 2,4 | 9 | 10,8 | 29 | 34,9 | 33 | 39,8 | | |
| $t_{10}$ | 88 | 87 | 98,9 | | | | | | | 11 | 12,5 | 76 | 86,4 |
| $t_{13}$ | 75 | 69 | 92, | | | 2 | 2,7 | | | 2 | 2,7 | 63 | 84, |

A % de células em esporulação foi avaliada em relação ao número total de células contadas.
Em $t_{13}$ havia 2 esporos livres (2,7%).

# IV - DISCUSSÃO

## 1. MORFOCINÉTICA DA ESPORULAÇÃO DAS ESTIRPES SELVAGENS

Após o terminus do crescimento exponencial em meio líquido as células de Bacillus subtilis sofrem uma citodiferenciação conducente à formação de esporos maduros. As transformações que ocorrem entre $t_0$ e $t_7$ foram descritas e caracterizadas morfologicamente pela microscopia electrónica, utilizando a técnica dos cortes ultrafinos (21,236). É geralmente aceite a presença de seis fases morfológicas facilmente distinguíveis durante o processo esporulativo.

1.1. FASE I - A formação do filamento axial nuclear, entre $t_0$ e $t_1$, nas células do Gén. Bacillus, é considerada como acontecimento inicial da esporulação (21,78,192,236,251,337,338), apesar de Ryter referir a natureza episódica desta estrutura em Bacillus subtilis baseado em dados não quantificados (236). Mandelstam sugere que o alongamento do material nuclear não é um acontecimento específico da esporulação (177); os dados de Rousseau e col. obtidos com Clostridium tyrobutyricum apontam na mesma direcção (234). No entanto,apesar do significado desta estrutura ter sido posta em causa,nunca foi feito um estudo quantitativo sistemático das diferentes espécies esporulativas. A quantificação dos nossos estudos cinéticos,realizados com Bacillus subtilis 168,revelou que somente 1-3% das células exibe o alongamento do material nuclear, enquanto que nas outras estirpes tal formação praticamente não foi observada. Em nossa opinião, o alongamento do material nuclear não deve, por conseguinte, ser considerado um marcador da esporulação bacteriana. Aliás, o alongamen-

to do material nuclear ocorre noutras situações que nada têm em comum com a esporulação, nomeadamente, nas células de culturas envelhecidas (67), nas células expostas ao frio e a altas concentrações de NaCl (325) ou expostas aos antibióticos (149).

1.2. FASE II - A formação do septo esporulativo parece ser o resultado de uma última divisão celular atípica (21,91,192,236,246), precedida pela formação de protuberâncias parietais (21,236,332). A análise dos nossos resultados quantitativos mostra que a formação do septo esporulativo e a sua evolução para a formação do pré-esporo ocorre rapidamente, nunca atingindo as células nesta fase frequências muito elevadas. As frequências máximas mais altas na fase II são obtidas quando os estudos morfológicos quantitativos são feitos apenas nos cortes longitudinais das células. A presença de protuberâncias parietais precedendo a formação do septo não ocorreu sistematicamente, contrariamente ao que foi descrito por Ryter (236).

Dados morfológicos (332) e bioquímicos (208,209) parecem indicar que a paragem da síntese do material parietal é condição indispensável para uma correcta formação do septo esporulativo. Sempre que a síntese da parede celular acompanha a formação deste septo, a esporulação fica bloqueada (88,236,332), sendo geralmente descrita a ausência de material parietal entre os dois folhetos membranosos do septo esporulativo (21,192,236,246). A observação sistemática das células do Bacillus subtilis 168 durante a fase II permitiu-nos detectar a existência de material electronodenso entre as duas membranas do septo e com uma aparência semelhante à da camada interna da parede celular. Uma revisão cuidadosa

dos numerosos trabalhos científicos descritos na literatura, permitiram-nos detectar, sistematicamente, a existência desse material no septo esporulativo, embora esse facto não tenha sido valorizado pelos seus autores. Esta situação é particularmente evidente nos estudos de Ohye & Murrell em Bacillus coagulans (200). A parede celular do Bacillus subtilis contém, essencialmente, mucopeptídeo e ácidos teicóicos com glicerol (73,182).Os estudos de Pitel & Gilvarg (209) demonstram que durante a formação do septo não há síntese de mucopeptídeo. Estes dados sugerem, indirectamente, que o material descrito no septo esporulativo possa ser o ácido teicóico. As observações de Nermut em Bacillus megaterium (197) e as efectuadas em Bacillus subtilis (44,101,336), sugerem que os ácidos teicóicos se localizam à superfície da parede celular. Estudos morfológicos, utilizando concanavalina marcada, reforçam esta opinião (37). No entanto, o isolamento de ácidos lipoteicóicos e estudos de natureza imunológica parecem indicar que os ácidos teicóicos com glicerol estão ligados à membrana citoplasmática e atravessam a parede celular em direcção à superfície (54,101,305,326). A utilização da técnica de Thièry (299), durante as fases iniciais de esporulação do Bacillus subtilis, permitiu-nos verificar a deposição preferencial de grãos de prata no septo esporulativo e na camada interna da parede celular do esporângio. Em preparações estudadas por esta técnica a observação ocasional de células lisadas permitiu-nos visualizar melhor a existência de material de natureza polissacarídica no septo esporulativo em conexão com a camada mais interna da parede celular (Fig.7).Estes resultados são concordantes com as observações de Rousseau e col. em Bacillus subtilis (232) e com

as de Walker e col. em Clostridium (318). A intervenção do material parietal do esporângio na realização da fase II parece ser fundamental, dado o facto de os protoplastos de Bacillus subtilis serem incapazes de esporular excepto quando as membranas do pré-esporo já estão formadas (85).

1.2.1. Tem sido atribuído aos mesossomas participação activa na formação do septo esporulativo (21,65,78,82,83,88,146,192,200,240, 316,332), o que foi relacionado em células de Bacillus subtilis com a sua localização predominantemente polar e anexa às protuberâncias parietais (21,236,332). Dado que a formação dos mesossomas nas Eubacteriae está dependente das condições de fixação (264) a evolução destas estruturas durante a morfogénese esporulativa foi por nós estudada. Embora os nossos resultados não sejam concludentes, o processo fixador parece influenciar a formação daquelas estruturas. O comportamento da membrana citoplasmática do esporângio, durante a esporulação, perante a fixação RK, é análogo ao das células vegetativas, isto é, maior número de mesossomas quando a pré-fixação é utilizada. A partir de $t_{2,5}$ a membrana do esporângio parece não ser afectada grandemente pelo método fixativo utilizado. Várias razões podem explicar este facto: i - durante a esporulação as células possuem menor pressão osmótica do que durante o crescimento exponencial (61); ii - as células do Bacillus subtilis são menos sensíveis que as outras Eubacteriae de Gram positivo à omissão da pré-fixação (264).

O número de mesossomas no esporângio vai diminuindo progressivamente ao longo do processo esporulativo.

O número de mesossomas no pré-esporo não parece ser grande-

mente afectado pelas condições de fixação, embora vá diminuindo ao longo do processo, o que poderá estar relacionado com a organização dos invólucros esporais, dificultando o acesso ao fixador, ou com a síntese de DPA no citoplasma esporal. O aumento significativo de mesossomas que ocorre em $t_{15}$ , tanto no esporângio como no esporo, poderá estar relacionado com o período activo da síntese de fosfolipídeos que ocorre "de novo" entre $t_1$ e $t_3$ (88, 209). Aliás a frequência máxima de células na fase II ocorre precisamente por esta altura.

1.3. FASE III - A evolução morfológica do septo esporulativo para a formação do pré-esporo nas diferentes estirpes de Bacillus subtilis por nós observada coincide com a já descrita por outros autores (21,192,236). As células, após atingirem a fase III, permanecem longo tempo nesta fase antes da formação dos invólucros esporais. É particularmente sugestiva a ausência de ribossomas no citoplasma do esporângio contíguo ao pré-esporo, precisamente no local onde vão ser organizados os invólucros esporais. É sugerida uma ligação entre este fenómeno morfológico e a síntese de precursores proteicos das túnicas, que ocorre ente $t_2$-$t_3$, conforme foi sugerido por Wood (328). A observação ocasional de células em cadeia revelou que um dos esporos se localizava no pólo oposto ao do último septo de divisão celular (Fig. 11). Estes resultados não coincidem com as observações de Yamamoto & Balassa em células de Bacillus badius (331), nem com dados de Hitchins realizadas em Bacillus megaterium (132).

Pouco é conhecido àcerca da modificação dos componentes estruturais das membranas durante a morfogénese, embora seja de ad-

mitir que após a formação do pré-esporo elas se adaptem às suas novas funções. É evidente que para o espaço intermembranoso do pré-esporo vai ser sintetizado mucopeptídeo, diferente do mucopeptídeo parietal, pelo que é de admitir a existência de novas enzimas membranosas envolvidas na síntese daquele composto. A permeação da membrana do esporo aos iões cálcio, que ocorre entre $t_5$--$t_6$, apesar deste ião ter sido concentrado no esporângio algum tempo antes (77), sugere essas alterações. Diferenças entre membranas vegetativas e membranas esporulativas quanto à composição fosfolipídica (79) não deverão ser entendidas como acontecimentos específicos da esporulação, dado que as variações de pH no meio de cultura, após $t_0$, poderão ser responsáveis por essa alteração. Os resultados obtidos por Op den Kamp com Bacillus megaterium (203) e em Bacillus subtilis (202) serviram-nos de suporte às nossas conclusões, apesar dos dados obtidos com B. emersonii (273).

1.4. FASE IV-V - É geralmente aceite que a formação do córtex no espaço intermembranoso do septo esporulativo caracteriza a fase IV (21,192,236,246). Os estudos quantitativos realizados com as diferentes estirpes de Bacillus subtilis revelaram que a frequência de células nesta fase é pouco significativa. Simultaneamente com a organização do córtex surgem dois tipos de fragmentos no citoplasma esporangial: um com localização sub-polar e outro com localização lateral, os quais parecem representar, respectivamente, os primórdios do exosporo e os primórdios da túnica interna do esporo. Este facto explica a baixa frequência de células observadas na fase IV, dado que, segundo critérios morfológicos, aquelas células terão de ser classificadas na fase V. Idêntico facto

foi observado por Ohye & Murrell em Bacillus cereus T (201). Esta discrepância, juntamente com a inconstância e falta de significado do filamento axial nuclear, tornam necessária uma revisão dos critérios de definição das fases esporulativas. A frequente ausência das protuberâncias parietais, após a fase IV, poderá estar relacionada com a existência de autolisinas (335). Estas enzimas, resistentes à acção das proteases, produzidas durante a esporulação (41), são provavelmente as responsáveis pela solubilização das protuberâncias parietais.

As lamelas que aparecem conjuntamente com a formação do córtex acabam por involver progressivamente o esporo, constituíndo a túnica interna. No início da fase V, o material constitutivo da túnica externa deposita-se à volta das lamelas da túnica interna, acabando por coalescer no final desta fase esporulativa. A morfologia das túnicas do Bacillus subtilis obedece aos padrões descritos por outros autores (11,21,136,192,236). Desconhece-se qual dos dois domínios celulares, pré-esporo ou esporângio, participa na organização destas estruturas. Os resultados obtidos com as mutantes Sco sugerem que o esporângio é o responsável, pelo menos parcialmente, pela organização destes invólucros, dado que as lamelas mais externas da túnica interna são descontínuas, e que a sua montagem seja feita a partir do exterior. A formação dos esporos sem córtex viu-se ocorrer com certa frequência na estirpe mutante FA10, pelo que a formação das túnicas parece ser independente da do córtex. Estes resultados são concordantes com as observações de outros autores em Bacillus subtilis (27), Bacillus cereus (88), e em Clostridium histolyticum (28).

Tem sido atribuído papel activo ao citoplasma esporangial, incluso entre a membrana externa do pré-esporo e as túnicas, na germinação do esporo (193). Em nosso entender,esse citoplasma poderá participar na organização da túnica interna, visto que, em células esporulativas de EV15, o número de lamelas da túnica interna aumenta, entre $t_6$ e $t_{24}$, de 2 para 4 a 6 em presença de uma túnica externa que muito provavelmente actua como barreira intransponível aos precursores da túnica interna.

As células do Bacillus subtilis permanecem longo tempo na fase V, levando-nos a admitir que a maturação dos invólucros esporais consome mais tempo que a montagem destas estruturas.

Ohye & Murrell referem que a membrana externa do pré-esporo faz parte integrante das túnicas dos esporos de Bacillus coagulans (194), o que não foi confirmado por Kawata e col. nas células de Bacillus subtilis (146). Os nossos dados indicam que a membrana externa do pré-esporo vai-se desorganizando progressivamente e eventualmente desaparece durante a fase V. A desorganização controlada das túnicas com ureia-mercaptoetanol revelou, ocasionalmente, a presença de uma estrutura tipo "unit membrane" aderente à túnica interna do esporo,o que poderá sugerir a existência da membrana externa do pré-esporo (Fig.24 ).

