Maria Egídia de Sousa Bettencourt de Carvalho

Assistente do Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar"

Universidade do Porto

AUTÓLISE E HETERÓLISE DE *STREPTOCOCCUS FAECIUM*

Porto 1987

À Memória de

Meus Pais

Publicação subsidiada pelo Instituto
Nacional de Investigação Científica
(INIC)

Maria Egídia de Sousa Bettencourt de Carvalho

Assistente do Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar"
Universidade do Porto

AUTÓLISE E HETERÓLISE DE *STREPTOCOCCUS FAECIUM*

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA AO INSTITUTO CIÊNCIAS BIOMÉDICAS "ABEL SALAZAR DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Orientador - Doutor Manuel A. Teixeira da Silva
(Art. 4º - D. L. 388/70)

PORTO
1987

De acordo com o ponto 2 do Art. 8 do Decreto de Lei n. 388/70 foram utilizados nesta Dissertação dados apresentados nos seguintes artigos e comunicações:

I - Artigos publicados

"A turbidimetric and electron microscopic study of the effects of several parameters on the lysis of *Streptococcus faecalis* by lysozyme. (col. M. H. Gonçalves e M. T. Silva). *Can. J. Microbiol.*, **30:** 905-915 (1984).

"Induction of autolysis in *Streptococcus faecium* . (col. M. Helena Gonçalves e Manuel T. Silva). *J. Gen. Microbiol.*, **133:** 985-993 (1987).

II - Comunicações apresentadas em reuniões científicas

"Efeito de vários parâmetros na lise de *S. faecalis* ATCC 9790 induzida pela lisozima". (col. M. H. Gonçalves e M. T. Silva). 1º Congresso Luso-Espanhol de Bioquímica. 1980. (Resumo P2).

"Ultrastructural study of the effects of lysozyme on *Streptococcus faecalis* . Influence of growth conditions". (col. M. H. Gonçalves e M. T. Silva). Iª Reunião de Morfologistas Portugueses e XV Reunião Anual da SPME. 1980. *Ciênc. Biol.* (Portugal), **7(1,2)** , 1982. (Abstract 25).

"Correlation between the muralytic and the bacteriolytic actions of lysozyme: an ultrastructural study in *S. faecalis* ATCC 9790". (col. M. T. Silva). XVI Reunião Anual da SPME. 1981. *Ciênc . Biol.* (Portugal) , **7(3)** , 1982. (Abstract 42).

"Binding of lysozyme to *Streptococcus faecalis* ATCC 9790: a parameter which influences the bacteriolysis induced by that muralisin." (col. M. T. Silva). VII Congresso Nacional de Bioquímica. Póvoa do Varzim.1981. (Abstract P21).

"Ultrastructural study of chloramphenicol, tetracycline and N-bromosuccinimide (NBS) effect on the autolysis of *S. faecalis* (ATCC 9790)". (col. M. T. Silva). XVII Reunião Anual da SPME. 1982. *Ciênc. Biol.* (Portugal), **7(4)** , 1982. (Abstract 41).

"Estudo ultrastrutural e bioquímico das membranas de *S. faecalis* isoladas após autólise e após lise na presença da lisozima". (col. M. T. Silva). XVIII Reunião Anual da SPME. 1983. *Ciênc. Biol.* (Portugal), **9(1)**, 1984. (Resumo 74).

"Ultrastructural and spectrophotometric study of the effects of lysozyme on isolated cell walls of *Streptococcus faecalis* grown with and without chloramphenicol". (col. M. T. Silva). XIX Reunião Anual da SPME e 1º Congresso Ibérico de Microscopia Electrónica. 1984. *Ciênc. Biol.* (Portugal), **9(4)** , 1984. (Abstract 9).

"Autolysis and heterolysis induced by lysozyme in the autolysin-deficient EC78 mutant of *S. faecalis* ATCC 9790: ultrastrucural and turbidimetric study". (col. M. H. Gonçalves e M. T. Silva). XX Reunião Anual da SPME. 2ª Reunião dos Morfologistas Portugueses. 1985. *Ciênc. Biol.* (Portugal), **11(1/2)**, 1986. (Abstract 77).

"Autólise de *Streptococcus faecalis* : Efeito do congelamento prévio das suspensões em diferentes tampões". (col. M. Helena Gonçalves e Manuel T. Silva). Congresso de Biologia Celular (III Congresso Iberoamericano e V Congresso Brasileiro de Biologia Celular). Campus da Universidade do Rio de Janeiro. 1986. (Resumo p.p.149).

"Efeito do tampão Imidazol na autólise de *Streptococcus faecium"* (col. M. Helena Gonçalves e Manuel T. Silva). XXI Reunião Anual da SPME. Faculdade de Medicina do Porto. 1986. (Resumo 36C).

"Caracterização de um mutante de *S. faecium* ATCC 9790 deficiente na autolisina ". (col. M. Helena Gonçalves e Manuel T. Silva). 2ª Reunião Anual da Sociedade Portuguesa de Microbiologia. Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto. 1986. (Resumo 20C)

São da nossa responsabilidade a elaboração dos projectos de investigação que resultaram nos trabalhos aqui referidos, bem como a elaboracção e execução de experiências, interpretação de resultados, sua discussão e redacção dos textos. Esses trabalhos contaram ainda com a participação dos co-autores dos respectivos artigos ou comunicações.

AGRADECIMENTOS

Este trabalho contou com a valiosa colaboração de numerosas Pessoas e Instituições que me cumpre reconhecer.

O meu maior agradecimento dirige-se ao Doutor Manuel Teixeira da Silva, orientador desta tese, a quem expresso profundo reconhecimento pelo contínuo estímulo, apoio e disponibilidade sempre demonstradas. Estou-lhe sinceramente grata pela grande atenção que dispensou à revisão e redacção do texto, pelas sugestões dadas bem como pelas discussões críticas que efectuou.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar" e à Direcção do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto desejo agradecer as facilidades e os apoios concedidos.

De uma forma muito especial desejo agradecer à Maria Helena Gonçalves o contínuo estímulo, bem como a colaboração em muitos trabalhos experimentais, sugestões, discussões oportunas e empenho demonstrado na elaboração deste trabalho. Pelo apoio prestado nos momentos de desânimo, o meu sincero obrigado.

Desejo também agradecer às Pessoas do Instituto de Ciências Biomédicas "Abel Salazar" que de diversas formas comigo colaboraram, salientando em particular a Sra. D. Elsa Mendonça e a Sra. D. Natália Mota que contribuíram com o seu apoio técnico para a concretização de parte deste trabalho, e a Sra. D. Teresa Oliveira pelo excelente trabalho na elaboração dos gráficos e tabelas.

O meu reconhecimento às Pessoas do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e, em especial, à Doutora Ana Maria Parente desejo agradecer as sujestões oportunas ; à Sra. D. Maria Andrea Costa manifesto a minha gratidão

pelo entusiasmo, competência e dedicação postos no trabalho fotográfico; à Sra. D. Maria Margarida Oliveira desejo agradecer a maneira paciente e dedicada como transmitiu os ensinamentos que tornaram possível a utilização do computador, bem como a invulgar competência simpatia e disponibilidade sempre demonstradas.

Aos Profs. Doutores Lolita Daneo-Moore e Gerald D. Shockman do Departamento de Microbiologia e Imunologia da "Temple University" de Medicina, Philadelphia, USA, a minha gratidão pelo acolhimento amável que me dispensaram, bem como pelo convite de colaboração futura.

Ao Luís Bettencourt e Bernardino de Freitas um agradecimento especial pela impressão do trabalho fotográfico que realizaram com entusiasmo e empenho.

À Licenciada Assunção Costa Lima cuja amabilidade e ajuda valiosa permitiram a impressão do texto deste trabalho, o meu sincero obrigado.

Agradeço também ao Instituto Nacional de Investigação Científica o suporte financeiro concedido através do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, onde foi realizada uma parte significativa deste trabalho.

À Fundação Calouste Gulbenkian desejo agradecer o subsídio que tornou possível a apresentação de uma comunicação no Rio de Janeiro.

Enfim, a todos aqueles que me apoiaram de diferentes modos, dirijo também os meus agradecimentos.

PRÓLOGO

A degradação da parede celular das bactérias e consequente bacteriólise em meios hipotónicos é um fenómemo conhecido desde há longos anos. As bactérias produzem enzimas capazes de hidrolisar componentes das suas próprias paredes e, quando submetidas a condições que provocam o descontrolo destas enzimas, degradam-se - fenómeno conhecido por autólise. Contudo, a bacteriólise pode ser originada por enzimas exógenas (nomeadamente lisozima e mutanolisina) e então denomina-se heterólise.

À medida que o estudo da autólise e heterólise foi sendo aprofundado, percebeu-se que se tratava de fenómenos complexos. Várias foram então as questões levantadas em relação a estes fenómenos, nomeadamente:

1 - Quais os mecanismos que levam ao descontrolo de enzimas que, embora potencialmente suicidas, têm a sua acção controlada durante o crescimento normal?

2 - Quais as funções fisiológicas desempenhadas por essas enzimas?

3 - Por que razão as bactérias apresentam diferentes sensibilidades à degradação da sua parede celular pela lisozima?

4 - As enzimas endógenas do sistema autolítico bacteriano participam na heterólise induzida pela lisozima?

Porque as respostas a questões como estas e outras estão longe de terem sido totalmente compreendidas, é que nos propusemos estudar os fenómenos da autólise e heterólise induzida pela lisozima numa bactéria de Gram - positivo.

Como modelos experimentais utilizámos *Streptococus faecium* ATCC 9790 e os mutantes EC31 e EC78, deficientes na actividade autolítica, que isolámos desta bactéria por mutação com etilmetanossulfonato. A bactéria *S. faecium* é um modelo excelente para o estudo destes fenómenos pois, além de possuir um sistema

autolítico endógeno mais simples que a maior parte dos sistemas encontrados nas bactérias de Gram-positivo, possui uma parede que não é facilmente degradada pela lisozima. A relativa resistência apresentada a esta muralisina permite que eventuais diferenças observadas na degradação possam ser avaliadas com mais rigor.

Os mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium* constituem modelos óptimos para avaliar o papel desempenhado pelas enzimas do sistema autolítico na autólise, bem como para avaliar a influência de um sistema autolítico deficiente na lise induzida pela lisozima

Vários foram os objectivos propostos na realização deste trabalho:

1. Melhor entendimento dos mecanismos que conduzem à autólise;
2. Compeensão do papel fisiológico desempenhado pelas enzimas autolíticas;
3. Optimização das condições que conduzem à bacteriólise induzida pela lisozima;
4. Avaliação do papel das enzimas do sistema autolítico na heterólise induzida pela lisozima.

Este trabalho está dividido em cinco secções. Na primeira, encontram-se as informações de literatura mais directamente relacionadas com o estudo que realizámos; na segunda, os métodos que utilizámos neste trabalho; na terceira, os resultados e discussão da autólise (Capítulo A) e da heterólise induzida pela lisozima (Capítulo B); na quarta, as conclusões do estudo realizado e na quinta, e última secção, a bibliografia utilizada na recolha das informações apresentadas neste trabalho.

ABREVIATURAS UTILIZADAS

CAM	Cloranfenicol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase	Desoxirribonuclease
EMS	Etilmetanossulfonato
g	Aceleração da gravidade
GA	Glutaraldeído
K	Unidade de actividade lítica
KDa	Quilodaltons
Lis	Lisozima
NBS	N-bromossuccinimida
PAS	"Periodic acid Schiff"
PMSF	Fluoreto de fenilmetanossulfonilo
RNA	Ácido ribonucleico
RNase	Ribonuclease
S	Coeficiente de sedimentação
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
TEMED	N,N,N',N' -Tetrametiletilenodiamina
TC	Tetraciclina
Tris	Tris (hidroximetil)aminometano
UV	Ultravioleta

ÍNDICE

INTRODUÇÃO

1. Organização do invólucro das bactérias de Gram-positivo 2
1.1. Membrana citoplasmática 3
1.2. Parede celular 7
1.2.1. Peptidoglicano 9
1.2.2. Polímeros acessórios 11
1.2.2.1. Ácidos teicóicos 11
1.2.2.2. Ácidos teicurónicos 14
1.2.2.3. Proteínas 14
2. Degradação da parede das bactérias de Gram-positivo 16
2.1. Autólise 17
2.1.1. Funções das autolisinas 20
2.1.1.1. Crescimento celular 21
2.1.1.2. Divisão e separação celulares 22
2.1.2. Regulação da actividade das autolisinas 23
2.1.2.1. Inibição da actividade das autolisinas 23
2.1.2.2. Indução da actividade das autolisinas 25
2.1.3. O sistema autolítico de *S. faecium* 26
2.1.3.1. Algumas propriedades da muramidase - 1 (E -1) . . . 27
2.1.3.2. Algumas propriedades da muramidase - 2 (E - 2) . . . 28
2.2. Lise induzida pela lisozima 29
2.2.1. Factores de resistência à lisozima 31

MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS 34
1.1. Estirpes utilizadas. Conservação de culturas 34
1.2. Meios de cultura 34
1.2.1. Meios de cultura líquidos 34
1.2.2. Meios de cultura sólidos. 38

1.3. Tampões e soluções 38
1.4. Origem comercial das enzimas e produtos químicos 39
1.4.1. Enzimas 40
1.4.2. Produtos químicos 40
1.5. Equipamento utilizado 40
2. MÉTODOS 42
2.1. Isolamento de mutantes deficientes na actividade autolítica 42
2.2. Condições de crescimento das culturas 43
2.2.1. Culturas da estirpe selvagem 43
2.2.1.1. Culturas CAM e culturas TC 43
2.2.2. Culturas dos mutantes deficientes na actividade autolítica . . . 44
2.3. Determinação da concentração bacteriana 44
2.4. Indução e avaliação da autólise 44
2.4.1. Células totais 44
2.4.2. Paredes celulares isoladas 45
2.5. Avaliação da heterólise induzida pela lisozima 45
2.5.1. Células totais 46
2.5.2. Paredes celulares isoladas 46
2.6. Isolamento de membranas 47
2.7. Isolamento de paredes celulares 47
2.7.1. Paredes contendo autolisina 48
2.7.2. Paredes tratadas com SDS 48
2.8. Determinação do efluxo de K^+ 49
2.9. Determinação da absorção de materiais em UV 49
2.10. Determinação da concentração de proteínas 49
2.11. Preparação de amostras para microscopia electrónica 50
2.12. Determinação da espessura das membranas 50
2.13. Determinação da espessura das paredes 51
2.14. Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE) 51

RESULTADOS

CAPITULO A

AUTÓLISE DE *S. FAECIUM* 54
1. Autólise celular 54
1.1. Autólise de células não congeladas 54
1.1.1. Tampão Tris-HCl 54
1.1.2. Tampão Imidazol-HCl 54
1.1.3. Tampão fosfato 55
1.2. Autólise induzida pelo congelamento prévio das suspensões celulares 62
1.2.1. Influência do tampão de congelamento 62
1.2.1.1. Tampão Tris-HCl 62
1.2.1.2. Tampão Imidazol-HCl 70
1.2.1.3. Tampão fosfato 73
1.2.2. Influência do Mg^{2+} 80
1.2.3. Inluência de nucleases 85
1.2.3.1. Acção da DNase 85
1.2.3.2. Acção da RNase 86
1.2.4. Participação das enzimas do sistema autolítico 89
1.2.4.1. Efeito da N-bromossuccinimida 89
1.2.4.2. Efeito do cloranfenicol e da tetraciclina 92
1.2.4.2.1. Características das culturas 92
1.2.4.2.2. Actividade autolítica das culturas CAM e TC 92
1.2.4.3. Mutantes de *S. faecium* deficientes na actividade autolítica 100
1.2.4.3.1. Características morfológicas 100
1.2.4.3.2. Actividade autolítica dos mutantes EC31 e EC78 100
1.2.5. Influência da fase de crescimento na autólise celular 101
1.2.6. Influência das condições de crescimento na autólise celular . . . 109
2. Autólise de paredes celulares isoladas 111
3. Características das membranas isoladas após autólise em diversos tampões 114
4. Discussão 119

CAPITULO B

LISE DE *S. FAECIUM* INDUZIDA PELA LISOZIMA 131

1. Lise celular 131

1.1. Efeito do congelamento prévio das suspensões celulares 131

1.2. Influência do tampão de incubação 131

1.2.1. Tampão fosfato 131

1.2.2. Tampão Tris-HCl 140

1.3. Ligação da lisozima às bactérias 143

1.3.1. Influência da razão lisozima/massa bacteriana na lise de *S. faecium* 147

1.3.2. Aumento da absorvância induzida pela lisozima 158

1.4. Avaliação da actividade autolítica na lise induzida pela lisozima . . . 158

1.4.1. Influência do fluoreto de fenilmetanossulfonilo 159

1.4.2. Influência do cloranfenicol e da N-bromossuccinimida 159

1.4.3. Acção da lisozima nos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium* . . 165

1.5. Influência da idade da cultura na eficiência de lise 171

1.6. Influência das condições de crescimento na eficiência de lise 174

2. Lise de paredes celulares isoladas 180

3. Características das membranas isoladas após heterólise induzida pela lisozima 181

4. Discussão 187

RESUMO E CONCLUSÕES 198

BIBLIOGRAFIA 205

INTRODUÇÃO

1. Organização do invólucro das bactérias de Gram-positivo

Os microrganismos podem viver numa variedade de ambientes sem paralelo e são responsáveis pela manutenção dos ciclos biológicos essenciais a toda a vida na Terra. Entre eles, encontram-se as bactérias que são sem dúvida a forma de vida mais abundante deste planeta - 80-90 % - (Pirie, 1973), provavelmente devido à sua alta taxa de mutação e adaptabilidade e também à simplicidade tanto da forma e estrutura, como da função. Deste modo constituem um óptimo material de investigação de numerosos fenómenos biológicos, nomeadamente os relacionados com a característica mais importante dos seres vivos - a sua capacidade de crescimento e divisão.

Numa observação ao microscópio de luz de uma cultura de bactérias em crescimento, torna-se evidente que estas possuem uma forma bem definida que se mantem de geração em geração; uma estrutura altamente organizada, a parede celular, é responsável por esta característica.

As duas estruturas que constituem o invólucro das bactérias de Gram-positivo e que se encontram intimamente associadas são a membrana citoplasmática e a parede celular. O isolamento de qualquer um destes dois constituintes pode hoje ser obtido com relativa facilidade. Os invólucros das bactérias funcionam como um todo dinâmico e intregrado com a parte restante da célula e não como camadas separadas de componentes hoje conhecidos (Rogers, 1987).

A membrana citoplasmática rodeia completamente o citoplasma bacteriano, constitui a principal barreira de permeabilidade entre a célula e o meio ambiente e, está envolvida em numerosos fenómenos biológicos de vital importância para as bactérias.

Ocupando uma posição externa relativamente à membrana citoplasmática, encontra-se a parede celular que constitui o principal suporte mecânico da célula e lhe confere uma enorme estabilidade; ela actua provalvelmente como uma barreira física perante uma variedade de agentes potencialmente nocivos e é responsável pelas diferentes formas encontradas nas bactérias (esférica, bastonete e outras). Apesar da extraordinária força mecânica, que lhe é conferida por ligações covalentes (Rogers, 1963; Weidel & Pelzer, 1964; Rogers *et al* ., 1980) capaz de suportar uma

enorme pressão osmótica interna (3-5 atmosferas em *Escherichia coli* ; 20 atmosferas nas bactérias de Gram-positivo), é uma estrutura dinâmica que permite à célula crescer e dividir-se (Koch, 1985).

O mecanismo de expansão da superficie da célula bacteriana é altamente complexo, mas organizado. As sequências de alterações no tamanho e na forma da célula não colidem com a capacidade de conferir protecção constante e estão programadas com precisão, sendo fielmente reproduzidas de geração para geração.

1.1. Membrana citoplasmática

A rodear o citoplasma bacteriano existe a membrana citoplasmática, que constitui a principal barreira osmótica de importância vital para a célula. Embora nas bactérias possam existir outras membranas, como a membrana exterior dos Gram-negativos e membranas intracitoplasmáticas adicionais nalgumas espécies, a membrana citoplasmática em muitas bactérias de Gram-positivo é a única estrutura membranosa existente (Silva, 1980). Se a parede celular fôr totalmemte removida o protoplasto pode ainda sobreviver, desde que colocado num meio que lhe confira protecção osmótica.

A membrana citoplasmática é constituida por uma bicamada fosfolipídica, onde se inserem proteínas integrais e se associam proteínas periféricas de acordo com o modelo de Singer & Nicolson (1972).

As bactérias são desprovidas de núcleo e de outros organelos intracelulares (mitocôndrias, cloroplastos, retículo endoplasmático, aparelho de Golgi, etc.) existentes nos eucariotas. Deste modo, funções desempenhadas naqueles organismos por essas estruturas membranosas, estão reunidas na membrana citoplasmática das bactérias, à qual estão associadas funções importantes como o transporte de aminoácidos, de açúcares e de iões, biossíntese dos fosfolípidos, fosforilação oxidativa, transporte de electrões, etc. (Kaback, 1970; Osborn *et al* ., 1974).

A análise de membranas purificadas de bactérias de Gram-positivo revelou a presença de muitas actividades enzimáticas que lhe estão associadas (Salton, 1961;

Machtiger & Fox, 1973). As propriedades vitais e características das membranas biológicas resultam da interacção existente entre as proteínas e os lípidos. Nas membranas das bactérias de Gram-positivo a relação proteína/lípido é mais elevada (cerca de 2-4/1) do que na generalidade das membranas citoplasmáticas dos organismos superiores (Silva, 1980).

A maior parte dos lípidos das bactérias encontra-se localizada nas membranas. Em *Streptococcus faecium* ATCC 9790 a membrana citoplasmática contém 94% dos lípidos totais, estando a restante porção no citoplasma (Vorbeck & Marinetti, 1965). De entre os diferentes grupos de lípidos encontrados na membrana citoplasmática de *S. faecium* destacam-se os fosfolípidos que representam 49% dos lípidos totais (Santos Mota *et al* ., 1970) e aproximadamente 0,6 % do peso seco da célula (Santos Mota *et al* ., 1972)

Em bactérias de Gram-positivo existem diferenças significativas na composição dos fosfolípidos; essas diferenças devem-se não só às condições utilizadas no meio de cultura, mas também à fase de crescimento da qual as bactérias são recolhidas (Houtsmuller & van Deenen, 1964; Op den Kamp *et al* ., 1967; Santos Mota *et al* ., 1972).

Uma outra característica das membranas das bactérias diz respeito à assimetria observada na distribuição dos lípidos pelos dois folhetos. Em *Bacillus megaterium* o folheto interno da membrana citoplasmática contem duas vezes mais fosfatidiletanolamina que o folheto externo (Rothman & Kennedy, 1977) e em *Bacillus subtilis* pelo menos 60 % daquele fosfolípido encontra-se no folheto externo da membrana citoplasmática (Bishop, 1977). Em *Bacillus amyloliquefaciens* 70 % do total dos fosfolípidos encontra-se situado no folheto externo da membrana apresentando-se a fosfatidiletanolamina com uma distribuição altamente assimétrica (Paton *et al* ., 1978).

A assimetria típica de todas as membranas biológicas resultante da distribuição desigual de proteínas e dos fosfolípidos nos seus folhetos pode, na membrana exterior de alguns Gram-negativos, acentuar-se como resposta ao seu habitat. É o que acontece com as Enterobacteriaceas que possuem uma membrana externa com distribuição preferencial dos lipopolissacarídeos no folheto externo e fosfolípidos

predominantemente no folheto interno (Ghuysen, 1977; Funahara & Nikaido, 1980).

Todas as membranas das bactérias, quando observadas em cortes ultrafinos ao microscópio electrónico de transmissão, apresentam um perfil de "unit membrane", constituido por duas camadas densas aos electrões, separadas por uma camada central não electronodensa.

A distribuição dos átomos densos aos electrões na membrana reflecte aproximadamente a organização molecular subjacente dos seus componentes; as duas camadas densas aos electrões, constituídas pelos grupos polares das proteínas integrais, pelas proteínas periféricas e pelos grupos polares dos fosfolípidos, são hidrofílicas, enquanto que a camada não electronodensa, constituida pelas cadeias dos ácidos gordos dos fosfolípidos e zonas hidrofóbicas das proteínas intregrais, é hidrofóbica (Fig. 1).

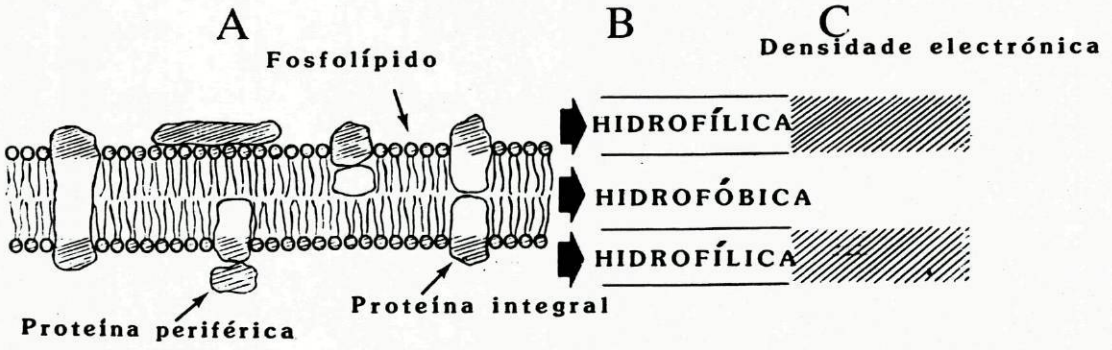


Fig. 1. (A) Representação esquemática da organização molecular das biomembranas de acordo com o modelo de Singer e Nicolson (1972). As áreas a tracejado nas proteínas o nos fosfolípidos representam as respectivas regiões polares (hidrofílicas). As áreas não tracejadas representam as regiões não polares (hidrofóbicas). A seta à esquerda indica o plano central da estrutura da membrana pelo qual é dividida em duas monocamadas. (B) As três camadas correspondem à distribuição geral dos resíduos hidrofílicos e hidrofóbicos dos componentes da membrana. (C) As três camadas do perfil observado no microscópio electrónico de membranas fixadas pelo OsO4 , ultraseccionadas e contrastadas pelo acetato de chumbo e uranilo, correspondem à distribuição preferencial dos átomos densos aos electrões. Reproduzido de Silva *et al* . (1979).

O perfil da membrana citoplasmática das bactérias de Gram-positivo, quando devidamente fixada e contrastada, é assimétrico, sendo o folheto externo mais espesso e mais electronodenso que o folheto interno (Silva, 1984). Os perfis da membrana citoplasmática das bactérias podem ser estudados em traçados

microdensitométricos realizados em negativos de imagens de microscopia electrónica. Os dois picos obtidos representam as duas camadas densas aos electrões. O perfil simétrico ou assimétrico da membrana citoplasmática pode ser deduzido da comparação destes dois picos: geralmente membranas simétricas apresentam os dois picos com a mesma altura e largura, enquanto que membranas assimétricas apresentam dois picos com áreas diferentes (Silva, 1980).

Por essa assimetria, não parece ser responsável a distribuição quer dos fosfolípidos, quer das proteínas (observada pela técnica do "freeze-ecthing") mas sim os anfifílos que se encontram presentes unicamente na camada externa da membrana. Os anfifílos são moléculas constituidas por uma porção lipídica, ancorada na porção exterior da membrana e uma porção hidrofílica que contém açúcar. O ácido lipoteicóico, a principal molécula anfifílica asssociada à membrana citoplasmática das bactérias de Gram-positivo, contribui com 1-2 % do peso seco das células e não é uma molécula de fácil extracção (Huff, 1982). Os ácidos lipoteicóicos são constituidos por 15-30 unidades de fosfato de glicerol covalentemente ligadas a um glicolípido (Wicken & Knox, 1975; Silva, 1984).

A ocorrência generalizada dos anfifílos na membrana citoplasmática dos Gram-positivos (van Driel *et al* ., 1973; Lambert *et al* ., 1977; Ward, 1981) levou à ideia de que eles deveriam desempenhar um papel importante na sua fisiologia. No grupo D de Estreptococos, o ácido lipoteicóico é o antigénio específico de grupo e encontra-se associado à membrana (Jones & Shattock, 1960; Wicken & Baddiley, 1963; Slade & Shockman, 1963; Shockman & Slade, 1964). Vários estudos mostraram que o ácido lipoteicóico completamente acilado, bem como outras moléculas anfifílicas, são inibidoras da actividade autolítica de *S. faecium* e de outras bactérias de Gram-positivo (Cleveland *et al* ., 1975, 1976a, 1976b; Höltje & Tomasz, 1975a, 1975b ; Meyer & Wouters, 1987).

A degradação da parede celular de *S. faecium* pelos processos líticos, autólise e heterólise induzida pela lisozima (objecto deste trabalho), altera o perfil normal assimétrico da membrana citoplasmática para um perfil simétrico. Esta alteração é sempre observada nas bactérias de Gram-positivo em situações que provocam lesões na membrana citoplasmática (Silva, 1984).

A perda das moléculas anfifílicas do folheto externo da membrana citoplasmática durante os processos líticos ou exposição das bactérias ao calor húmido ou agentes membrano-activos, parece ser o factor responsável pelo perfil simétrico observado nestas situações (Silva, 1984).

Como dissemos anteriormente, a membrana citoplasmática constitui a principal barreira osmótica da célula bacteriana; a ela se deve a regulação selectiva do tráfico de todos os iões ou moléculas. Para desempenhar uma tal função a membrana citoplasmática tem de estar íntegra, dado que pequenas perturbações levam ao efluxo de iões como o K^+, que em condições normais são acumulados no interior da célula (Epstein & Schultz, 1968), enquanto que rupturas maiores permitem a libertação de materiais que absorvem em UV. A quantificação quer do efluxo de K^+, quer da libertação de materiais que absorvem em UV, é facilmente realizável pelo doseamento das suas concentrações em filtrados de suspensões bacterianas (Allwood & Russel, 1968; Allowood & Hugo, 1971; Silva *et al* ., 1976a, 1976b). Este foi um dos processos que utilizámos para avaliar a integridade da membrana citoplasmática de *S. faecium* durante a autólise celular.

1.2. Parede celular

Nas bactérias de Gram-positivo a parede celular representa 15-30 % do peso seco da célula (Ghuysen, 1977). Sob o ponto de vista estrutural, a parede celular dos Gram-positivos apresenta-se como uma camada aparentemente homogénea de 15-50 nm de espessura que ocupa uma posição imediatamente externa em relação à membrana citoplasmática (Ghuysen, 1977; Beveridge, 1981; Shockman & Barrett, 1983). Contudo, em algumas espécies, esta camada apresenta zonas distintas (Beveridge, 1981).

Nas bactérias de Gram-positivo, a parede celular pode ser isolada, por ruptura mecânica das células, como um resíduo insolúvel não contaminado por componentes citoplasmáticos ou membranas (Ghuysen, 1977; Daneo-Moore & Shockman, 1977; Tipper & Wright, 1979). Contudo, o isolamento com sucesso das

paredes "purificadas" das bactérias de Gram-positivo obscureceu, como mostram os métodos imunológicos, a penetração dos componentes da membrana citoplasmática através da parede. Este resíduo insolúvel contém peptidoglicano, que constitui 30-70 % do peso total da parede seca (Schleifer & Kandler, 1972) e um ou mais polímeros acessórios dependentes da espécie, tais como os ácidos teicóicos, ácidos teicurónicos e/ou outros polissacarídeos acídicos ou neutros (Ghuysen, 1977; Lambert *et al* ., 1977; Tipper & Wright, 1979; Ward, 1981; Baddiley, 1981).

Estes polímeros acessórios estão covalentemente ligados ao ácido N-acetilmurâmico do peptidoglicano, através de uma ligação fosfodiester. Existem ainda outros polissacarídeos neutros e acídicos, tais como a ramnose, o ácido neuramínico e os polímeros contendo colina, encontrados nos cocos de Gram-positivo, que não têm sido tão bem estudados com os ácidos teicóicos e teicurónicos (Shockman & Barrett, 1983). Recentemente foram isolados de *S. faecium* dois tipos de complexos contendo ramnose. Um deles, neutro, contem ramnose, glucose, N-acetilglucosamina, ácido N-acetilmurâmico e uma pequena quantidade de fósforo; o segundo complexo, um ácido teicóico, mais acídico contem, para além dos componentes do complexo neutro, ribitol, N-acetilgalactosamina e uma quantidade apreciável de fósforo. Foi sugerido que o ácido teicóico de *S. faecium* contendo ribitol seria composto por ribitol, fósforo, N-acetilgalactosamina, glucose e ramnose numa relação molar aproximada de 1 : 1 : 1,5 : 4 : 1, com um peso molecular de aproximadamente 15 KDa (Kariyama & Shockman, 1987). Adicionalmente encontram-se outros polímeros, incluindo os polipeptídeos, presentes em pequenas quantidades, mas nem por isso menos importantes (Shockman & Barrett, 1983); entre eles, salientam-se as proteínas, algumas das quais ligadas covalentemente ao peptidoglicano (Giesberscht *et al* ., 1976; Ghuysen, 1977; Baddiley, 1981).

Apesar da numerosa informação actualmente existente acerca da estrutura da parede das bactérias, muito há por descobrir em relação à sua ultrastrutura. Esta ideia está bem expressa no título de uma comunicação recente de Beveridge (1987) - "Wall Ultrastructure: How Little We Know".

A parede celular desempenha um papel importante nos processos de

transformação (Seto & Tomasz, 1974, 1975), conjugação bacterianas (Jacob & Hobbos, 1974; Krogstad *et al* ., 1980; Clewell, 1981) e infecção vírica (Lopez *et al* ., 1982). Existe alguma informação de que os grupos carregados negativamente (carboxílicos e fosfato) servem para atrair e concentrar catiões divalentes e, deste modo, facilitar o seu transporte para a célula (Beveridge, 1981). Além disso, na parede celular localizam-se a maior parte dos antigénios das bactérias de Gram-positivo. O grupo D de Estreptococos parece constituir uma notável excepção, dado que o antigénio específico deste grupo não está associado com a parede celular (Jones & Shattock, 1960). A fracção mais importante do antigénio do grupo D parece estar intimamente associada com a membrana dos protoplastos de *Streptococcus faecalis* ATCC 9790 (Shockman & Slade, 1964). Associado ainda à parede celular encontram-se enzimas algumas das quais, durante o crescimento normal, desempenham um papel importante na divisão celular - as autolisinas.

1.2.1. Peptidoglicano

O peptidoglicano é um polímero que não tem paralelo fora do reino procariótico e, deste modo, revela-se como um componente característico das bactérias (Tipper & Wright, 1979), constituindo excepção poucos casos, como as Halófilas extremas e os Micoplasmas (Woese, 1981).

A principal função do peptidoglicano das bactérias de Gram-positivo é a protecção mecânica das células contra as alterações osmóticas que permite manter a expansão e elasticidade normais, necessárias para o metabolismo, crescimento e divisão celulares. O peptidoglicano de uma célula viva está normalmente hidratado - a água contribui com 92 % do peso das paredes (Beveridge, 1981). Alterações na hidratação podem modificar de muitas maneiras as propriedades mecânicas desta molécula, provavelmente afectando a porosidade. Além disso, os estados físicos do "network" do peptidoglicano estão altamente dependentes das interacções electrostáticas entre os grupos carregados (Marquis, 1987). Trabalhos de Matthews *et al.* (1979) e de Beveridge & Murray (1980) revelaram que o peptidoglicano tem uma

elevada capacidade para captar catiões inorganicos. A análise química do peptidoglicano revelou que na sua constituição estão presentes três elementos principais - as cadeias de glicano, as cadeias peptídicas e as pontes inter-peptídicas:

a) cadeias de glicano - constituídas por dois aminoaçúcares, a N-acetilglucosamina e ácido N-acetilmurâmico, dispostos linear e alternadamente e unidos pela ligação glicosídica ß (1→4), (Ghuysen & Strominger, 1963a, 1963b). O comprimento destas cadeias varia consideravelmente desde uma média de 7-10 unidades dissacarídicas em *Staphylococcus aureus* , até 30-590 unidades em *Bacillus licheniformis* e *B. subtilis* (Ward, 1973; Rogers, 1981). Embora em alguns casos especiais exista uma relação entre a forma da célula e o comprimento médio das cadeias (Krulwich *et al* ., 1967), não existem dados para uma correlação generalizada (Kolenbrander & Ensign, 1968; Ward & Strominger, 1971). As variações encontradas na determinação do comprimento das cadeias do glicano são grandes e parecem ser devidas à acção de enzimas endógenas - as hidrolases do peptidoglicano (Daneo-Moore & Shockman, 1977).

b) cadeias peptídicas - ligam-se ao grupo carboxilo (COOH) do ácido murâmico. Os peptídeos de uma dada espécie bacteriana contêm apenas um número limitado de tipos de aminoácidos (não excedendo geralmente 4 ou 5) na forma L ou D que alternam entre si sequencialmente; contudo, a D-alanina está sempre presente (Rogers, 1979).

c) pontes inter-peptídicas - ligam cadeias peptídicas. De espécie para espécie têm sido observadas variações nos aminoácidos que constituem estas pontes inter-peptídicas.

Ghuysen (1968) agrupou os peptidoglicanos em quatro quimiótipos com base na composição e localização das pontes peptídicas. Mais tarde, Schleifer & Kandler (1972) consideraram dois grandes grupos que por sua vez contêm subgrupos.

A classificação dos peptidoglicanos tem sido considerada de importância taxonómica. A estrutura das cadeias de glicano apresenta um razoável grau de uniformidade (Ghuysen, 1968; Schleifer & Kandler, 1972). Através da análise da composição do peptidoglicano e de estudos enzimáticos e químicos das paredes sabe-se que as unidades estruturais dissacarídicas de uma espécie podem não ser

idênticas - algumas podem conter D-ala-D-ala no carbono terminal, enquanto que outras podem não possuir a D-ala terminal. A acção das transpeptidases e carboxipeptidases parece ser responsável por esta variação (Shockman & Barrett, 1983). Além disso, os resíduos de aminoácidos podem não ser N-acetilados. A remoção do grupo N-acetil em *Bacillus cereus* resulta na resistência à hidrólise pela lisozima (Hayashi *et al* ., 1973).

A estrutura do peptidoglicano difere da de outras macromoléculas, tais como ácidos nucleicos e proteínas, por não ser uma estrutura linear ou mesmo ramificada, mas possuir uma estrutura bi- ou tridimensional semelhante a uma rede. Além disso, nela estão envolvidas vários tipos de ligações: a) glicosídicas - entre os aminoaçúcares; b) amina - entre o ácido murâmico e a cadeia lateral peptídica; c) peptídicas - entre aminoácidos e ligações fosfodiestéricas que ligam os outros polímeros acessórios do peptidoglicano. Finalmente, a presença de D-aminoácidos (e consequentemente ligações D-L e L-D) e de ligações peptídicas envolvendo grupos amino (que não são α) a um grupo carboxílico apresentam-se como características estruturais únicas. Não são conhecidos os papeis desempenhados por estas variações na função do peptidoglicano (Shockman & Barrett, 1983).

1.2.2. Polímeros acessórios

1.2.2.1. Ácidos teicóicos

Os ácidos teicóicos da parede podem exibir a gama completa de estruturas contendo quer fosfato de glicerol, quer fosfato de ribitol. Nos ácidos teicóicos que contêm glicerol, as ligações fosfodiestéricas unem as posições 1 e 3 das moléculas adjacentes de glicerol; nos ácidos teicóicos que contêm ribitol as ligações fosfodiestéricas fazem-se entre as posições 1 e 5 das moléculas adjacentes de ribitol; ocorrem na maior parte das paredes das bactérias de Gram-positivo, onde ocupam cerca de 20-30 % do peso seco da parede (Baddiley, 1972).

A presença destes polímeros pode ser dependente das condições de

crescimento. Deste modo, quando as células crescem em cultura contínua num meio onde o fosfato é o factor limitante de crescimento, a síntese do ácido teicóico cessa abruptamente e um outro polímero - o ácido teicurónico, um polissacarídeo acídico que não contem fósforo - substitui-o na parede. A adição de fosfato ao meio causa o retorno rápido do ácido teicóico e a perda do ácido teicurónico (Ellwood & Tempest, 1969). A limitação de fosfato no meio de cultura pode, noutros casos, causar uma alteração na morfologia das células; contudo, essa alteração de forma está directamente relacionada com a perda do ácido teicóico das paredes dessas células (Forsber *et al* ., 1973).

Os ácidos teicóicos apresentam uma grande variabilidade de estrutura. A cadeia de fosfato de ribitol contem em *S. aureus* H 10 unidades repetitivas (Garrett, 1965; Hay *et al* ., 1965), em *S. aureus* possui aproximadamente 30-40 unidades (Baddiley, 1981) e em *B. cereus* AHU 1030 as cadeias de fosfato de glicerol são constituídas por 60-65 unidades repetitivas (Sasaki *et al* ., 1983).

Estudos realizados em várias bactérias indicam que os ácidos teicóicos estão localizados na superfície da célula ou suficientemente próximos da superfície desta, dadas as reacções destes organismos intactos com os anticorpos específicos dos ácidos teicóicos (Nermut, 1967; Doyle *et al* ., 1974). Contudo, dado que os ácidos lipoteicóicos em algumas bactérias podem reagir serologicamente na superfície da célula, torna-se difícil a localização dos ácidos teicóicos.

Alguns autores, baseados na observação ultrastrutural das paredes das bactérias de Gram-positivo, procuraram relacionar o aspecto que por vezes apresentam em camada com a localização dos ácidos teicóicos e teicurónicos (Weibull, 1973; Nermut, 1967; Tsien *et al* ., 1978). No entanto, não é possível tirar conclusões precisas acerca da relação entre o aspecto em camadas das paredes dos Gram-positivos e a distribuição dos polímeros (Ward, 1981). Uma parte dos ácidos teicóicos da parede deve estar localizada à superfície, dado que constitui o local da estrutura receptora para bacteriófagos, como foi mostrado por Young (1967) e Glaser (1966). De um modo particular em Pneumococos, o ácido teicóico contendo colina, parece ser essencial para a adsorção do bacteriofago Dp-1 e foi sugerido por Lopez *et al* . (1982) que os resíduos de colina deste polímero possuem nesta bactéria elementos essenciais dos

receptores do fago Dp-1. Por outro lado, o complexo formado pelo ácido teicóico e o peptidoglicano em *B. subtilis* e em *S. aureus* possui receptores para vários bacteriófagos (Chatterjee, 1969; Hemphill & Whitelely, 1975).

Os ácidos teicóicos são poderosos agentes quelatizantes e tal como os grupos carboxílicos do peptidoglicano podem contribuir para a densidade de carga da parede (Heptinstall *et al* ., 1970; Matthews *et al* ., 1979; Beveridge & Murray, 1980; Beveridge, 1981).

Os ácidos teicóicos desempenham um papel vital pelo facto de sequestrar os iões necessários às enzimas da membrana dependentes de catiões (Hughes *et al* ., 1971). Outras funções celulares estão relacionadas com estes polímeros. O sistema autolítico de *Diplococcus pneumoniae* é largamente inactivo quando a colina não está presente no ácido teicóico (Tomasz & Westphal, 1971; Höltje & Tomasz, 1975c). Uma deficiência na biossíntese do ácido teicóico da parede do mutante 168 ts - 200 B, isolado de *B. subtilis*, altera a estrutura da parede celular, influenciando a morfologia e divisão celulares (Boylan *et al* ., 1972). Estes polímeros da parede desempenham ainda um papel importante na ligação de pelos menos algumas enzimas autolíticas ao seu substrato - parede celular - e controlam a actividade das autolisinas (Herbold & Glaser, 1975; Ghuysen, 1977, Robson & Baddiley, 1977, Beveridge, 1981); além disso, participam no fenómeno da competência (Tomasz, 1968). Recentes investigações realizadas com *B. subtilis* apontam para um papel essencial dos polímeros aniónicos no crescimento celular (Pooley *et al* ., 1987).

Os ácidos teicóicos estão covalentemente ligados ao peptidoglicano através de uma unidade de ligação (Coley *et al* ., 1978; Sasaki *et al* ., 1983). Recentes investigações com várias bactérias de Gram-positivo têm não só revelado a estrutura dos seus componentes acídicos, como a das ligações destes polímeros ao peptidoglicano (Kaya *et al* ., 1984; Kojima *et al* ., 1985; Yoneyama *et al* ., 1982, 1984; Iwasaki *et al* ., 1986). As unidades de ligação parecem envolver a N-acetilglucosamina-1-fosfato e um arranjo linear de alguns resíduos de fosfato de glicerol. O modo de ligação dos ácidos teicóicos e outros polímeros ao peptidoglicano, bem como os modelos de junção das cadeias de polímeros ancorados a lípidos nos ácidos lipoteicóicos da membrana, podem constituir marcadores importantes para uma classificação filogenética e

taxonómica das bactérias de Gram-positivo. No entanto, mais investigações necessitam ser efectuadas no intuito de avaliar se esta informação tem um significado geral (Iwasaki, 1986).

1.2.2.2. Ácidos teicurónicos

Em algumas espécies de bactérias de Gram-positivo existe um outro polímero acídico denominado ácido teicurónico (Janczura *et al* ., 1961). Em alguns casos, o ácido teicóico está ausente e então o ácido teicurónico está presente em grandes quantidades. Assim, as condições de crescimento podem, como dissemos anteriormente, determinar a presença de um ou outro destes polímeros.

Têm sido descritas variações estruturais nos ácidos teicurónicos da parede. Este polímero em *B. subtilis* é constituido por unidades dissacarídicas de N-acetilglucosamina e do ácido glucorónico e está presente em condições de limitação de fosfato (Ellwood & Tempest, 1969). Em *B. licheniformis* ATCC 9945 a estrutura repetitiva é um tetrassacarídeo que compreende dois resíduos de ácido glucorónico ligados a dois resíduos da N-acetilglucosamina (Baddiley, 1981).

A ligação das autolisinas às paredes celulares isoladas bem como os sistemas líticos nas paredes das bactérias de Gram-positivo podem ser controlados quer pelos ácidos teicóicos, quer pelos ácidos teicurónicos (Robson & Baddiley, 1977; Ghuysen, 1977; Beveridge, 1981).

1.2.2.3. Proteínas

Na parede das bactérias de Gram-positivo encontram-se ainda as proteínas embora pouco se saiba acerca da sua ligação com os outros polímeros da parede; no entanto, algumas encontram-se ligadas covalentemente ao peptidoglicano e aos ácidos teicóicos (Brown *et al* ., 1970). A proteína A de *S. aureus* está ligada à parede celular (Movitz, 1976; Sjödahl, 1977; Lindmark *et al* ., 1977). Estudos recentes

mostraram que a esta proteína permanece associada à parede após tratamento com SDS e sugerem que em *S. aureus* as proteínas, dependendo da sua natureza, estão ligadas covalentemente ou ionicamente às cadeias dos ácidos teicóicos (Umeda *et al* ., 1987).

Noutros casos, as proteínas cobrem a superfície exterior da célula e podem ser removidas pela tripsina. Assim, a proteína M, que constitui o antigéneo de tipo do grupo A de Estreptococos, é lábil a enzimas proteolíticas (por exemplo a tripsina) e pode ser extraída, sem afectar a viabilidade das células ou a insolubilidade e o aspecto ultrastrutural das paredes isoladas (Fox, 1974). A parede de um mutante de *B. subtilis* 168, estirpe Gbl-1, apresenta características pouco comuns (Leduc & van Heijenoort, 1973): em vez do ácido teicóico, apresenta uma proteína de alto peso molecular, que representa 50 % ou mais do material da parede. Esta proteína, formada por duas cadeias, não está covalentemente ligada ao peptidoglicano e pode ser facilmente removida com LiCl 6 M. No entanto, desconhece-se qual a função desempenhada por esta proteína na fisiologia da estirpe Gbl-1. Em *B. subtilis* , foram encontradas associadas com fracções purificadas de parede celular, pelo menos doze proteínas cujos pesos moleculares se situam entre 14 KDa e 203 KDa; todas estas proteínas podem ser extraídas por detergentes, o que sugere a ausência de ligações covalentes (Studer & Karamata, 1987).

Porém, no que diz respeito à morfogenese da parede celular, certas proteínas enzimáticas activas - autolisinas - parecem ser as mais importantes do invólucro das bactérias (Giesbrecht *et al* ., 1976). Não se conhece ao certo a localização celular das autolisinas de todas as bactérias de Gram-positivo. É característico de várias espécies que as paredes celulares isoladas, após ruptura ultrassónica das células, contêm autolisina firmemente ligada (Shockman *et al* ., 1967a; Fan, 1970; Fan & Beckman, 1972; Daneo-Moore & Shockman, 1977). Nessa ligação os polímeros acessórios - ácidos teicóicos e teicurónicos - desemphenham um papel importante (Herbold & Glaser, 1975; Ghuysen, 1977) mas, nalguns casos a presença da actividade autolítica ligada às paredes após ruptura celular, pode não reflectir a sua localização nas células intactas (Daneo-Moore & Shockman, 1977). As autolisinas podem não se encontrar ligadas ao peptidoglicano, como a autolisina de *S. faecium* (Shockman *et al* ., 1967b),

mas no momento da sua acção, elas ligam-se à parede celular (Giesbrecht *et. al* ., 1976). Provavelmente, Mitchell & Moyle (1957), foram os primeiros a reconhecer que a lise das bactérias se iniciava pela acção de enzimas endógenas - as hidrolases do peptidoglicano - na parede das bactérias.

Porque o nosso trabalho incidiu fundamentalmente nos processos de degradação de *S. faecium* - autólise e heterólise induzida pela lizosima - daremos algum relevo a esses fenómenos e às enzimas capazes de dissolver o seu próprio peptidoglicano - as autolisinas.

2. Degradação da parede das bactérias de Gram-positivo

A parede celular constitui o principal suporte mecânico da célula bacteriana, em virtude de possuir na sua estrutura peptidoglicano. Nas bactérias de Gram-positivo, para que uma pressão osmótica de cerca de 20 atmosferas possa ser mantida, é necessária a existência de uma parede celular intacta (Shockman *et al* ., 1983).

A degradação do peptidoglicano, em meios que não confiram protecção osmótica à célula bacteriana, conduz à ruptura da membrana citoplasmática (estrutura frágil, incapaz de suportar uma grande pressão osmótica) e consequentemente à libertação do conteúdo intracelular, isto é, tal degradação conduz à desagregação da célula bacteriana, fenómeno denominado bacteriólise (Welsch, 1958; Stolp & Starr, 1965). A bacteriólise, ou lise celular, pode ser avaliada espectrofotometricamente pela descida progressiva dos valores da absorvância inicial das suspensões celulares (Welsch, 1958; Stolp & Starr, 1965) e microscopicamente pela perda progressiva do conteúdo celular (Fitz-James & Hancock, 1965; Silva, 1967, 1979).

A lise celular que ocorre sem a intervenção de nenhum agente externo e que resulta da acção de enzimas endógenas da própria célula bacteriana, denomina-se autólise. A bacteriólise que resulta da acção de agentes exógenos denomina-se heterólise (Welsch, 1958; Stolp & Starr, 1965). No entanto, há agentes exógenos

podem capazes de modificar de tal modo as bactérias submetidas à sua acção, que elas entram em autólise. Um agente deste tipo pode ser chamado um indutor da autólise.

Como consequência lógica destas considerações decorre que o estudo do processo autolítico seja um pré - requesito para o estudo da heterólise (Welsch, 1958).

2.1. Autólise

A simples presença nas bactérias de enzimas endógenas, cuja actividade é potencialmente degradativa para o petidoglicano e consequentemente suicída para as células, e a observação de que durante o crescimento e divisão celulares ocorre natural e necessariamente a expansão desse polímero, levam à conclusão de que estas enzimas têm normalmente a sua actividade perfeitamente controlada. A autólise ocorre sempre que a célula bacteriana deixa de ser capaz de controlar as suas autolisinas, situação que pode ser consequência de perturbações drásticas do metabolismo celular (Stolp & Starr, 1965).

A ideia de que "a autólise de uma célula é um fenómeno estritamente endógeno e que a autólise de uma população bacteriana, pelo contrário, é simultaneamente um fenómeno endógeno e exógeno, dado que as enzimas autolíticas libertadas das células individuais lisadas podem actuar sobre os outos membros da população a partir do exterior" (Welsch, 1958), parece ultrapassada. Pelo menos em *S. faecium* , a autolisina "SF muramidase" parece incapaz de se ligar à superfície externa da parede celular constituindo esta característica um mecanismo de defesa pela qual as células podem proteger-se da dissolução da actividade libertada pelas células vizinhas (Joseph & Shockman, 1976).

A dissolução de paredes celulares isoladas provocada pelas autolisinas, é também denominada autólise e, deste modo, esta pode ser considerada como o fenómeno da lise das bactérias ou das suas paredes isoladas, ocorrido na ausência de enzimas líticas exógenas.

Dado que as autolisinas têm sido consideradas sinónimos das hidrolases do peptidoglicano e, que por vezes existe, alguma confusão na aplicação deste termos,

daremos uma definição clara do que são as enzimas consideradas autolisinas. Segundo o grupo de Shockman, "estritamente falando, autolisinas bacterianas são enzimas endógenas com actividades capazes de causar a lise (autólise) das suas próprias células intactas". *S. faecium* possui duas hidrolases endógenas, a E-1 e a E-2, mas apenas a primeira é uma autolilisina. Porém, falaremos com mais pormenor do sistema autolítico desta bactéria na secção 2.1.3.

As autolisinas provocam a hidrólise de ligações específicas necessárias à manutenção da integridade do peptidoglicano (Daneo-Moore & Shockman, 1977; Rogers *et al* ., 1980). No entanto, podem existir nas bactérias enzimas endógenas que hidrolisam apenas um número limitado de ligações não essenciais à manutenção da estrutura bi- ou tridimensional do peptidoglicano; são denominadas hidrolases do peptidoglicano, mas não são verdadeiras autolisinas, dado que são incapazes de dissolver as próprias células ou paredes isoladas (Shockman *et al* ., 1983; Kawamura & Shockman, 1983b). Exemplos deste tipo de hidrolases são a N-acetilase de *B. cereus* e a hidrolase E-2 de *S. faecium* .

Nas bactérias são conhecidos quatro tipos de autolisinas:

I. N-acetilmuramoil hidrolase (muramidase) - hidrolisa as ligações N-acetil-muramil ß-1,4 N-acetilglucosamina, na cadeia do glicano, com libertação dos grupos redutores livres do ácido N-acetilmurâmico. A "SF- muramidase" de *S. faecium* pertence a este grupo de enzimas;

II. ß-N-acetilglucosaminidase - liberta os grupos redutores livres da N-acetil-glucosamina.

III. N-acetilmuramil-L-alanina amidase (amidase) - hidrolisa a ligação entre as cadeias de glicano e as cadeias laterais peptídicas.

IV. Peptidases (cuja especificidade é variada) - cliva ligações peptídicas quer nas cadeias laterais peptídicas, quer nas pontes interpeptídicas.

A figura seguinte representa as ligações do peptidoglicano hidrolisadas pelas autolisinas.

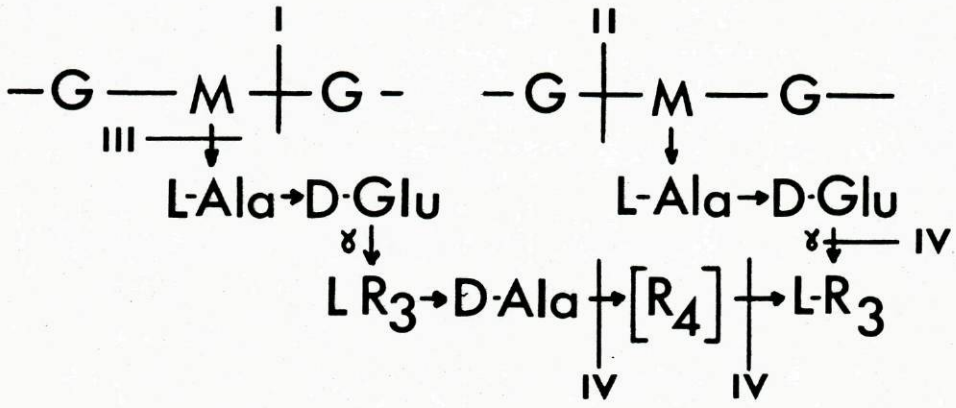


Fig. 2. Locais da hidrólise do peptidoglicano pelas autolisinas. A figura mostra a estrutura generalizada de um peptidoglicano na qual L-R_3 é um ácido diamino e [R_4], se presente, a ponte de aminoácido(s). Reproduzido de *Bacterial Autolysines: Specificity and Function* . Ward & Williamson, 1984.

A existência de mutantes que podem crescer e dividir-se a taxas razoáveis e que exibem apenas 5-20 % da actividade autolítica das estirpes de onde foram isolados apoia a ideia de que, pelo menos para os organismos com grande actividade autolítica, apenas uma fracção dessa actividade é necessária para o crescimento e divisão celulares (Shockman & Barrett, 1983). As dificuldades encontradas no isolamento de mutantes totalmente deficientes na actividade autolítica sugerem também a hipótese de que, de modo idêntico ao que acontece com outras funções essenciais, pode existir mais do que uma actividade enzimática presente e, deste modo, na ausência de funcionamento de um sistema, um segundo sistema redundante assume essa função, como é o caso de *S. faecium* (Shockman & Barrett, 1983; Shockman *et al* ., 1987).

Mutantes deficientes na actividade autolítica, isolados de várias estirpes de bactérias, têm sido úteis na obtenção de dados experimentais em favor de algumas funções atribuidas às autolisinas.

A ocorrência generalizada das autolisinas nas bactérias tem levado a numerosas investigações relacionadas com as possíveis funções desempenhadas por estas enzimas.

2.1.1. Funções das autolisinas

A actividade das autolisinas tem sido relacionada com numerosos fenómenos bacterianos: crescimento celular (Rogers, 1970, 1979; Shockman *et al* ., 1974), divisão e separação celulares (Fan, 1970; Pooley *et al* . , 1972; Chatterjee *et al.* , 1976; Rogers, 1979), "turnover" da parede (Chatterjee *et al* ., 1976; Pooley, 1976; Doyle *et al* ., 1981), transformação genética (Stewart & Marmur, 1970; Ranhand *et al.*, 1971), formação de flagelos (Fein, 1979; Pooley & Karamata, 1984a, 1984b), etc.

O numeroso trabalho que tem sido realizado neste domínio, nem sempre tem gerado consenso acerca destas funções. Tem sido impossível atribuir com exactidão a função biológica precisa das autolisinas, dadas as dificuldades de obtenção de mutações nos genes que codificam estas enzimas. Contudo, a sugestão de Pooley & Karamata (1984a, 1984b) de que a actividade autolítica de *B. subtilis* está sob o controlo dos genes "fla" e parece ser necessária à flagelação e a caracterização de um mutante de *S. pneumoniae* , completamente desprovido de amidase (sem o gene lyt A), parece abrir novas prespectivas no sentido de um esclarecimento total do papel das autolisinas (Lopez *et al* ., 1987).

Nesta introdução apenas nos referiremos a algumas destas possíveis funções - as que mais directamente se relacionam com o trabalho que realizámos.

2.1.1.1. Crescimento celular

Em 1964, Weidel & Pelzer propuseram um modelo para o crescimento e expansão do peptidoglicano. De acordo com este modelo, durante o crescimento das bactérias, a expansão do peptidoglicano ocorria pela acção conjunta e controlada de enzimas sintéticas e enzimas autolíticas (autolisinas). As enzimas autolíticas produziriam fendas no peptidoglicano existente e, nesses mesmos locais, novas unidades dissacarídicas seriam introduzidas devido à acção de enzimas sintéticas.

Até há 5 anos, a lise observada em *S. faecium* após a inibição do peptidoglicano (quer pela adição de um antibiótico, quer pela falta de um constituinte essencial da

parede) parecia poder ser explicada de acordo com o seguinte modelo: a lise ocorreria devido à actividade contínua da autolisina E-1 e à simultânea inibição da síntese do peptidoglicano. Contudo, *S. faecium* possui outra hidrolase do peptidoglicano, a E-2, que pode desempenhar uma tal função (Shockman *et al* . , 1983, 1987).

Segundo o mesmo modelo, os mutantes deficientes na actividade autolítica não deveriam degradar as suas paredes celulares sobrevivendo mesmo durante a inibição da síntese do peptidoglicano; por outro lado, não deveriam ser capazes de crescer normalmente, existindo apenas como mutantes letais. Surpreendentemente, as propriedades destes mutantes têm apenas confirmado a primeira, mas não a segunda das previsões acima feitas (Tomasz, 1984).

Têm sido isolados mutantes deficientes na actividade autolítica em várias espécies bacterianas.

Os mutantes (AUT-1, AUT-2 e AUT-3) isolados de *S. faecium* (Shungu *et al* ., 1979) e um dos mutantes (NH-4) isolado de *B. licheniformis* 6346 (Forsberg & Rogers, 1974), deficientes na actividade autolítica, crescem a taxas inferiores às das respectivas estirpes selvagens de onde foram isolados. O crescimento do mutante ß A177 de *B. subtilis* pode ser inibido em condições que impedem a produção das enzimas autolíticas; o rápido crescimento do mutante pode ser restabelecido pela adição de lisozima ou de um extracto contendo autolisina da estirpe selvagem ao meio de crescimento (Fan & Beckman, 1971; Fan *et al.*, 1972).

No entanto, mutantes de *B. subtilis* que exibem uma deficiência de 90-95 % na sua actividade autolítica, crescem a taxas normais; além disso, as paredes destes mutantes são hidrolizadas pela autolisina da estirpe selvagem e possuem uma composição química igual à daquela estirpe (Fein & Rogers, 1976). Idêntico comportamento apresenta um mutante de *S. aureus* que possui uma taxa de autólise das células e de paredes celulares isoladas 90 % inferior à da estirpe selvagem; no entanto, a composição das suas paredes e as taxas de crescimento são idênticas às daquela estirpe (Chatterjee *et al* ., 1976).

Recentemente isolou-se o primeiro mutante de *S. pneumoniae*, M-31, que possui uma deleção completa no gene lyt A que codifica para a amidase verificando-se que a completa ausência da autolisina não impede o crescimento deste

mutante a uma taxa normal (Sanchez-Puelles *et al* ., 1986; Lopez *et al* ., 1987)

Em resumo, os resultados obtidos com mutantes deficientes na actividade autolítica não permitem chegar a um consenso acerca do envolvimento das autolisinas no crescimento celular.

2.1.1.2. Divisão e separação celulares

Têm sido isoladas de uma grande variedade de espécies, nomeadamente em *B. subtilis* (Fein & Rogers, 1976; Williamson & Ward, 1981), em *B. licheniformis* NTC 6346 e ATCC 9945 (Forsberg & Rogers, 1974; Robson & Baddiley, 1977), em *S. faecium* ATCC 9790 (Pooley *et al* ., 1972) e em *S. aureus* (Chatterjee *et al* ., 1976), mutantes deficientes na actividade autolítica incapazes de completar a separação normal, originando cadeias. Contudo, este fenótipo pode também ser originado quer pela modificação na composição química da parede, quer pelos efeitos combinados da baixa actividade autolítica e modificações na composição química das paredes, que as tornam resistentes à autólise (Forsberg & Rogers, 1974). Assim, no mutante de *B. licheniformis* resistente à novobiocina, a deficiência no ácido teicurónico conduz à formação de cadeias (Robson & Baddiley, 1977).

Porém, nem todos os mutantes deficientes na actividade autolítica crescem em cadeia. De um grupo de três mutantes deficientes na autolisina, isolados de *S. faecium* por Shungu *et al.* (1979) dois, denominados AUT-2 e AUT-3, crescem em cadeias formadas por longos filamentos, mas um outro, denominado AUT-1, não mostra este fenótipo.

Os dados acumulados sobre a participacão da autolisina na separação celular, não têm sido apenas obtidos em mutantes deficientes na actividade autolítica. O crescimento em cadeia da estirpe selvagem de *B. subtilis* , a altas temperaturas, é devido a uma deficiência na actividade autolítica (Fan, 1970). A adição ao meio de cultura da autolisina de *B. subtilis* , parcialmente purificada, ou de lisozima provoca a separação das células (Fan, 1970). A adição de um inibidor da amidase ao meio de cultura de Pneumococos causa a formação de cadeias (Höltje & Tomasz, 1975a, 1975b)

Contudo, a formação de longas cadeias em estirpes com níveis elevados de actividade da amidase (mutante M-51) ou em estirpes onde a enzima falta (mutante M 31) não pode ser atribuída à amidase. Por outro lado, o mutante M-31 isolado de *S. pneumoniae* , em contraste com a estirpe selvagem, não autolisa na fase estacionária de crescimento quando incubado a 37 ^{o}C; contudo, este mutante autolisa a 30 ^{o}C (Lopez *et al* ., 1987).

2.1.2. Regulação da actividade das autolisinas

É geralmente aceite que a degradação do peptidoglicano é um passo essencial no processo autolítico (Shockman, 1965). O controlo das enzimas autolíticas, potencialmente suicídas, existente durante o crescimento e divisão celulares, pode ser quebrado através de mecanismos *in vitro*. São conhecidas condições experimentais capazes de inibir a expressão da actividade das autolisinas ou de induzir essa actividade.

2.1.2.1. Inibição da actividade das autolisinas

Höltje & Tomasz (1975a) mostraram que o ácido lipoteicóico - antigénio Forsman - inibia a autólise de Pneumococos. Posteriormente, vários estudos mostraram que o ácido lipoteicóico bem como certos lípidos (cardiolipina e fosfatidilglicerol) eram poderosos inibidores da actividade autolítica de paredes (e, em alguns casos de células) de algumas espécies de bactérias de Gram-positivo, nomeadamente em *S. faecium* (Cleveland *et al* ., 1975, 1976a, 1976b; Fisher *et al* ., 1981). Em alguns casos, a presença dos ésters dos ácidos gordos é necessária para essa actividade inibitória (Cleveland *et al* ., 1975, 1976a, 1976b). Os ácidos lipoteicóicos, a cardiolipina e, no caso de Pneumococos, o antigénio Forsman, não só inibem a degradação *in vitro* das paredes celulares, mas também são ainda capazes de impedir a lise de culturas induzida pela penicilina G e outros antibióticos que inibem a

síntese da parede celular (Shockman *et al* ., 1979; Tomasz, 1979). O mecanismo da lise de *S. pneumoniae* induzido pela penicilina G depende da libertação espontânea do ácido lipoteicóico no meio de cultura das bactérias tratadas com penicilina - a libertação do ácido lipoteicóico, desreprime as enzimas autolíticas, as quais por sua vez conduzem à destruição celular (Tomasz & Waks, 1975). Contudo, mesmo em Pneumococos, o mecanismo de regulação da actividade autolítica parece ser mais complexo, dado que mutantes isolados de *S. pneumoniae* não deficientes nessa actividade, não lisam após a inibição do crescimento pela benzilpenicilina mas, após a inibicão da síntese do peptidoglicano pela vancomicina e bacitracina lisam (Williamson & Tomasz, 1980).