1.5. FASE VI - A perda de visualização do citoplasma do esporo tem servido de critério morfológico para a definição da fase VI e tem sido atribuída à maturação dos invólucros esporais, com a consequente impenetrabilidade dos fixadores utilizados para a microscopia electrónica (21,192,236). A boa definição morfológica do

citoplasma dos esporos $DPA^-$ e a perda da sua visualização após a adição exógena de DPA parecem indicar que este composto interfere com a fixação. Silva & Sousa verificaram "in vitro" que o DPA compete com o $OsO_4$ durante a fixação (medida como velocidade de gelificação da albumina; resultados não publicados). Ocasionalmente, a túnica externa do esporo revela a existência de sub-camadas, provavelmente ligadas entre si por ligações dissulfidrilo ou ligações hidrofóbicas. A ruptura destas ligações com ureia-mercaptoetanol revelou claramente a presença destas sub-camadas. Estes resultados são concordantes com os obtidos por Aronson & Fitz-James nas células de B. subtilis após tratamento com sulfito de sódio (11).

1.6. Exosporo - Os esporos de B. cereus são rodeados por uma estrutura, tipo balão, chamada exosporo (78,86,99,192,201,317). Resultados idênticos foram obtidos com B. sphaericus (156) e com algumas estirpes de B. megaterium (30,303) e Clostridium (133,250,251). Esporos de B. subtilis têm sido descritos como desprovidos de exosporo (21,145,146,147,236). Giesbrecht (100) e recentemente Gerhardt (comunicação pessoal) sugerem a existência de exosporo em B. subtilis, pela observação ocasional de uma camada simples electronodensa justaposta à túnica externa. Holt e Leadbetter, usando a técnica do "freeze-etching", sugerem também a existência daquela estrutura (136). Nenhuma destas observações permitiu uma prova inequívoca da existência do exosporo em B. subtilis, continuando esta bactéria a ser considerada como não possuindo tal estrutura (11,21,121,236,241). A adição de $Na_2SO_3$ a culturas em esporulação permitiu também visua-

lizar estas estruturas, as quais Aronson e col. (11) correlacionaram com a camada externa observada por Holt e Leadbetter (136). O tratamento com ureia-mercaptoetanol, utilizado para a extracção parcial das proteínas estruturais das túnicas do esporo (66, 277), permite uma clara visualização do exosporo. O tratamento dos esporos com ureia-mercaptoetanol-lisozima e ureia-mercaptoetanol--pronase não alterou o perfil morfológico do exosporo. Isto pode explicar as dificuldades encontradas na solubilização das proteínas das túnicas dos esporos do Bacillus subtilis (11). O exosporo parece ser dotado de grande resistência, pois a sua estrutura permanece preservada mesmo após o uso de técnicas drásticas para o isolamento de pré-esporos (277).

A dificuldade da observação do exosporo em esporos de B. subtilis, pela técnica de cortes ultra-finos, é devida ao facto de esta estrutura estar intimamente aderente à túnica externa do esporo. O tratamento com ureia-mercaptoetanol, além de desorganizar a túnica externa, permite que o exosporo se destaque e apareça como flexível conforme descrito em B. cereus (201). Os resultados deste tratamento indicam que o exosporo do B. subtilis está provavelmente ligado à túnica externa por pontes de hidrogénio e dissulfidrilo. A presença deste exosporo, que observamos nas várias estirpes selvagens e mutantes do B. subtilis, tira qualquer fundamento à classificação corrente (192) dos esporos em duas classes: com e sem exosporo.

O exosporo aparece por vezes como uma camada simples ou como uma estrutura trilamelar, tipo "unit membrane", e outras vezes como estrutura periódica. Uma vez que estes diferentes aspectos estão

localizados na mesma camada, representam diferentes perfis morfológicos do mesmo invólucro. A presença de estrutura periódica logo no início da formação do exosporo torna improvável que esta estrutura seja a forma final da sua maturação.

A morfogénese do exosporo foi bem estudada em B. cereus (192, 201) tendo sido inicialmente proposto que ele derivaria da membrana externa do pré-esporo (192), embora mais tarde Ohye & Murrell neguem tal interpretação (201). Os nossos resultados, obtidos com B. subtilis, apontam para uma evolução independente da membrana externa do pré-esporo e exosporo, apesar deste exibir também estrutura tipo "unit membrane", aliás confirmada pela sua composição química (180).

1.7. Resistência aos agentes químicos e ao calor - Os esporos resistem à acção agressiva de numerosos agentes químicos e físicos e essa resistência é adquirida gradualmente (21,186). Ryter (236), baseada em experiências cinéticas, correlacionou a $OCT^R$ com a fase V e a $CLOR^R$ com a fase VI. Dado o assincronismo da esporulação, torna-se difícil estabelecer esta correlação baseada apenas em dados quantitativos de predomínio de uma fase. Milhaud & Balassa (186), seguindo o mesmo critério, estabeleceram a sequência da aparição das resistências aos agentes químicos e ao calor apresentadas pelas células esporulativas do B. subtilis: XIL→TOL→OCT→ →CLOR→TCA, FEN, TEMP. Com a finalidade de estabelecer uma correlação correcta entre células esporulativas e as resistências, procurou-se para cada tratamento encontrar a última fase morfológica da esporulação para a qual o esporo ainda mostra alterações

morfológicas e a fase mais recente em que não há qualquer alteração do esporo após esse tratamento. A fim de poder estabelecer esta correlação é necessário definir as alterações ultraestruturais, provocadas por essas substâncias nas células vegetativas. Dado que a estrutura das membranas bacterianas e a presença de mesossomas nas Eubactériae de Gram positivo depende das condições de fixação (264), a técnica RK sem pré-fixação foi usada. Nestas condições, apesar do B. subtilis ser menos sensível à acção dos fixadores do que as outras Eubactériae de Gram positivo (264), o aparecimento de mesossomas proeminentes e a perda de assimetria da membrana poderão ser usados como critérios de alteração da permeabilidade da membrana após os tratamentos com solventes.

1.7.1. Alterações causadas pelos agentes nas células vegetativas - Os solventes orgânicos estudados actuam predominantemente ao nível de biomembranas e a sua acção agressiva manifestou-se por: mudança de perfil de assimétrico para simétrico; fracturas e dissolução em largas extensões e formação de estruturas tipo mesossomas. Este tipo de lesões não são exclusivas destes solventes, sendo muito semelhantes às alterações estruturais descritas em células de Bacillus cereus tratadas com álcool feniletílico (269). A mudança de perfil da membrana de assimétrico para simétrico ocorre sempre que há uma alteração da permeabilidade da membrana, a qual pode ser avaliada "in vitro" pelo efluxo do potássio intracelular (87,109,110,253,263,265,269).

Uma correlação linear foi estabelecida entre a hidrofobicidade das moléculas e a sua actividade nas membranas (110,230,270).

No nosso caso, a alteração da membrana das células vegetativas de B. subtilis tratadas com solventes orgânicos aumentava pela seguinte ordem: XIL> TOL>OCT>CLOR. Apesar da hidrofobicidade dos mesmos solventes aumentar na ordem inversa (164), esta aparente inversão de correlação observada por outros pode ser atribuída ao facto de nos nossos tratamentos se ter usado meio aquoso para estes solventes; nestas condições, a uma maior hidrofobicidade corresponde uma menor solubilidade (184) e,portanto,uma menor concentração efectiva de solvente.

O TCA é um polianião que actua como precipitante das proteínas, o que poderá explicar as alterações ultraestruturais que causa no citoplasma bacteriano. Os blocos densos que ele forma no citoplasma são sensíveis à digestão enzimática por pronase.

As alterações provocadas pelo calor húmido são semelhantes às descritas em B. cereus e S. faecalis (267,285). O aquecimento provoca alteração da permeabilidade da membrana, traduzida pelo rápido efluxo de potássio (267,271,285), o que aliás está de acordo com as fracturas da membrana citoplasmática após estes tratamentos, e com a perda de assimetria da membrana. As fracturas da membrana e a mudança de perfil provocadas pelo aquecimento podem estar relacionadas com a perda de fosfolipídeos ou a sua hidrólise, conforme sugerem os nossos resultados obtidos com S. faecalis (285). A coagulação proteica verificada no citoplasma das células de B. subtilis, após o aquecimento a 80°C/10', está de acordo com os resultados previamente referidos por Heden & Wyckoff (126). A preservação da estrutura fibrilar do DNA

em B. subtilis, após o aquecimento, coincide com os resultados já descritos para o B. subtilis (267) e com os dados de Strange & Schon (293) e de Alwood & Russell (2).

1.7.2. Alterações provocadas pelos agentes nas células em esporulação - Em qualquer fase do processo esporulativo o esporângio é sujeito à acção dos agentes químicos e ao aquecimento, apresentando lesões semelhantes às descritas para as células vegetativas, embora a formação de mesossomas seja menos proeminente, provavelmente devido ao facto de a pressão osmótica das células diminuir durante a fase estacionária (61). Utilizamos o perfil da membrana como critério morfológico indicativo da integridade fisiológica das células. Dada a hidrofobicidade de alguns dos agentes usados, o $OsO_4$ foi renovado durante a fixação após curto período de actuação.

A resistência ao xilol (detectada como integridade da membrana interna do esporo após este tratamento) está correlacionada com o aparecimento do córtex, não requerendo, portanto, a formação das túnicas.

A resistência ao tolueno coincide com a maturação do córtex e a formação da túnica interna e do exosporo, enquanto que as resistências ao octanol e clorofórmio surgem com a formação da túnica externa (Quadro 11).

Com a maturação das túnicas surge a resistência ao TCA, seguida pela $Termo^R$. A síntese do DPA, que se inicia nesta fase, é implicada, pelos resultados obtidos com as mutantes $DPA^-$, na aquisição desta última resistência.

Numa tentativa de interpretação dos mecanismos de resistência

que se coadune com os resultados obtidos, podemos considerar 5 hipóteses (todas condicionadas pelo conhecimento da esporulação resultar da expressão sequencial dos genes correspondentes):

i - As resistências podem advir de uma modificação da membrana interna do pré-esporo. O facto de esta membrana continuar susceptível à acção dos solventes orgânicos até à completa maturação das túnicas, apresentando até esta fase morfologia alterada, depõe contra o facto de ser ela uma barreira de resistência.

ii - O efeito protector de resistência aos agentes estudados poderia ser conferido por substâncias sintetizadas especificamente durante a esporulação. Tal papel, no caso dos solventes, não pode ser atribuído ao DPA, visto que os esporos $DPA^-$ são $OCT^R$ e $CLOR^R$; no caso da $Termo^R$, tal como referido, é provável que o DPA tenha uma acção deste tipo.

iii - A túnica externa poderá representar uma barreira à penetração dos solventes e aos efeitos do calor. No entanto, esta interpretação é posta em causa pelo facto de os esporos tratados com ureia-Me, que apresentam uma túnica externa desorganizada, continuarem $CLOR^R$ e $Termo^R$.

iv - Uma barreira do tipo referido atrás pode ser constituída pelo córtex e túnica interna no que respeita à resistência aos solventes orgânicos, visto que estas estrutras, em contraste com a túnica externa, permanecem intactas após o tratamento com ureia-Me. A integridade do exosporo, após este tratamento, em células na fase V não lhe confere papel de resistência, visto que, nesta altura ele é ainda descontínuo.

v - A aquisição de continuidade pelo exosporo na fase VI, coincidindo com a aquisição da resistência ao TCA e ao aquecimento, su-

gere que ele pode ter papel determinante como barreira contra estes agentes. A este respeito são significativas as observações de Gould e col. (106) de que os esporos de B. cereus, tratados com agentes redutores, conservam a sua Termo$^{R}$.

É evidente que embora estas hipóteses sejam consideradas separadamente para facilidade de análise, os mecanismos atribuídos a cada uma delas devem interactuar durante a esporulação que é um processo dinâmico e contínuo.

## 2. ESPORULAÇÃO DAS MUTANTES DPA$^{-}$

Tem sido estabelecida uma correlação entre a Termo$^{R}$ e a síntese do DPA ( 124, 147), aliás reforçada pelo facto de terem sido isoladas estirpes DPA$^{-}$ termo-sensíveis (327 ). A obtenção de mutantes DPA$^{-}$ produzindo esporos Termo$^{R}$ ( 120, 342) tem posto em causa a correlação DPA/aquecimento.

As estirpes CB22 e AB12 do Bacillus subtilis, em meios de cultura líquidos, não produzem quantidades normais de DPA, produzindo esporos CLOR$^{R}$ Termo$^{S}$. As estirpes CB22 e AB12 incorporam DPA adicionado externamente ao meio de cultura, durante as fases exponencial ou estacionária, adquirindo então a Termo$^{R}$. Não têm sido descritas mutantes de Bacillus subtilis com estas características. Sebald descreve uma mutante do Clostridium histolyticum com propriedades semelhantes (260 ). Fukuda & Gilvarg ( 95) isolaram uma mutante de Bacillus megaterium, afectada na produção da enzima responsável pela síntese do ácido dihidrodipicolínico, que requer também a adição de DPA para atingir a resistência ao calor.

Estudadas as condições de incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$, verificámos que existe uma correlação entre a quantidade de DPA incorporada e a $Termo^R$, provando-se a implicação directa deste composto na aquisição daquela resistência. Dada a localização do DPA no citoplasma esporal (158) poderá admitir-se ser esse o seu local de síntese, mas as condições de incorporação de DPA nos esporos das estirpes CB22 e AB12 sugerem-nos que este composto é sintetizado no esporângio. Esta hipótese está de acordo com os resultados obtidos por Andreoli e col. (7).

A adição de DPA ao meio de cultura e a sua incorporação no citoplasma dos esporos $DPA^-$ implica que este composto tem de atravessar as membranas do esporângio e pré-esporo. Isto pode explicar a demora até uma concentração normal por incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$ e as necessidades energéticas envolvidas neste processo.

A constatação morfológica de que os esporos $DPA^-$ têm um citoplasma visualizável que após a incorporação de DPA já não o é, parece atribuir a este composto responsabilidade na dificuldade do processo fixativo, que os nossos dados parecem mostrar ser devido a competição directa com o $OsO_4$. Esta interpretação é corroborada pela boa visualização dos ribossomas no citoplasma dos esporos $DPA^-$.

A incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$ parece ser independente da acumulação de $Ca^{++}$, o que aliás se verifica nas mutantes $DPA^+$ (205).

As estirpes CB22 e AB12 têm um comportamento análogo ao das estirpes selvagens até à $CLOR^R$, inclusivé. No entanto, as experiên-

cias cinéticas mostram que a aparição das resistências é mais lenta do que nas estirpes selvagens. Este atraso na esporulação também foi confirmado morfologicamente à microscopia electrónica e o número significativo de células nas fases II, III e IV foram observadas entre $t_8$ e $t_{32}$.

A localização da mutação $DPA^-$ foi determinada (24) e o fenótipo das estirpes $DPA^-$ sugere que a síntese do DPA pode ser um dos últimos acontecimentos da sequência pleiotrópica.

## 3. ESPORULAÇÃO DAS MUTANTES DECADENTES

A estirpe DB16 e um grupo de 8 mutantes com fenotipo semelhante foram caracterizadas quanto à cinética morfológica da sua esporulação e quanto à resistência aos vários agentes químicos e físicos usados neste estudo. Esta resistência foi estudada em células colhidas num tempo que para a estirpe selvagem corresponderia ao termo do processo esporulativo ($t_{24}$). Os estudos morfológicos mostraram que para estas estirpes, de um modo geral, a frequência de células que atinge cada uma das fases diminui ao longo do processo esporulativo, embora esses decréscimos de frequência sejam mais marcados em fases diferentes para as diferentes estirpes; todas elas, no entanto, apresentam uma deficiente síntese ou maturação do córtex. Estes dados correlacionaram-se com os resultados dos estudos de resistência aos vários agentes: o número de células viáveis, após cada tratamento, é tanto menor quanto mais tardio é, na esporulação normal, o aparecimento da correspondente resistência. Também relativamente a estes tratamentos se verificou heterogeneidade entre estas mutantes de fenótipo geral semelhante, isto é, a redução do número de viáveis após cada tratamento não é

uniforme. Perante estes dados seria tentador estabelecer uma correspondência entre as várias fases morfológicas e a aquisição sequencial das várias resistências, correlacionando, para cada mutante, as frequências de células nas várias fases com as frequências de células resistentes aos vários tratamentos. No entanto, os nossos dados sugerem que a falta de aquisição de uma resistência pode ser devida não apenas à impossibilidade de uma dada estirpe atingir a fase correspondente a essa resistência mas sim ao facto de as células atingirem essa fase com componentes anormais (que não confeririam resistência). Assim, por exemplo, para as mutantes FA10 e FA9, 1/3 das células atingem as fases V-VI mas, dentre estas, apenas 1% são $CLOR^R$ e 0,1% são $Termo^R$. A impossibilidade para estas mutantes de correlação directa entre as várias fases morfológicas e a aquisição das várias resistências, não impede uma interpretação genérica do seu fenótipo decadente: nestas mutantes o mecanismo regulador da transição entre as várias fases parece ser menos eficiente tanto quanto ao tempo de actuação (a sequência é mais lenta), como quanto ao número de células em que ele ocorre (há "decadência" da frequência das células nas sucessivas fases). Nestas mutantes, como é natural, os efeitos destas alterações do mecanismo regulador parecem poupar os acontecimentos iniciais do processo esporulativo, como a síntese de proteases, que é normal, afectando predominantemente os acontecimentos tardios (síntese de DPA e lise do esporângio).

## 4. ESPORULAÇÃO DAS MUTANTES Sco

O estudo morfológico e bioquímico das numerosas mutantes esporulativas tem ajudado a estabelecer a sequência da expressão da informação dos genes responsáveis pelo processo esporulativo (21). No entanto a natureza dos mecanismos reguladores que controlam essa sequência permanecem obscuros.

O numeroso grupo de mutantes por nós estudado, em que as células estão bloqueadas numa dada fase morfológica (permanência nessa fase por tempo excessivo, em relação às estirpes $Spo^+$), comporta-se de um modo bastante peculiar: desrepressão na produção de proteases, aparecimento de estruturas anormais e atraso na formação de esporos $Termo^R$.

A cinética da esporulação das mutantes EV15 (ScoA1) e EC21 (ScoB2) mostra que estas mutantes se acumulam principalmente nas fases III e V, surgindo a formação de esporos $Termo^R$ com grande atraso relativamente às estirpes selvagens. Os estudos cinéticos que efectuámos revelaram que as mutantes EV15 e EC21 sintetizam durante mais tempo produtos que, na estirpe selvagem, surgem nas fases iniciais do processo esporulativo levando a acumulação de quantidades supranormais desses produtos. Isto foi verificado não só com a síntese de proteases extracelulares e de fosfatases, que na estirpe selvagem são sintetizadas, respectivamente, entre $t_0$-$t_3$ (23) e entre $t_2$-$t_3$ (108), mas também com a produção de precursores proteicos das túnicas esporais. Estes precursores, que na estirpe selvagem são sintetizados também entre $t_2$-$t_3$ (328), acumulam-se no citoplasma do esporângio das mutantes estudadas

sob a forma de inclusões que morfologicamente se puderam caracterizar como material de tipo túnica interna e externa.

Experiências de transformação e transdução demonstraram que estas características das mutantes ScoA1 (EV15) são transmitidas simultaneamente indicando que são, provavelmente, o resultado de mutação num só gene (22), o qual aliás foi localizado (22).

Os efeitos pleiotrópicos destas mutações (ScoA1 e ScoB2), por um lado, e o atraso (bloqueio) que elas acarretam no processo esporulativo levam-nos a interpretá-las como ocorrendo num gene com papel regulador na transição da fase III para a fase IV.

O comportamento das mutantes ScoC é ligeiramente diferente do das mutantes acabadas de referir e isso pode ser devido ao efeito directo da mutação na produção de proteases (22).

Uma situação análoga à descrita para as mutantes ScoA1 e ScoB2, embora inversa, ocorre com o Bacillus thuringiensis. Nesta espécie a estirpe selvagem produtora de cristais parasporais exibe, simultaneamente, um bloqueio na fase III, enquanto que mutantes desta espécie não produtoras de cristal não revelam qualquer atraso na transição das fases III e IV (160).

# V - CONCLUSÕES

1. A evolução do processo esporulativo não é sincronizada e num dado momento coexistem células nas diferentes fases morfológicas.

2. A heterogeneidade da população no processo esporulativo tem a sua origem antes de as células atingirem a fase III.

3. O alongamento do material nuclear não deve ser considerado um marcador da esporulação bacteriana.

4. A formação do septo esporulativo e a sua evolução para a formação do pré-esporo ocorre rapidamente.

5. A presença de protuberâncias parietais, precedendo a formação do septo esporulativo não ocorre sistematicamente.

6. Presença de material parietal, semelhante ao da camada interna da parede celular do esporângio, entre as duas membranas do septo esporulativo.

7. A técnica RK parece influenciar a formação dos mesossomas nas células em esporulação.

8. É sugerida uma ligação entre a ausência de ribossomas no citoplasma do esporângio contíguo ao pré-esporo e a síntese de precursores proteicos das túnicas esporais.

9. Baixa frequência de células na fase IV, dado o aparecimento quase simultâneo do córtex e dos primórdios do exosporo e da túnica interna.

10. O esporângio parece ser o responsável pela organização das túnicas esporais.

11. A formação das túnicas esporais parece ser independente da do córtex.

12. O citoplasma esporal incluso entre a membrana externa do pré-esporo e as túnicas, poderá participar na organização da túnica interna.

13. A membrana externa do pré-esporo poderá não ser desorganizada totalmente durante o processo esporulativo, ficando aderente à túnica interna.

14. O DPA parece ser um dos responsáveis pela má definição morfológica do citoplasma dos esporos maduros, quando fixados pela técnica RK.

15. A túnica externa do esporo é constituída por sub-camadas.

16. Existência de exosporo aderente à túnica externa do esporo, nos esporos de B. subtilis.

17. Evolução independente da membrana externa do pré-esporo e do exosporo.

18. A resistência dos esporos ao xilol parece estar correlacionada com o aparecimento do córtex.

19. A resistência ao tolueno coincide com a maturação do córtex e formação da túnica interna e exosporo.

20. As resistências ao octanol e clorofórmio surgem com a formação da túnica externa.

21. A resistência ao TCA surge com a maturação das túnicas.

22. A síntese de DPA parece ser responsável pelo aparecimento da termo-resistência dos esporos.

23. O DPA parece ser sintetizado no esporângio.

24. A incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$ parece ser independente da acumulação de $Ca^{++}$.

25. A incorporação de DPA nos esporos $DPA^-$ não requer síntese proteica, mas requer energia.

26. A utilização de solventes orgânicos e outros agentes permite uma boa caracterização das mutantes esporulativas.

27. Os precursores proteicos das túnicas esporais são sintetizados entre $t_0$-$t_3$ e a acumulação de células na fase III leva à acumulação de quantidades supranormais desses produtos.

28. Uma mutação simples nos genes esporulativos têm efeitos pleiotrópicos.

1 - The development of the sporulation process is not synchronized, cells in different stages coexisting at a given time.

2 - The heterogeneous character of the population engaged in the sporulation process begins before stage III.

3 - The elongation of the nuclear material should not be considered as a marker of the bacterial sporulation.

4 - Both the formation of the sporulation septum, and its evolution toward the formation of the forespore occur quickly.

5 - The presence of the wall spikes before the formation of the sporulation septum does not occur in all cases.

6 - Wall material, similar to that seen at the inner part of the sporangium cell wall, is present between the two membranes of the sporulation septum.

7 - The RK technique seems to influence the formation of the mesosomes in sporulating cells.

8 - A relationship between the absence of ribosomes in cytoplasm of the sporagium contiguous to the forespore, and the synthesis of the protein precursors of the spore coats, is suggested.

9 - There is a low frequency of cells at stage IV due to the almost simultaneous appearance of the cortex, exosporium primordia and inner coat.

10 - The sporangium seems to be the responsible for the organization of the spore coats.

11 - The formation of the spore coats seems to be independent from

that of the cortex.

12 - The spore cytoplasm between the forespore outer membrane and the coats may participate in the organization of the inner coat.

13 - The outer forespore membrane may not be completely disorganized during the sporulation process, remaining adherent to the inner coat.

14 - The DPA seems to be one of the factors responsible for the poor morphological definition of the cytoplasm of the mature spores after the RK fixation.

15 - The outer spore coat has several layers.

16 - There is an exosporium adherent to the outer coat of B. subtilis spores.

17 - The evolution of the outer forespore membrane is independent from that of the exosporium.

18 - The spore resistance to xylol seems to be related to the cortex appearance.

19 - The resistance to toluene coincides with both the cortex maturation and the formation of the inner coat and exosporium.

20 - The resistance to octanol and chloroform appear with the formation of the outer coat.

21 - The resistance to TCA appears with the coat maturation.

22 - The DPA synthesis seems to be responsible for the appearance of the heat-resistance of the spores.