A actividade enzimática das autolisinas das bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo é inibida pela N-bromossuccinimida (Cornett & Shockman, 1978; Parente & Silva, 1984; Parente, 1984), através da ligação deste composto aos aminoácidos triptofano, tirosina e histidina da enzima (Ramachandran & Witkop, 1967).

A actividade enzimática pode ainda perder-se por tratamentos das células ou paredes celulares isoladas com SDS; este detergente aniónico liga-se às proteínas provocando a sua desnaturação e perda de actividade biológica, nomeadamente a actividade enzimática (Nelson, 1971; Ne'eman *et al* ., 1971; Jones *et al* ., 1973, Helenius & Simons, 1975; Silva, 1979). Embora o SDS possa provocar a libertação de algumas proteínas não covalentemente ligadas à parede celular (Amano & Williams, 1984; Umeda *et al* ., 1987), não é capaz de libertar as que se encontram associadas deste modo a esta estrutura.

Em bactérias de Gram-positivo sabe-se também que a actividade autolítica é inibida quer pelo cloranfenicol, quer pela tetraciclina, conhecidos inibidores da síntese proteica (Pooley & Shockman, 1970; Sayare *et al* ., 1972). A inibição da síntese proteica das bactérias pela tetraciclina ocorre pela ligação deste antibiótico à subunidade 30 S dos ribossomas (Pestka, 1971), ou pela ligação do cloranfenicol à subunidade 50 S dos ribossomas (Vazquez, 1964). Além da inibição da actividade autolítica a exposição de bactérias ao CAM origina também a condensação do nucleóide (Kellenberger *et al* ., 1958; Murray, 1960; Franklin & Granboulan, 1966;

Morgan *et al* ., 1967; Daneo-Moore & Higgins, 1972); a "centralização" do nucleióde bacteriano tinha sido também observada em bactérias expostas à tetraciclina (Silva, 1962). A exposição das bactérias a este antibiótico originava o desaparecimento dos ribossomas Morgan *et al* . (1967).

A adição de etanol e outros alcoóis a culturas de *B. subtilis* em crescimento exponencial conduz a uma rápida redução na taxa de autólise das células em suspensão (Rogers & Wright, 1986).

2.1.2.2. Indução da actividade das autolisinas

Dado que para a manutenção da estrutura da célula bacteriana é necessária energia, um agente endógeno ou exógeno, capaz de interferir com a fonte ou utilização da energia, pode induzir o processo autolítico (Welsch, 1958).

Jolliffe & Doyle (1981) mostraram que em *B. subtilis* a autólise podia ser induzida por tratamentos que alteram os gradientes eléctrico e/ou de pH através das membranas celulares.

Culturas da fase exponencial de *S. faecium* autolisam rapidamente quando colocadas em condições ambientais que inibem a síntese contínua do peptidoglicano; esta inibição pode ser causada quer pela adição de um inibidor específico (penicilina ou cicloserina), quer pela falta de um percursor nutricionalmente essencial à síntese da parede (L-lisina, D-alanina, ácidos aspártico ou glutâmico, ou glucose) Shockman *et al.* (1961, 1967a). A adição de Triton X-100 a culturas da fase exponencial de *S. faecium* induz a lise celular (Cornett & Shockman, 1978). Segundo estes autores, a acção deste detergente não iónico, exerce-se ao nível da membrana citoplasmática, provocando a sua desestabilização e consequente libertação do ácido lipoteicóico ou de outros inibidores lipídicos da actividade autolítica.

Outros sistemas de regulação da actividade autolítica incluem uma "proteína modificadora" que se junta à amidase de *B. subtilis* e estimula a actividade desta enzima (Herbold & Glaser, 1975). Estudos realizados com *B. subtilis* mostraram que o "turnover" da parede parece ser sensível à presença de proteases no meio de

cultura e sugeriram que as enzimas autolíticas podem, nesta bactéria, ser reguladas por proteases extracelulares (Jolliffe *et al* ., 1980).

Condições desfavoráveis para o crescimento e anabolismo, isto é, a incubação de células em tampões com força iónica e pH determinados, constituem uma das muitas condições experimentais capazes de induzir *in vitro* a autólise de bactérias de Gram-positivo. Porém, os mecanismos que conduzem nas bactérias a uma actividade autolítica descontrolada, permanecem ainda largamente desconhecidos. Foi na perspectiva de um melhor entendimento desses mecanismos que nos proposemos estudar a autólise de *S. faecium.*

2.1.3. O sistema autolítico de *S. faecium*

O sistema autolítico de *S. faecium* ATCC 9790 parece ser mais simples que os sistemas encontrados noutras bactérias dado que, no peptidoglicano, a única ligação hidrolisada é a ß (1→4) - entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina (Shockman *et al* ., 1967a; Shockman & Cheney, 1969; Rosenthal & Shockman, 1975; Dezélée & Shockman, 1975). Além disso, existem apenas duas proteínas com actividade de muramidase - a muramidase-1 (E-1) e a muramidase-2 (E-2). A E-1 encontra-se ligada não covalentemente à parede celular; em células ou em paredes celulares isoladas esta proteína está presente numa forma activa e numa forma latente (activável por uma variedade de proteinases) na proporção de 1 : 4 ou 1 : 5 (Shockman *et al* ., 1967a; Shockman & Cheney, 1969; Kawamura & Shockman, 1983a; Shockman *et al* ., 1983). A autólise celular é um reflexo da forma activa da autolisina e não da sua forma latente (Pooley & Shockman, 1969). A outra proteína, E-2, uma enzima que hidrolisa pelo menos algumas ligações nas paredes intactas, é aparentemente incapaz de dissolver tais paredes, sugerindo deste modo que não é uma verdadeira "autolisina"; encontra-se também ligada à parede celular e possui uma fraca actividade extracelular em paredes homólogas intactas (Shockman *et al* ., 1983).

Estas duas hidrolases do peptidoglicano exercem funções separadas mas

coordenadas durante a "assembly" e divisão normal da parede celular (Shockman *et al* ., 1987); contudo, na ausência de uma delas (por exemplo, da E-2) a actividade da outra é suficiente (Shockman *et al* ., 1987). Estas duas muramidases, dadas as diferenças de actividade que apresentam, são possivelmente produtos de dois genes distintos (Kawamura & Shockman, 1983b). A expressão da actividade autolítica de *S. faecium* depende não só das condições de crescimento da cultura, mas também das condições do meio no qual a expressão da actividade autolítica é observada (Shockman *et al* ., 1961; Shockman, 1965).

2.1.3.1. Algumas propriedades da muramidase - 1 (E-1)

As características desta enzima indicam o seu envolvimento na divisão e separação celulares: a actividade desta enzima parece estar topologicamente regulada, isto é, exerce-se primariamente junto das porções da parede mais recentemente formadas (Pooley & Shockman, 1969; Higgins *et al.* , 1970; Joseph & Shockman, 1976); a sua actividade máxima ocorre na fase exponencial de crescimento e descresce à medida que a cultura avança na fase estacionária (Shockman *et al.*, 1958). Células de culturas nas quais a síntese proteica é inibida por adição de antibióticos são resistentes à autólise (Pooley & Shockman, 1970; Sayare *et al* ., 1972), mas a inibição da síntese do DNA não impede a manifestação deste fenómeno (Sayare *et al* ., 1972).

A enzima purificada pode hidrolisar os peptidoglicanos de várias espécies de bactérias, mas tem uma pequena actividade nas correspondentes paredes intactas (Kawamura & Shockman, 1983a). Tal dificuldade parece ser devida à presença de polímeros acessórios, diferentes dos de *S. faecium* , ligados covalentemente a essas paredes (Shockman *et al* ., 1987, em publicação). A forma latente desta muramidase, facilmente extraível das paredes isoladas, possui um peso molecular de 130 KDa e, após tratamento pela tripsina ou proteinases endógenas, é convertida numa forma activa de peso molecular igual a 87 KDa. A forma latente parece ser sintetizada numa forma zimogénica que é mais tarde transportada para os locais da parede onde é activada (Shockman *et al* ., 1983; Pooley & Shockman, 1969).

A autolisina E-1 constitui provavelmente o primeiro exemplo de uma glicoproteína existente nas bactérias (Shockman *et al .*, 1983; Kawamura & Shockman, 1983a). Preparações altamente purificadas da enzima revelam um espectro de absorção pouco usual, com uma absorvância máxima a 260 nm e a presença de ribose covalentemente ligada, bem como fósforo e grupos SH sem cisteína (Dolinger *et al .*, 1987a; Shockman *et al .*, 1987, em publicação). A reacção positiva com o método de PAS apresentada pelas duas formas da enzima (130 e 87 KDa) deve-se à presença de cadeias de glicano covalentemente ligadas (Kawamura & Shockman, 1983a; Shockman *et al .*, 1987, em publicação).

Esta muramidase possui um mecanismo sequencial de acção exodissacarídica - a enzima liga-se aos grupos terminais não redutores das cadeias, hidrolisando progressivamente as suas ligações susceptíveis: uma vez ligada a uma cadeia, é incapaz de se libertar ou de se ligar a outra, sem que a hidrólise de todas ou de quase todas as ligações tenha ocorrido; quando a enzima atinge a parte final ou está muito próximo do fim, a hidrólise das ligações diminui ou pára e, da parte distal da cadeia, ocorre uma pequena libertação da enzima (Barrett *et al .*, 1984; Shockman *et al .*, 1985).

A cinética e as propriedades físicas desta muramidase, bem como a sua capacidade para permanecer e hidrolisar ligações apropriadas na parede, são altamente consistentes com a sua localização fora da barreira de permeabilidade celular (Barrett *et al .*, 1984).

2.1.3.2. Algumas propriedades da muramidase - 2 (E-2)

A muramidase E-2 é uma proteína hidrofóbica de 125 KDa, sensível á proteólise e possui pelo menos uma forma com 75 KDa que retém a actividade de muramidase (Shockman *et al .*, 1987; Dolinger *et al .*, 1987b). Foi recentemente demonstrado que as duas formas da proteína que possuem actividade de muramidase -2 e as proteínas 1 e 5 da membrana de *S. faecium* , às quais se liga a penicilina, são idênticas (Shockman *et al .*, 1987, em publicação). Além disso, a forma

total da E-2 corresponde à proteína 5 (PBS 5) da membrana (Said *et al* ., 1987) e, tal como esta proteína, é funcionalmente importante na "assembly" do peptidoglicano (Shockman *et al* ., 1981, 1987).

A muramidase E-2 possui provalvelmente um mecanismo de hidrólise do peptidoglicano não sequencial. O facto desta hidrolase ser incapaz de dissolver as paredes celulares intactas da mesma espécie, não significa que a enzima não possa hidrolisar ligações nestas paredes. Esta enzima pode hidrolisar ligações do meio de uma cadeia de glicano e deste modo fornece grupos terminais adicionais para a ligação da muramidase E-1. Esta muramidase é capaz de dissolver a fracção insolúvel do peptidoglicano das paredes de *S. faecium* ou de *Lactobacillus acidophilus* (Shockman *et al* ., 1987, em publicação). A acção desta hidrolase parece ser mais subtil e selectiva que a da "SF muramidase" (Kawamura & Shockman, 1983b). A capacidade de se ligar e dissolver as paredes de *M. luteus* é uma característica que a distingue da muramidase E-1; além disso, a muramidase E-2 está presente numa forma activa quer no sobrenadante das culturas, quer na fracção da parede celular, enquanto que a muramidase E-1 encontra-se presente no sobrenadante das culturas, mas numa forma desnaturada. A presença da muramidase E-2 no meio de cultura indica que esta enzima pode facilitar os passos finais da divisão e separação celulares (Shockman *et al* ., 1987, em publicação). Recentemente foi extraída e purificada a muramidase E-2 a partir de preparações sonicadas de células (Dolinger *et al* ., 1987, artigo em preparação).

2.2. Lise induzida pela lisozima

Lisozima foi o nome dado por Fleming em 1922 a uma enzima presente em vários tecidos e secreções de origem humana e animal (lágrimas, saliva, etc.), com capacidade de lisar as células de muitas espécies microbianas. De todas as fontes testadas por Fleming para avaliar a actividade da lisozima, a clara de ovo da galinha revelou ser a que possuía a enzima em quantidades mais abundantes (Salton, 1958). Numerosas investigações realizadas com microrganismos têm utilizado a lisozima extraída desta origem; possivelmente duas razões estão na origem de tal facto: a sua

abundância e a comercializacão da enzima num estado puro.

O grau de susceptibilidade dos microrganismos à acção lítica da lisozima tem sido usado como índice do potencial desta enzima como agente antibacteriano. Contudo, os resultados obtidos com a lisozima da clara do ovo não devem ser extrapolados a lisozimas de outras origens. A lisozima humana constitui, pelo menos em *S. mutans* BTH, um factor antibacteriano mais efectivo que a lisozima da clara do ovo (Iacono *et al* ., 1980). A lisozima do bacteriófago T_4 possui a mesma função catalítica que a lisozima da clara do ovo, mas é 250 vezes mais activa que esta nas paredes celulares de *E. coli* (Matthews *et al* ., 1981; Grütter & Matthews, 1982).

A lisozima (EC 3.2.1.17) é uma molécula catiónica cuja adsorção à célula bacteriana é altamente dependente do pH e da força iónica do meio (Smolelis & Hartsell, 1952; Davies *et al* ., 1969; Metcalf & Deibel, 1969, 1973; Saint-Blancard *et al.* ,1970; Coleman *et al* ., 1970; Chang & Carr, 1971).

A adsorção não energética de um determinado catião às paredes celulares de microrganismos depende directamente do meio no qual ocorre e, dentro de determinados limites, a um aumento do valor de pH corresponde um aumento da quantidade de catião adsorvido pelas células (Sussman & Lowry, 1955). Por outro lado, os catiões podem competir entre si na ligação aniónica à parede celular (Webb, 1970; Cabral & Silva, 1984). A actividade lítica da lisozima, observada a um determinado pH e força iónica, depende também da temperatura (Smolelis & Hartsell, 1952; Saint-Blancard *et al* ., 1981). A lisozima é uma proteína pequena (129 aminoácidos) que possui um peso molecular de 14 KDa e um ponto isoeléctrico a pH 10,5 - 11 (Salton, 1957; Lenhinger, 1977; Mathews *et al* ., 1981), que hidrolisa as ligações glicosídicas ß (1→4) entre o ácido N-acetilmurâmico e a N-acetilglucosamina da parede das bactérias (Ghuysen *et al.* , 1968). Devido às suas características básicas, a lisozima pode formar complexos com substâncias carregadas negativamente quer da superfície da célula, quer com outros componentes celulares acídicos (Salton, 1957), nomeadamente com o DNA (Chassy & Giuffrida, 1982).

Dado que o peptidoglicano, substracto para a lisozima, está presente em todas as bactérias, excepto nos Micoplasmas e Halófitas obrigatórias, o efeito lítico desta enzima sobre as células intactas é determinado primariamente pelo seu livre acesso à

parede celular, nomeadamente às ligações por ela hidrolisadas. Células bacterianas intactas tratadas com lisozima em condições apropriadas de concentração da enzima, pH, força iónica do veículo, etc, variam consideravelmente na sua resposta lítica e, mesmo entre as bactérias de Gram-positivo que são directamente afectadas pela lisozima, existe uma escala de diferentes sensibilidades (Salton & Pavlik, 1960; Stolp & Starr, 1965; Metcalf & Deibel, 1972).

É geralmente aceite que as membranas das bactérias de Gram-positivo podem ser facilmente isoladas num estado puro e nativo após lise das células com lisozima. Este processo lítico, se realizado na presença de nucleases, facilita o isolamento de membranas não contaminadas por constituintes celulares. Bactérias de Gram-positivo sensíveis à lisozima, expostas à acção desta enzima em meios que lhes confiram protecção osmótica apropriada dão origem, após digestão da parede celular, à formação de protoplastos (Weibull, 1953). A sensibilidade osmótica dos protoplastos está relacionada com o facto de não possuirem parede celular. A transferência destes protoplastos para meios hipotónicos conduz à ruptura da membrana citoplasmática que os rodeia e dá origem à lise celular. O método descrito por Kaback (1970) para o isolamento de membranas consiste essencialmente nestas etapas que acabámos de descrever. O método proposto por Konings *et al.* (1973) evita a etapa da formação de protoplastos e, deste modo, torna-se mais rápido e resulta na formação de vesículas de membrana altamente estáveis.

Foi este último método que seguimos, no essencial, para o isolamento das membranas de *S. faecium* após heterólise na presença da lisozima.

2.2.1. Factores de resistência à lisozima

As bactérias de Gram-negativo são geralmente "resistentes" à acção da lisozima (Strominger & Ghuysen, 1967) necessitando de um pré-tratamento para torná-las sensíveis (Noller & Hartsell, 1961a, 1961b). A membrana externa destas bactérias funciona como uma barreira de difusão e, deste modo, a lisozima deixa de ter acesso ao peptidoglicano, a menos que ocorra uma modificação dessa membrana.

Outros factores podem ainda influenciar a sensibilidade das células bacterianas à lisozima, nomeadamente o meio usado para o crescimento celular, a fase de crescimento na qual as bactérias são recolhidas (Metcalf & Deibel, 1969, 1972; Neujahr *et al* ., 1973; Chassy & Giuffrida, 1980), a concentração da enzima e a presença de sais inorgânicos (Grula & Hartsell, 1954; Pollock *et al* ., 1981; Goodman *et al* ., 1981a, 1981b; Wilkens *et al* ., 1982; Cho *et al* ., 1982). Shockman *et al.* (1968) mostraram que as células da fase exponencial de *S. faecium* são mais sensíveis à lisozima do que as da fase estacionária.

A presença de grupos O-acetil na cadeia de glicano constitui um outro factor que interfere com a sensibilidade à lisozima (Brumfitt *et al* ., 1958; Logardt & Neujahr, 1975). A presença de grupos O-acetil na parede celular de *S. faecalis* diminui a sensibilidade desta bactéria à lisozima (Abrams, 1958). A sensibilidade das células de *L. fermentum* ATCC 9338 à lisozima apresenta um máximo durante a fase exponencial de crescimento, enquanto que as células da fase estacionária são resistentes a esta muralisina (Neujahr *et al* ., 1973). Este aumento de resistência à lisozima, observado à medida que as células atingem a fase estacionária, foi relacionado com o aumento na substituição dos grupos O-acetil dos resíduos do ácido N-acetilmurâmico (Logardt & Neujahr, 1975). Variantes resistentes à lisozima foram também isolados de *M. lysodeikticus* - o protótipo da sensibilidade à lisozima (Salton, 1952) - onde a resistência encontrada foi igualmente atribuída à presença de grupos O-acetil ligados ao ácido murâmico (Brumfitt *et al* ., 1958; Ghuysen & Strominger, 1963a, 1963b). Bactérias sujeitas à restrição da síntese proteica quer pela falta de um aminoácido, quer pela presença no meio de crescimento de antibióticos bacteriostáticos, como o CAM, possuem paredes celulares modificadas que são resistentes à acção da lisozima (Goodell & Tomasz, 1980; Johannsen *et al* ., 1983; Reinicke *et al* ., 1983). A análise química das paredes de células cultivadas na presença de CAM mostrou que estas possuem um maior número de grupos O-acetil (Johannsen *et al* ., 1983).

Constituem ainda factores de resistência à digestão do peptidoglicano pela lisozima: o alto grau de pontes interpeptídicas (Strominger & Ghuysen, 1967; Amano & Williams, 1983), a ligação de polímeros como os ácidos teicóicos e polissacarídeos

ao ácido murâmico (Krause & McCarty, 1961), a ocorrência de resíduos de N-glucosamina não acetilados (Hayashi *et al* ., 1973; Westmacott & Perkins, 1979) e a presença de proteínas associadas ao peptidoglicano (Amano & Williams, 1984).

S. faecium, contrariamente a outras bactérias de Gram-positivo, tais como *M. lysodeikticus* ou *B. megaterium* possui uma parede celular que não é facilmente degradada pela lisozima. Deste modo, pensamos que esta bactéria constitui um modelo óptimo de investigação da actividade desta enzima em condições variadas porque eventuais diferenças observadas nas taxas de degradação da parede celular induzidas por esta muralisina, podem ser avaliadas com maior exactidão.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAIS

1.1. Estirpes utilizadas. Conservação de culturas

A maior parte das experiências foram realizadas com a estirpe selvagem de *Streptococcus faecium* (*S. faecalis* ATCC 9790). Utilizámos também os mutantes EC31 e EC78 deficientes na actividade autolítica, seleccionados entre os 85 que isolámos de *S. faecium* por mutação com etilmetanossulfonato(EMS), pelo método descrito por Pooley *et al*. (1972) (ver secção 2.1. Métodos).

A conservação das culturas foi efectuada de duas maneiras:

a) As culturas em uso foram mantidas a 4 ^{o}C em placas de Petri com meio "Brain Heart Infusion Agar" (BHIA), invertidas e fechadas com parafilme, por períodos geralmente de duas a três semanas. A repicagem das culturas foi sempre efectuada de modo a serem obtidas colónias isoladas.

b) O armazenamento das culturas por períodos longos foi efectuado em tubos de vidro com tampa de rosca contendo cerca de 5 ml de cultura e glicerol estéril, na concentração final de 15%. Estes tubos foram mantidos a -70 ^{o}C.

1.2. Meios de cultura

1.2.1. Meios de cultura líquidos

a) Meio T

Triptona (Difco) - 1% (p/v); Extracto de levedura (Difco) - 0,5 % (p/v); K_2HPO_4 - 0,25 % (p/v); Glucose - 1 % (p/v). O pH foi ajustado para 7,2.

b) Meio T_1

A sua composição química difere do meio T pelo facto de não conter glucose.

c) Meio Mínimo BM *

Foi preparado do seguinte modo:

1- Pesar os seguintes reagentes e dissolver com 100 ml de água, usando um ligeiro aquecimento:

Glucose (anidra)	40, 0 g
Na_2HPO_4	51, 3 g
NaH_2PO_4,H_2O	32, 9 g
NaOAc (anidro)	12, 0 g

2- Num balão volumétrico de 1000 ml juntar as soluções 1 a 20 (ver Tabela I).

3- Adicionar a solução preparada em 1) e misturar bem.

4- Adicionar, uma a uma, as soluções 21 a 24 (ver Tabela I), misturando após cada adição.

5- Prefazer o volume de 1000 ml com água destilada.

6- Ajustar o pH para 6,5 ± 0,10.

7- Esterilizar por filtração (filtro de 0,45 μm de poro).

8- Guardar no frigorífico. Não congelar.

Nota: não utilizar soluções "stock" preparadas há mais de 6 meses.

*A composição química deste meio foi gentilmente cedida pelo Prof. Gerald D. Shockman.

TABELA I - Preparação dos reagentes para o meio BM

	Solução "Stock"	Peso (g)	Adicionar	Vol. final (com água)	Vol. a Adicionar (para 1000 ml de meio)
1	KH_2PO_4	8,84		100	10
	K_2HPO_4	6,10			
2	$(NH_4)2SO_4$	12,00		100	10
3	Mistura de aminoácidos:		3,2 ml de NaOH 2,5 N	200	40
	Glicina	2,00	+		
	L-Hidroxiprolina	2,00	alguma água**		
	L-Prolina	2,00			
	L-Serina	1,00			
	L-Fenilalanina	1,00			
	L-Ácido Aspártico	1,00			
4	L-Leucina	1,00		200	40
5	L-Ácido glutâmico	3,00	9,6 ml NaOH, 2,5 N + 10 ml H_2O**	100	20
6	DL-Alamina	2,00		100	20
7	L-Isoleucina	1,00		100	20
8	L-Metionina	1,00		100	20
9	L-Treonina	2,00		100	10
10	L-Arginina-HCL	2,42		100	20
	(ou L-Arginina)	2,00			
11	L-Histidina-HCl, $2H_2O$	2,70		100	20
	(ou L-Histidina)	2,00			
	(ou L-Histidina-HCl)	2,46			
12	L-Triptofano	2,00	10 ml de HCl, 2,0 N	100	20
13	L-Valina	2,00		100	10

T A B E L A I (continuação)

14	L-Lisina-HCl	2,76		100	10
	(ou L-Lisina)	2,34			
15	Riboflavina	0,008	0,1 ml de Acido Acético	100	5
16	Vitaminas:			100	10
	Ácido Pantoténico (ou Pantotenato de cálcio)	0,017			
	Ácido p-aminobenzóico	0,002			
	Tiamina-HCl	0,008			
	Nicotinamina	0,040			
17	Biotina	0,005	Diluir 1ml de etanol a 95% para 50 ml com HCl 0,01 N; adicionar 10 ml desta solução a 90 ml de HCl 0,01 N		1
18	Ácido Fólico	0,002	0,1 ml de NaOH 2,5 N	100	5
19	Piridoxamina	0,023		100	5
20	L-Glutamina	0,10		100	10
21	L-Cistina	2,00	40 ml de HCl, 2,0 N	200	40
22	L-Tirosina	2,00	8 ml de NaOH 2,5 N + alguma água**	200	40
23	Solução A-U-G:		25 ml de HCl, 2,0 N**	250	60
	Sulfato de adenina	0,435			
	(ou adenina)	0,291			
	Guanina-HCl	0,310			
	(ou Guanina)	0,227			
	Uracilo	0,250			
24	Sais:		1,2 ml de HCl, 2,0 N	100	10
	$MgSO_4, 7H_2O$	4,00			
	NaCl	0,20			
	$FeSO_4, 7H_2O$	0,20			
	$MnSO_4, 4H_2O$	0,20			

** Utilizar aquecimento moderado (50°C) para dissolver.
Nota: O uso de H_2O a 45°C, ajudará na preparação de todas as soluções "Stock".

1.2.2. Meios de cultura sólidos

a) Meio BHIA - " Brain Heart Infusion Agar" (Difco)

b) Meio TSA - " Tryptic Soy Agar" (Difco)

c) Meio ML

Ao meio TSA fundido foi adicionada uma suspensão de células mortas (pelo calor) de*Micrococcus lysodeikticus* (2 mg/ml). Após autoclavagem a 110 ^{o}C durante 10 min, cerca de 8 ml desta suspensão foi adicionada a cada placa de Petri contendo aproximadamente 15 ml de meio TSA.

Todos os meios, líquidos ou sólidos, foram autoclavados a 121 ^{o}C durante 20 min, a não ser quando especificamente se indiquem outras condições de esterilização. Em todos os meios a glucose foi esterilizada separadamente, por filtração.

1.3. Tampões e Soluções

a) Tampão cacodilato de sódio

O tampão cacodilato de sódio foi preparado com a molaridade 0,05 M e um pH 7,0 ajustado com ácido clorídrico concentrado.

b) Tampão fosfato de sódio

Na preparação destes tampões utilizaram-se soluções equimolares de NaH_2PO_4 e Na_2HPO_4; a quantidade de cada uma das soluções foi determinada segundo a equação de Henderson-Hasselbalch, para cada um dos valores de pH utilizados nas experiências pretendidas.

c) Tampão fosfato de sódio e potássio

Na preparação destes tampões foram utlizadas soluções equimolares, normalmente misturadas para a obtenção do pH pretendido; deste modo, igual volume das soluções de NaH_2PO_4 (0,01 M - 0,5 M) e de K_2HPO_4 (0,01 M - 0,5 M) origina pH 6,8; 389 ml das soluções de KH_2PO_4 (0,01 M - 0,5M) e 611 ml de Na_2HPO_4 (0,01 M - 0,5 M) origina pH 7,0; e 55 ml das soluções de KH_2PO_4 (0,05 M e 0,1 M) e 945 ml de Na_2HPO_4 (0,05 M e 0,1 M) origina pH 8,0.

d) Tampão Imidazol-HCl

Os tampões Imidazol foram preparados com a molaridade e pH indicados nas experiências; o pH foi ajustado com ácido clorídrico concentrado.

e) Tampão Tris-HCl

Os tampões Tris(hidroximetilaminometano) foram preparados com a molaridade e o pH indicados nas experiências; o pH foi ajustado com ácido clorídrico concentrado.

f) Solução de PMSF

Uma solução de PMSF 1 M foi preparada em etanol absoluto e mantida a -20°C.

Todas as outras soluções utilizadas nas experiências foram preparadas quer em água desionizada, quer nos tampões a indicar posteriormente.

1.4. Origem comercial das enzimas e produtos químicos

1.4.1. Enzimas

Lisozima (EC.3.2.1.17) extraída da clara do ovo, "Grade I"; Desoxirribonuclease I (EC.3.1.4.5), (pancreática); Ribonuclease A, (pancreática) foram obtidas da Sigma Chemical Company.

1.4.2. Produtos químicos

Aminoácidos, vitaminas, adenina, guanina, uracilo, cloranfenicol- cristalino, éster etílico do ácido metanossulfónico (etilmetanossulfonato),"Coomassie Brillant BlueR", N-bromossuccinimida-cristalina, tetraciclina hidroclorida-cristalina, Imidazol (Grade III) e *Micrococcocus lysodeikticus* "Dried cells" foram provenientes da Sigma Chemical Company. Glutaraldeído, Epon (TAAB 812 Resin), MNA "Methyl nadic anhydride" e DMP 30 "tri-dimetilaminometil phenol" foram obtidos de TAAB Labaratories Equipment Limited. "Kit" de calibração para electroforese foi obtido da Pharmacia Fine Chemicals.

Os restantes produtos químicos (pró-análise) foram obtidos da Merck ou da BDH Chemicals Ltd.

1.5. Equipamento utilizado

- As culturas líquidas foram incubadas a 37 ^{o}C, excepto quando se indica outra temperatura, numa incubadora com agitação orbital Gallenkamp (modelo INR-200).

- As placas foram incubadas a 37 ^{o}C, com excepção de experiências em que se referem outras temperaturas, numa estufa de incubação Heareus (modelo T5042).

- A determinação da transmitância óptica das culturas bacterianas foi feita num espectrofotómetro Spectronic 20 (Bausch & Lomb) no comprimento de 520 nm e usando meio de cultura como branco; a determinação das transmitâncias ópticas das suspensões celulares ou de paredes isoladas foram realizadas num espectrofotómetro Spectronic 710 (Bausch & Lomb), respectivamente, nos

comprimentos de onda de 520 nm e 450 nm, utilizando como branco os tampões usados na preparação das suspensões.

- As determinações das transmitâncias ópticas a 260 e 280 nm dos filtrados das suspensões celulares foram realizadas num espectrofotómetro Shimadzu (modelo UV-260), utilizando como branco os tampões utilizados na preparação das suspensões.

- As determinações das taxas de autólise ou de heterólise foram obtidas em suspensões celulares ou de paredes isoladas, colocadas a 37 ^{o} C, numa incubadora Haereus (modelo T 5042).

- As determinações de pH foram efectuadas com um aparelho de pH Beckman (modelo Expandomatic IV).

- As centrifugações foram realizadas numa centrífuga refrigerada Sorval RC-5 (Du Pont Instruments).

- A fragmentação de células, para obtenção de paredes celulares isoladas, foi efectuada num desintegrador ultrasónico MSE 150W.

- As determinações do efluxo de K^{+} foram efectuadas num fotómetro de chama EEL (modelo 150).

- As fotografias de microscopia electrónica foram obtidas num microscópio electrónico de transmissão Siemens Elmiskop IA, com abertura de condensador 200 µm e de objectiva de 50 µm. As observações foram registadas em películas fotográficas Agfa-Gevaert 23D 56, as quais foram reveladas com Neutol liquid NE, Agfa-Gevaert, sendo os positivos obtidos em papel Agfa-Gevaert 100 utilizando o ampliador Durst Laborator 138 S.

- As determinações da espessura das paredes foram realizadas em microfotografias com uma lupa Mitutoyo, equipada com uma ocular micrométrica.

- Os traçados densitométricos foram realizados num microdensitómetro Joyce-Loebl MK III CS a partir de negativos de microfotografias electrónicas ou de geis de poliacrilamida (hidratados) com uma relação de braço de 50 X e uma fenda de 0,5 nm.

- Os cortes ultrafinos foram obtidos num micrótomo LKB Ultratome III com uma faca para microscopia Ge-Fe-Ri SNC, Frosinone e recolhidos em grelhas E.M. G

400 de 3,05 mm, (Polaron Equipment Ltd).

- As observações das culturas, bem como as determinações da contagem do número de células foram efectuadas com um microscópio de contraste de fase Nikon (modelo Optiphot).

- As microfotografias ópticas foram obtidas num microscópio óptico Leitz (modelo Dialux 20), a partir de preparações coradas pelo método de Gram.

- As electroforeses foram realizadas num aparelho Bio-Rad (modelo 220), com uma fonte de alimentação de corrente Vokam (Shandon Southern, Ltd).

2. MÉTODOS

2.1. Isolamento de mutantes deficientes na actividade autolítica

A mutagenização da estirpe selvagem de *S. faecium* e o isolamento de mutantes deficientes na actividade autolítica foram efectuados pela técnica descrita por Pooley *et al*. (1972).