23 - The DPA seems to be synthesized in the sporangium.

24 - The DPA incorporation into the $DPA^-$ spores seems to be independent from the $Ca^{++}$ accumulation.

25 - The DPA incorporation into the $DPA^-$ spores requires energy but not protein synthesis.

26 - The use of organic solvents and of other agents allows a good characterization of sporulation results.

27 - The protein precursors of the spore coats are synthesized between $t_0$-$t_3$ and the accummulation of stage III cells leads to the accummulation of abnormally high amounts of such products.

28 - A single mutation in sporulation genes has pleiotropic effects.

# VI - BIBLIOGRAFIA

1. ALDERTON, G. & SNELL, N. 1963. Base exchange and heat resistance in bacterial spores. Biochem. Biophys. Res. Commun. 10:139-143.

2. ALWOOD, M.C. & HUGO, W.B. 1971. The leakage of cations and aminoacids from Staphylococcus aureus exposed to moist heat, phenol and dinitrophenol. J. Appl. Bacteriol., 34:369-375.

3. ANAGNOSTOPOULOS, C. 1977. Alkaline phosphatase formation in B. subtilis. Fed. Proc., 19:48.

4. ANATHASWAMY, H.N. 1977. Release of periplasmic enzymes from Escherichia coli by penicillin-ethylenediaminetetraacetate treatment. J. Bacteriol., 131:710-712.

5. ANDERSON, W.A. & ANDRÉ, J. 1968. The extraction of some cells components with pronase and pepsin from thin sections of tissue embedded in an Epon-araldite mixture. J. Microscopie, 7:343-354.

6. ANDREOLI, A.J., SUEHIRO, S. & SAKIYAMA, D. 1973. Regulation and localization of enzymes in forespore and mother cell compartments of Bacillus cereus. Coll. int. CNRS, 87-88.

7. ———, SARANTO, J., BAECKER, P.A., SUEHIRO, S., ESCAMILLA, E. & STEINER, A. 1975. Biochemical properties of forespores isolated from Bacillus cereus. In: "Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds., Amer.Soc. Microbiol., 418-424.

8. ANGUS, T.A. 1954. A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature, 173:545-546.

9. ——— 1956. Extraction, purification, and properties of Bacillus sotto toxin. Can. J. Microbiol., 2:416-426.

10. ARONSON, A.I. & FITZ-JAMES, P.C. 1968. Biosynthesis of bacterial spore coats. J. Mol. Biol., 33:199-212.

11. ——— & ——— 1976. Structure and morphogenesis of the bacterial spore coat. Bact. Rev., 40:360-402.

12. ———, HENDERSON, E. & TINCHES, A. 1967. Participation of the lysin pathway in dipicolinic acid synthesis in Bacillus cereus T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 26:454-460.

13. ——— & HORN, D. 1972. Characterization of the spore coat protein of Bacillus cereus T. In 'Spores V", Halvorson, H.O., R. Hanson & L.L. Campbell, Amer. Soc. Microbiol., 19-22.

14. AUBERT, J.P. & MILLET, J. 1965. Induction de la β-galactosidase chez Bacillus megaterium au cours de la sporulation. Coll. int. Centre Nat. Rech. Sci., 124:545-551.

15. ——— , RYTER A. & SCHAEFFER, P. 1968. Comportement de l'ADN des bactéries et des spores au cours d'un cycle sporal chez B. subtilis. Ann. Inst. Past., 115:989-1007.

16. AVERY, O.T., MACLEOD, C.M. & MCCARTY, M. 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. J. Exptl. Med., 79:137-158.

17. BACH, M.L. & GILVARG, C., 1966. Biosynthesis of dipicolinic acid in sporulating Bacillus megaterium. J. Biol. Chem., 241:4563-4564.

18. BAILLIE, A., THOMSON, R.O. BOTTY, I. & WALKER, P.D. 1967. Some preliminary observations on the location of esterases in Bacillus cereus. J. Appl. Bacteriol., 30: 312-316.

19. BALASSA, G. 1968. Renouvellement des ARN et des proteines au cours de la sporulation de Bacillus subtilis. An. Inst.

Past., 110:316-346.

20. BALASSA, G. 1969. Biochemical genetics of bacterial sporulation. I - Unidirectional pleiotropic interactions among genes controlling sporulation in Bacillus subtilis. Molec. Gen. Genetics, 104:73-103.

21. ——— 1971. The genetic control of spore formation in Bacilli. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 56:99-192.

22. ———, DOD, B., JEANNODA, V. MILHAUD, P. ZUCCA, J. SOUSA, J.C.F. & SILVA, M.T. 1978. Pleiotropic control mutations affecting the sporulation of Bacillus subtilis. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 129B:537-549.

23. ———, ———, MILHAUD, P. SERRE,A.,SILVA, M.T.& SOUSA J.C.F. 1974. The genetic control of late sporulation events in mutants of Bacillus subtilis: preliminary results. In: "Spore Research 1973" A.N. Barker, G.W.Gould & J. Wolf, eds. Acad. Press, 73-86.

24. ———, MILHAUD, P., RAULET, E., SILVA, M.T. & SOUSA, J.C.F. 1979. A Bacillus subtilis mutant requiring dipicolinic acid for the development of heat-resistant spores. J.Gen. Microbiol., 110:365-379.

25. ———, ———, SOUSA, J.C.F. & SILVA, M.T. 1979. Decadent sporulation mutants of Bacillus subtilis. J.Gen. Microbiol. 110 381-392.

26. ——— & YAMAMOTO, T. 1970. A Bacillus subtilis mutant with heat-sensitive but chloroform-resistant spores. Microbios, 5:73-76.

27. ——— & ——— 1970. Biochemical genetics of bacterial sporula-

tion. III - Correlation between morphological and biochemical properties of sporulation mutants. Molec. Gen. Genetics, 108:1-22

28. BAYEN, H. FREHEL, C., RYTER, A. & SEBALD, M. 1967. Étude cytologique de la sporulation chez Clostridium histolyticum. Souche sporogène et mutants de sporulation. Ann. Inst. Pasteur, 113:163-173.

29. BEAMAN, T.C., PANKRATZ, H.S. & GERHARDT, P. 1971. Paracrystalline sheets reaggregated from solubilized exosporium of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 107:320-324.

30. ———, ——— & ———. 1972. 1972. Ultrastructure of the exosporium and underlying inclusions in spores of Bacillus megaterium strains. J. Bacteriol., 109:1198-1209.

31. BECHTEL, D.B. & BULLA, L.A. 1976. Electron microscope study of sporulation and parasporal crystal formation in Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 127:1472-1481.

32. BENDIS, I.K. & SHAPIRO, L. 1973. Deoxyribonucleic acid-dependent ribonucleic acid polymerase of Caulobacter crescentus. J. Bacteriol., 115:848-857.

33. BERNHEIMER, A.W. & AVIGAD, L.S. 1970. Nature and properties of a cytolytic agent produced by Bacillus subtilis. J. Gen. Microbiol., 61:361-369.

34. BERNLOHR, R.W., MADDOX, M.K. & GOLDBERG, N.D. 1974. Cyclic guanosin 3':5'-monophosphate in Escherichia coli and Bacillus lichenformis. J. Biol. Chem., 249:4329-4331.

35. ——— & NOVELLI, G.D. 1960. Uptake of bacitracin by sporangia and its incorporation into the spores of Bacillus licheni-

formis. Biochim. Biophys. Acta, 41:541-543.

36. BHATTACHARYYA, P. & BOSE, S.K. 1967. Aminoacid composition of cell wall and spore coat of Bacillus subtilis in relation to Mycobacillin production. J. Bacteriol., 94:2079-2080.

37. BIRDSELL, D.C., DOYLE, R.J. & MORGENTERN, M. 1975. Organization of teichoic acid in the cell wall of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 121:726-734.

38. BONSEN, P.P.M., SPUDICH, J.A. NELSON, D.L. & KORNBERG, A.1969. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. XII - A sulfonic acid as a major sulfur compound of Bacillus subtilis spores. J. Bacteriol., 98:62-68.

39. BRENNER, M.,GRAY, E. & PAULUS, H. 1964. The relation of polymyxin B to the spore coat of Bacillus polymyxa. Biochim. Biophys. Acta, 90:401-403.

40. BREVET, J. 1976. Evolution of the transcription complex during sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 125:74-83.

41. BROWN, W.C. & YOUNG, F.E. 1970. Dynamic interaction between cell wall polymers, extracellular proteases and autolytic enzymes. Biochem. Biophys. Res. Commun., 38:564-568.

42. BULLA, L.A., KRAMER, K.J. & DAVIDSON, L.I. 1977. Characterization of the entomocidal parasporal crystal of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol.,130:375-383.

43. ———, RHODES, R.A. & JULIAN, G.S. 1975. Bacteria as insect pathogens. Ann. Rev. Microbiol., 29:163-190.

44. BURGER, M.M. 1966. Teichoic acids: antigenic determinants, chain, separation and their location in the cell wall. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 56:910-917.

45. BURGESS, R.R. 1971. RNA polymerase. Ann. Rev. Biochem., 40: 711-740.

46. BUTTON, D., ARCHIBALD, A.R. & BADDILEY, J. 1966. The linkage between teichoic acid and glucosaminopeptide in the wall of a strain of Staphylococcus lactis. Biochem. J. 99: 110-140.

47. CAIN, A.K. & NESTER, E.W. 1973. Ribonucleic acid polymerase in Allomyces arbuscula. J. Bacteriol. 115:769-776.

48. CASHEL, M. & FREESE, E. 1964. Excretion of alkaline phosphatase by Bacillus subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 16:541-544.

49. CHASIN, L.A. & SZULMAJSTER, J. 1969. Enzymes of dipicolinic acid biosynthesis in Bacillus subtilis. In: "Spores IV," L.L. Campbell, ed., Amer. Soc. Microbiol., 133-147.

50. CHELDELIN, V.H. 1961. Evaluation of metabolic pathway. In: "Metabolic Pathways in Microorganisms," E.R. Squibb Lectures on Chemistry of Microbial Products, Wiley, N.Y., pag.

51. CHURCH, B.D. & HALVORSON, H.O. 1957. Intermediate metabolism of aerobic spores. I. Activation of glucose oxidation in spores of Bacillus cereus var. terminalis. J. Bacteriol. 73:470- 476.

52. CLARK, V.L. & BERNLOHR, R.W. 1972. Catabolic repression and the enzymes regulating cyclic adenosine 3':5'-monophosphate and cyclic guanosine 3':5'-monophosphate level in Bacillus licheniformis. In: "Spores V," H.O. Halvorson, R. Hanson & L.L. Campbell, eds., Amer. Soc. Microbiol., 167-173.

53. COHN, F. 1876. Beitr. Biol. Bfl., 2:249. Citado por Fitz-James, P.C. & Young, E. 1969. Morphology of sporulation In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould & A.Hurst, eds. Academic Press, 39-72.

54. COLEY, J. DUCKWORTH, M. & BADDILEY, J. 1972. The occurrence of lipoteichoic acids in the membranes of Gram positive bacteria. J. Gen. Microbiol. 73:587-591.

55. COOKSEY, K.E. 1971. The protein crystal toxin of Bacillus thuringiensis biochemistry and mode of action. In:"Microbial Control of Insect and Mites"

56. CORDONNIER, C. & BERNARDI, G. 1965. Location of Escherichia coli endonuclease I, Biochem. Biophys. Res. Commun., 20:555-559.

57. CROSS, T. 1968. Thermophilic actinomycetes. J. Appl. Bacteriol., 31:36- 53.

58. ——— & ATWELL, R.W. 1965. Actinomycetes spores. In:"Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow and H.L. Sadoff, Amer. Soc. Microbiol., 3-14.

59. ——— & GOODFELLOW, M. 1973. Taxomony and classification of the Actinomycetes. In:"Actinomycetales", G. Sykes & F.A. Skinner, eds., Academic Press, 11-112.

60. ———, WALKER, P.D. & GOULD, G.W. 1969. Thermophilic actinomycetes producing resistant endospores. Nature, 220:352--354.

61. CURRAN, H.R., BRUNSTETTER,B.C. & MYERS,A.T. 1943. Spectrochemical analysis of vegetative cells and spores of bacteria. J. Bacteriol., 45:485-494.

62. DANCER, B.N. & MANDELSTAM, J. 1975. Production and possible function of serine protease during sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 121:406-410.

63. ——— & ——— 1975. Criteria for categorizing early biochemical events occurring duraing sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 121: 411-415.

64. DICIOCCIO, R.A. & STRAUSS, N. 1973. Patterns of transcription in Bacillus subtilis during sporulation. J. Mol. Biol., 77:325-336.

65. DECKER, S., MAIER, S. 1975. Fine structure of mesosomal involvement during Bacillus macerans sporulation. J. Bacteriol., 121:363-372.

66. DELAFIELD,F.P. SOMMERVILLE, H.J. & RITTENBERG, S.C. 1968. Immunological homology between crystal and spore protein of Bacillus thuringiensis. J. Bacteriol., 96:713-720.

67. DELAPORTE, B. 1950. Genetics,3:1. Citado por Fitz-James, P.C. & Young E. 1969.In:"The Bacterial Spore", G.W.Would & A. Hurst, eds. Academic Press, pag. 39-72.

68. DEUTSCHER, M.P. & KORNBERG, A. 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VIII Patterns of enzyme development during growth and sporulation of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem., 24:4653-4660.

69. DOD, B. BALASSA, G. RAULET, E. & JEANNODA, V. 1978. Spore control (Sco) mutations in Bacillus subtilis. II. Sporulation and the production of extracellular proteases and α-amylase by Sco mutants. Molec. Gen. Genetics, 163:45-56.

70. DOI, H.R. & IGARASHI, R.T. 1964. Genetic transcription during morphogenesis. Proc. Nat.Acad.Sci. USA, 52:755-762.

71. ——— & LEIGHTON, T.J., 1972. Regulation during initiation and subsequent stages of bacterial sporulation. In"Spores V", H.O. Halvorson, R. Hanson & L.L. Campbell, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 225-232.

72. DONNELLAN, J.E. & SETLOW, R.B. 1965. Thymine photoproducts but not thymine dimers found in ultraviolet-irradiated bacterial spores. Science, 149:308-310.

73. DUCKWORTH, M. ARCHIBALD, A.R. & BADDILEY, J. 1972. The location of N-acetyl-galactosamine in the walls of Bacillus subtilis 168. Biochem. J. 130:691-696.

74. DUNCAN, C.L., STRONG,D.H. & SEBALD, M. 1972. Sporulation and enterotoxin production by Clostridium perfringens. J. Bacteriol., 110:378-391.

75. DWORKIN, M. 1966. Biology of the myxobacteria. Ann. Rev. Microbiol. 20:75-106

76. EHREMBERG, E.G. 1838. Die infusionstierchen als vollkomene organismen. Leipzig. Citado por Fitz-James, P.C. & Young, E. 1969. Morphology of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould & Hurst, eds. Acad. Press. 39-72.

77. EISENSTADT, E. & SILVER, S. 1972. Calcium transport during sporulation in Bacillus subtilis. In:"Spores V," H.O. Halvorson, R. Hanson & L.L. Campbell, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 180-190.

78. ELLAR, D.J. & LUNDGREN, D.G. 1966. Fine structure of sporulation in Bacillus cereus grown in a chemically defined medium. J. Bacteriol., 92:1748-1764.

79. ——— & POSTGATE, J.A. 1974. Characterization of forespores isolated from Bacillus megaterium at different stages of development into mature spores. In:"Spore Research 1973," A.N. Barker, G.W. Gould & J. Wolf, eds., Academic Press, p. 21-40.

80. ENSIGN, J.C. 1978. Formation, properties, and germination of Actinomycete spores. Ann. Rev. Microbiol., 32:185-220.

81. FELIX, J., & LUNDGREN, D.G. 1972. Some membrane characteristics of Bacillus cereus during growth and sporulation. In"Spores V," H.O. Halvorson, R.Hanson & L.L. Campbell, eds.,Amer. Soc. Microbiol., p. 35-44.

82. FITZ-JAMES, P.C. 1960. Participation of the cytoplasmic membrane in the growth and spore formation of Bacilli. J. Biophys. Biochem. Cytol., 8:507-528.

83. ——— 1962. Morphology of spore development in Clostridium pectinovorum. J.Bacteriol., 84:104-114.

84. ——— 1962. The initial formation of parasporal inclusions in Bacilli. Vth Int. Cong. Electronmicroscopy.

85. ——— 1964. Sporulation in protoplasts and its dependence on prior forespore development. J. Bacteriol., 87:667-675.

86. FITZ-JAMES, P.C. 1965. Spore formation in wild and mutant strains of Bacillus cereus and some effects of inhibitors. Coll. int. CNRS. 124:529-544.

87. ——— & HANCOCK, R. 1965. The initial structural lesion of penicillin action in Bacillus megaterium. J. Biophys. Biochem. Cytol., 26:657-667.

88. ——— & YOUNG, E. 1969. Morphology of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould & A. Hurst,eds., Academic Press, p. 39-72.

89. FORTNAGEL, P. BERGMAN, R. HAFEMANN, B. & LENGELSEN, C. 1975. Structural and functional alterations of Bacillus subtilis ribosomes. In:"Spores VI",P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds., Amer. Soc. Microbiol., p.301--306.

90. FREER, J.M. & LEVINSON, H.S. 1967. Fine structure of Bacillus megaterium during microcycle sporogenesis. J. Bacteriol., 94:441-457.

91. FREESE, E. 1972. Sporulation of Bacilli. A model of cellular differentiation. Curr. Top. Develop. Biol., 7:85-124.

92. ——— & CASHEL, M. 1965. Initial stages of germination. In: 'Spores III", L.L. Campbell & H.O. Halvorson, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 144-151.

93. FRÉHEL, C. BEAUFILS, A.M. & RYTER, A. 1971. Étude au microscope électronique de la croissance de la paroi chez B. subtilis et B. megaterium. Ann. Inst. Pasteur, 121:139--148.

94. FRIEBEN, W.R. & DUNCAN, C.L. 1973. Homology between enterotoxin protein and spore structural protein in Clostridium perfringens type A. Eur. J.Biochem., 39:393-401.

95. FUKUDA, A. & GILVARG, C. 1968. The relationship of dipicolinate and lysine biosynthesis in Bacillus megaterium. J. Biol. Chem., 243:3871-3876.

96. GAREN, A. & ECHOLS, H. 1962. Properties of two regulating genes for alkaline phosphatase. J. Bacteriol., 83:297--300.

97. ——— & LEVINTHAL, C. 1960. A fine structure genetic and chemical study of the enzyme alkalie phosphatase of Escherichia coli. I. Purification and characterization of alkaline phosphatase. Biochim. Biophys. Acta, 38:470-483.

98. GERHARDT, P., PANKRATZ, H.S. & SCHERRER, R. 1976. Fine structure of the Bacillus thuringiensis spore. Appl. Env. Microbiol., 32:438-440.

99. ——— & RIBI, E. 1964. Ultrastructure of the exosporium enveloping spores of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 88:17--74.

100. GIESBRECHT, P., 1964. Uber oberflachenstrukturen von sporen der gattung Bacillus. Naturwissenchaften, 51:46.

101. GLASER, L. IONESCO, H. & SCHAEFFER, P. 1966. Theichoic acids as components of a specific phage receptor in Bacillus subtilis. Biochim. Biophys. Acta, 124:415-417.

102. GLEN, A.R. & MANDELSTAM, J. 1971. Sporulation in Bacillus subtilis 168. Comparison of alkaline phosphatase from

sporulating and vegetative cells. Biochem. J. 123:129--138.

103. GOLDMAN, M. & BLUMENTHAL, H.J. 1963.Pathways of glucose catabolism in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 86:303--311.

104. GOULD, G.W. 1969. Germination. In:'The Bacterial Spore'! G.W. Gould, A. Hurst, eds, Academic Press,p. 397-444.

105. ——— & DRING, G.J. 1974. Mechanisms of spore heat resistance. Adv. Microbiol. Physiol., 11:137-144.

106. ——— & HITCHINS, A.D. 1963. Sensitization of bacterial spores to lysozyme and to hydrogen peroxide with agents which rupture disulphide bonds. J. Gen. Microbiol., 33: 413-423.

107. GRANT, S.J. & BULLA, L.A.J. 1971. Physiology of sporeforming bacteria associated with insects. IV. Glucose catabolism in Bacillus larvae. J. Bacteriol., 108:828-834.

108. GRANT, W.D. 1974. Sporulation in Bacillus subtilis 168. Control of synthesis of alkaline phosphatase. J. Gen. Microbiol., 82:363-369.

109. GRELET,N. 1957. Growth limitation and sporulation. J. Appl. Bact. 20:315-324.

110. GRISHAM, C.M. & BARNETT, R.E. 1973. The effects of long-chain alcohols on membrane lipids and the $(Na^+ + K^+)$-ATPase. Biochim. Biophys. Acta, 311:417-422.

111. GUHA, S. & SZULMAJSTER, J. 1977. Specific alteration of the 30S ribosomal subunits of Bacillus subtilis during sporulation. J. Bacteriol., 131:866-871.

112. HAAVIK, H.I. & THOMASSEN, S. 1973. A bacitracin-negative mutant of Bacillus licheniformis which is able to sporulate. J. Gen. Microbiol., 76:451-454.

113. HAGEMAN, J.H. & CARLTON, B.C. 1973. Effects of mutational loss of specific intracellular proteases on the sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 114:612-617.

114. HALVORSON, H.O. 1965. Sequential expression of biochemical events during intracellular differentiation. XVth Symp. Soc.Gen. Microbiol., pp. 343-368.

115. ——— & SRINIVASAN, V.R. 1964. Biochemical changes accompanying sporogenesis. Natick Symp. Food Sci.

116. HANSON, R.S. 1975. Role of small molecules in regulation of gene expression and sporogenesis in Bacilli. In "Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds. Amer. Soc.Microbiol., pp. 318-326.

117. ———, BLICHARSKA, J. & SZULMAJSTER, J. 1964. Relationship between the tricarboxylic acid cycle enzymes and sporulation of B. subtilis. Biochem. Biophys. Res. Commun., 17:1-7.

118. ——— & COX, D.P. 1967. Effect of different nutritional condition on the synthesis of tricarboxylic acid cycle enzymes. J. Bacteriol., 93:1777-1787.

119. ———, CURRY, N.V., GARDNER, J.V. & HALVORSON, H.O. 1972. Mutants of Bacillus cereus strain T that produce thermoresistant spores lacking dipicolinate and have low levels of calcium. Can.J. Microbiol., 18:1139-1143.

120. ———, ——— & PATT, T. 1971. Thermoresistant spores of Bacillus cereus that lack dipicolinate. Bacterial Proc.63

121. HANSON, R.S. PETERSON, J.A. & YOUSTEN, A.A. 1970. Unique biochemical events in bacterial sporulation. Ann. Rev. Microbiol., 24:53-90.

122. ———, SRINIVASAN, V.R. & HALVORSON, H.O. 1961. Citrate formation in B. cereus strain T. Biochem. Biophys. Res. Commun., 5:457-460.

123. ———, ——— & ——— 1963. Biochemistry of sporulation. I. Metabolism of acetate by vegetative and sporulating cells. J. Bacteriol., 85,451-460.

124. HASHIMOTO, T. BLACK, S.H. & GERHARDT, P. 1960. Development of fine structure, thermostability and dipicolinate during sporogenesis in a Bacillus. Can. J. Microbiol., 6:203-212.

125. ——— & CONTI, S.F. 1971. Ultrastructural changes associated with activation and germination of Bacillus cereus T spores. J. Bacteriol., 105:361-368.

126. HEDEN, C & WICKOFF, W.G. 1949. The electron microscopy of heated bacteria. J. Bacteriol., 58:153-160.

127. HERNDON, S.E. & BOTT, K.F. 1969. Genetic relationship between Sarcina ureae and members of the genus Bacillus. J. Bacteriol., 97:6-12.

128. HIGGINS, M.L. & SHOCKMAN, G.D. 1970. Model for cell wall growth of Streptococcus faecalis. J. Bacteriol., 101:643--648.

129. ——— & ——— 1970. Early changes in the ultrastructure of Streptococcus faecalis after aminoacid starvation. J. Bacteriol., 103:244-254.

130. HIGGINS, M.L. & STOCKMAN, G.D. 1971. Prokariotic cell division with respect to wall and membrane. Crit. Rev. Microbiol., 1:29-71.

131. HIRAGI, T.K. TIJIMA, K. & KADATA, H. 1967. Hexagonal single crystal pattern from the spore coat of Bacillus subtilis. Nature, 215:154-155.

132. HITCHINS, A.D. 1975. Polarised relationship of bacterial spore loci to the "old" and "new" ends of sporangia. J. Bacteriol., 121:516-523.

133. HOENIGER, J.F.M. & HEADLEY, C.L. 1969. Ultrastructural aspects of spore germination and outgrowth in Clostridium sporogenes. Can. J. Microbiol., 15:1061-1065.

134. HOGANSON,D.A. & STAHLY, D.P. 1975. Control of dihydropicolinate synthase and aspartokinase during growth and sporulation of Bacillus cereus cells. In:"Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds. Amer. Soc. Microbiol., p. 367-374.