S. faecium foi cultivado durante a noite com agitação no meio BM, de composição química definida (ver Tabela I). A 15 ml desta cultura adicionou-se 0,3 ml de EMS e retiraram-se em seguida 10 amostras de 1 ml. Todas as amostras foram incubadas 45 min a 37 ^{o}C, seguido de incubação por mais um período de 15 min, a 48 ^{o}C. O conteúdo de cada tubo foi diluído 1:10 com meio BM. Os tubos foram então incubados durante 5 horas a 37 ^{o}C. Após diluição apropriada espalharam-se inóculos em placas contendo meio TSA, as quais foram incubadas a 37 ^{o}C durante a noite. Escolheram-se placas contendo 100 a 300 colónias para posterior selecção de mutantes deficientes na actividade autolítica.

Uma réplica de cada colónia, crescida nas placas contendo meio TSA, foi feita em placas contendo meio ML, as quais foram posteriormente incubadas 24 horas a 30 ^{o}C. As placas foram então colocadas a 4 ^{o}C e inspeccionadas diariamente. Ao fim de 1 a 2 dias, à volta das colónias de tipo selvagem apareceram halos que indicavam

a dissolução das células de *M . lysodeikticus*. Foram seleccionadas, para ensaio da actividade autolítica, as colónias sem halos ou à volta das quais apareceram halos muito pequenos.

2.2. Condições de crescimento das culturas

2.2.1. Culturas da estipe selvagem

A estirpe selvagem de *S. faecium* (retirada de uma colónia isolada) foi cultivada em meio T, durante a noite a 37 °C, com agitação (100 rev/min). Esta cultura bacteriana foi usada como inóculo num novo meio T ou no meio T_1 (diluição 1:20). O crescimento da cultura (cultura WT) efectuou-se a 37 °C, com agitação de 120 rev/min, numa incubadora orbital, sendo acompanhado pela determinação da absorvância a 520 nm (A520). As células da fase exponencial (A520 = 0,5-0,6) ou do início da fase estacionária (A520 = 1,0-1,1) foram centrifugadas a 15 000 x *g* (10 min, 4 °C), lavadas e suspensas nos tampões a utilizar posteriormente. O pH das culturas foi registado ao longo da incubação.

2.2.1.1. Culturas CAM e culturas TC

Culturas WT, cultivadas durante a noite, foram rejuvenescidas em meio T e incubadas como descrito na secção 2.2.1. Quando a cultura atingiu o valor de A520 = 0,32-0,35 adicionou-se nalguns casos cloranfenicol (CAM), noutros tetraciclina (TC), respectivamente nas concentrações finais de 10 e 0,5 µg/ml. Após mais 30 min de incubação, as células das culturas expostas à acção do CAM (culturas CAM) ou da TC (culturas TC) foram centrifugadas como descrito na secção 2.2.1.

2.2.2. Culturas dos mutantes deficientes na actividade autolítica

Os mutantes foram cultivados em meio T até à fase exponencial de crescimento (A520 = 0,5-0,6) e centrifugados do mesmo modo que as culturas WT (ver secção 2.2.1.).

2.3. Determinação da concentração bacteriana

Durante o crescimento das culturas em meio líquido (37 ^{o}C) foram retiradas amostras simultaneamente para a determinação A520 e da determinacão do número de células/ml, efectuada com uma câmara de contagem Neubaeur, num microscópio óptico de contraste de fase. Nalguns casos as amostras foram previamente diluídas. Após o estudo da correspondência entre a absorvância e a concentração da cultura bacteriana, foi possível calcular o número de células de cada cultura bacteriana, a partir da leitura da A520.

A determinação da concentração das suspensões bacterianas nos tampões a ensaiar foi obtida a partir de amostras com diferentes valores de A520 procedendo-se de modo idêntico ao descrito no parágrafo anterior.

2.4. Indução e avaliação da autólise

2.4.1. Células totais

Células de culturas WT, CAM, TC ou dos mutantes EC31 e EC78 da fase exponencial (A520 = 0,5-0,6) ou do início da fase estacionária (A520 = 1,0-1,1) foram centrifugadas a 15 000 x g (10 min, 4 ^{o}C), lavadas e suspensas nos tampões de autólise ** ou no meio T sem K_2HPO_4. Algumas amostras foram congeladas, como suspensões concentradas, directamente a -70 ^{o}C ou sujeitas aos seguintes processos de congelamento: i) -20 ^{o}C (30 min) e -70 ^{o}C (um dia ou mais); ii) 4 ^{o}C (30 min);

-20 °C (30 min) e -70 °C (um dia ou mais). Suspensões de células (20ml; 7,2 x 10^8 células/ml) não congeladas ou congeladas-descongeladas à temperatura ambiente foram transferidas para "Erlenmeyers" de 250 ml de capacidade e incubadas durante 120 min a 37 °C .

**

a. Tris-HCl 0,01 - 0,5 M (pH 6,8-7,0); 0,05 M ou 0,1 M (pH 8,0)

b. Imidazol-HCl 0,01 - 0,4 M (pH 6,8)

c. Fosfato de sódio 0,01 - 0,5 M (pH 6,8)

d. Fosfato de sódio e potássio 0,01 - 0,5 M (pH 6,8-7,0); 0,05 M e 0,1 M (pH 8,0)

Em algumas experiências adicionou-se ao tampão de autólise NBS (1 mM) ou $MgSO_4$ (10 mM ou 100 mM), DNase (0,01 mg/ml) ou RNase (0,01-0,5 mg/ml).

Em todos os casos, a variação da A520 das suspensões foi determinada espectrofotómetricamente a intervalos regulares.

2.4.2. Paredes celulares isoladas

Paredes celulares isoladas (ver secção 2.7.) de *S. faecium* ou do mutante EC31 da fase exponencial foram suspensas (A450 = 0,200-0,210) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 7,0). Suspensões de paredes (4 ml) em tubos de espectrofotómetro, foram incubadas durante 120 min a 37 °C e analisadas a intervalos regulares para a determinação da absorvância a 450 nm. O decréscimo nos valores da A450 observado durante os primeiros 50 min de incubação foi utilizado para o cálculo das unidades de actividade lítica (K). Uma unidade de actividade lítica representa a descida de 0,001 unidades de absorvância, por minuto.

2.5. Avaliação da heterólise induzida pela lisozima

2.5.1. Células totais

Células de *S. faecium* da fase exponencial (A520 = 0,5-0,6) ou do ínicio da fase estacionária (A520 = 1,0-1,1) foram centrifugadas a 15 000 x *g* (10 min, 4 °C), suspensas em diferentes tampões de modo a serem obtidos diferentes valores de A520 nm e tratadas como se indica na Tabela X ou com diferentes concentrações de enzimas, como será referido em cada caso. Algumas células foram previamente congeladas-descongeladas antes da incubação. A lisozima (0,01-0,4 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e RNase (0,01 mg/ml) foram adicionadas no ínicio das experiências. O $MgSO_4$ na concentração final de 10 mM, foi adicionado no início das experiências ou após 30 min de incubação. Em algumas experiências a adição de RNase, DNase e Mg^{2+} efectuou-se aos 60 e 90 min de incubação em supensões celulares expostas à acção da lisozima, conforme se indicará posteriormente na respectiva secção. Em alguns casos, quando indicado, adicionou-se no início da incubação, PMSF na concentração final de 1 mM.

Suspensões bacterianas dos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium* , não congelados ou previamente congelados, foram tratados com lisozima, nas concentrações finais de 0,01; 0,05 e 0,1; 0,2; 0,3; 0,4 e 0,5 mg/ml em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio 0,05 M ou 0,1 M (pH 8,0), conforme será indicado na respectiva secção.

As experiências de heterólise foram realizadas com suspensões celulares (20 ml; 7,2 x 10^8 células/ml) colocadas num "Erlenmeyer" de 250 ml e incubadas durante 120 min a 37 °C. A leitura da A520 foi realizada, a intervalos regulares, espectrofotométricamente. Duplicados de amostras sem enzimas adicionadas exogenamente foram utilizados como controlo para cada experiência.

2.5.2. Paredes celulares isoladas

Paredes celulares isoladas de *S. faecium* ou do mutante EC31 (ver secção 2.7.) foram suspensas e incubadas na presença de 0,05 mg/ml de lisozima em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0), conforme descrito na secção 2.4.2. As

suspensões de paredes mantidas a 37 ^{o}C foram removidas a intervalos regulares para a determinação da A450 num espectrofotómetro Spectronic 710.

2.6. Isolamento de membranas

As membranas de *S. faecium* foram isoladas segundo o método de Konings *et al.* (1973), com algumas modificações.

Células da fase exponencial de crescimento de *S. faecium* foram suspensas (7,2 x 10 ^{8} células/ml) em diversos tampões*** e incubadas a 37 ^{o}C.

***

a) Tampão fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), RNase (0,01 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e $MgSO_4$ (10 mM)
b) Tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 6,8-7,0).
c) Tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8-7,0).

A incubação foi continuada até ser atingido um valor constante da A520 das suspensões celulares. Os restos celulares foram removidos por centrifugação a 800 x *g* (10 min, 4 ^{o}C) e o sobrenadante foi centrifugado a 30 000 x *g* (30 min, 4 ^{o}C) para recolha das membranas no sedimento. Após lavagem nos tampões indicados anteriormente (sem enzimas ou $MgSO_4$), as membranas foram suspensas em pequenos volumes desses tampões para posterior utilização. O conteúdo de proteínas das membranas foi determinado pelo método de Lowry (ver secção 2.10).

2.7. Isolamento de paredes celulares

O isolamento das paredes celulares foi adaptado do método descrito por Fan (1970).

Foram preparadas dois tipos de paredes celulares: i) paredes contendo

autolisinas; ii) paredes tratadas com SDS

2.7.1. Paredes contendo autolisina

Células de *S. faecium* e do mutante EC31 da fase exponencial de crescimento (A520 = 0,5-0,6) cultivadas em meio T foram centrifugadas a 15 000 x *g* (10 min, 2 °C) e lavadas em água destilada estéril mantida em gêlo. Todos os passos subsequentes foram realizados a temperaturas compreendidas entre 0-2 °C, para reduzir a autólise celular.

As células foram suspensas em 5-10 ml de água destilada estéril e fragmentadas num desintegrador ultrasónico em 30 períodos de 25 s cada. Após centrifugação a 1 000 x *g* (10 min) os fragmentos das paredes permaneceram no sobrenadante. O sedimento, formado principalmente por células não quebradas, foi ressuspenso em 5 ml de água estéril, sonicado novamente e a fracção contendo as paredes separada como acima referido. Os sobrenadantes das duas centrifugações foram reunidos e centrifugados a 12 000 x *g* (15 min). O sedimento foi lavado quatro vezes em água destilada estéril.

As suspensões continham geralmente menos de 1% de células intactas, avaliado por observação no microscópio de contraste de fase.

2.7.2. Paredes tratadas com SDS

O sedimento obtido após a centrifugação a 12 000 x *g* durante 15 min (como descrito na secção 2.7.1.) foi suspenso numa solução de SDS (concentração final de 2%) e incubado 30 min à temperatura ambiente, sendo em seguida centrifugado e lavado quatro vezes em água destilada estéril.

As paredes celulares foram utilizadas de seguida ou congeladas a -70 °C para posterior utilização, dado que experiências realizadas com paredes congeladas ou não congeladas forneceram resultados idênticos.

2.8. Determinação do efluxo de K^+

O efluxo de K^+ foi determinado em filtrados de suspensões de células da fase exponencial não congeladas ou congeladas-descongeladas, no ínicio do processo autolítico ou durante a incubação nos tampões de autólise. Os filtrados foram obtidos em menos de 30 segundos, com filtros Millipore (tipo HA; poro 0,45 μm). Os valores foram expressos com percentagem do valor total intracelular (100 %). O valor 100 % corresponde ao K^+ libertado das bactérias nas amostras fervidas durante 30 min. As determinações foram efectuadas num fotómetro de chama.

2.9. Determinação da absorção de materiais em UV

Usando filtrados resultantes do processo de autólise obtidos como indicado na secção 2.8., determinou-se, num espectrofotómetro com leitura em UV, a quantidade de material intracelular que absorve respectivamente a 260 e 280 nm. Os valores registados são os obtidos por leitura directa no aparelho.

2.10. Determinação da concentração de proteínas

As determiações da concentração de proteínas foram feitas pelo método de Lowry *et al* . (1951).

Foram preparados os seguintes reagentes: A - solução 2 % de Na_2CO_3; B_1- solução 1% de $CuSO_4$, $5H_2O$; B_2 - solução 2% de tartarato de Na e K; D - reagente Folin-Ciocalteau-Fenol diluído para uma concentração final de 1 N; C - preparado pouco antes de ser utilizado pela adição de 0,5 ml do reagente B_1 a 0,5 ml do reagente B_2 e diluído para 50 ml com o reagente A.

Em pequenos tubos de ensaio foram adicionados 0,2 ml da amostra a 2 ml do

reagente C e após agitação foram incubados à temperatura ambiente durante 10 min. A cada tubo foram adicionados 0,2 ml do reagente D e o seu conteúdo foi agitado vigorosamente. Os tubos foram incubados mais 30 min à temperatura ambiente. A absorvância a 750 nm foi lida num Spectronic 710. Uma solução de lisozima (1 mg/ml) foi usada como padrão.

2.11. Preparação de amostras para microscopia electrónica

As bactérias destinadas a estudos estruturais foram obtidas de amostras de células congeladas e não congeladas suspensas nos tampões utilizados na autólise ou na lise induzida pela lisozima antes ou em intervalos regulares ao longo da incubação. As amostras das bactérias foram tratadas do seguinte modo :

A fixação foi feita pela adição de glutaraldeído directamente às amostras, na concentração final de 2,5% (p/v). Em algumas experiências as células congeladas foram descongeladas à temperatura ambiente, centrifugadas e suspensas em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,0) e em seguida fixadas com glutaraldeído, como descrito acima. Após 60 min, as bactérias foram centrifugadas e pós-fixadas durante 16 horas com OsO_4 (1%, p/v), Ryter & Kellenberger (1958), seguido de uranilo a 1% (p/v) em solução aquosa (Silva *et al.* , 1971). Após fixação, as amostras foram desidratadas com séries ascendentes de etanol e embebidas em Epon 812 (Luft, 1961). Os cortes ultrafinos, recolhidos em grelhas, foram contrastados com acetato de uranilo (solução aquosa concentrada) seguido de acetato de chumbo (Venable & Coggeshall, 1965). Os tempos de contrastação foram de 50 s e 2 min, respectivamente para o primeiro e segundo corantes. As observações realizaram-se num microscópio electrónico Siemens Elmiskop IA e foram registadas em películas fotográficas Agfa-Gevaert.

2.12. Determinação da espessura das membranas

As determinações foram efectuadas a partir de traçados densitométricos

realizados em negativos fotográficos de microscopia electrónica num microdensitómetro Joyce Loebel M K III. Os registos foram feitos em papel e as determinações avaliadas entre picos dos respectivos traçados.

2.13. Determinação da espessura das paredes

As determinações foram efectuadas em células ou em paredes celulares intactas, a partir de positivos ou de negativos fotográficos de microscopia electrónica com uma lupa Mitutoyo. A espessura da parede foi definida como a distância entre os limites externos das bandas electronodensas interna e externa da parede celular. As medidas foram repetidas pelo menos duas vezes em momentos diferentes, num mínimo de trinta determinações.

2.14. Electroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS (SDS-PAGE)

As electroforeses foram realizadas segundo o método descrito por Laemmli (1970) e posteriormente modificado por Anderson *et al.* (1973).

As proteínas foram analisadas electroforéticamente utilizando geis de poliacrilamida de 10% ou 12,5%, com 0,75 mm de espessura. As amostras foram fervidas durante 90 s a 100 ^{o}C, arrefecidas em gelo e colocadas no gel. Aplicou-se a este conjunto uma corrente constante de 12 mA/gel (1 hora) seguida de 16 mA/gel. Os geis foram fixados 30 min numa mistura de ácido acético e metanol em água (45: 10: 45, v/v), corados com "Coomassie Brillant Blue R"- 0,125% dissolvido no fixador e descorados em metanol, ácido acético e água (5: 7,5: 87,5; v/v). Utilizámos como marcadores uma mistura de proteínas da Pharmacia composta por: fosforilase b (94 KDa), albumina bovina (67 KDa), ovalbumina (43 KDa), anidrase carbónica (30 KDa), inibidor da tripsina (20,1 KDa) e α - lactalbumina (14,4 KDa).

RESULTADOS

CAPÍTULO A

AUTÓLISE DE *S. FAECIUM*

1. Autólise celular

Os resultados apresentados nesta secção, excepto os referidos em 1.2.6., foram obtidos com células de *S. faecium* ou dos mutantes EC31 e EC78 cultivadas em meio com glucose (Meio T).

1.1. Autólise de células não congeladas

1.1.1. Tampão Tris-HCl

Sempre que células de culturas de *S. faecium* da fase exponêncial de crescimento (A520 = 0,5 -0,6) não congeladas foram suspensas durante 120 min a 37 °C em tampões Tris-HCl (pH 6,8) com molaridades compreendidas entre 0,01 M e 0,5 M não se verificou lise celular (Fig. 3B) e o correspondente estudo ultrastrutural revelou células com paredes celulares intactas, matriz citoplasmática homogénea e com ribossomas bem visíveis (comparar as Figs. 4 e 34).

Experiências paralelas realizadas com células não congeladas suspensas em tampões Tris-HCl (pH 8,0) e molaridades de 0,05 M e de 0,1 M (Tabela II, pag. 58) revelaram resultados idênticos aos obtidos a pH 6,8.

1.1.2. Tampão Imidazol-HCl

Alonso *et al.* (1979) mostraram que o tampão Tris-HCl alterava a permeabilidade das membranas do retículo sarcoplásmico (isoladas do músculo esquelético do rato) e que essas alterações eram reprodutíveis substituindo o Tris-HCl pelo Imidazol-HCl. A partir destes dados, propusemo-nos estudar os efeitos do tampão Imidazol-HCl (pH 6,8) na autólise de *S. faecium* e compará-los com os obtidos em tampão Tris-HCl com pH 6,8.

Os resultados que obtivemos quer por espectrofotometria (Fig. 3B), quer por microscopia electrónica (Fig. 5), com células da fase exponencial de crescimento não congeladas e incubadas durante duas horas em tampões Imidazol-HCl com molaridades compreendidas entre 0,01 M e 0,4 M foram idênticos aos encontrados com tampões Tris-HCl (Figs. 3B, 4).

1.1.3. Tampão fosfato

Células de culturas de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento não congeladas quando suspensas e incubadas em tampões fosfato de sódio ou de sódio e potássio (pH 6,8) com molaridades compreendidas entre 0,01 M e 0,5 M, durante 120 min a 37 ^{o}C, registaram diferentes taxas de lise celular (Fig. 3A) com valores máximos nas concentrações de 0,3 M para o tampão fosfato de sódio e 0,4 M para o tampão fosfato de sódio e potássio. Como veremos na secção 1.2.4., esta lise deve-se à actividade do sistema autolítico de *S. faecium*. Os resultados ultrastruturais de amostras colhidas após duas horas de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,4 M (Fig. 6) foram concordantes com os dados obtidos por espectrofotometria (Fig. 3A) e revelaram que na maior parte das células extensamente degradadas as paredes celulares possuiam sinais típicos de hidrólise pela autolisina e encontravam-se desprovidas de conteúdo citoplasmático. A Fig. 7 mostra as cinéticas da autólise máxima espontânea observada nos tampões fosfato de sódio e potássio 0,3 M e 0,4 M (pH 6,8).

Ao analisar, pela determinação do efluxo de K^{+} intracelular, a integridade da membrana citoplasmática durante a autólise em tampão fosfato de sódio 0,3 M observou-se que durante a primeira hora de incubação houve uma saída de cerca de 80 - 85 % desse ião (Fig. 8). Estes valores são significativamente superiores aos observados durante a incubação das células em tampões Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) ou Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8) onde não se verificou autólise (Fig. 8).

Estudos realizados em condições diferentes das referidas acima, descritas na Tabela V (pag. 84) permitem afirmar que a autólise de células não congeladas de *S. faecium* não se manifestou nos tampões fosfato com pH 8,0.

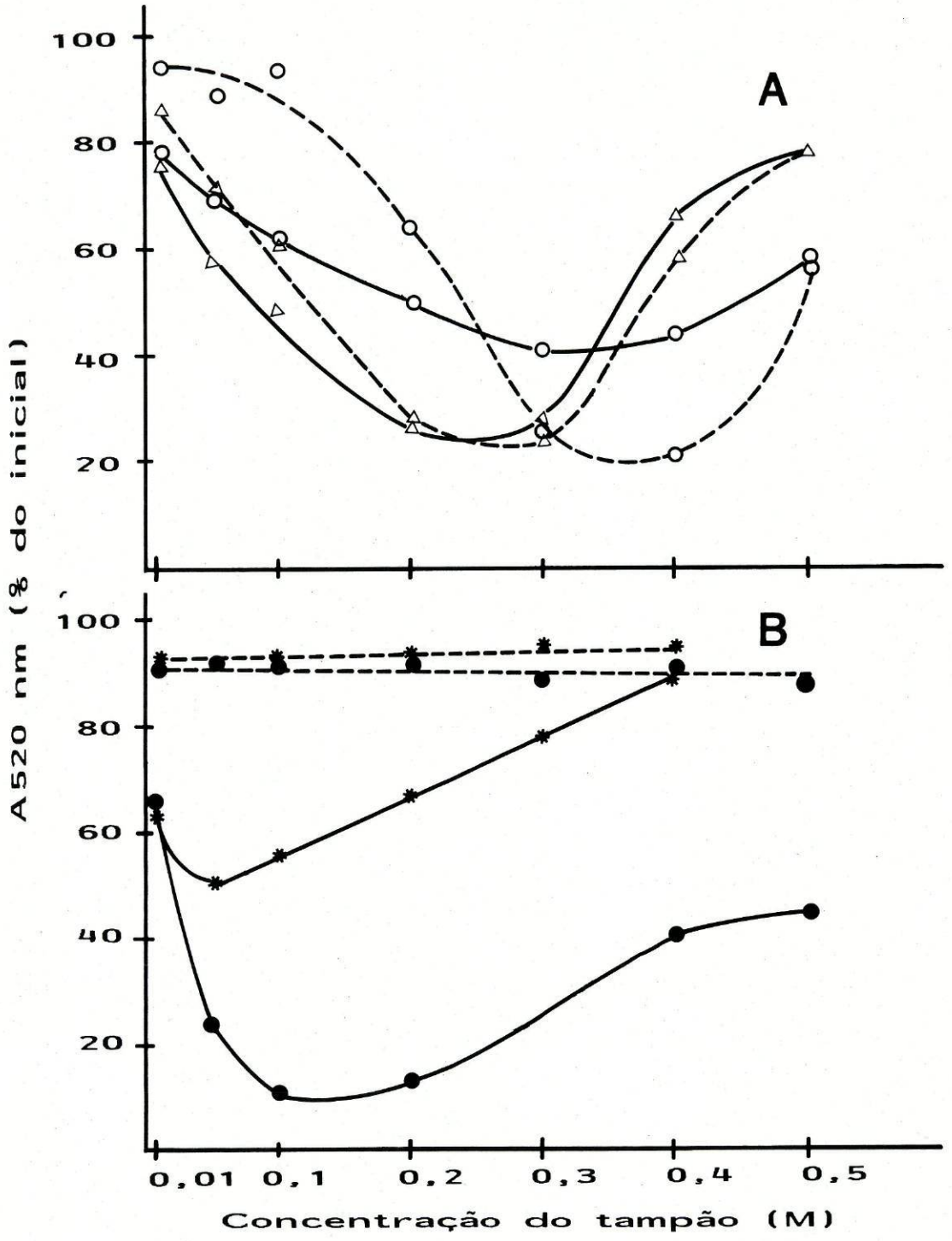


Fig. 3. Efeito do congelamento-descongelamento e da concentração de vários tampões na autólise de *S. faecium* . Células da fase exponencial de crescimento, não congeladas (---) ou previamente congeladas e descongeladas (—), foram suspensas em (A) tampões fosfato (de sódio ou sódio e potássio) (pH 6,8) ou (B) tampões Tris-HCl ou Imidazol-HCl (pH 6,8). A autólise foi seguida pela leitura da A520 das suspensões celulares (7,2 x 10^8 células/ml) durante 120 min de incubação a 37 ^oC. Símbolos: tampão fosfato de sódio (△); tampão fosfato de sódio e potássio (○); tampão Tris-HCl (●); tampão Imidazol-HCl (✸).

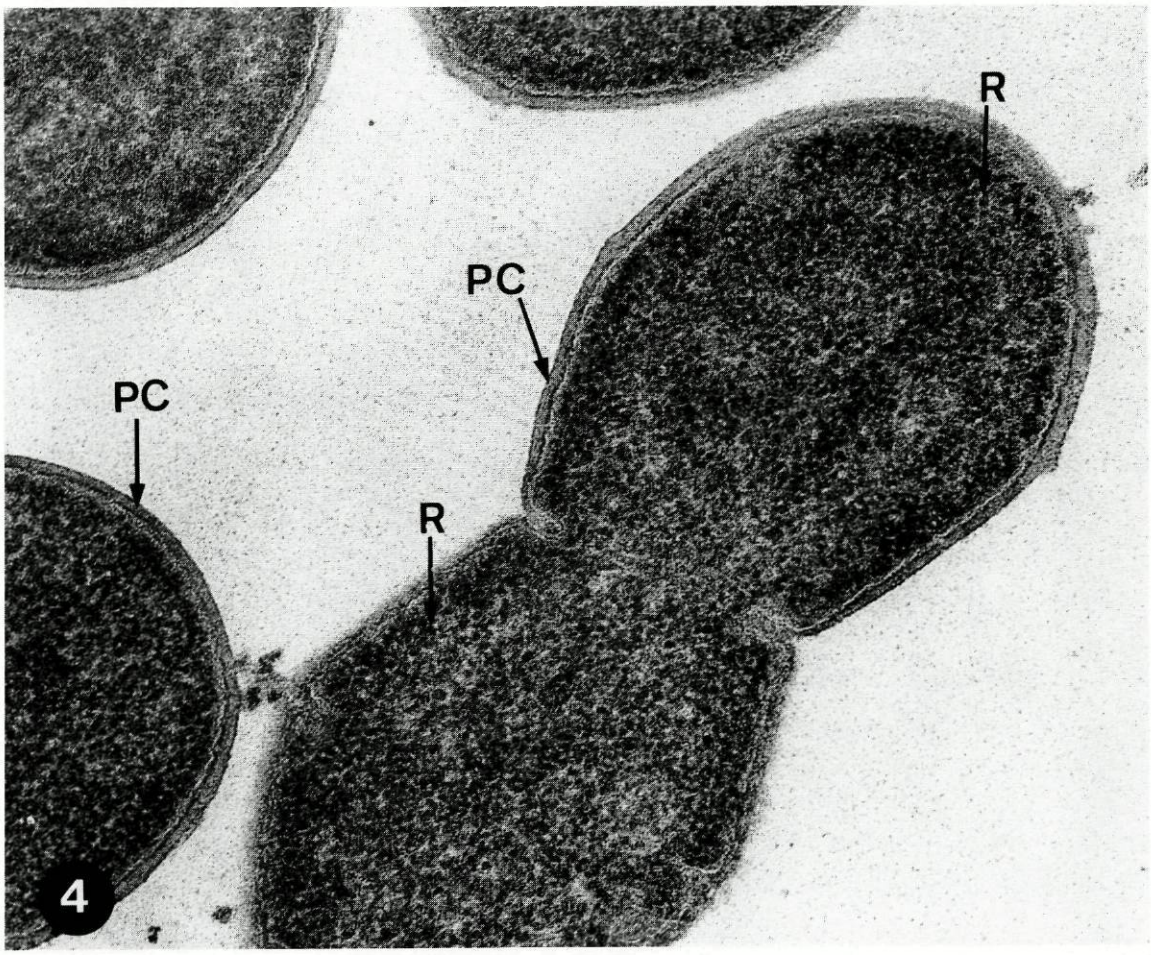


Fig. 4. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8). As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. Notar a parede celular intacta (PC) e matriz citoplasmática com ribossomas (R). 68 000 X.

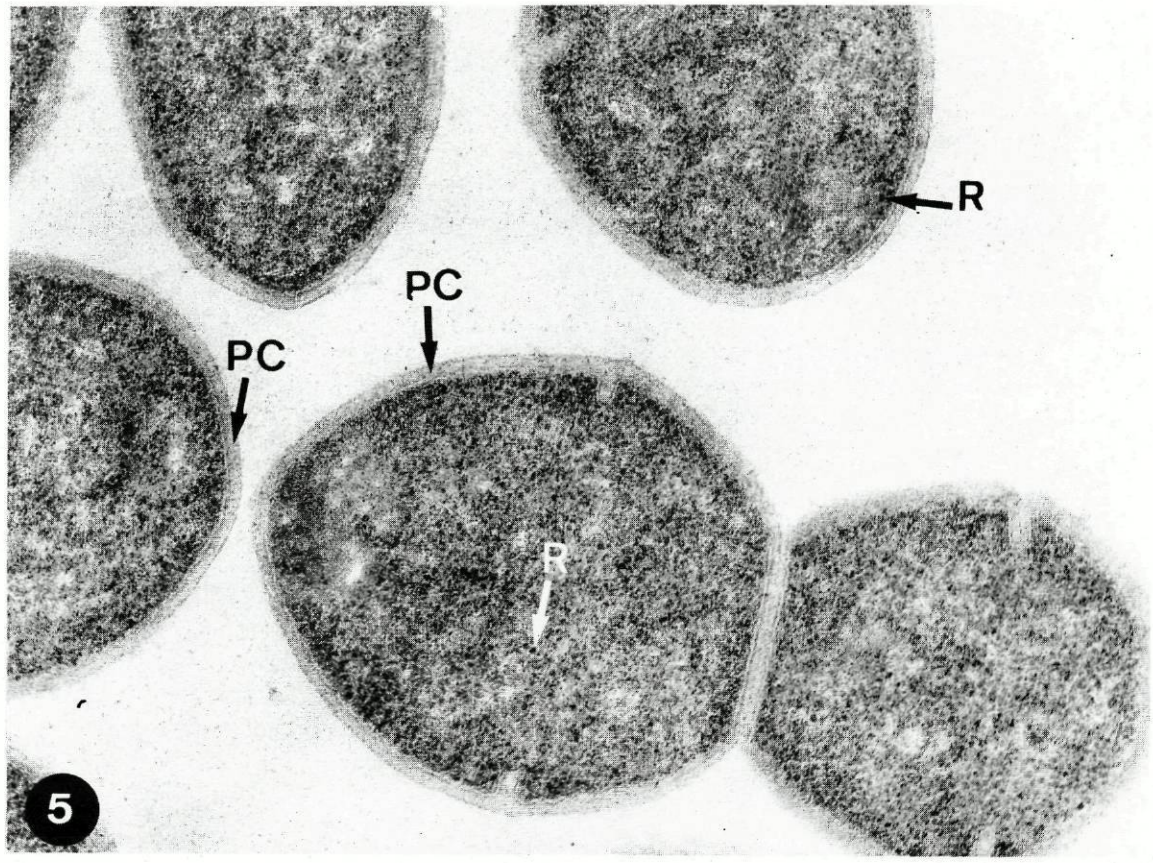
Influência do congelamento na autólise de S. faecium

Condições experimentais	Tampão de incubação	
	Tris - HCl (pH 8,0)	
	0,05 M	0,1 M
Células não congeladas	98	95
Células congeladas	75	83

Tabela II. Células não congeladas ou congeladas* da fase exponencial de crescimento foram suspensas (7,2 x 10^8células/ml) em tampões Tris-HCl (pH 8,0) com as molaridades indicadas. A autólise foi seguida pela leitura da A520 durante 120 min de incubação a 37 ^oC. Os valores indicados na tabela representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. * O congelamento efectuou-se nos tampões utilizados posteriormente na incubação.

Fig. 5. Ultrastrutura de células da fase exponencial de crescimento de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8). Notar a parede celular intacta (PC) e matriz citoplasmática com ribossomas (R). 50 400 X.

Fig. 6. Aspecto ultrastrutural de células não congeladas da fase exponencial de crescimento de *S. faecium* após 120 min a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,4 M (pH 6,8). Notar a parede celular degradada, a presença de vesículas da membrana citoplasmática e de protoplastos com membrana simétrica. 60 000 X.