135. HOLT, S.C. GAUTHIER, J.J. & TIPPER, D.J. 1975. Ultrastructural studies of sporulation in Bacillus sphaericus. J. Bacteriol., 122:1322-1338.

136. ——— & LEADBETTER, E.R. 1969. Comparative ultrastructure of selected aerobic spore-forming bacteria: as a freeze--etching study. Bacteriol. Rev. 33:346-378.

137. HRANUEL, D. PIGGOT, P.J. & MANDELSTAM, J. 1974. Statistical estimate of the total number of operons specific for Bacillus subtilis sporulation. J. Bacteriol., 119:684-690.

138. HUGHES, R.C. 1970. Autolysis of isolated cell wall,of Bacillus licheniformis N.C.T.C. 6346 and Bacillus subtilis Marburg strain 168. Biochem. J. 119:849-860.

139. IDE,M. 1971. Adenyl cyclase of bacteria. Arch. Biochem. Biophys., 144:262-268.

140. JACOB, F. & MONOD, J. 1961. Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. J. Mol. Biol., 3:318-356.

141. ———, RYTER, A & CUZIN, F. 1966. On the association between the DNA and membrane in bacteria. Proc. Royal Soc., 164:267-278.

142. JANSSEN, F.W.,LUND, A.J. & ANDERSON, L.E. 1958. Colorimetric assay for dipicolinic acid in bacterial spores. Science, 127:26-27.

143. JENG, Y.H. & DOI, R.H. 1975. New transfer ribonucleic acid species during sporulation of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 121:950-958.

144. KALAKOUTSKII, L.V. & AGRE, N.S. 1976. Comparative aspects of development and differentiation in Actinomycetes. Bacteriol. Rev.,40:469-524.

145. KANEKO, I. MATSUSHIMA, H. 1973. Crystal-like structure in the sporulating cells of Bacillus subtilis 168. J. Elect. Microsc., 22:217-219.

146. KAWATA, T., INOVE, T. & TAKAGI, A. 1963. Electron microscopy of spore formation and germination in Bacillus subtilis. Jap.J.Microbiol., 7:23-42.

147. KAY, D. & WARREN, S.C. 1968. Sporulation in Bacillus subtilis. Morphological changes. Biochem. J. 109:819-824.

148. KEAY, L.& WILDI, B., 1979. Proteases of the Genus Bacillus. I. Neutral proteases. Biotech. Bioengineerin., 12:179--212.

149. KELLEMBERGER, E. 1953. Symp. on Bacterial Cytology,VIth Intern.Congr. Microbiol.,Rome,p.45. Citado por Fitz-James,P.C. & Young,E. 1969. In:"The Bacterial Spore",G.W.Would & A.Hurst,eds.Acad.Press,p.39-72.

150. KERJAN, P. 1973. Effect of proteases on RNA polymerase of Bacillus subtilis. Coll. int. CNRS, sobre "La Regulation de la Sporulation Microbienne", pp.38-40.

151. KOCH, R. 1876. Beitr. Biol., pfl.2:277. Citado por Fitz-James, P.C. & Young, E. 1969. Morphology of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W; Gould & A.Hurst, eds. Academic Press, pp. 39-72.

152. KORANSKY, J.R., ALLEN, S.D. & DOWELL, V.R. 1978. Use of ethanol for selective isolation of sporeforming microorganisms. Appl. Env. Microbiol., 35:762-765.

153. KORNBERG, A. 1960. Biologic synthesis of deoxyribonucleic acid. Science, 131:1503-1508.

154. ———, SPUDICH, J.A., NELSON, D.L. & DEUTSCHER, M.P. 1968. Origin of protein in sporulation. Ann.Rev.Biochem., 37: 51-77.

155. KRASIL'NIKOV, N.A., DUDA, V.L. & SOKOLOV, A.A. 1966. Protusions on the surface of spores of anaerobic bacteria of the genus Clostridium. Microbiology (URSS), 33:304-310.

156. LANYI, J.K. & LEDERBERG,J. 1966. Fluorescent method for the detection of excreted ribonuclease around bacterial colonies. J. Bacteriol., 92:1469-1472.

157. LAWRENCE, N.L., & HALVORSON, H.O. 1954. Studies on the spores of aerobic bacteria. IV. A heat resistant catalase from spores of Bacillus terminalis. J. Bacteriol., 68:334-337

158. LEANZ, G.F. & GILVARG, C. 1972. Localization of bacterial spore components by Beta-attenuation analysis. In:"Spores V", H.O. Halvorson, R. Hanson & L.L. Campbell,eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 45-48.

159. ——— & ——— 1973. Dipicolinic acid location in intact spores of Bacillus megaterium. J. Bacteriol., 114:455--456.

160. LECADET, M. & DEDONDER, R. 1971. Biogenesis of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis during sporulation. Europ. J. Biochem. 23:282-294.

161. LEIGHTON, T.J. 1973. An RNA polymerase mutation causing temperature-sensitive sporulation in Bacillus subtilis. Proc. Nat. Acad.Sci. USA, 70:1179-1183.

162. ——— 1974. Sporulation-specific translational discrimination in Bacillus subtilis. J. Mol. Biol. 86:855-863.

163. ———, FREEZE, P.K., DOI, R.H., WARREN, R.A.J. & KELLN, R.A. 1972. Initiation of sporulation in Bacillus subtilis: Requirement for serine protease activity and ribonucleic acid polymerase modification. In:"Spores V", H.O. Halvorson, R. Hanson & L.L. Campbell, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 238-246.

164. LEO, A. HAUSCH, C. & ELKINS, D. 1971.Partition coefficient and their uses. Chem. Rev. 71:525-616.

165. LEWIS, J.C., SNELL, N.S. & BURR, H.K. 1960. Water permeability of bacterial spores and the concept of a contractile cortex. Science, 132:544-545.

166. LI, E. & YOUSTEN, A.A. Metalloprotease from Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol., 30:354-361.

167. LINNETT, P.E. & TIPPER, D.J. 1974. Cell wall polymers Bacillus sphaericus: activities of enzymes involved in peptidoglycan precursor synthesis during sporulation. J. Bacteriol., 120:342-354.

168. LOSICK, R. 1973. New subunits of RNA polymerase from sporulating Bacillus subtilis. Coll. int. CNRS. sobre "La Regulation de la Sporulation Microbienne", p. 1-6

169. ——— & SHORENSTEIN, R.G. 1970. Structural alteration of RNA polymerase during sporulation. Nature, 227:910-913.

170. ——— & SONENSHEIN, A.L. 1969. Change in the template specifity of RNA polymerase during sporulation of Bacillus subtilis. Nature, 224:35-37.

171. LUFT, J.H. 1961. Improvement in epoxy resin embedding methods. J. Biophys. Biochem. Cytol., 9:409-414.

172. MACKEY, B.M. & MORRIS, J.G. 1971. Ultrastructural changes during sporulation of Clostridium pasteurianum. J. Gen. Microbiol., 66:1-13.

173. MACLISTER, T.J. IRVIN, R.T. & COSTERTON, J.W. 1977. Cell surface-localized alkaline phosphatase of Escherichia coli as visualized by reaction product deposition and ferritin-

-labeled antibodies. J. Bacteriol., 130 :318-328.

174. MALAMY, H.M. & HORECKER, B.L. 1961. The localization of alkaline phosphatase in Escherichia coli K12. Biochem.Biohpys. Res. Commun. 5:104-108.

175. ——— & ——— 1964. Release of alkaline phosphatase from cells from Escherichia coli upon lysozyme spheroplast formation. Biochemistry, 3:1889-1893.

176. MANDELSTAM, J., KAY, D. & HRANUELY, D. 1975. Biochemistry and morphology of stage I in sporulation of Bacillus subtilis cells. In:"Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 181-186.

177. ——— & WAITES, W.M. 1968. Sporulation in Bacillus subtilis. The role of exoproteases. Biochem. J. 109:793-801.

178. MARNAS, S. & MILLET, J. 1975. Purification et propriétés d'une estérase excreté pendant la sporulation de Bacillus subtilis, Biochimie, 57:9-16.

179. MARSCHKE, C.K. & BERNLOHR, R.W. 1970. Reevaluation of bacitracin as a spore coat component. J. Bacteriol., 102:283-284.

180. MATZ, L.L. BEAMAN, T.C. & GERHARDT, P. 1970. Chemical composition of exosporium from spores of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 101:196-201.

181. MAUCK, J., CHAU, L. & GLASER, L. 1971. Turnover of the cell wall of Gram-positive bacteria. J. Biol. Chem., 246:1820-1827.

182. ——— & GLASER, 1972. On the mode of in vivo assembly of the cell wall of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem., 247:1180-1187.

183. MAZANEC, K., KOCUR, M. & MARTINEC, T.1965. Electron microscopy of ultrathin sections of Sporosarcina ureae. J. Bacteriol., 90:808-816.

184. Merck Index of Chemical and Drugs, 7º edição, 1960.

185. MICHEL, J.F. & MILLET, J. 1970. Physiological studies on early-blocked sporulation mutants of Bacillus subtilis. J.Appl. Bacteriol., 33:220-227.

186. MILHAUD, P. & BALASSA, G. 1973. Biochemical genetics of bacterial sporulation. IV. Sequential development of resistances to chemical and physical agents during sporulation of Bacillus subtilis. Molec. Gen. Genetics, 125, 241-250.

187. MILLET, J. 1970. Characterization of proteinases excreted by Bacillus subtilis Marburg strain during sporulation. J.Appl. Bacteriol., 33:207-219.

188. ——— & RYTER, A. 1972. Mutants de "Bacillus subtilis" Marburg bloqués tardivement dans leur sporulation. Ann. Inst. Pasteur, 122:395-406.

189. MONNERON, A. 1966. Utilization de la pronase en cytochimie ultrastructural. J. Microscopie, 5:583-596.

190. ——— & BERNHARD, W. 1966. Actions de certaines enzymes sur des tissues inclus en epon. J. Microscopie, 5:697-714.

191. MOSELAY, M.H. & KEAY, L. 1970. Purification and characterization of the amylase of Bacillus subtilis NRRL, 83411. Biotechn. Bioengin., 12:251-271.

192. MURRELL, W.G. 1967. The biochemistry of the bacterial endospore. Adv. Microbiol. Physiol., 1:133-251.

193. MURRELL, W.G., OHYE, D.F. & GORDON, R.A. 1969. Cytological and chemical structure of the spore. In: "Spores IV", L.L. Campbell, ed., Amer. Soc. Microbiol., p.1-19

194. ——— & WARTH, A.D. 1965. Composition and heat resistance of bacterial spores. In: "Spores III", L.L. Campbell & H.O. Halvorson, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 1-24.

195. NAGATA, Y. YAMAGUCHI, K. & MARNO, B. 1974. Genetic and bio chemical studies on cell-bound α-amylase in Bacillus subtilis Marburg. J. Bacteriol., 119:425-430.

196. NELSON, D.L.SPUDICH, J.A. BONSON, P.P.M., BERTSCH,L.L. & KORNBERG, A. 1969. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination, XVI. Small molecules in spores. In: "Spores IV", L.L. Campbell, ed., Amer. Soc. Microbiol., p. 59-71.

197. NERMUTT, M.V. 1967. The ultrastructure of the cell wall of Bacillus megaterium. J. Gen. Microbiol., 49:503-512.

198. NEU, H.C. & HEPPEL, L.A. 1964. The release of ribonuclease into the medium when Escherichia coli cells are converted to spheroplasts. J. Biol. Chem., 239:3893-3900.

199. NYBERG, M.H.T., CEFOLA, M. & SABINE, D. 1959. Chelation of cobalt, nickel and copper with glutamic acid. Arch. Biochem. Biophys., 85:82-88.

200. OHYE, D.F. & MURRELL, W.G. 1962. Formation and structure of the spore of Bacillus coagulans. J. Cell Biol., 14:111--123.

201. ——— & ——— 1973. Exosporium and spore coat formation in Bacillus cereus T. J. Bacteriol.,115:1179-1190.

202. OP DEN KAMP, J.A.F., REDAI, I. & VAN DEENEN, L.L.M. 1969. Phospholipid composition of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 99:298-303.

203. ———, VAN ITERSON, W. & VAN DEENEN, L.L.M. 1967. Studies on the phospholipids and morphology of protoplasts of Bacillus megaterium. Biochim. Biophys. Acta, 135:862-884.

204. PASTEUR, L. 1870. Étude Sur La Maladie Des Vers À Soie. Gauthier-Villars. Citado por Fitz-James, P.C. & Young, E. 1969. Morphology of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould & A. Hurst, eds., Academic Press, p. 39-72.

205. PEARCE, S.M. & FITZ-JAMES, P.C. 1971. Sporulation of a cortex--less mutant of a variant of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 105:339-348.

206. PERTY, M. 1852. Zur kenntnis kleinster Lebensformen. Berna. Citado por Fitz-James, P.C. & Young, E. 1969. Morphology of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould & A. Hurst, eds., Academic Press, p. 39-72.

207. PIGGOT, P.G. & COOTE, J.G. 1976. Genetic aspects of bacterial endospore formation. Bacteriol. Rev. 40:908-962.

208. PITEL, D.W. & GILVARG, C. 1970. Mucopeptide metabolism during growth and sporulation in Bacillus megaterium. J. Biol. Chem., 245:6711-6717.

209. ——— & ——— 1971. Timing of mucopeptide and phospholipid synthesis in sporulating Bacillus megaterium. J. Biol. Chem., 246:3720-3724.

210. POLLOCK, M.R. 1962. Exoenzymes. In:"The Bacteria", I.C. Gun-

salus & R.Y. Stanier, eds., Academic Press, vol.IV.

211. POPE, L.M. & WYSS, O. 1970. Outer layers of the Azotobacter vinelandii. cyst. J. Bacteriol., 102:234-239.

212. POWELL, J.F. & STRANGE, R.E. 1956. Biochemical changes occurring during sporulation in Bacillus species. Biochem. J., 63:661-668.

213. ——— & ——— 1957. αε-diaminopimelic acid metabolism and sporulation in Bacillus sphaericus. Biochem. J., 65: 700-708.

214. PRESTIDGE, L. GAGE, V. & SPIZIZEN, J. 1971. Protease activities during the course of sporulation in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 107:815-823.

215. PRIEST, F.G. 1977. Extracellular enzyme synthesis in the Genus Bacillus. Bacteriol. Rev., 41:711-753.

216. REMSEN, C.C. 1966. The fine structure of frozen-etched Bacillus cereus spores. Archiv. Mikrobiologie, 54:266-275.

217. ——— & LUNDGREN, D.G. 1965. Multiple septation in variants of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 90:1426-1431.

218. REYSETT, G. & MILLET, J. 1972. Characterization of an intracellular protease in B. subtilis during sporulation. Biochem. Biophys. Res. Commun., 49:328-334.

219. RHAESE, H.J., DICHTELMULLER, H. GRADE, R. & GROSCURTH, F.M. 1975. High phosphorylated nucleotides involved in regulation of sporulation in Bacillus subtilis. In:"Spores VI", P. Gerhardt, H.L.Sadoff & R.N. Costilow, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 335-340.

220. ———, ——— & GROSCURTH, F.M. 1972. Unusual phosphorylated

substances associated with sporulation. In: "Spores V", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 174-179.

221. RHAESE, H.J., GRADE, R. & DICHTELMULLER, H. 1976. Studies on the control of development. Correlation of initiation of differentiation with synthesis of highly phosphorylated nucleotides in Bacillus subtilis. Eur. J. Biochem., 64: 205-213.

222. RIBIER, J. 1971. L'inclusion parasporale du Bacillus thuringiensis, var. Berliner 1715: moment et site de son initiation raports ave 1'ADN sporangial. Centre Rech. Acad. Sci. Paris, 273:1444-1447.

223. RICKENBERG, H.V. 1974. Cyclic AMP in prokaryotes. Ann. Rev. Microbiol., 28:353-369.

224. ROBERTS, F.A. & HITCHINS, A.D. 1969. Resistance of spores. In: "The Bacterial Spores", G.W. Gould & A. Hurst, eds., Academic Press, p. 611-670.

225. ROBINOW, C.F. 1951. Observations on the structure of Bacillus spores. J. Gen. Microbiol., 5:439-457.

226. ——— 1960. Morphology of bacterial spores. Their development and germination. In:"The Bacteria" I.C. Gunsalus & R.Y. Stanier, eds., Academic Press, vol. I, 207-248.

227. RODE, L.J. 1971. Bacterial spore appendages. Critical Rev. Microbiol., 5:1-27.

228. ——— & SMITH, L.D. 1971. Taxonomic implications of spore fine structure in Clostridium bifermentans. J. Bacteriol., 105:349-354.

229. ROGERS, H.J., NEWTON, G.G.F. & ABRAHAM, E.P. 1965. Production and purification of bacilysin. Biochem. J., 97:573-578.

230. ROUFOGALIS, B.D. 1975. Comparative studies on the membrane actions of depressant drugs: the role of lipophobicity in inhibition of brain sodium and potassium-stimulated ATPase. Neurochemistry, 24:51-61.

231. ROTH, N.G., LIVELY, D.H. & HODGE, H.M. 1955. Influence of oxygen uptake and age of culture on sporulation of B.anthracis and B. globigii. J. Bacteriol., 69:455-459.

232. ROUSSEAU, M. & HERMIER, J. 1975. Localisation en microscopie eléctronique des polysacharides de la paroi chez les bactéries en sporulation. J. Microsc. Biol.Cell. 23:237-248.

233. ———, ——— & BERGÈRE, J.L. 1971. Structure de certain Clostridium du groups butyrique. I. Sporulation de Clostridium butyricum et Clostridium saccharobutyricum. Ann. Inst. Pasteur, 120:23-32.

234. ———,——— & ——— 1971. Structure de certain Clostridium du groupe butyrique. II. Sporulation de Clostridium tyrobutyricum. Ann. Inst. Pasteur, 120:33-41.

235. ———, ——— & ——— 1971. Structure de certains Clostridium du groupe butyrique. III. Rôle de la membrane dans la formation des tuniques: mise en évidence par l'analyse des formes anormales de sporulation. Ann. Inst. Pasteur, 121: 3-12.

236. RYTER, A. 1965. Étude morphologique de la sporulation de Bacillus subtilis. Ann. Inst. Pasteur, 108:40-60.

237. ——— 1968. Association of the nucleus and the membrane of

bacteria: a morphological study. Bacteriol. Rev. 32:39-54.

238. RYTER, A. 1969. Structure and functions of mesosomes of Gram positive bacteria. In: "Current Topics in Microbiology and Immunology", 49:149-177.

239. ——— & AUBERT, J.P. 1969. Étude autoradiographique de la synthèse de l'ADN au cours de la sporulation de Bacillus subtilis. Ann. Inst. Pasteur, 117:601-611.

240. ——— & JACOB,F. 1964. Étude au microscope électronique de la liaison entre noyau et mésosome chez Bacillus subtilis. Ann. Inst. Pasteur, 107:384-400.

241. ——— & ——— 1966. Étude morphologique de la liaison du noyau a la membrane chez E. coli et chez les protoplastes de B. subtilis. Ann. Inst. Pasteur, 110:801-812.

242. ——— & KELLEMBERGER, E. 1958. Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucleique. I. Les nucléoides des bactéries en croissance active. Z. Naturf., 13b:597-605.

243. ——— & LANDMAN, O.E. 1968. Morphological study of the attachment of nucleoid to membrane in Bacilli, protoplasts and reverting protoplasts of Bacillus subtilis. In:"Protoplast, forms L". L. Guze, ed., Williams and Wilkins, Co., p.110--123.

244. ———, SCHAEFFER, P. & IONESCO, H. 1966. Classification cytologique par leur stade de blocage, des mutants de sporulation de Bacillus subtilis Marburg. Ann. Inst. Pasteur,110: 305-315.

245. SADOFF, H.L. 1972. Sporulation antibiotics of Bacillus species. In:"Spores V", P. Gerhardt, H.L.Sadoff & R.N.Costilow,eds., Amer. Soc. Microbiol., p.157-166.

246. ——— 1973. Comparative aspects of morphogenesis in three prokaryotic genera. Ann. Rev. Microbiol.,27:133-153.

247. ———, HITCHINS, A.D. & OELIKKOL, E. 1969. Properties of fructose 1,6-diphosphate aldolases from spores and vegetative cells of Bacillus cereus. J. Bacteriol.,98:1208-1218.

248. ———, PAGE, W.J. & REUSCH, R.N. 1975. The cyst of Azotobacter vinelandii: comparative view of morphogenesis. In: "Spores VI", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow, eds., Amer. Soc. Microbiol., p.52-60.

249.SALTON, M.R. 1964. The Bacterial Cell Wall. Elsevier Publishing Company.

250. SAMSONOFF, W.A., HASHIMOTO, T. & CONTI, S.F. 1970. Ultrastructural changes associated with germination and outgrowth of an appendage-bearing clostridial spore. J. Bacteriol.,101: 1038-1045.

251.SANTO, L.M. HOHL, H.R. & FRANK, H.A. 1969. Ultrastructure of putrefactive anaerobe 3679h during sporulation. J. Bacteriol., 99:824-833.

252. SANTO, Y.L. & DOI, H.R. 1973. Crystal formation by a ribonucleic acid polymerase mutant of Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 116:479-482.

253. SANTOS-MOTA, J.M., SILVA, M.T. & CARVALHO GUERRA, F. 1971. Ultrastructural and chemical alterations induced by Dicumarol in Streptococcus faecalis. Biochim.Biophys. Acta,249:114--121.

254. SCHAEFFER, P. 1967. Asporogenous mutants of Bacillus subtilis Marburg. Folia Microbiol. Acad. Sci. Bohemoslov.,12:291--296.

255. ——— 1969. Sporulation and the production of antibiotics, exoenzymees and exotoxins. Bacteriol. Rev.,33:48-71.

256. ———, IONESCO, H., RYTER, A. & BALASSA, G. 1963. La sporulation de Bacillus subtilis: étude genétique et physiologique. Coll. int. CNRS, 124:553-563.

257. ———, MILLET, J. & AUBERT, J.P. 1965. Catabolic repression of bacterial sporulation. Proc. Nat. Acad. Sci., 54:704--711.

258. SCHLESINGER, M.J. 1968. Secretion of alkaline phosphatase subunits by spheroplasts of Escherichia coli. J. Bacteriol., 96:727-733.

259. SCHESSER, J.H. & BULLA, L.A. 1978. Toxicity of Bacillus thuringiensis spores to the tobacco Hornwore, Manduca sexta. Appl. Env. Microbiol., 35:121-123.

260. SÈBALD, M. 1968. Sur un mutant asporogène de Clostridium histolycum incapable de synthétiser 1'acide dipicolinique. Ann.Inst. Pasteur, 114:265-276.

261. SHIMKETZ, L. & SEALE, T.W. 1975. Fruiting-body formation and mixospore differentiation and germination in Mixococcus xantus viewed by scanning lectron microscopy. J.Bacteriol., 121:711-720.

262.SILVA, M.T. 1967. Electron microscopy study on the effect of the oxidation of ultrathin sections of Bacillus cereus and Bacillus megaterium. J. Ultrastruct.Res.,18:345-353.

263. SILVA, M.T. 1967. Electron microscopy aspects of membrane alterations inducing bacterial cell lysis. Exp. Cell Res., 46: 245-251.

264. ———1975. The ultrastructure of the membrane of Gram-positive bacteria as influenced by fixative and membrane-damaging treatments. In: "Biomembranes – Lipids, Proteins and Receptors", R.M. Burton, & L. Packer, eds., BI-Science Publ. Division, USA, p. 255-289.

265. ———, LIMA, M.P., FONSECA, A.F. & SOUSA, J.C.F. 1973. The fine structure of Sporosarcina ureae as related to its taxonomic position. J. Submicrosc. Cytol., 5:7-22.

266. ———, SANTOS-MOTA, J.M., MELO, J.V.C. & CARVALHO GUERRA, F. 1971. Uranyl salts as fixative for electronmicroscopy. Study of the membranes ultrastructure and phospholipid loss in Bacilli. Biochim. Biophys. Acta, 233:513-520.

267. ——— & SOUSA, J.C.F. 1972. Ultrastructural alterations induced by moist heat in Bacillus cereus. Appl. Microbiol., 24:463-476.

268. ———, ——— & BALASSA, G. 1978. Ultrastructural effects of chemical agents and moits heat on Bacillus subtilis. I. Effects on vegetative cells. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 129B:363-375.

269. ———, ———, MACEDO, M.A.E., POLÓNIA, J. & PARENTE, Ana M. 1976. Effects of phenethyl alcohol on Bacillus and Streptococcus. J. Bacteriol., 127:1359-1369.

270. ———, ———, POLÓNIA, J. & MACEDO, Paula M. 1979. Effects of

local anesthetics on bacterial cells. J. Bacteriol., 137: 461-468.

271. SILVA, M.T., SOUSA, J.C.F., POLÓNIA, J., MACEDO, M.A.E. & PARENTE, Ana M. 1976. Bacterial mesosomes. Real structure or artifacts?. Biochim. Biophys. Acta, 443:92-105.

272. SLEPECKY, R.A., 1972. Ecology of bacterial sporeformers. In: "Spores V", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow,eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 297-313.