R
PC
PC
R
5


6

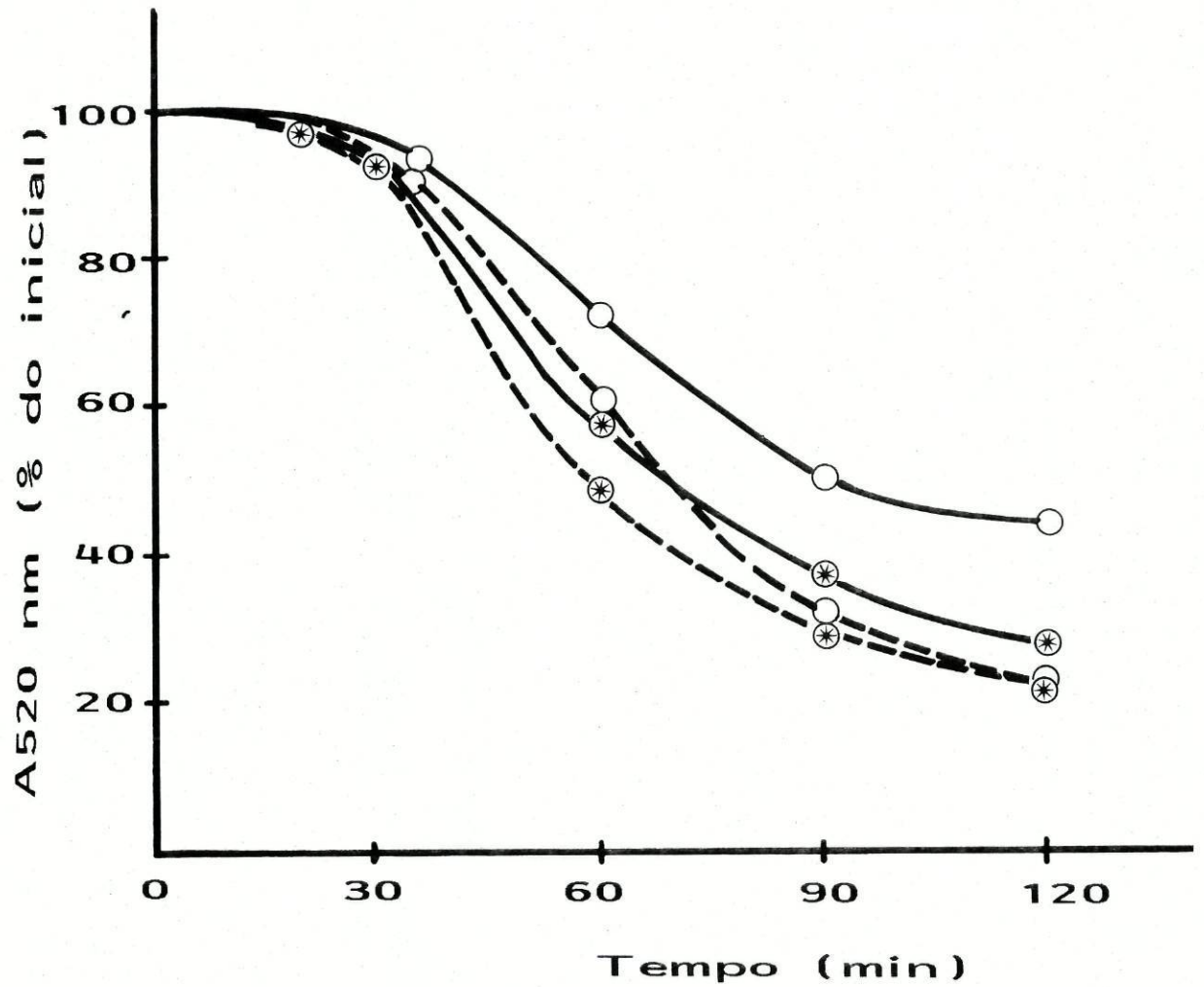


Fig. 7. Cinéticas da autólise de células de *S. faecium* não congeladas (---) ou induzida pelo congelamento prévio das suspensões celulares (—). As células foram incubadas 120 min a 37 ^{o}C em tampões (○) fosfato de sódio 0,3 M ou (⊛) fosfato de sódio e potássio 0,4 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes de incubação no tampão indicado. Os valores registados estão expressos como % do valor inicial das suspensões celulares (A520 = 1,700; 7,2 x 10^{8} células/ml).

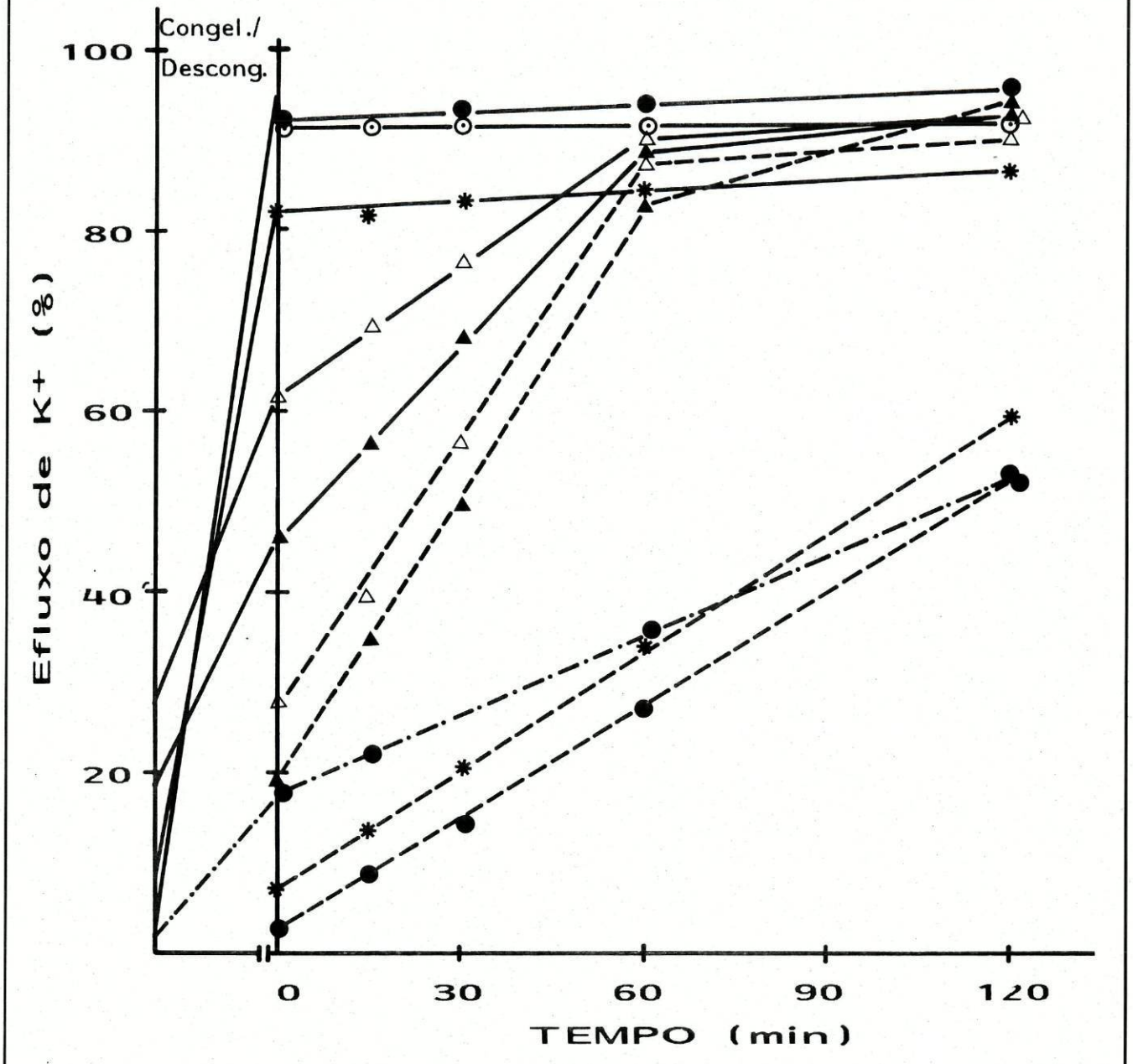


Fig. 8. Efluxo de K^+ observado após congelamento-descongelamento e/ou durante a incubação de *S. faecium* em várias condições. Células não congeladas (---) ou congeladas (-70 °C) em tampões Tris-HCl, fosfato de sódio ou Imidazol-HCl (—) ou em meio T sem K_2HPO_4 (– · –) foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) e incubadas a 37 °C em tampões Tris-HCl, fosfato de sódio ou Imidazol-HCl. As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. Filtrados de amostras recolhidos após o descongelamento ou durante a incubação foram utilizados na determinação do K^+. O conteúdo do K^+ dos filtrados de cada suspensão, fervida durante 30 min, foi normalizado para 100%. Símbolos: (●) Tris-HCl 0,1M; (⊙) Tris-HCl 0,1 M com $MgSO_4$ (10 mM); (✱) Imidazol-HCl 0,05 M; tampão fosfato de sódio 0,2 M (▲) ou 0,3 M (△).

1.2. Autólise induzida pelo congelamento prévio das suspensões celulares

O uso de suspensões bacterianas congeladas é um método conveniente de armazenar um grande número de amostras colhidas de uma cultura e usá-las nas semanas ou meses subsequentes. Porém, como o congelamento-descongelamento pode provocar alterações nas bactérias, a autólise celular de*S. faecium* e dos mutantes EC31 e EC78 foi estudada em células não congeladas ou previamente congeladas em diferentes tampões.

1.2.1. Influência do tampão de congelamento

1.2.1.1. Tampão Tris-HCl

Uma extensa taxa de autólise celular foi observada quando as bactérias foram previamente congeladas (- 70 ^{o}C) em tampões Tris-HCl, antes da incubação nestes tampões.

Os resultados obtidos por espectrofotometria (Fig. 3B) mostraram que a taxa de autólise de células congeladas depende da concentração do tampão utilizado e apresenta um máximo em 0,1 M a pH 6,8. Os resultados ultrastruturais de amostras obtidas após 120 min de incubação de células previamente congeladas e incubadas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) revelaram uma extensa taxa de autólise celular (Fig. 9) e mostraram-se concordantes com os dados espectrofotométricos.

Experiências paralelas realizadas em tampões Tris-HCl 0,05 M e 0,1 M (pH 8,0) com células previamente congeladas revelaram taxas de autólise celular significativamente inferiores às obtidas a pH 6,8 (comparar a Tabela II, pag. 58 com a Fig. 3B). O estudo ultrastrutural das amostras congeladas e incubadas durante duas horas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) mostrou que (Fig. 10), não obstante a presença de muitas células com paredes degradadas (setas) e desprovidas de conteúdo celular, são numerosas as células com ultrastrutura normal (comparar as Figs. 9 e 10).

Amostras obtidas para microscopia electrónica imediatamente após o

congelamento-descongelamento em tampões Tris-HCl 0,1 M ou 0,4 M (pH 6,8) revelaram bactérias com paredes celulares intactas e na matriz citoplasmática o nucleióde encontrava-se condensado e não se observaram ribossomas (Figs. 11a e 11b).

Procurámos investigar porque razão *S. faecium* só autolisou em tampão Tris-HCl após congelação prévia das células nesse tampão e, em particular, as razões das alterações observadas na matriz citoplasmática das células congeladas, dado que tais alterações não foram observadas nas células não congeladas, mesmo após duas horas de incubação em Tris-HCl 0,05 M (pH 6,8), como pode ser observado na Fig. 4.

Como possíveis causas dessas alterações foram consideradas três hipóteses:

a) Interferência do tampão Tris-HCl no processo de fixação.

b) Alterações físicas motivadas pelo congelamento (-70 ^{o}C) e descongelamento.

c) Agressividade do tampão Tris-HCl, quando utilizado a baixas temperaturas (- 70 ^{o}C) no congelamento.

A observação de alterações ultrastruturais semelhantes em bactérias previamente congeladas em Tris-HCl e posteriormente fixadas com glutaraldeído quer no mesmo tampão, quer em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,0), e ainda a observação da ultrastrutura normal de células não congeladas incubadas 120 min em tampão Tris-HCl e fixadas pelo glutaraldeído (Fig. 4) fez-nos excluir a primeira das hipóteses colocadas.

A observação de bactérias com ultrastrutura preservada após o congelamento-descongelamento no próprio meio de cultura e fixação pelo glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,05 M (pH 7,0) (Fig. 12), veio excluir a hipótese de que o congelamento-descongelamento seria o único factor responsável pelas alterações observadas.

Assim, os dados obtidos levaram-nos a concluir que as alterações ultrastruturais são devidas à agressividade do tampão Tris-HCl quando utilizado no congelamento a - 70 ^{o}C.

Na Fig. 13 apresentamos a cinética da autólise de células não congeladas ou congeladas-descongeladas e incubadas duas horas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). Nas Figs. 14a-14d apresentamos os resultados ultrastruturais obtidos com amostras previamente congeladas colhidas durante a incubação. Como podemos observar, as alterações ultrastruturais visíveis apenas no citoplasma imediatamente após o congelamento-descongelamento estendem-se, durante a incubação, à parede celular. A degradação desta inicia-se ao nível dos septos e surge depois noutros locais, onde são visíveis interrupções perfeitamente localizadas. À medida que aumenta a degradação da parede, ocorre a progressiva clarificação dos conteúdos celulares. Estes resultados são concordantes com as descidas da A520 ocorridas ao longo das duas horas de incubação (Fig. 13).

Analisámos ainda a integridade da membrana citoplasmática das bactérias previamente congeladas durante a incubação em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8). Os resultados obtidos (Fig. 8) mostraram que o efluxo de K^+ intracelular, observado imediatamente após o congelamento-descongelamento das células em Tris-HCl foi muito superior (90% do total intracelular) ao verificado com células não congeladas (6 % do total intracelular), mesmo após duas horas de incubação (50 % do total intracelular). Por outro lado, o efluxo de K^+ detectado imediatamente após o congelamento das células no meio de cultura (sem K_2HPO_4) representou apenas 18 % do total intracelular. Os efluxos de materiais que absorvem em UV ocorridos devido à alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática durante o congelamento-descongelamento em Tris-HCl 0,1 M foram significativamente superiores aos ocasionados por este tratamento no própio meio de cultura (Fig. 15).

Tendo em vista a influência do processo de congelamento na autólise celular, amostras paralelas foram congeladas em tampões Tris-HCl 0,1 ou 0,3 M (pH 6,8), do seguinte modo:

a) - 20 ^oC (30 min) —> - 70 ^oC (um dia ou mais);

b) 4 ^oC (30 min) —> - 20 ^oC (30 min) —> - 70 ^oC (um dia ou mais).

As taxas de autólise obtidas foram idênticas às observadas com células directamente congeladas a - 70 ^oC.

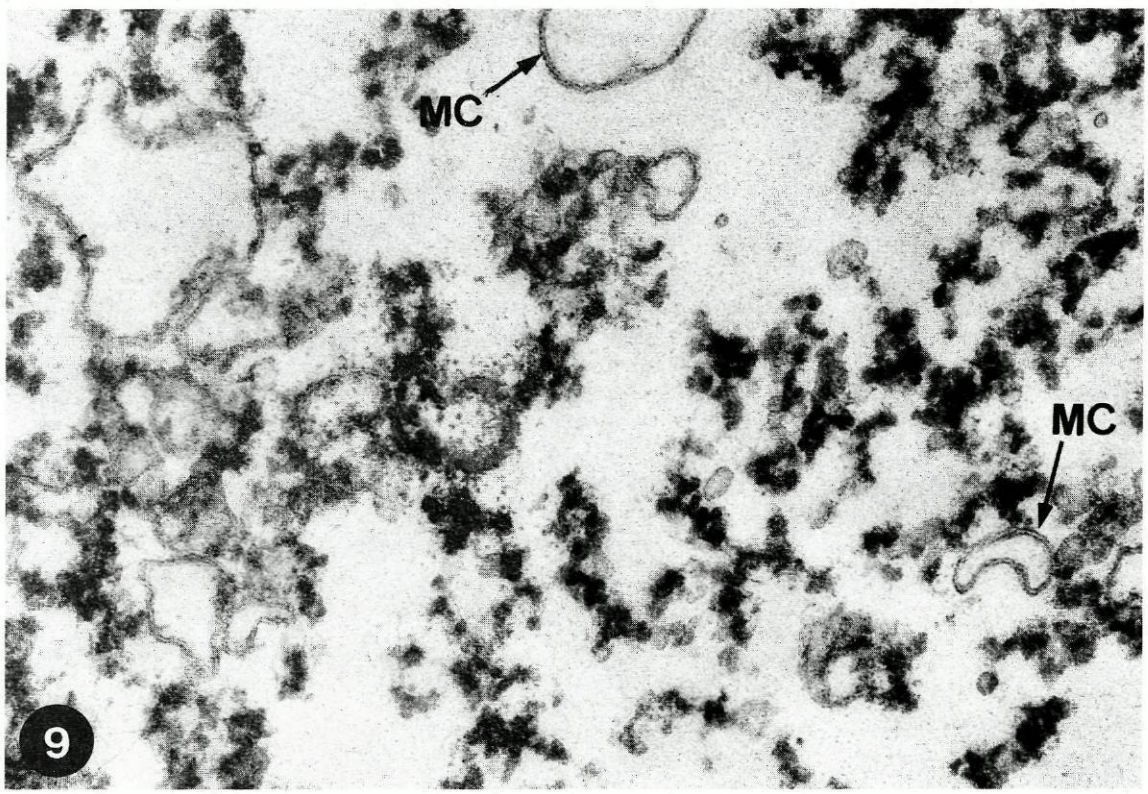
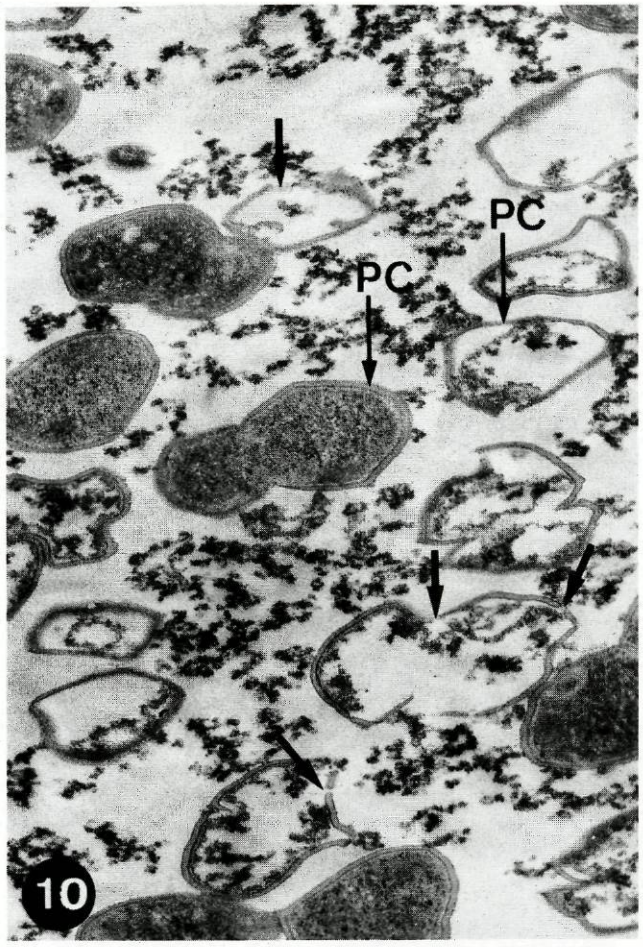


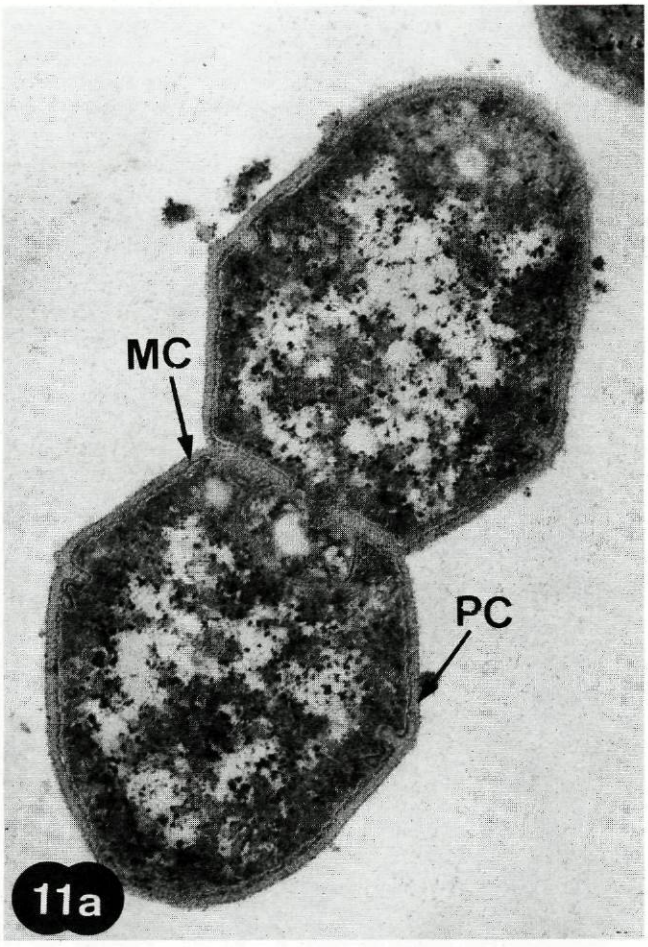
Fig. 9. Aspecto ultrastrutural de restos celulares de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a extensa bacteriólise proveniente da desintegração total das células e a pequena quantidade de vesículas provenientes da membrana citoplasmática (MC). 68 000 X.

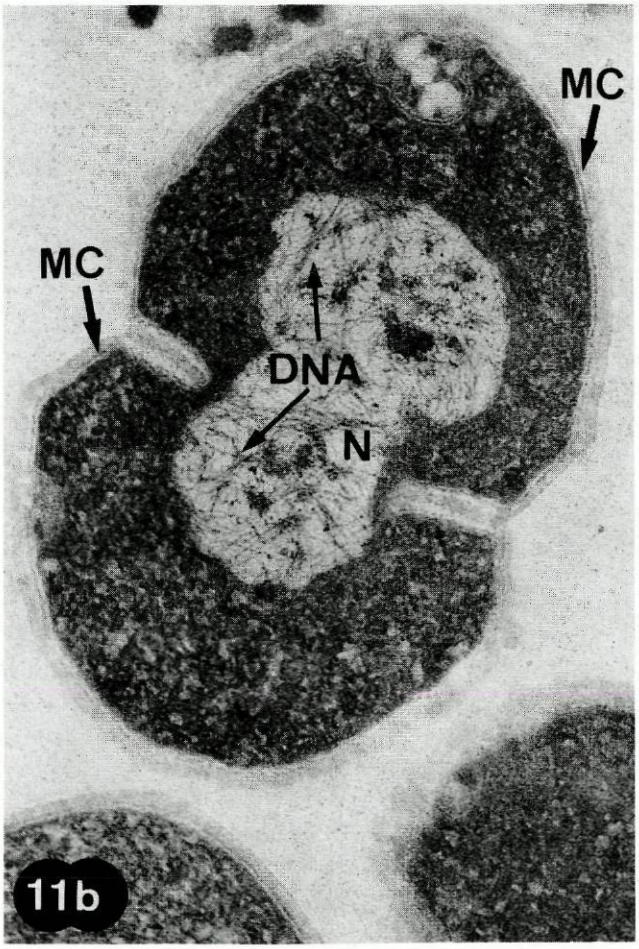
Fig. 10. Aspecto ultrastrutural de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a existência de numerosas células com parede celular degradada (setas) e sem conteúdo celular. PC- parede celular. 28 000 X.

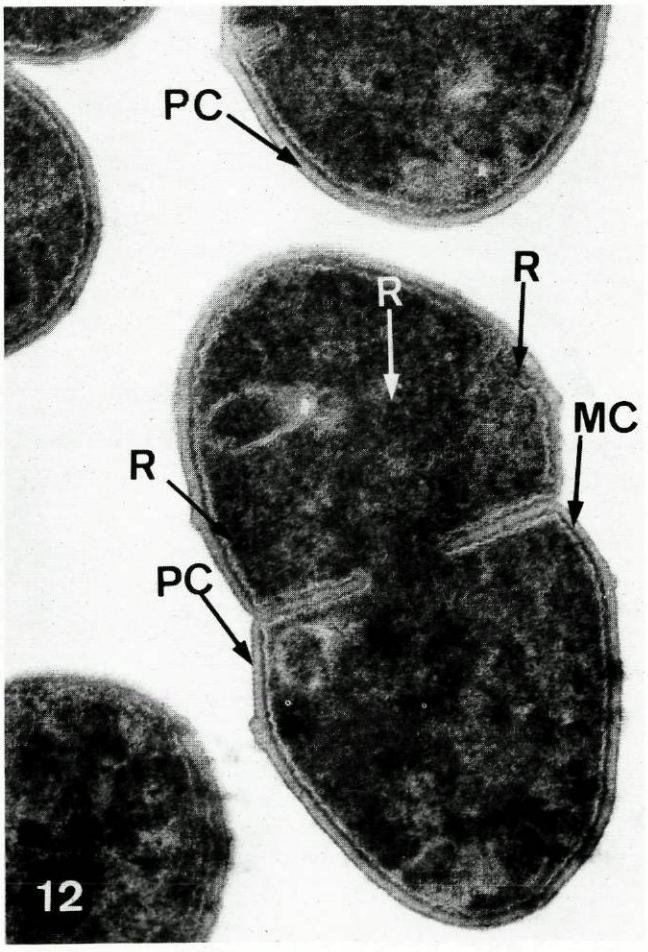
Fig. 11. Ultrastrutura de *S. faecium* imediatamente após congelamento e descongelamento em (a) tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) ou (b) tampão Tris-HCl 0,4 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas nos tampões indicados. Notar em (a) e (b) a parede celular intacta (PC), a alteração do conteúdo celular, a assimetria pouco nítida da membrana citoplasmática (MC) e a ausência de ribossomas e em (b) a condensação do nucleóide (N) onde são visíveis fibrilas de DNA.
(a) 54 000 X; (b) 62 000 X.

Fig. 12. Ultrastrutura de *S. faecium* imediatamente após o congelamento e descongelamento em meio T sem K_2HPO_4. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas no meio indicado. Notar a preservação da ultrastrutura celular: parede celular intacta (PC), membrana citoplasmática (MC) e matriz citoplasmática com ribossomas (R). 68 000 X.


PC
PC
10


MC
PC
11a


MC
MC
DNA
N
11b


PC
R
R
MC
R
PC
12

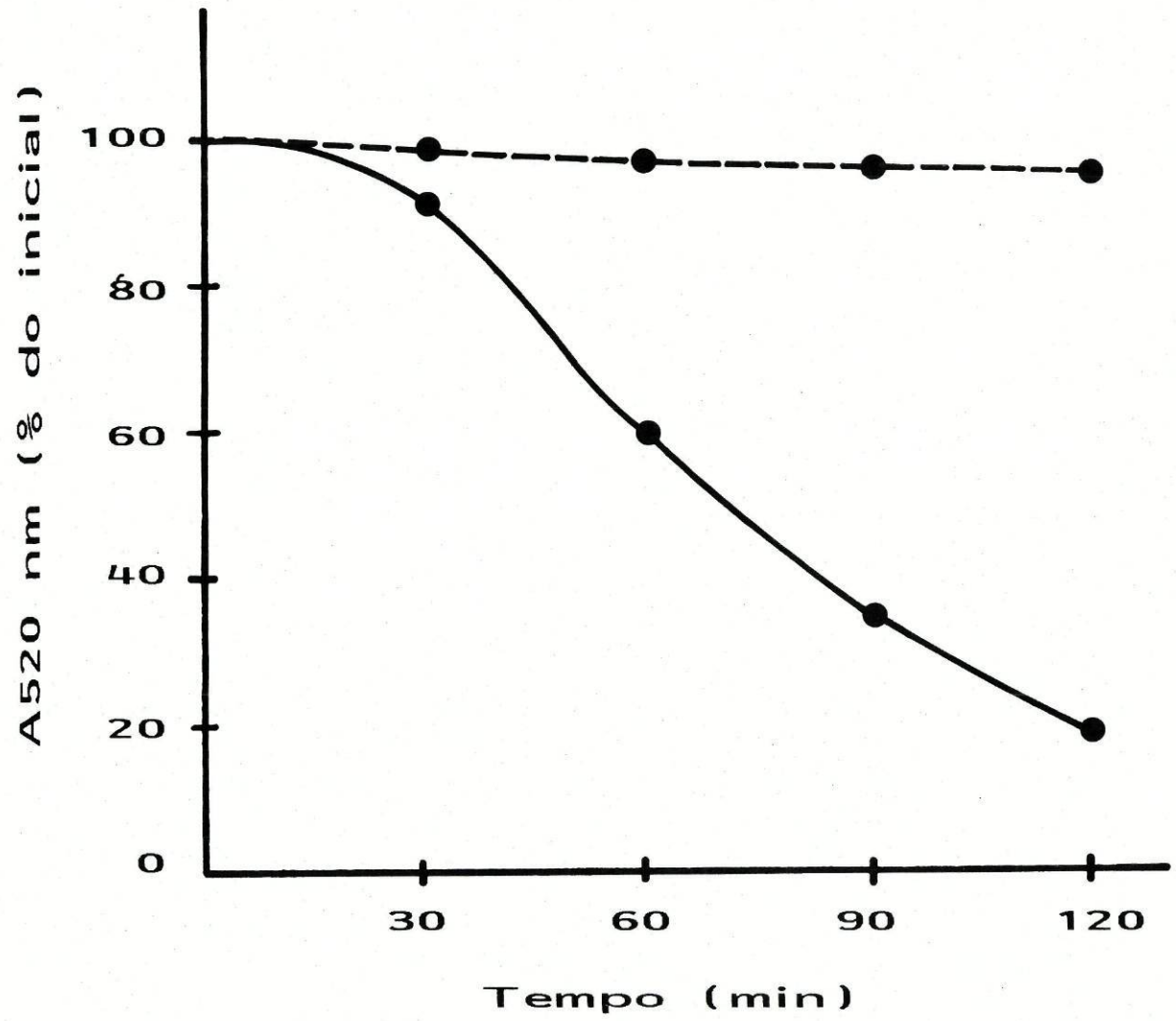
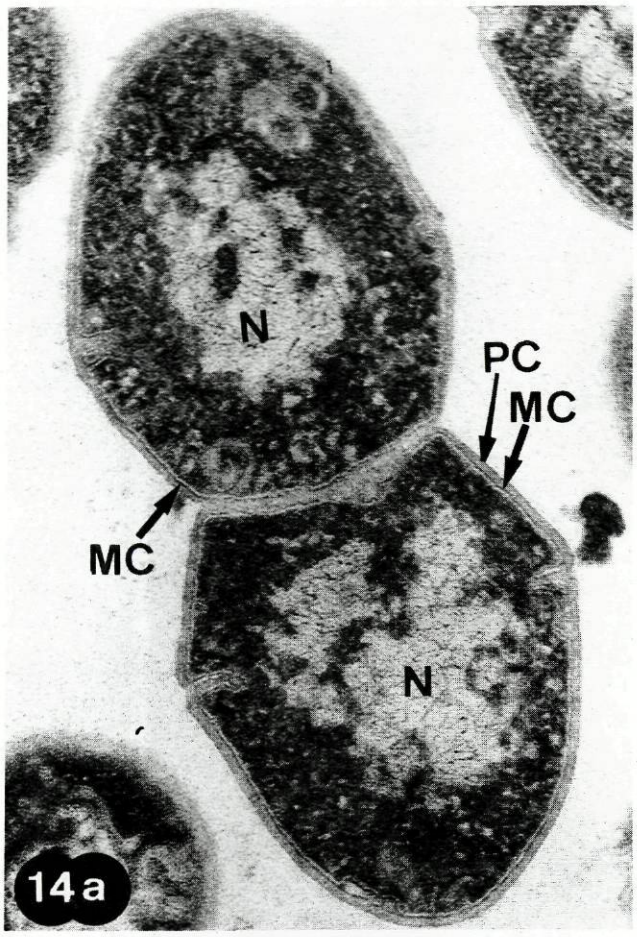
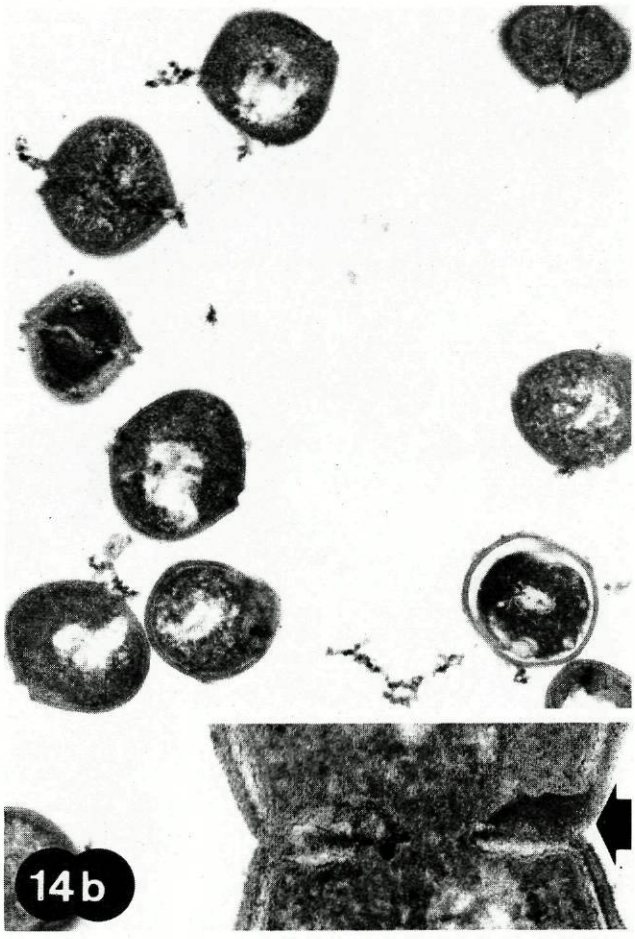
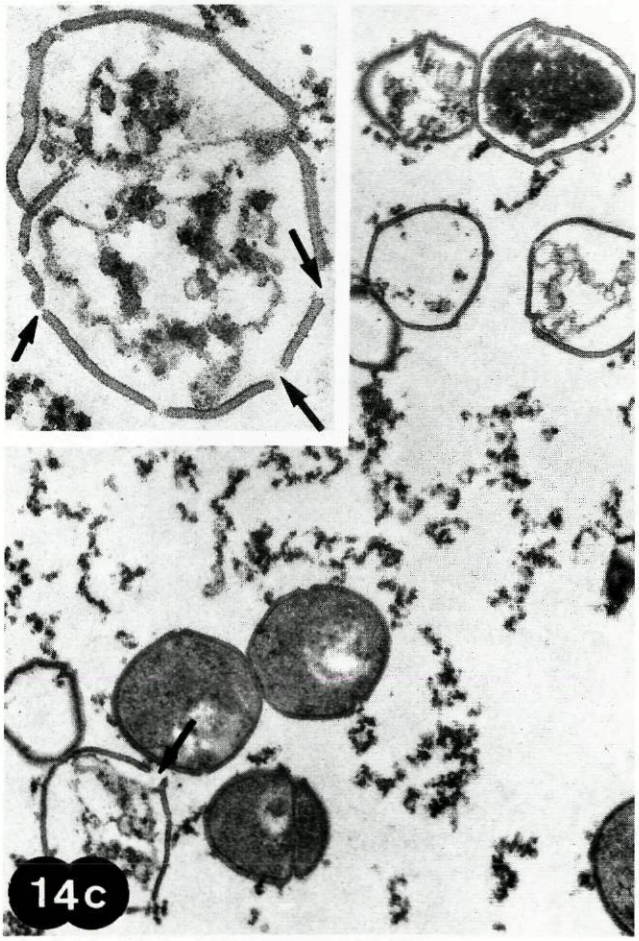


Fig. 13. Cinéticas da autólise de *S. faecium* em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). Células não congeladas (---), ou previamente congeladas e descongeladas (—) foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) e incubadas 120 min a 37 ^{o}C. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. A A520 foi registada a diferentes tempos como % do valor inicial.