273. SMITH, J.D. & SILVERMAN, P.M. 1973. Lipid turnover during morphogenesis in the water mold Blastocladiella emersonii. Biochem. Biophys. Res. Commun., 54:1191-1196.

274. SNOKE, J.E. 1964. Aminoacid composition of Bacillus licheniformis spore coat. Biochem. Biophys. Research Commun., 14: 571-574.

275. ——— & CORNELL, N. 1965. Protoplast lysis and inhibition of growth of Bacillus licheniformis by bacitracin. J. Bacteriol., 89:415-420.

276. SOMMERVILLE, H.J. 1971. Formation of the parasporal inclusion of Bacillus thuringiensis. Europ. J. Biochem., 18:226-237.

277. ———, DELAFIELD, F.P. & RITTENBERG, S.C. 1970. Urea-mercaptoethanol-soluble protein from spores of Bacillus thuringiensis and other species.J. Bacteriol.,101:551-560.

278. ——— & JAMES, C.R. 1970. Association of the crystalline inclusion of Bacillus thuringiensis with the exosporium. J. Bacteriol., 102:580-583.

279. SOUSA, J.C.F.& SILVA, M.T. 1972. Estudo ultrastrutural do processo esporulativo e dos esporos maduros de algumas es-

tirpes de Sporosarcina ureae. VII Reunião Anual da Soc. Port. Microsc. Electrónica, Oeiras.

280. SOUSA, J.C.F., SILVA, M.T. & BALASSA, G. 1974. Biochemical genetics of bacterial sporulation. V. Fine structure analysis of two sporulation mutants of B. subtilis derepressed for late functions. Molec. Gen. Genetics, 128: 261-272.

281. ———, ——— & ——— 1976. An exosporium-like outer layer in Bacillus subtilis spores. Nature, 263:53-54.

282. ———, ——— & ——— 1978. Spore control (Sco) mutations in Bacillus subtilis. V. Electron microscope studies of the kinetics of morphogenesis in wild type and Sco strains. Molec. Gen. Genetics, 163:285-291.

283. ———, ——— & ——— 1978. Ultrastructure and development of an exosporium-like outer spore envelope in Bacillus subtilis. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 129B:339-362.

284. ———, ——— & ——— 1978. Ultrastructural effects of the chemical agents and moist heat on Bacillus subtilis. II. Effects on sporulating cells. Ann. Microbiol. Inst. Pasteur, 129B:337-390.

285. ———, ———, SANTOS-MOTA, J.M. & ABREU, M.L. 1972. Membrane alterations induced by moist heat in Streptococcus faecalis. I Cong. Latino Americano de Microsc. Electrónica, Maracaíbo, Venezuela,

286. SPIZIZEN, J. 1958. Transformation of biochemically deficient strains of Bacillus subtilis by deoxyribonucleate. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 44:1072-1078.

287. SPUDICH, J.A. 1970. Biochemical studies of spore core and coat protein synthesis. J. Appl. Bacteriol.,33:25-33.

288. ——— & KORNBERG, A. 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VI. Origin of spore core and coat proteins. J. Biol. Chem., 243:4588-4599.

289. ——— & ——— 1968. Biochemical studies of bacterial sporulation and germination. VII. Protein turnover during sporulation of Bacillus subtilis. J. Biol. Chem., 243: 4600-4605.

290. STEIN, A.E. 1957. Structure of Bacillus subtilis α-amylase. Fed. Proc. 16:254-255.

291. STRANGE, R.E. & DARK, F.A. 1957. A cell-wall lytic enzyme associated with spores of Bacillus species. J. Gen. Microbiol., 16:236-249.

292. ——— & POWELL, J.F. 1954. Hexosamine-containing peptides in spores of Bacillus subtilis, B. megaterium and B. cereus. Biochem. J. 58:80-85.

293. ——— & SHON, M. 1964. Effects of thermal stress on viability and ribonucleic acid of Aerobacter aerogenes in aquous suspension. J. Gen. Microbiol., 34:99-114.

294. STWART, B.J. & HALVORSON, H.O. 1953. Studies on the spores of aerobic bacteria. I. The occurrence of alanine racemase. J. Bacteriol., 65:160-168.

295. SUSSMAN, A.S. & HALVORSON, H.O. 1966. Spores, Their Dormancy and Germination. Harper & Row, eds.,

296. SUZUKI, K. & YAMASAKI, K. 1957. Stabilities of dipicolinic

acid complexes with bivalent metals. Naturwissenschaften, 44:396.

297. SZULMAJTER, J. 1973. Bacillus subtilis RNA polymerase from vegetative and sporulating cells and from dormant spores: Hypothesis and realities. Coll. int. CNRS, sobre "La Regulation de la Sporulation Microbiennne", p. 45-53.

298. TAKAHASHI, I. 1965. Transduction of sporogenesis in Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 89:294-298.

299. THIÉRY, J.P. 1967. Mise en évidence des polysaccharides sur coupes fines en microscopie électronique. J. Microscopie, 6:987-1018.

300. TIPPER, D.J. & GAUTHIER, J.J. 1972. Structure of the bacterial endospore. In: "Spores V", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 3-12.

301. ——— & PRATT, I. 1970. Cell wall polymers of Bacillus sphaericus 9602. II. Synthesis of the first enzyme unique to cortex synthesis during sporulation. J. Bacteriol., 103: 305-317.

302. TOCHIKUBO, K. 1971. Changes in terminal respiratory pathways of Bacillus subtilis during germination, outgrowth and vegetative growth. J. Bacteriol., 108:652-661

303. TOMCSICK, J. & BAUMAN-GRACE, J.B. 1959. Specific exosporium reaction of Bacillus megaterium. J. Gen. Microbiol., 21: 666-675.

304. TORRIANI, A. 1960. Influence of inorganic phosphate in the formation of phosphatase by Escherichia coli. Biochim. Biophys. Acta, 38:460-469.

305. VAN DRIEL, D. WICKEN, A.J., DICKSON, M.R. & KNOX, K.W. 1973. Cellular location of the lipoteichoic acids of Lactobacillus fermenti NCTC 6991 and Lactobacillus casei NCTC 6375. J. Ult. Res., 43:483-497.

306. VENABLE, J.H. & COGGESHALL, R. 1965. A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. J. Biol. Cell, 25:407-408.

307. VINTER, V. 1957. Sporulation of Bacilli. VIII. The participation of cystein and cystine in spore formation by Bacillus megaterium. Folia Microbiol., 4:216-221.

308. ——— 1959. Differences in cyst(e)ine content between vegetative and spores of Bacillus cereus and Bacillus megaterium. Nature, 183: 998-999.

309. ——— 1961. Changes in radioresistance of sporulating cells of Bacillus cereus. Nature, 189:589-590.

310. ——— 1962. Spores of microorganisms. IX. Gradual development of the resistant structure of bacterial endospore. Folia Microbiol., 7:115-120.

311. ——— 1969. Physiology and biochemistry of sporulation. In: "The Bacterial Spore", G.W. Gould, & A. Hurst, eds.,Academic Press, p. 73-123.

312. VITKOVIC, L. & SADOFF, H.L. 1977. Purification of the extracellular protease of Bacillus licheniformis and its inhibition by bacitracin. J. Bacteriol., 131:891-896.

313. VOELZ, H. & DWORKIN, M. 1962. Fine structure of Myxococcus xanthus during morphogenesis. J. Bacteriol., 84:943-952.

314. VOLD, B.S. & MINATOGAWA, S. 1972. Characterization of changes

in transfer ribonucleic acid during sporulation in Bacillus subtilis. In: "Spores V", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow, eds.,Amer. Soc. Microbiol., p. 254-263.

315. WAITES, W.M., KAY, D., DAWES, I.W., WOOD, D.A., WARREN, S.C. & MANDELSTAM, J. 1970. Sporulation in Bacillus subtilis. Correlation of biochemical events with morphological changes in asporogenous mutants. Biochem. J. 118:667-676.

316. WALKER, P.D. & BAILLIE, A. 1968. Structure of Bacillus stearothermophilus: an electron microscope study. J. Appl. Bacteriol., 31:108-113.

317. ———, THOMSON, R.O. & BAILLIE, A. 1967. Use of ferritin labelled antibodies in the location of spore and vegetative antigens of Bacillus subtilis. J. Appl. Bacteriol.,30: 317-320.

318. ——— & SHORT, J. 1969. Location of bacterial polysaccharide during various phases of growth. J. Bacteriol., 98:1342--1354.

319. WARREN, S.C. 1968. Sporulation in Bacillus subtilis. Biochemical changes. Biochem. J. 109:811-818.

320. WARTH, A.D.; OHYE, D.F. & MURRELL, W.G. 1963. Location and composition of spore mucopeptide in Bacillus species. J. Cell Biol., 16:593-609.

321. ——— & STROMINGER, J.L. 1969. Structure of the peptidoglycan of bacterial spores: occurrence of the lactam of muramic acid. Proc. Nat. Acad. Sci., 64:528-535.

322. WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. 1953. Molecular structure of nucleic acids. A structure for deoxyribose nucleic. Nature,171:737-738

323. WATSON, J.D. & CRICK, F.H.C. 1953. Genetical implications of the structure of deoxyribonucleic acid. Nature, 177:964-
-

324. WHITE, D. 1975. Mixospores of Myxococcus xanthus. In: "Spores VI", P. Gerhardt, R.N. Costilow & H.L. Sadoff, eds., Amer. Soc. Microbiol., p. 44-51.

325. WHITFIELD, J.F. & MURRAY, R.G.E. 1956. The effects of the ionic environment on the chromatin structures of bacteria. Can. J. Microbiol., 2:245-260.

326. WICKEN, A.J. & KNOX, K.W. 1970. Studies on the group F antigen of lactobacilli: isolation of a teichoic acid-lipid complex from Lactobacillus fermenti NCTC 6991. J. Gen. Microbiol., 60:293-301.

327. WISE, J., SWANSON, A. & HALVORSON, H.D. 1967. Dipicolinic acid--less mutants of Bacillus cereus. J. Bacteriol., 94: 2075-2076.

328. WOOD, D.A. 1972. Sporulation in Bacillus subtilis. Properties and time of synthesis of alkali-soluble protein of the spore coat. Biochem. J. 130:505-514.

329. ——— & TRISTRAM, H. 1970 Localization in the cell and extraction of alkaline phosphatase from Bacillus subtilis. J. Bacteriol., 104:1045-1051.

330 WYSS, O., NEUMANN, M.G. & SOCOLOFSKY, M.D. Development and germination of the Azotobacter Cyst. J. Biophys. Biochem. Cytol., 10:555-565.

331. YAMAMOTO, T. & BALASSA, G. 1969. Observations on the sporulation of a Bacillus badius strain. Microbios, 4:355-361.

332. YAMAMOTO, T. & BALASSA, G. 1969. Biochemical genetics of bacterial sporulation. II. Membrane development during sporulation of B. subtilis and its mutants. Mol. Gen. Genetics, 106:1-13.

333. ——— & ——— 1970. Abnormal late sporulation mutants of Bacillus subtilis with cytoplasmic inclusions. Microbios, 5:69-72.

334. YOSHIDA, T., WEISSBACH, H. & KATZ, E. 1966. Inhibitory effect of Actinomycin upon the producing organism. Arch. Biochem. Biophys. 114:252-255.

335. YOUNG, F.E. 1966. Autolytic enzyme associated with cell walls of Bacillus subtilis. J. Biol.Chem., 241:3462-3467.

336. ——— 1967. Requirement of glucosylated teichoic acid for adsorption of phage in Bacillus subtilis 168. Proc. Nat. Acad. Sci., USA, 58:2377-2384.

337. ——— & FITZ-JAMES, P.C.1959.Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. I. The formation of spores in Bacillus cereus. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6:467-480.

338. ——— & ——— 1959. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. II. Spore and parasporal protein formation in Bacillus cereus, var. Alesti. J. Biophys. Biochem. Cytol., 6:483-497.

339. ——— & ——— 1962. Chemical and morphological studies of bacterial spore formation. IV. The development of spore refractibility. J. Cell Biol., 12:115-133.

340. YOUSTEN,A.A. & ROGOFF, M.H. 1969. Metabolism of Bacillus thuringiensis in relation to spore and crystal formation.

J. Bacteriol., 100:1229-1236.

341. ZUBAY, G., SCHWARTZ, D. & BECKORTH, J.1970. Mechanism of activation of catabolite-sensitive genes: A positive control system. Proc. Nat. Acad.Sci., USA, 66:104-110.

342. ZYTKOVICZ, H. & HALVORSON, H.D. 1972. Some characteristics of dipicolinic acid-less mutants spores of Bacillus cereus, Bacillus megaterium and Bacillus subtilis. In "Spores V", P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow, Amer. Soc. Microbiol., p. 49-52.

impressão
editorial engenharia