Fig. 14. Alterações estruturais ocorridas em células de *S. faecium* imediatamente após o congelamento-descongelamento e durante 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. (a) Células imediatamente após o congelamento-decongelamento. Notar a parede celular intacta (PC) a assimetria da membrana citoplasmática (MC) a condensação do nucleóide (N) e a ausência de ribossomas. 50 400 X; (b) após 15 min de incubação. 18 000 X; Inserido - a degradação ao nível do septo (seta). 78 000 X; (c) após 60 min de incubação. Notar as interrupções bruscas da parede celular (setas) e o esvaziamento do conteúdo citoplasmático de algumas células. 20 100 X; Inserido - um promenor de uma célula desprovida da maior parte do conteúdo celular. 40 000 X; (d) restos celulares após 120 min de incubação. Notar que a maior parte das células perdeu o conteúdo celular e na parede são numerosas as interrupções bruscas (setas), sendo muito pouco abundantes as vesículas da membrana citoplasmática (MC). 20 400 X; Inserido - um promenor que mostra a degradação da parede celular. 68 000 X.


N
PC
MC
MC
N
14a


14b


14c


MC
14d

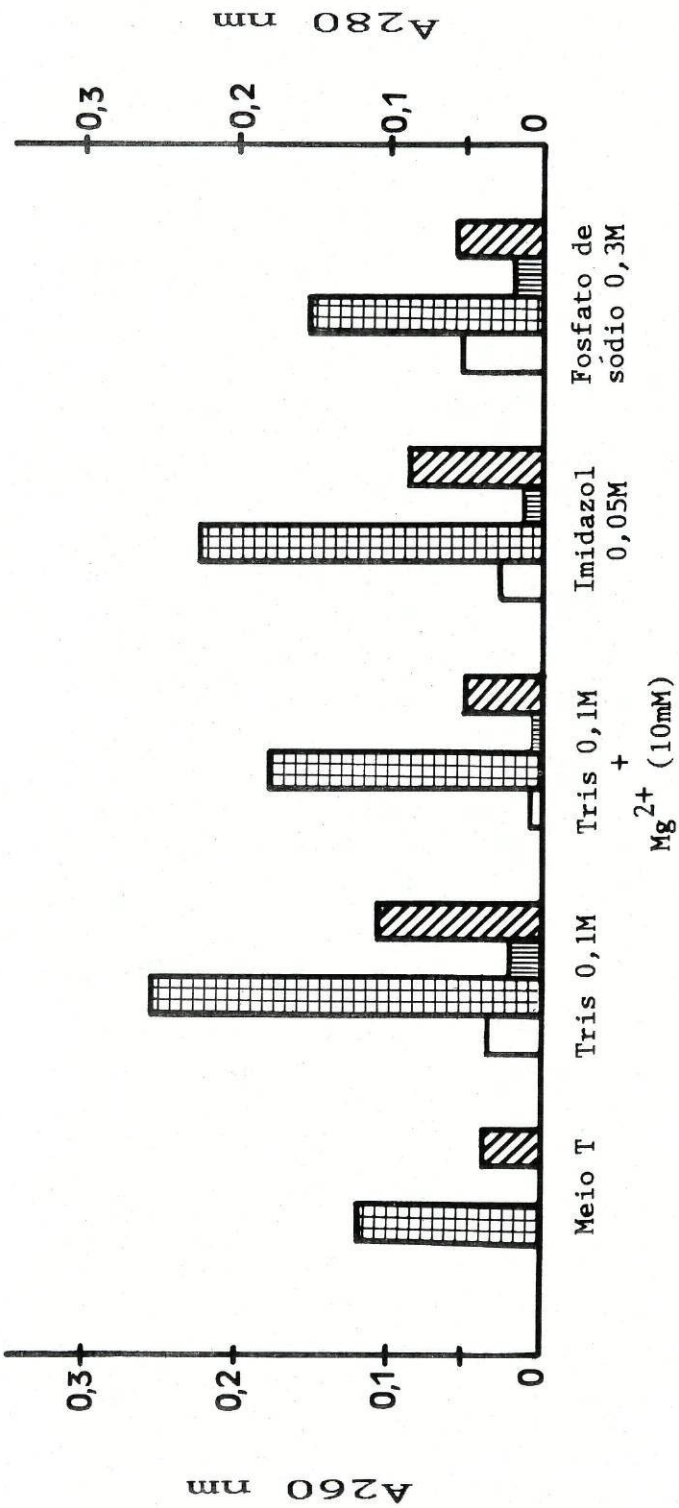


Fig. 15. Libertação de materiais que absorvem em UV de células não congeladas de *S. faecium* suspensas nos tampões Tris-HCl ou Imidazol-HCl ou fosfato de sódio (□ , ▥) com pH 6,8 ou congeladas em meio T sem K_2HPO_4 ou nos tampões acima citados (▤ , ▨). As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. A A260 (□ , ▤) ou a A280 (▥ , ▨) foi determinada em filtrados de suspensões celulares ($7,2 \times 10^8$ células/ml) imediatamente antes da incubação.

1.2.1.2. Tampão Imidazol-HCl

O congelamento prévio das células em tampões Imidazol-HCl (pH 6,8) originou taxas de autólise celular inferiores às ocorridas com o tampão Tris-HCl, tendo sido observado um máximo na concentração 0,05 M (Figs. 3B e 16). O estudo ultrastrutural mostrou que, após este tratamento prévio em Imidazol-HCl 0,05 M (Fig. 17), as células apresentaram alterações no conteúdo citoplasmático - blocos de materiais com diferentes densidades aos electrões - e, ao fim de duas horas de incubação no mesmo tampão, observaram-se numerosas células com paredes parcialmente degradadas, desprovidas de grande parte do seu conteúdo celular e com a membrana citoplasmática apenas visível em alguns locais (Fig. 18).

O congelamento-descongelamento das bactérias no tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8) provocou um aumento considerável no efluxo de K^+, quando comparado com o proveniente de células não congeladas (Fig. 8). Observou-se ainda que, imediatamente após o descongelamento das células em Imidazol-HCl 0,4 M (pH 6,8) ocorreu a libertação de todo o K^+ intracelular e alterações na matriz citoplasmática (não mostrado), sem que se tenha verificado autólise quando estas células foram incubadas no mesmo tampão. Além disso, após o descongelamento em Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8) as quantidades de materiais libertados que absorvem em UV foram superiores às observadas com células não congeladas (Fig. 15).

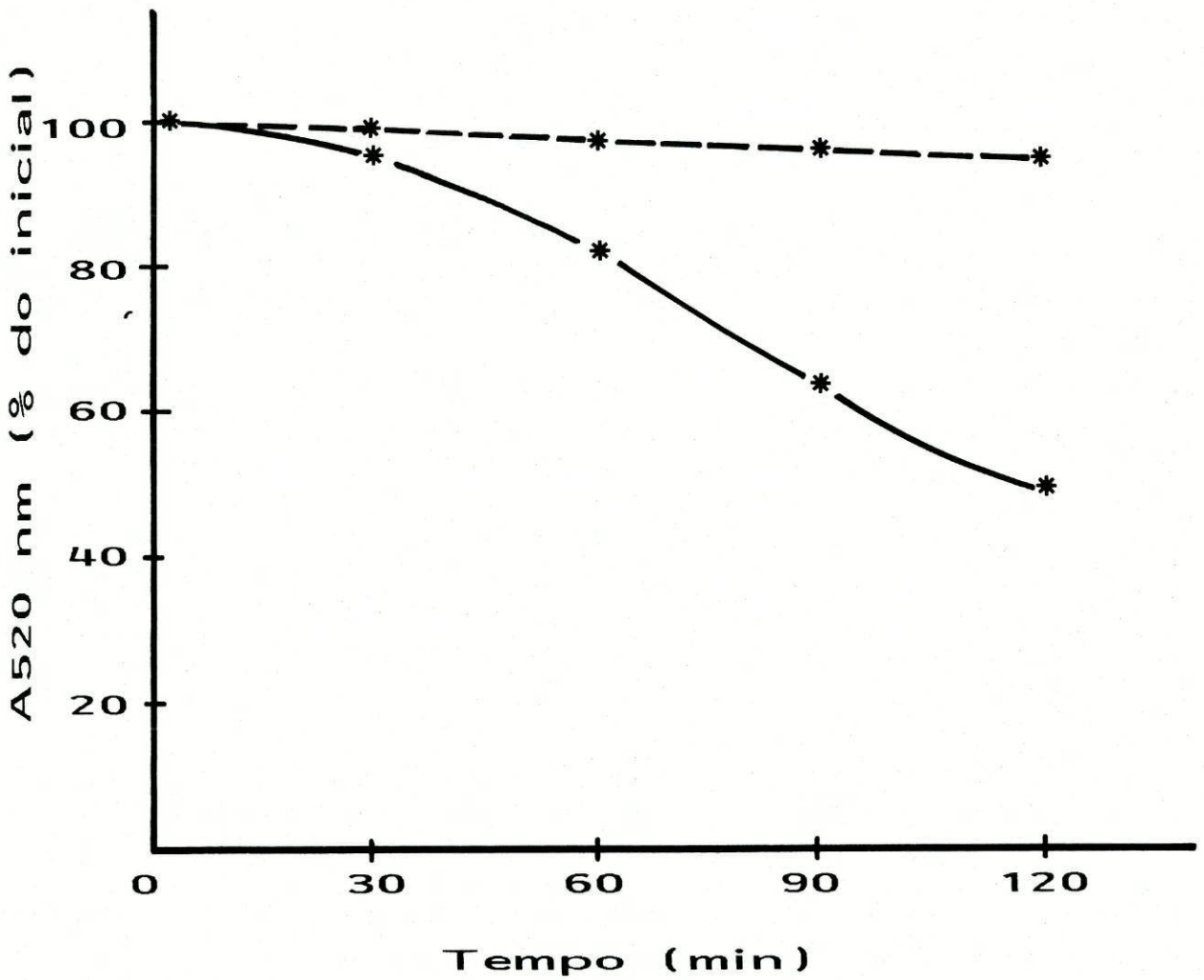
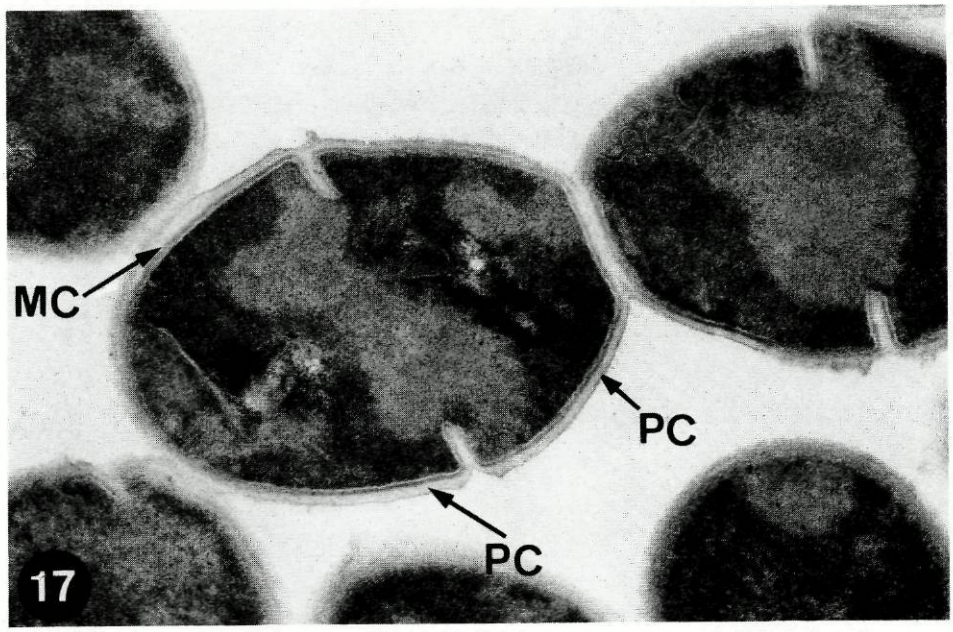
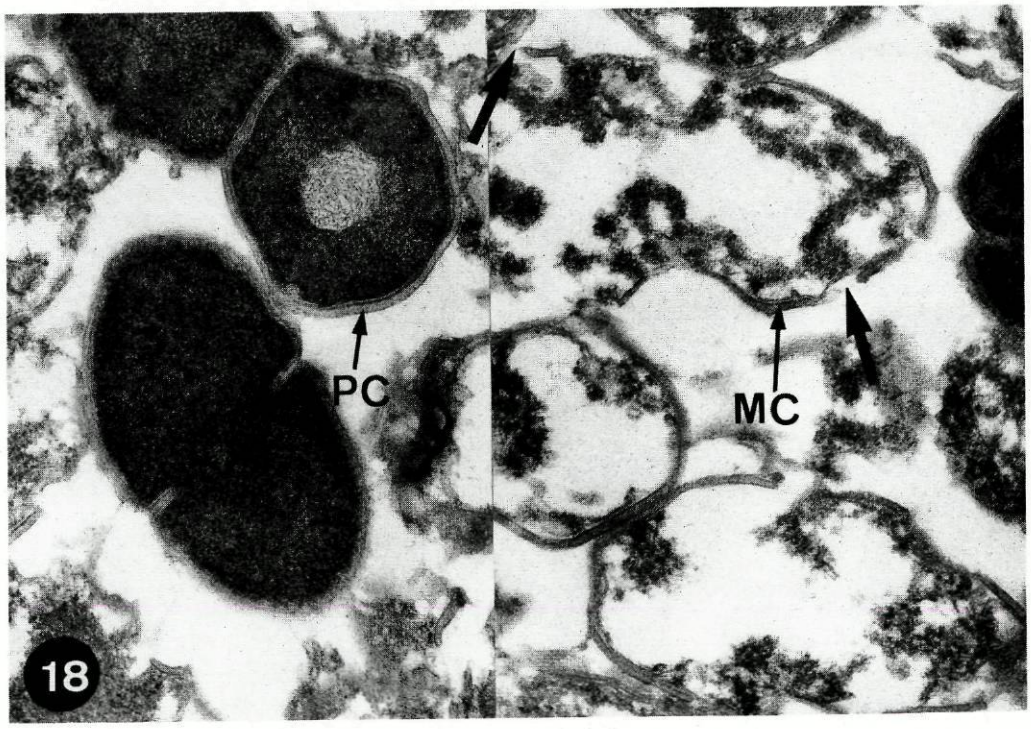


Fig. 16. Cinéticas da autólise de células de *S. faecium* não congeladas (---) ou previamente congeladas (—) em tampão Imidazol-HCl 0,05M (pH 6,8) durante 120 min a 37 °C . As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado.

Fig. 17. Ultrastrutura de células de *S. faecium* imediatamente após o congelamento e descongelamento em tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a parede celular intacta (PC), a membrana citoplasmática (MC), a alteração da matriz citoplasmática, onde são visíveis blocos de materiais com diferentes densidades aos electrões, e a ausência de ribossomas visíveis. 56 000 X.

Fig. 18. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a perda do conteúdo celular da maior parte das células, a degradação (setas) das paredes celulares (PC) e a pequena quantidade de membrana citoplasmática visível (MC). 32 400 X.


MC
PC
PC
17


PC
MC
18

1.2.1.3. Tampão fosfato

O congelamento prévio e posterior incubação das células em tampões fosfato de sódio e potássio ou fosfato de sódio com concentrações superiores a 0,25 M resultou em taxas de autólise inferiores às observadas com células não congeladas (Figs. 3A e 7). Estes resultados de espectrofotometria foram apoiados pelas observações ultrastruturais que revelaram uma menor degradação das células congeladas (Figs. 19a e 19b) em relação às células não congeladas incubadas nessas condições (comparar Fig. 19b com Fig. 6). Estudos ultrastruturais de amostras de células obtidas após o congelamento-descongelamento no tampão fosfato de sódio e potássio (não mostrado) ou em tampão fosfato de sódio 0,01 M ou 0,3 M revelaram bactérias com ultrastrutura normal (Figs. 20a e 20b; comparar com Fig. 34).

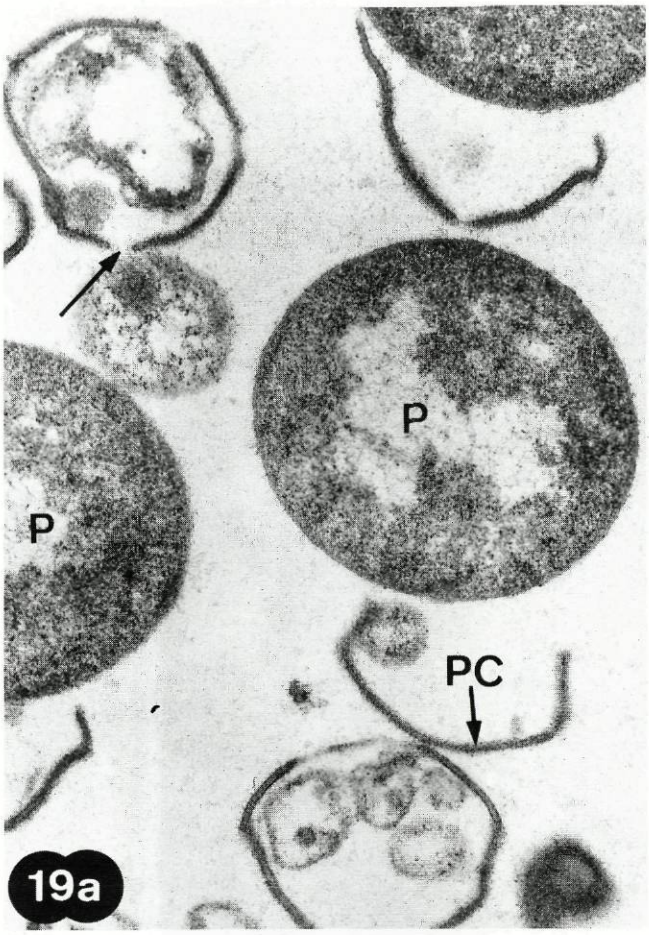
A Fig. 21 mostra a influência da molaridade do tampão fosfato de sódio e do congelamento prévio das células nesse tampão no efluxo do K^+ intracelular determinado antes do início do processo autolítico; os efluxos de K^+ observados com bactérias não congeladas ou previamente congeladas foram directamente proporcionais ao aumento da molaridade do tampão utilizado; por outro lado, os efluxos deste ião observados com bactérias congeladas foram, para todas as molaridades ensaiadas, cerca de duas vezes superiores aos observados com bactérias não congeladas.

O efluxo de K^+ observado durante a incubação das células não congeladas ou previamente congeladas em tampão fosfato de sódio 0,2 M ou 0,3 M ocorreu principalmente durante a primeira hora (Fig. 8).

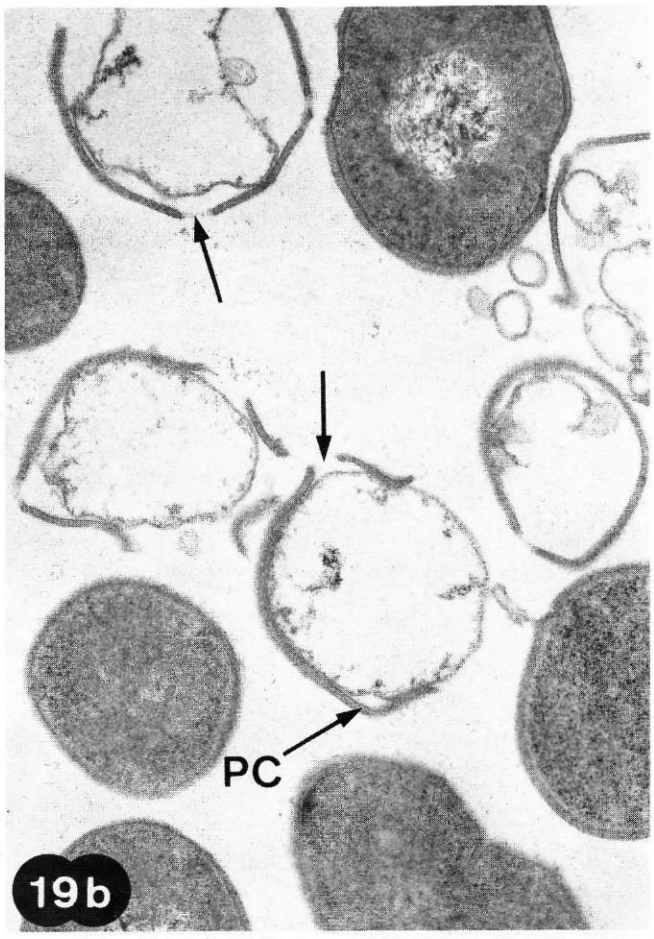
Experiências paralelas realizadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M ou 0,1 M (pH 8,0) revelaram que o congelamento prévio nesses tampões não induziu de forma significativa a actividade autolítica de *S. faecium* (Tabela III, pag. 76; Figs. 22a e 22 b).

Fig. 19. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação em (a) tampão fosfato de sódio 0,3 M (pH 6,8) ou (b) tampão fosfato de sódio e potássio 0,4 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação nos tampões usados na incubação. Notar em (a) a presença de protoplastos (P) e em (a) e (b) a degradação (setas) da parede celular (PC). (a) 28 800 X; (b) 31 900 X.

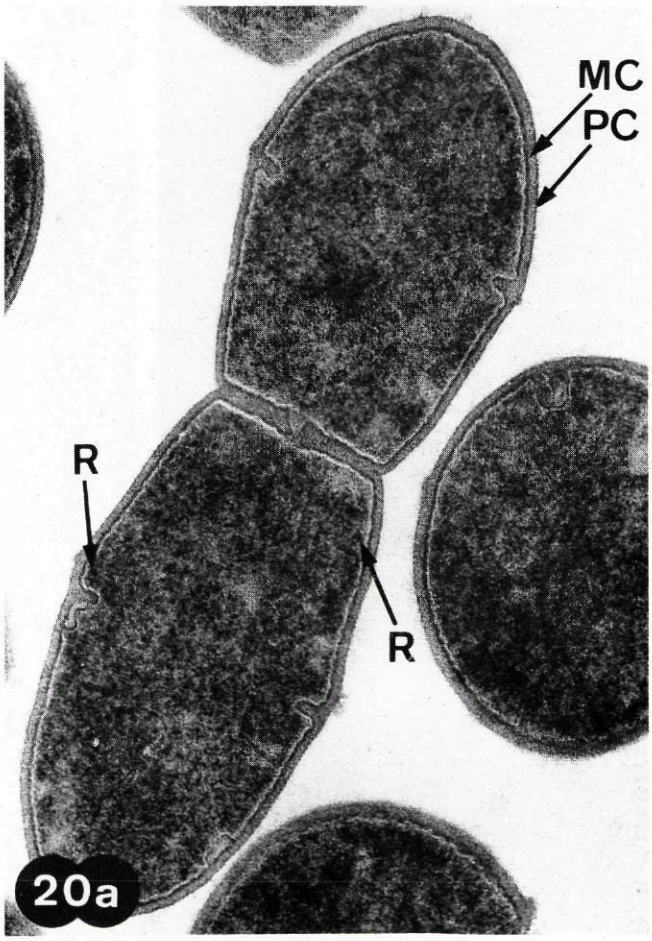
Fig. 20. Ultrastrutura de células de *S. faecium* imediatamente após o congelamento e descongelamento em tampões fosfato de sódio (a) 0,01 M (pH 6,8) ou (b) 0,3 M (pH 6,8). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação nos tampões indicados. Notar, a parede celular intacta (PC), membrana citoplasmática (MC) e a matriz citoplasmática com ribossomas (R). Comparar (a) e (b) com Fig. 34.
(a) 46 800 X; (b) 40 000 X.



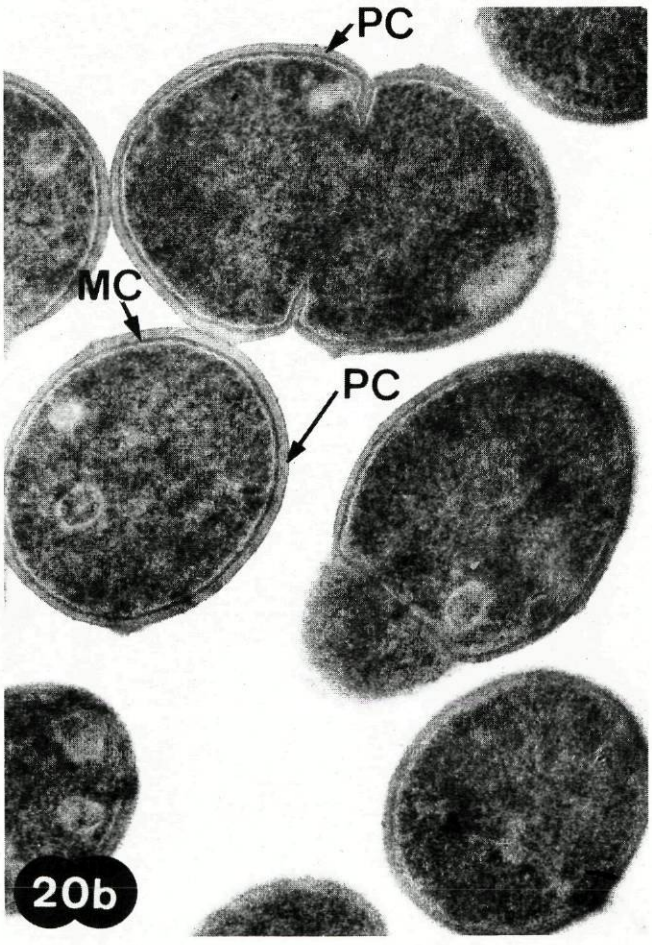
19a



19b



20a



20b

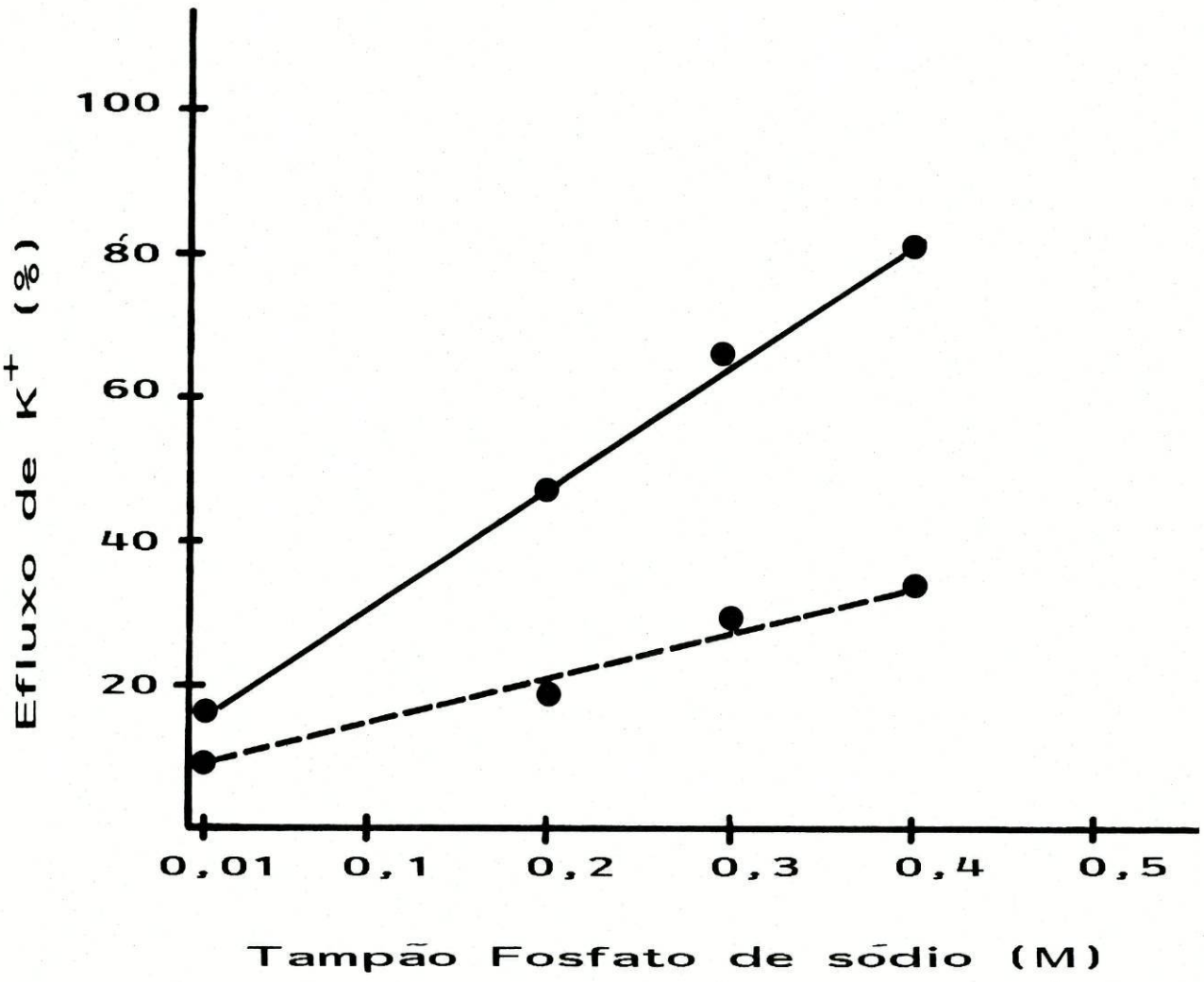


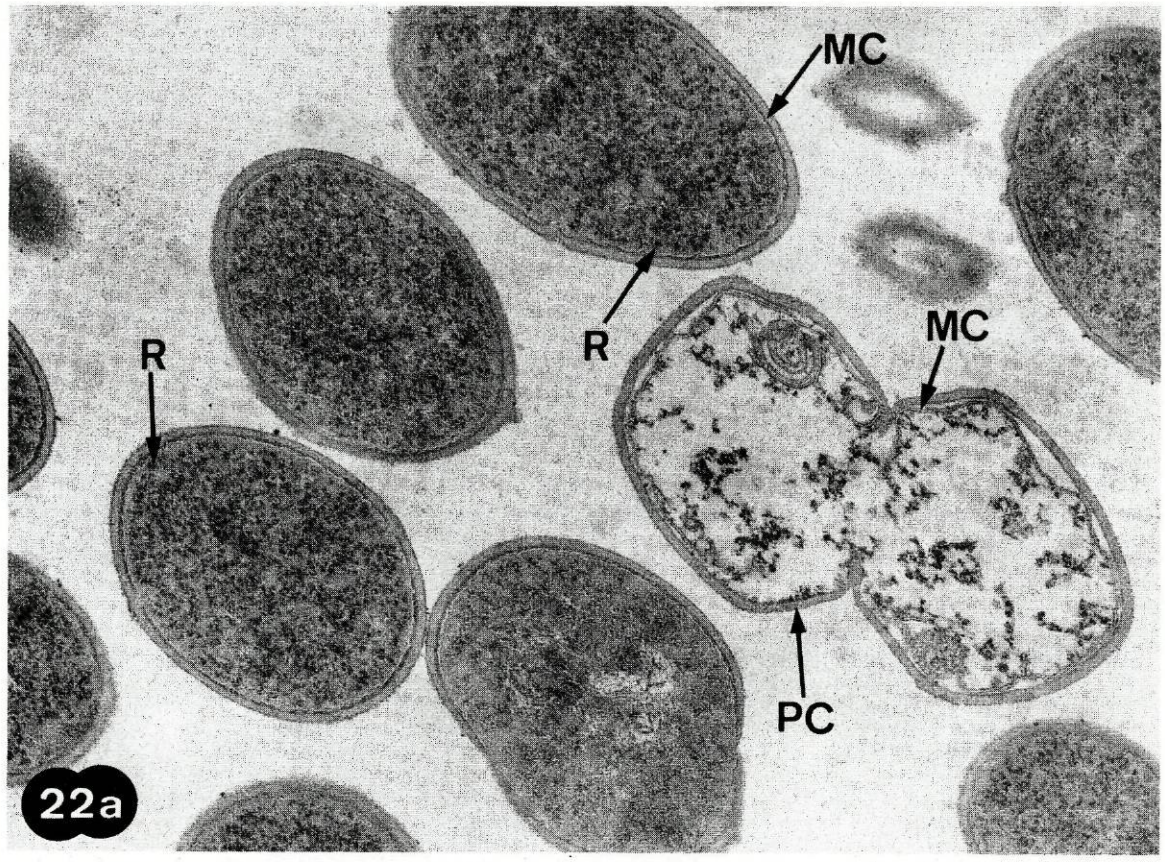
Fig. 21. Influência da molaridade do tampão fosfato de sódio e do congelamento prévio das suspensões celulares no efluxo de K^+ intracelular das células de *S. faecium* . As determinações do efluxo de K^+ foram efectuadas em filtrados de suspensões ($7,2 \times 10^8$ células/ml) não congeladas (- -) ou congeladas (—) e estão expressas como % do valor total do K^+ intracelular (100%).

Influência do congelamento na autólise de S. faecium

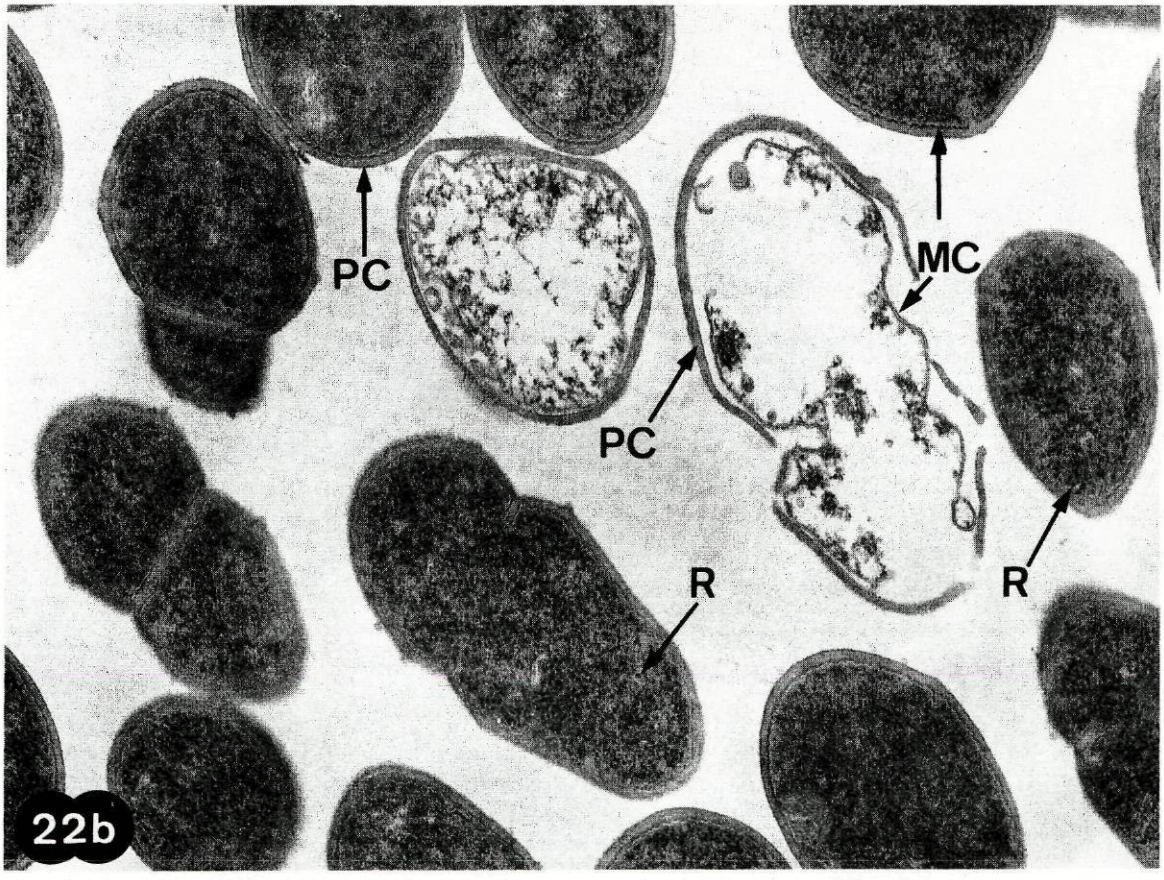
Condições experimentais	Tampão de incubação: Fosfato de sódio e potássio (pH 8,0) 0,05 M	0,01 M
Células não congeladas	96	93
Células congeladas	92	87

Tabela III. Células não congeladas ou congeladas* de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) em tampões fosfato de sódio e potássio (pH 8,0) com as molaridades indicadas. A autólise foi seguida pela leitura da A520 durante 120 min de incubação a 37 ^{o}C. Os valores indicados na tabela representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. * O congelamento efectuou-se nos tampões utilizados posteriormente na incubação.

Fig. 22. Aspecto ultrastrutural de células de *S. faecium* após 120 min de incubação em tampões fosfato de sódio e potássio (a) 0,05 M (pH 8,0) ou (b) 0,1 M (pH 8,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação nos tampões indicados. Notar na matriz citoplasmática das células não degradadas a presença de ribossomas (R) e o perfil normal assimétrico da membrana citoplasmática e, nas células degradadas, o perfil simétrico da membrana citoplasmática (MC). Notar a degradação da parede celular (PC) na zona do septo (seta). (a) 44 800 X; (b) 42 000 X.



22a



22b

No intuito de uma melhor compreensão da influência do tampão e do congelamento na taxa de autólise de *S. faecium* realizámos experiências adicionais cujos resultados se encontram na Tabela IV, pag. 79. As principais conclusões desses resultados são:

i) Ocorre uma taxa de autólise significativa de *S. faecium* quando células previamente congeladas em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8 são incubadas em fosfato de sódio e potássio 0,01 M, pH 6,8.

ii) O congelamento prévio das células em tampão fosfato de sódio e potássio 0,3 M, pH 6,8 não aumenta a taxa de autólise observada nesse tampão com células não congeladas.

iii) O congelamento de *S. faecium* quando realizado no meio de cultura não induz autólise - a incubação dessas células em tampão Tris-HCl 0,1M, pH 6,8, ou em Imidazol-HCl 0,05 M, pH 6,8 (não mostrado) origina taxas de autólise semelhantes às observadas com células não congeladas.

Condições experimentais		Tampão de incubação		
		Tris-HCl	Fosfato sódio-potássio	
		0,1 M	0,01 M	0,3 M
Células congeladas				
Tris-HCl	0,1 M	11	18	41
Fosfato de sódio-potássio	0,01 M	64	78	43
	0,3 M	40	28	41
Meio T		90	ND	41
Células não congeladas		90	86	23

Tabela IV. Células de *S. faecium* não congeladas ou congeladas * nos tampões indicados (pH 6,8) ou no meio T (sem K_2HPO_4) foram incubadas 120 min a 37 °C nos tampões indicados. As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. A autólise foi seguida pelo registo da A520 das suspensões celulares ($7,2 \times 10^8$ células/ml) durante 120 min a 37 °C. Os valores indicados representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. * Sempre que o tampão de incubação era diferente do utilizado na congelação, este foi removido por centrifugação. ND - não determinado.

1.2.2. Infuência do Mg^{2+}

Dado que a taxa mais elevada de autólise da estirpe selvagem de *S. faecium* foi observada com bactérias da fase exponencial de crescimento, previamente congeladas e incubadas em Tris-HCl 0,1 M, pH 6,8 (Fig. 3B), decidimos realizar neste tampão uma parte significativa do estudo da influência do Mg^{2+}.

A presença de $MgSO_4$ (10 mM) neste tampão, durante o congelamento e descongelamento, diminuiu parcialmente a taxa e extensão da autólise (comparar Figs. 23A e B), bem como a libertação de materiais que absorvem em UV (Fig. 15), mas não evitou o elevado efluxo de K^+ intracelular (Fig. 8). Contudo, a presença de $MgSO_4$ (10 mM) durante todo o processo (congelamento, descongelamento e incubação) resultou, em parte, na preservação da membrana citoplasmática, dado que após duas horas de incubação foram observados protoplastos (Fig. 24), não visíveis na sua ausência (Fig. 9). Por outro lado, a autólise foi fortemente inibida quando se adicionou $MgSO_4$ (100 mM) no início do processo autolítico ou parcialmente inibida quando este composto (na concentração final de 100 mM) foi adicionado após 30 min de incubação (Figs. 23A e B). Neste último caso, ao fim de 120 min de incubação, as microfotografias revelaram a ocorrência de protoplastos e de numerosas células com paredes e conteúdos celulares ainda que degradados (Fig. 25). Contudo, nas condições experimentais ensaiadas, a maior inibição do processo autolítico foi observada quando o $MgSO_4$ (10 mM) esteve presente no congelamento-descongelamento e durante todo o período de incubação na concentração de 100 mM, conforme evidencia a microfotografia da Fig. 26 (comparar com as Figs. 24 e 25).

Porque parte do estudo realizado referente à lise induzida pela lisozima (Capítulo B) foi efectuado em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0), fizemos também o estudo da influência do Mg^{2+} nestes tampões. Os resultados obtidos, especialmente com células previamente congeladas em Tris-HCl

0,05 M (pH 8,0) mostraram que a presença do $MgSO_4$ (10 mM) durante os 120 min de incubação diminuiu parcialmente a taxa de autólise (Tabela V, pag. 84); neste caso, verificou-se após 120 min de incubação, uma descida de 15 % no valor inicial da A520 das suspensões quando o Mg^{2+} está presente, em vez de 25 % observada na ausência daquele catião.

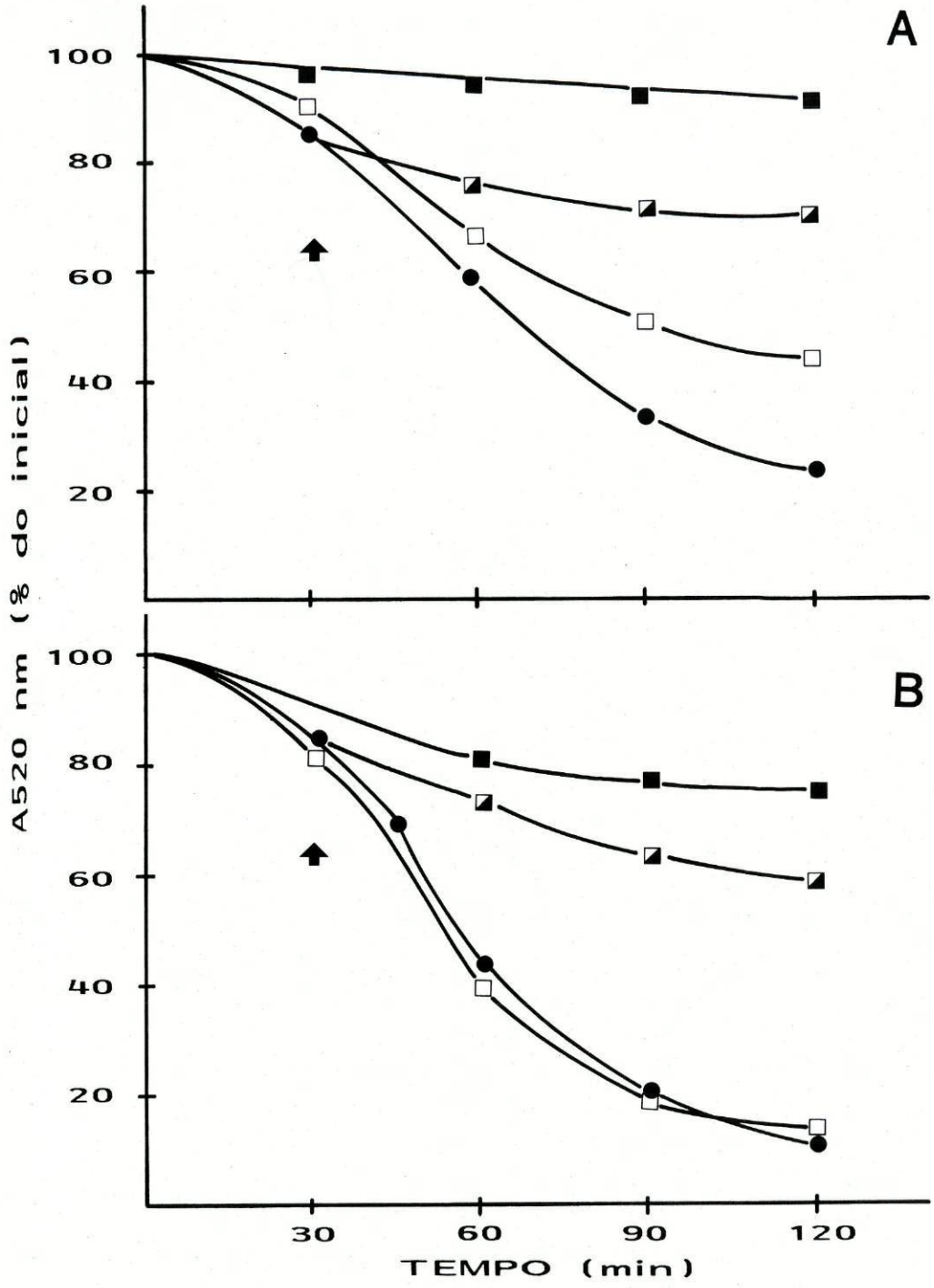
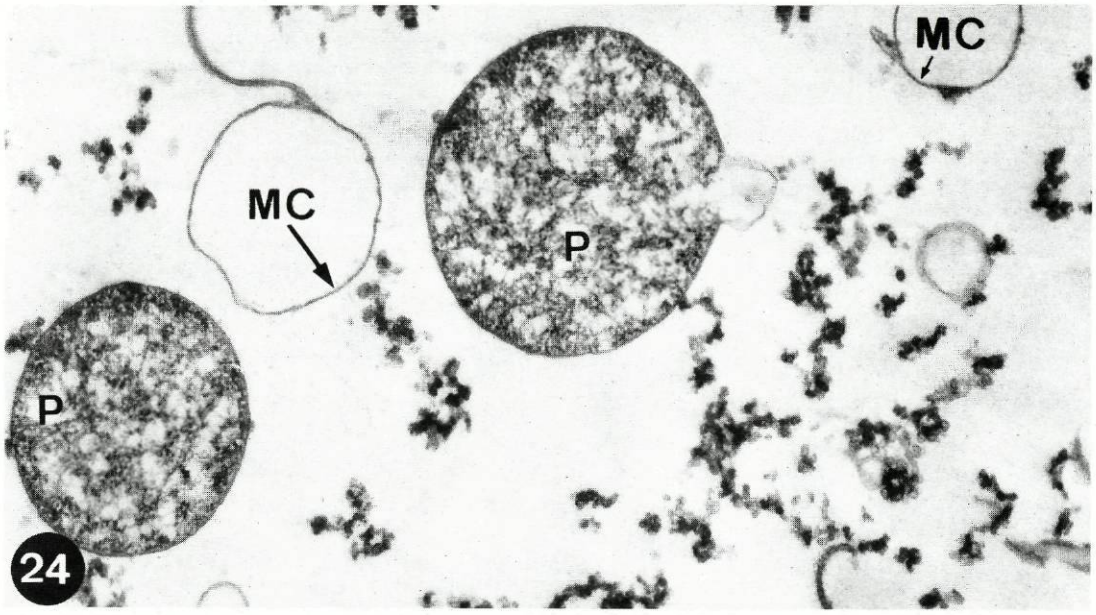


Fig. 23. Efeito do Mg^{2+} na cinética da autólise de *S. faecium* . Células da fase exponencial de crescimento foram congeladas-descongeladas e incubadas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) com 10 mM de $MgSO_4$ (A) ou sem $MgSO_4$ (B). A autólise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares (7,2 x 10^8 células/ml) durante 120 min a 37 °C. Símbolos: (●) sem $MgSO_4$; (□) $MgSO_4$ (10 mM); (■ , ◪) $MgSO_4$ (100 mM) adicionado respectivamente no início do processo autolítico ou após 30 min de incubação (seta).

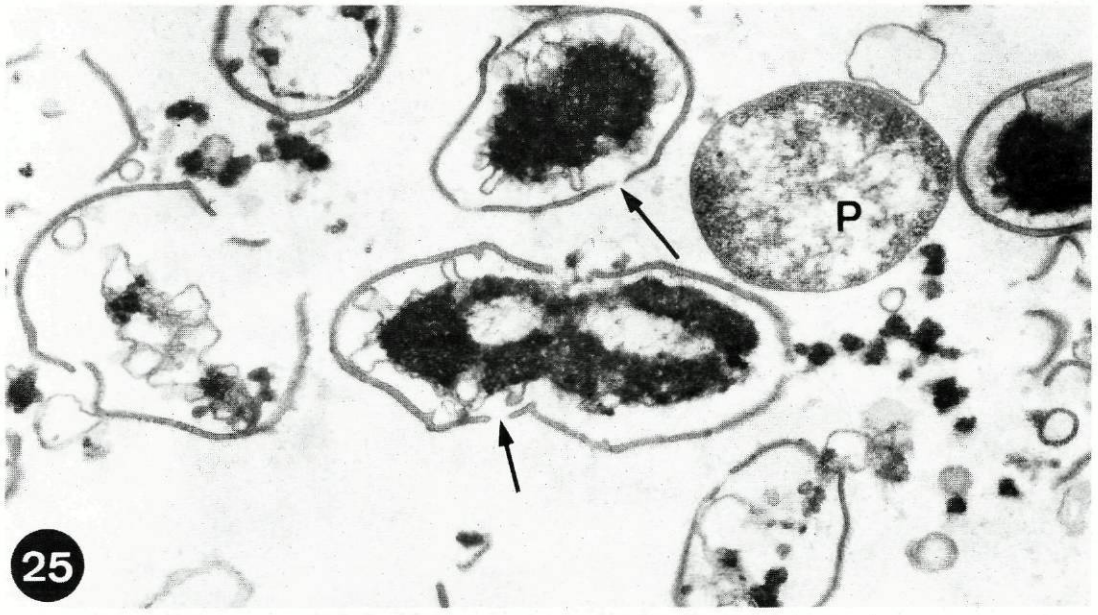
Fig. 24. Ultrastrutura de restos celulares de *S. faecium* após autólise na presença do Mg^{2+}. Células da fase exponencial de crescimento foram congeladas e descongeladas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) com $MgSO_4$ (10 mM) e incubadas 120 min a 37 °C no mesmo tampão. Notar a presença de protoplastos (P) e vesículas de membrana citoplasmática (MC). 28 800 X.

Fig. 25. Ultrastrutura de restos celulares de *S. faecium* após autólise na presença do Mg^{2+}. Células da fase exponencial de crescimento foram congeladas e descongeladas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) e incubadas 120 min a 37 °C no mesmo tampão com $MgSO_4$ (100 mM) adicionado 30 min após o início do processo autolítico. Notar a presença de protoplastos (P) e de células com conteúdos celulares e paredes degradadas (seta). 28 800 X.

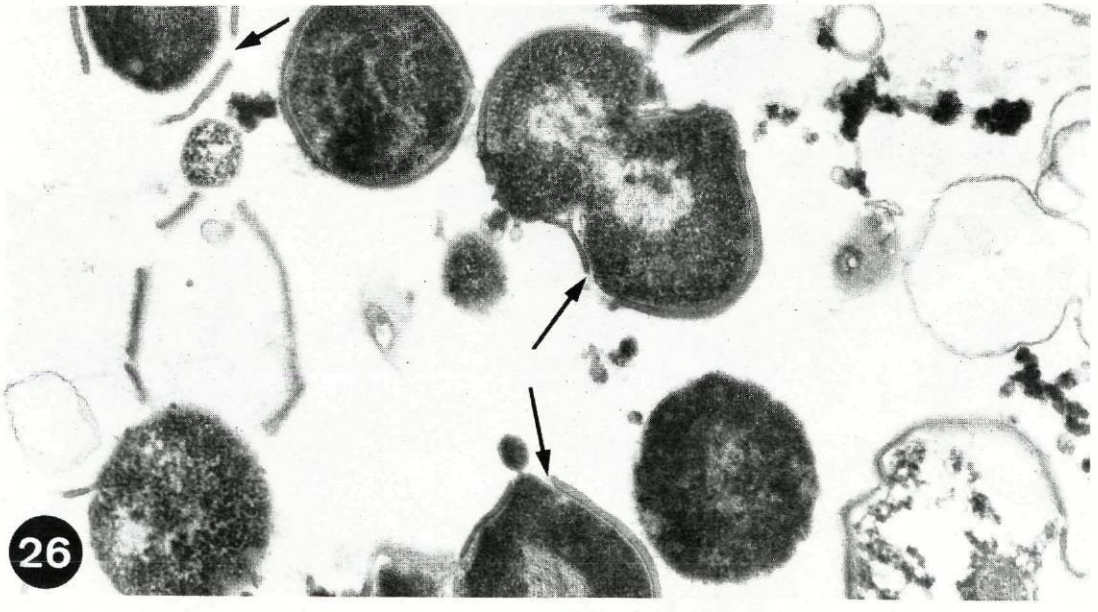
Fig. 26. Ultrastrutura de restos celulares de *S. faecium* após autólise na presença do Mg^{2+}. Células da fase exponencial de crescimento, foram congeladas e descongeladas em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) com $MgSO_4$ (10 mM) e incubadas 120 min a 37 °C no mesmo tampão com $MgSO_4$ (100 mM) adicionado no início do processo autolítico. Notar, em comparação com as Fig. 24 e 25, o maior número de células com conteúdos e paredes celulares ainda que degradadas (setas). 31 200 X.



24



25



26

Influência do Mg^{2+} e das nucleases na autólise de S. faecium

Condições experimentais		% da A520 inicial com a adição de:				
		—	MgSO4	DNase	RNase	DNase RNase
Células não congeladas						
Fosfato de sódio e potássio 0,05M (pH 8,0)	A	96	97	95	97	96
	B	98	98	98	98	98
Tris-HCl 0,05M (pH 8,0)	A	99	98	95	98	96
	B	99	97	98	97	99
Células congeladas						
Fosfato de sódio e potássio 0,05M (pH 8,0)	A	92	95	91	92	87
	B	96	96	96	95	96
Tris-HCl 0,05M (pH 8,0)	A	75	85	30	68	59
	B	95	95	85	95	82

Tabela V. Células de *S. faecium* da fase exponencial (A) ou estacionária (B) não congeladas ou congeladas * foram suspensas e incubadas nos tampões indicados. O $MgSO_4$, a DNase e/ou a RNase, quando indicados, foram adicionados respectivamente na concentração final de 10 mM, 0,01 mg/ml e 0,01 mg/ml. A autólise foi seguida pela leitura da A520 durante 120 min incubação a 37 ^{o}C. Os valores da tabela representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. * O congelamento efectuou-se nos tampões a utilizar posteriomente na incubação.

1.2.3. Infuência de nucleases

O estudo da influência da DNase e da RNase na autólise de *S. faecium* realizou-se com tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0), dado que parte dos resultados apresentados no Capítulo B - Lise induzida pela lizosima - são referentes à influência daquelas enzimas na acção muralítica da lisozima.

1.2.3.1. Acção da DNase

Células não congeladas de culturas de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento, quando suspensas em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) aos quais se adicionou DNase (0,01 mg/ml) no início do processo autolítico, originaram resultados idênticos aos obtidos naqueles tampões na ausência desta enzima (Tabela V, pag. 84). Idênticos resultados foram obtidos com células previamente congeladas e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença ou ausência de DNase (Tabela V).

Contudo, uma extensa taxa de autólise foi observada quando bactérias congeladas em Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) foram incubadas neste tampão ao qual se adicionou DNase (0,01 mg/ml) no início do processo autolítico. Após duas horas de incubação, as suspensões celulares apresentaram uma descida de 70 % do seu valor inicial (Tabela V; Fig. 27). O estudo ultrastrutural desta situação revelou células com paredes degradadas e desprovidas de grande parte do conteúdo celular (Fig. 28).

Porque a degradação da parede celular era topologicamente localizada e porque sabíamos que a autolisina E-1 de *S. faecium* é activável por uma variedade de proteínases (Shockman *et al.*, 1967a; Shockman & Cheney, 1969), decidimos verificar a hipótese da possível contaminação da DNase por enzimas proteolíticas. Os resultados obtidos em experiências paralelas realizadas na presença de um inibidor das proteinases, o PMSF, mostraram que esta actividade estava presente, dado que após 120 min de incubação as suspensões celulares apresentaram uma descida de 35 % da A520 inicial - valor semelhante ao observado na ausência da DNase (Fig. 27).

A observação de que a DNase não teve efeito em células não congeladas ou em células previamente congeladas em tampão fosfato indica que a agressão da membrana citoplasmática, induzida pelo congelamento-descongelamento em Tris-HCl (ver secção 1.2.1.1.), parece permitir o acesso ao interior das bactérias das enzimas proteolíticas contaminantes da DNase adicionada exogenamente.

1.2.3.2. Acção da RNase

Resultados idênticos aos descritos atrás para a DNase foram observados com a RNase, excepto quando as bactérias previamente congeladas foram incubadas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo RNAse; nesta situação, não se verificou descida acentuada dos valores iniciais da A520 (Tabela V, pag. 84). A ultrastrutura observada mostrou-se concordante com os dados de espectrofotometria (não mostrado).

Wecke *et al.* (1982) mostraram que a RNase, dada a sua natureza catiónica, é capaz de induzir a actividade autolítica de *S. aureus*. No intuito de verificar se a RNase seria capaz de induzir a actividade autolítica de *S. faecium* , realizámos experiências com células não congeladas ou previamente congeladas e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) ao qual se adicionou RNase nas concentrações de 0,1; 0,2 ; 0,3; 0,4, ou 0,5 mg/ml. Os resultados de espectrofotometria foram idênticos aos observados nas condições indicadas na Tabela V.

Os estudos ultrustruturais realizados mostraram-se concordantes com os dados espectrofotométricos. Como podemos observar na Fig. 29, mesmo após duas horas de incubação as células congeladas mantiveram a sua ultrastrutura. As micro-fotografias mostraram que, mesmo na presença de concentrações elevadas desta enzima (0,5 mg/ml), as paredes celulares permanecem intactas (Fig. 30). Além disso, os resultados obtidos com células previamente congeladas em Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e incubadas neste tampão, na presença ou ausência daquela enzima, não diferem significativamente (Tabela V).

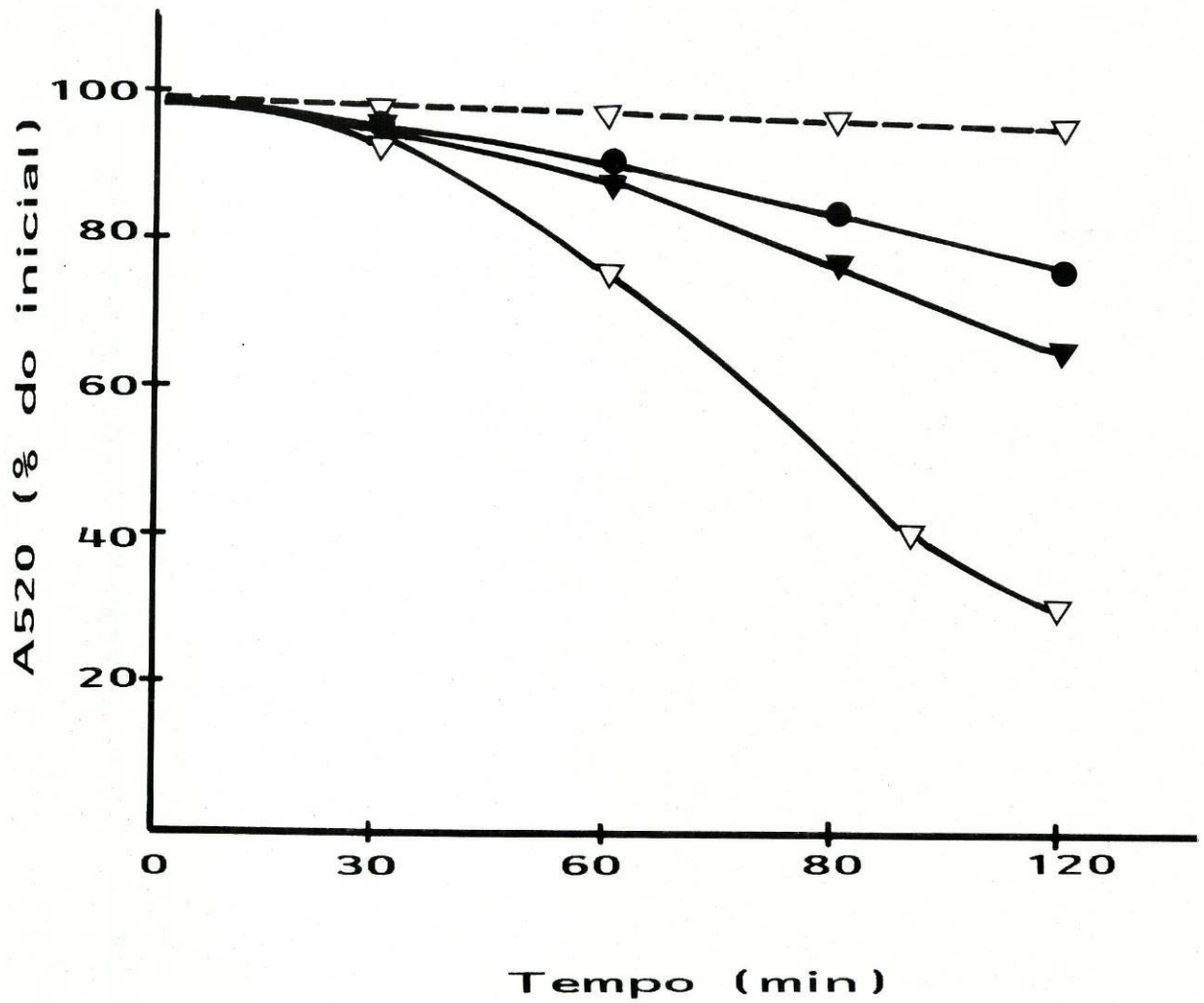
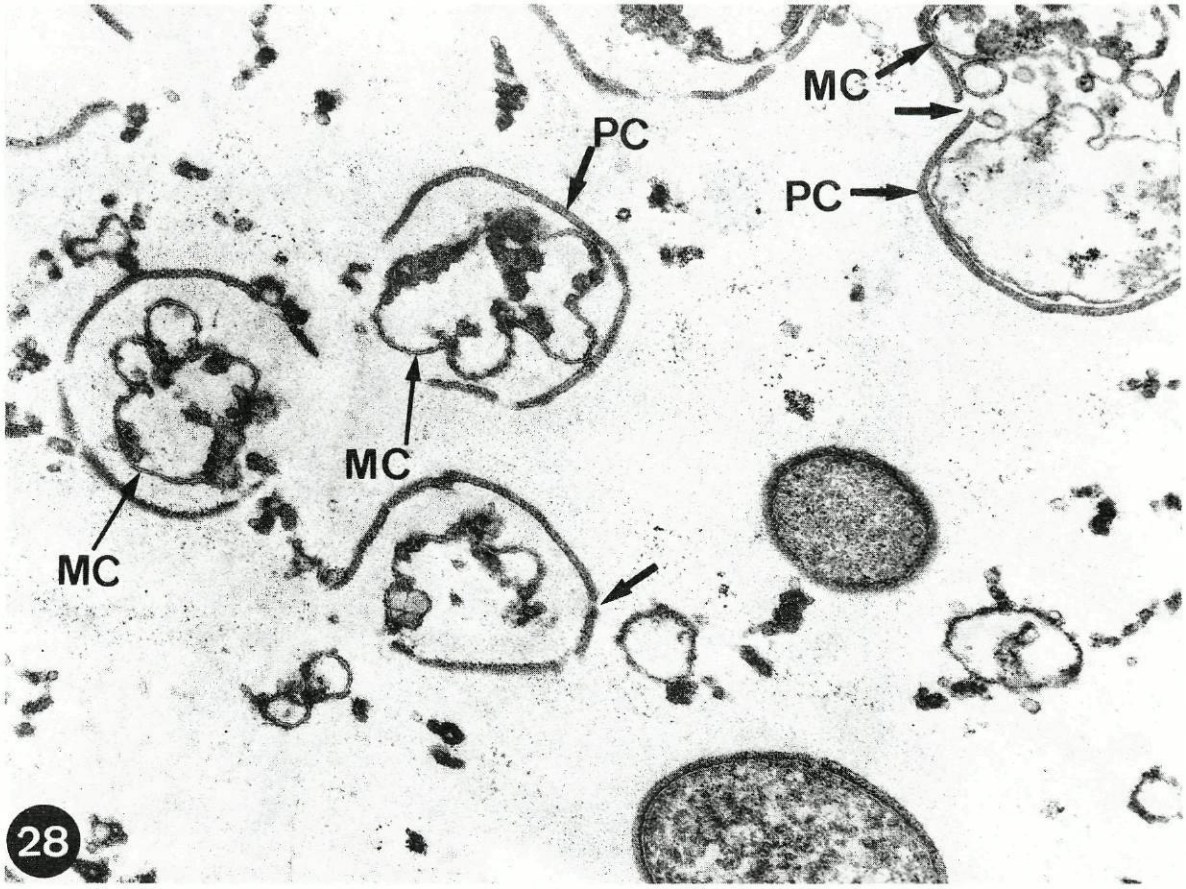


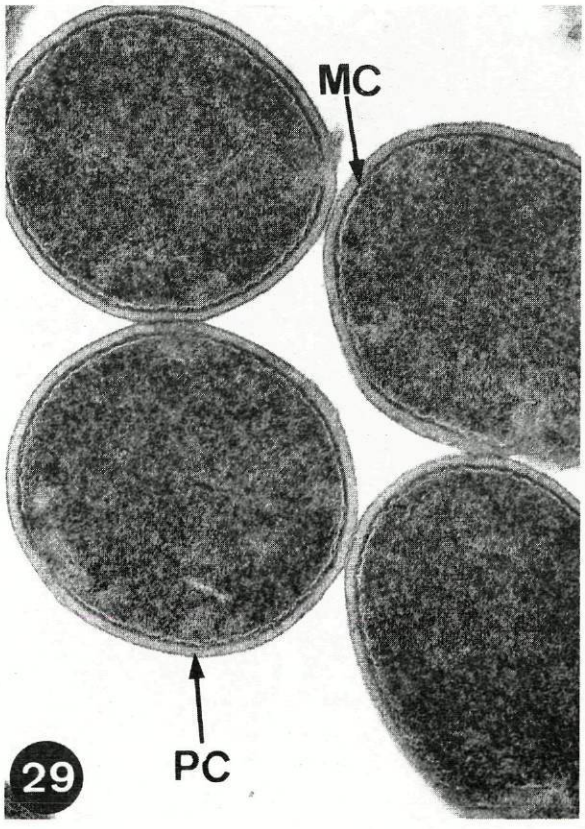
Fig. 27. Influência de DNase na cinética da autólise de *S. faecium* em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). Células não congeladas (---) ou previamente congeladas (—) foram incubadas 120 min a 37 °C na ausência (●) ou na presença (▽) de DNase (0,01 mg/ml), ou na presença (▼) da DNase e PMSF (1 mM). As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. Os valores da A520 obtidos ao longo da incubação foram registados como % do valor inicial.

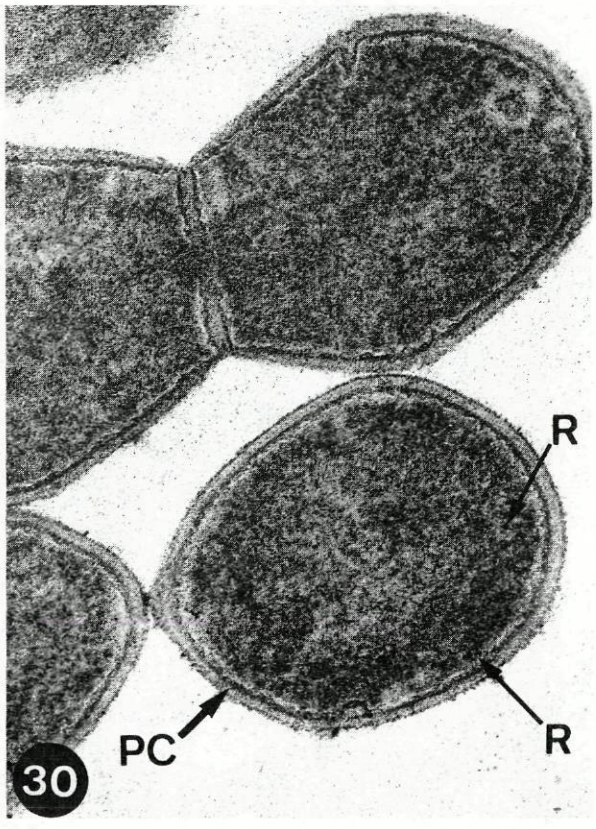
Fig. 28. Aspecto ultrastrutural de *S. faecium* após 120 min de incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) com DNase (0,01 mg/ml). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a degradação (setas) da parede celular (PC), o esvaziamento do conteúdo citoplasmático e o perfil simétrico da membrana citoplasmática (MC). 36 000 X.

Fig. 29. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de RNase (0,01 mg/ml). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a preservação da parede celular (PC), a membrana citoplasmática (MC) e a matriz citoplasmática com ribossomas visíveis. Comparar com a Fig. 43. 78 400 X.

Fig. 30. Aspecto ultrastrutural de células de *S. faecium* após duas horas de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com RNase (0,5 mg/ml). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a parede celular intacta (PC) e a preservação da matriz citoplasmática com ribossomas (R) . 63 000 X.


MC
PC
PC
MC
MC
28


MC
PC
29


R
PC
R
30

1.2.4. Participação das enzimas do sistema autolítico

No intuito de uma melhor compreensão da influência do sistema autolítico de *S. faecium* na indução da autólise celular nas situações referidas atrás, decidimos estudar o efeito de um inibidor das autolisinas - N-bromossuccinimida (NBS) - e de inibidores da síntese proteica - cloranfenicol CAM) e tetraciclina (TC) - no referido processo, dado que são conhecidos os efeitos destes compostos como inibidores da actividade autolítica endógena nas bactérias de Gram-positivo (Ramachandran & Witkop, 1967; Sayare *et al.* , 1972; Cornett & Shockman, 1978) e nas bactérias de Gram-negativo (Parente & Silva, 1984; Parente, 1984).

Além disso, a indução da autólise celular foi estudada utilizando mutantes de *S. faecium* deficientes na actividade autolítica, que isolámos pelo método descrito por Pooley *et al.* (1972).

1.2.4.1. Efeito da N-bromossuccinimida

Quando células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento foram congeladas e suspensas em Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) na presença da NBS, adicionada na concentração final de 1 mM, observou-se uma inibição total da autólise celular (Fig. 31).

O estudo ultrastrutural de amostras obtidas aos 15 e 120 min de incubação nestas condições (Figs. 32a e 32b) mostrou que as células mantiveram, durante todo o período de incubação, a parede celular intacta e o conteúdo celular, ainda que alterado (zonas dispersas de DNA, blocos de material com diferentes densidades aos electrões e ausência de ribossomas). Estes resultados confirmaram os dados de espectrofotometria obtidos (Fig. 31) e mostraram que a presença da NBS impediu a extensa degradação celular observada com células congeladas e incubadas em Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0), como pode ser observado na Fig. 14d.

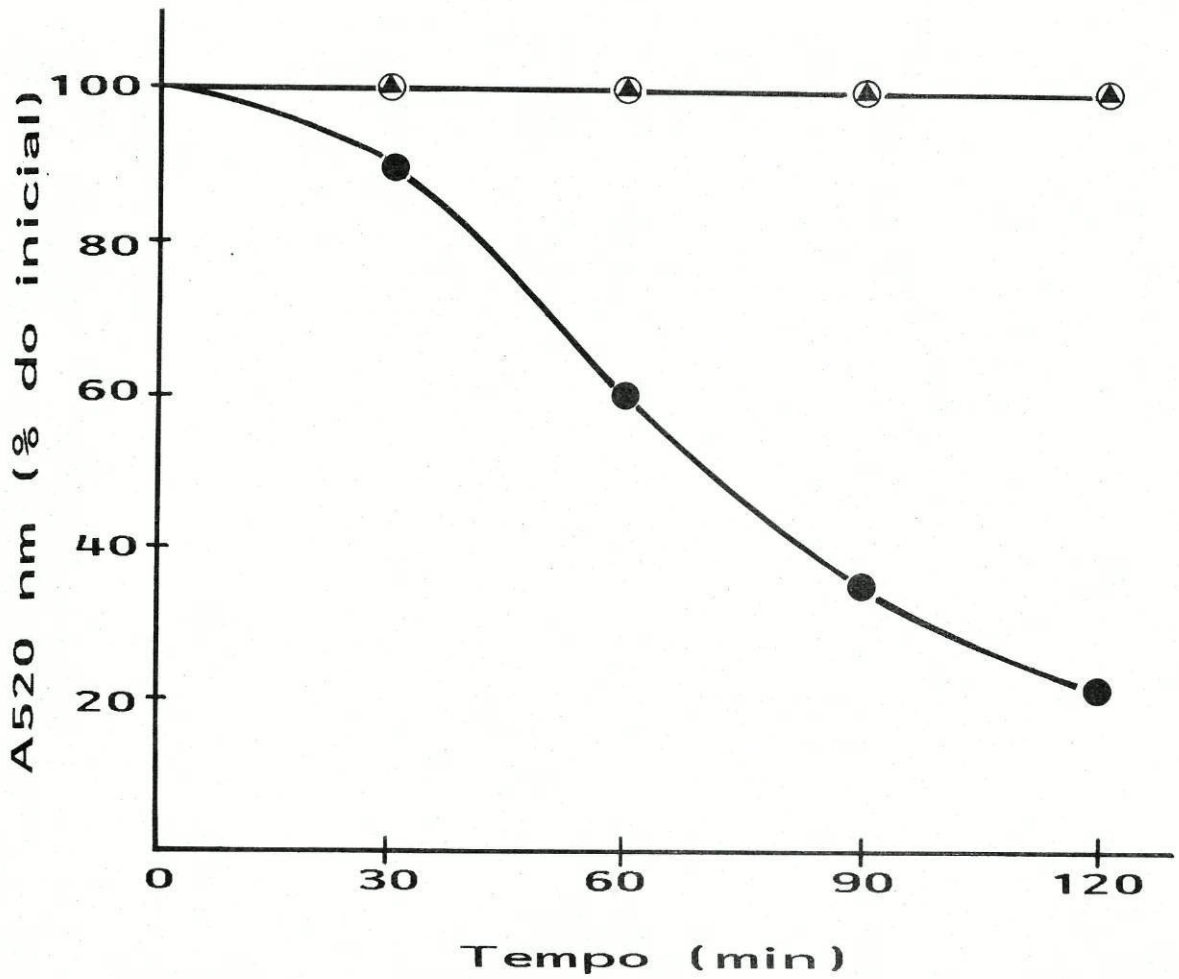
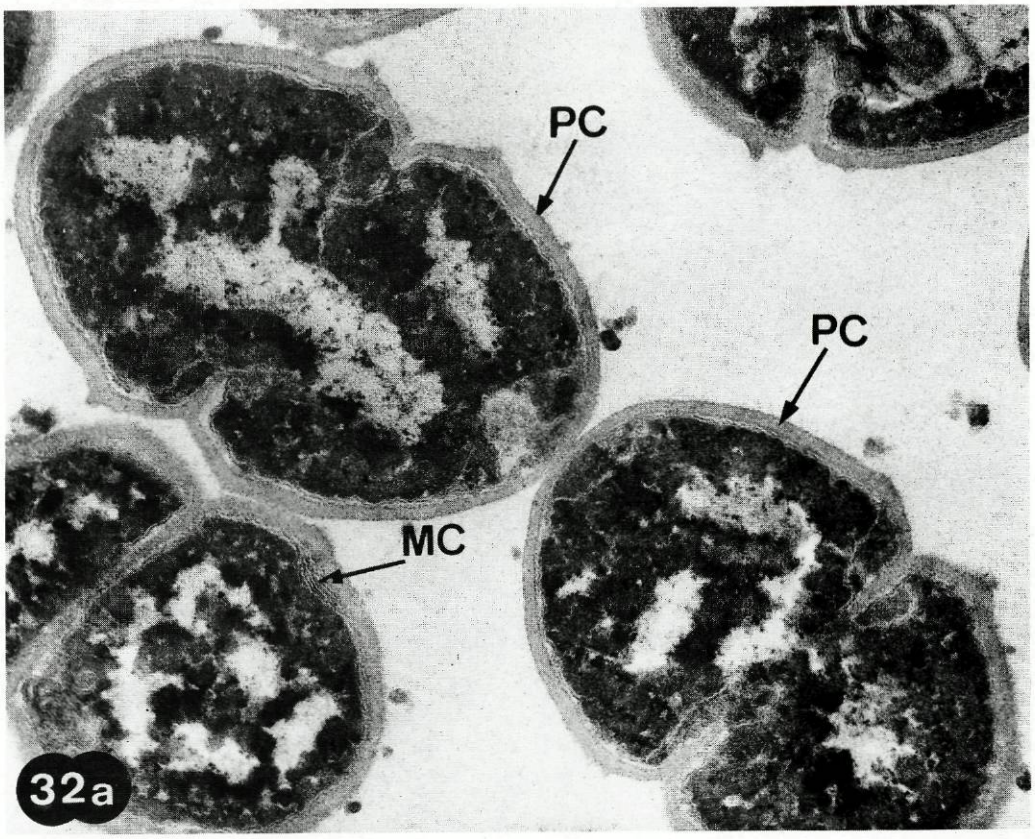
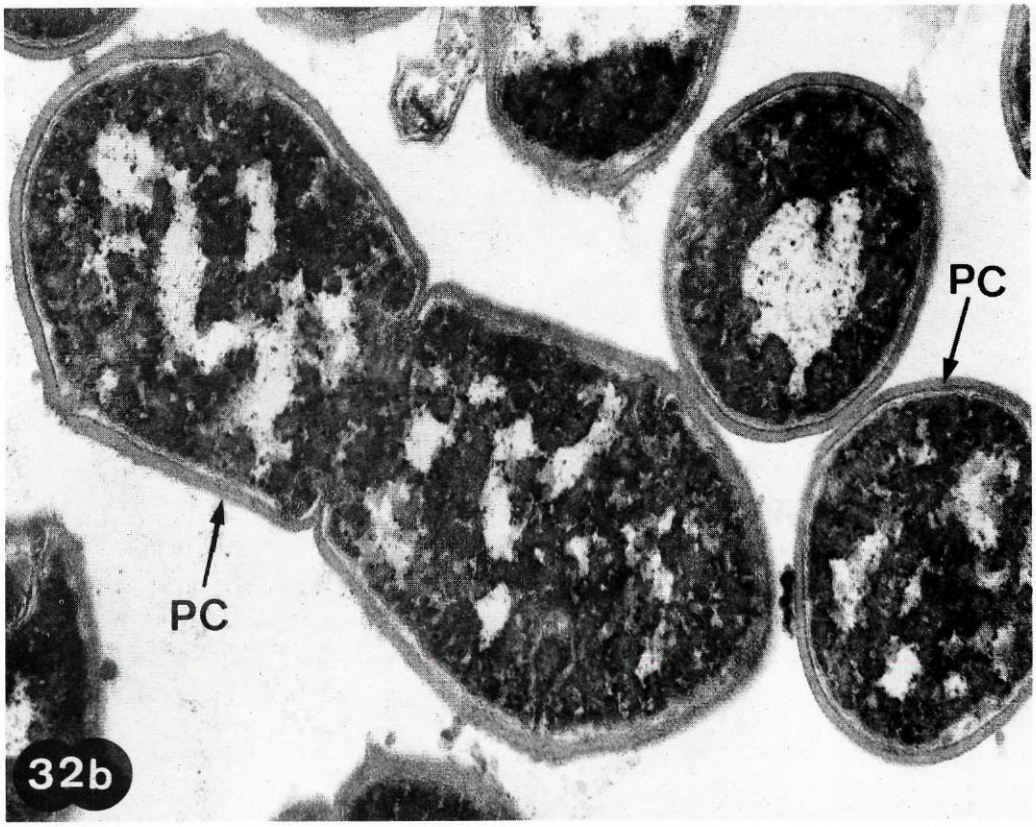


Fig. 31. Efeito da NBS na cinética da autólise de *S. faecium* . As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas e incubadas 120 min a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) na ausência (●) ou na presença (▲) da NBS (1 mM). A A520 foi registada como % do valor inicial.

Fig. 32. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após (a) 15 min ou (b) 120 min de incubação a 37 ^{o}C na presença da NBS (1 mM) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a preservação da parede celular (PC) e da matriz citoplasmática ainda que alterada - blocos dispersos de material com diferentes densidades aos electrões e ausência de ribossomas visíveis; notar ainda a presença de sistemas adicionais de membranas (MC). Comparar Fig. 32b com 14d. (a) e (b) 56 000 X.


PC
PC
MC
32a


PC
PC
32b

1.2.4.2. Efeito do cloranfenicol e da tetraciclina

1.2.4.2.1. Características das culturas

A adição de CAM (10 μg/ml) ou de TC (0,5 μg/ml) a culturas da fase exponencial de *S. faecium* provocou uma inibição no seu crescimento celular (Fig. 33).

A ultrastrutura de células da fase exponencial de culturas WT, TC ou CAM de *S. faecium* cultivado em meio T, encontra-se documentada respectivamente nas Figs. 34, 35 e 36. Comparando as imagens ultrastruturais obtidas de células da estirpe selvagem (Fig. 34) com as de culturas TC ou CAM (Figs. 35 e 36) observaram-se nas células expostas a estes antibióticos a condensação do nucleóide e a desorganização parcial dos ribossomas - características não observadas nas células da estirpe selvagem. Além disso, as paredes das células expostas à acção do CAM são significativamente mais espessas ($P < 0,01$) do que as das células das culturas da estirpe selvagem; os seus valores médios, quando avaliados em células intactas, foram respectivamente de 35,66 nm ± 2,05 e de 30,70 nm ± 1,93.

1.2.4.2.2. Actividade autolítica das culturas CAM e TC

Quando se incubaram células da fase exponencial de culturas CAM ou TC nas condições que promoveram uma autólise extensa das células das culturas WT verificaram-se inibições de 83 - 91 % na taxa de autólise celular (Tabela VI, pag. 97). As Figs. 37a e 37b, mostram a ultrastrutura de células de culturas TC, previamente congeladas e incubadas durante 5 ou 120 min em Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0).

A comparação destas imagens ultrastruturais com as das culturas da fase exponencial de crescimento sujeitas à acção deste antibiótico (Fig. 35) revelou que durante o congelamento se acentuou a condensação do nucleóide, tornando visíveis fibrilas de DNA; além disso, após o congelamento os ribossomas não são visíveis e surgiram sistemas adicionais de membranas. O facto da parede celular ter

permanecido intacta durante todo o período de incubação, evitando a desintegração celular, está de acordo com os correspondentes resultados espectrofotométricos obtidos (Tabela VI).

Células de culturas CAM observadas em amostras colhidas imediatamente após o congelamento (Fig. 38a) ou após 120 min de incubação (Fig. 38b) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) revelaram uma ultrastrutura semelhante à descrita no parágrafo anterior para as de culturas TC. Por outro lado, células de culturas CAM quando incubadas em condições óptimas para a autólise das células das culturas WT não autolisaram (Fig. 39).

Analisámos também a integridade da membrana citoplasmática de culturas CAM, após o descongelamento e durante a incubação em Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8). Os resultados obtidos mostraram que as libertações quer do K^+ intracelular (Fig. 40), quer dos materiais que absorvem em UV (Fig. 41), foram semelhantes aos observados com células das culturas WT sujeitas às mesmas condições (Figs. 8 e 15).

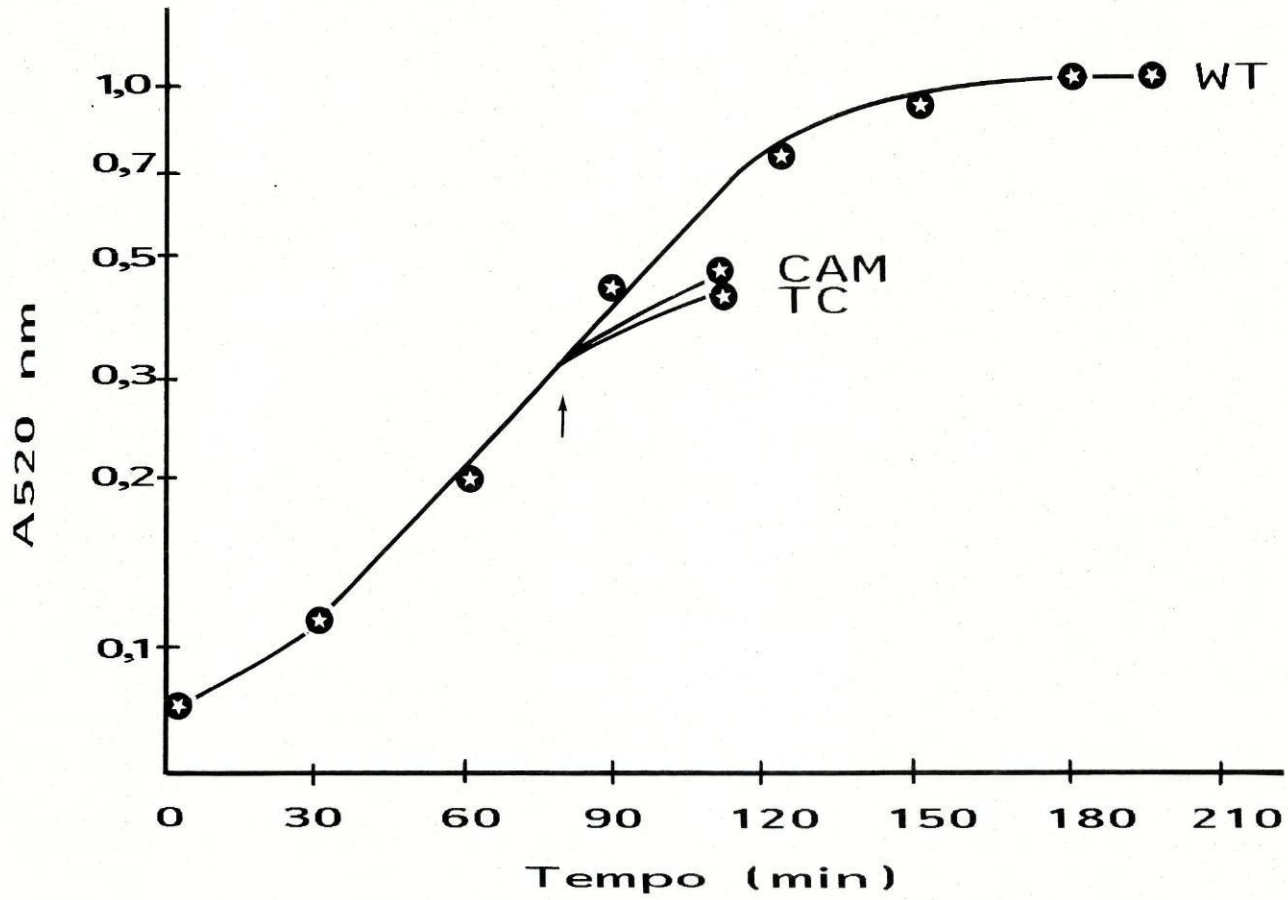
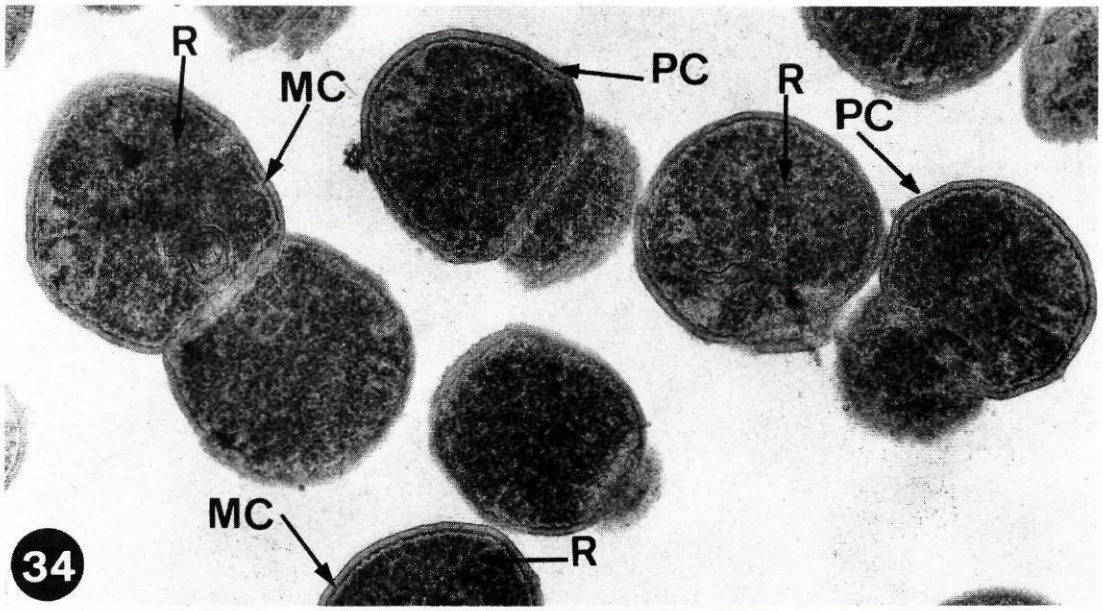


Fig. 33. Efeito do CAM ou da TC no crescimento de *S. faecium* . A culturas selvagens (WT) na fase exponencial de crescimento em meio T foram adicionados CAM (10 µg/ml) ou TC (0,5 µg/ml) aos 80 min de incubação (seta).

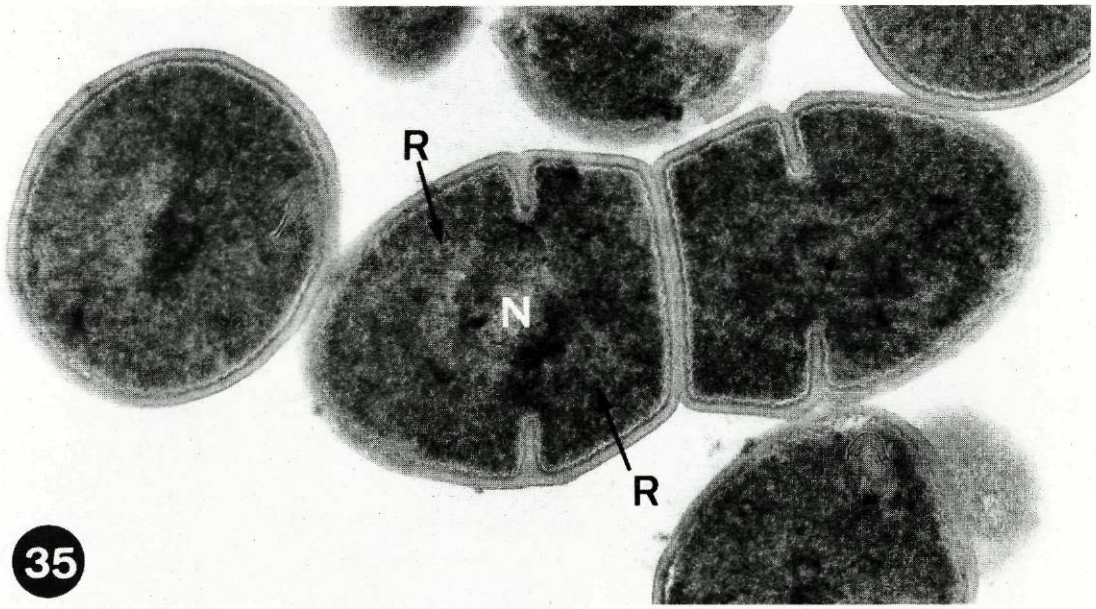
Fig. 34. Ultrastrutura de células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento. Notar a parede celular intacta (PC), e na matriz citoplasmática a presença de ribossomas (R). MC - membrana citoplasmática. 42 000 X.

Fig. 35. Ultrastrutura de células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento após 30 min de exposição à TC (0,5 µg/ml). Notar na matriz citoplasmática a desorganização parcial dos ribossomas (R), e a condensação do nucleóide (N). 44 000 X.

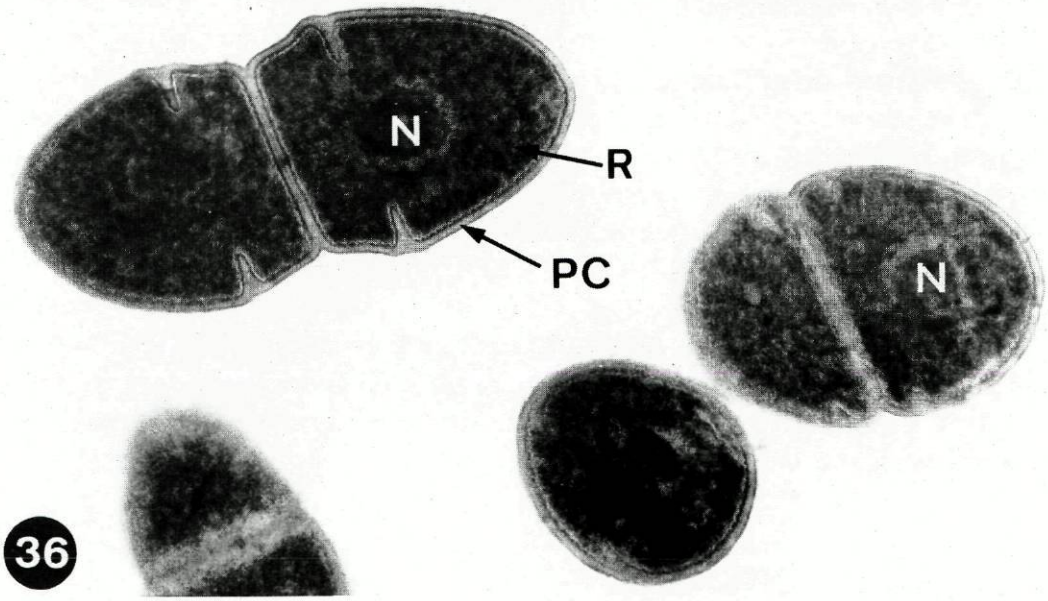
Fig. 36. Ultrastrutura de células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento após 30 min de exposição ao CAM (10 µg/ml). Notar na matriz citoplasmática a desorganização parcial dos ribossomas (R) e a condensação do nucleóide (N). PC - parede celular. 56 000 X.



34



35

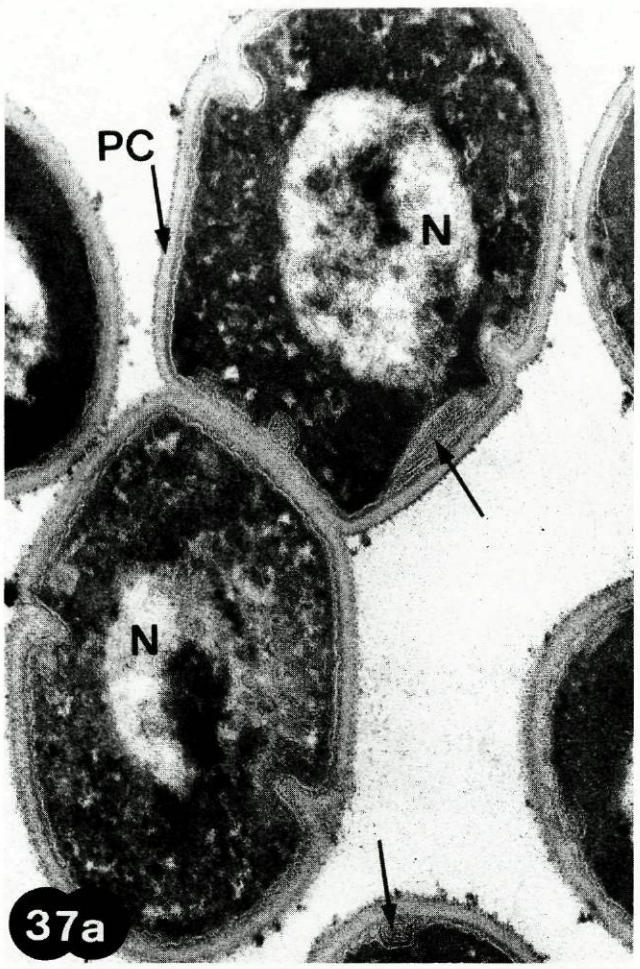


36

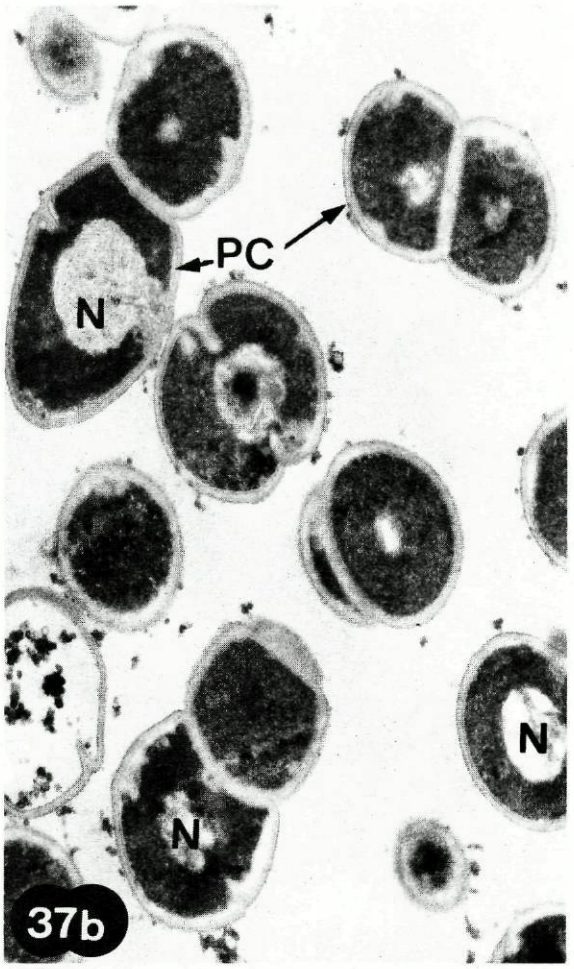
Fig. 37. Ultrastrutura de células de *S. faecium* cultivadas na presença de TC. (a) após 5 min ou (b) 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a parede celular intacta (PC), a condensação do nucleóide (N), a presença de sistemas adicionais de membranas (setas) e a ausência de ribossomas. Comparar Fig. 37b com Fig. 14d. (a) 60 000 X; (b) 26 400 X.

Fig. 38. Ultrastrutura de células de *S. faecium* cultivadas na presença de CAM. (a) imediatamente após o congelamento-descongelamento ou (b) após 120 min de incubação a 37 °C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar alterações ultrastruturais semelhantes às descritas nas Figs. 37a e 37b. (a) 38 400 X; (b) 44 000 X.

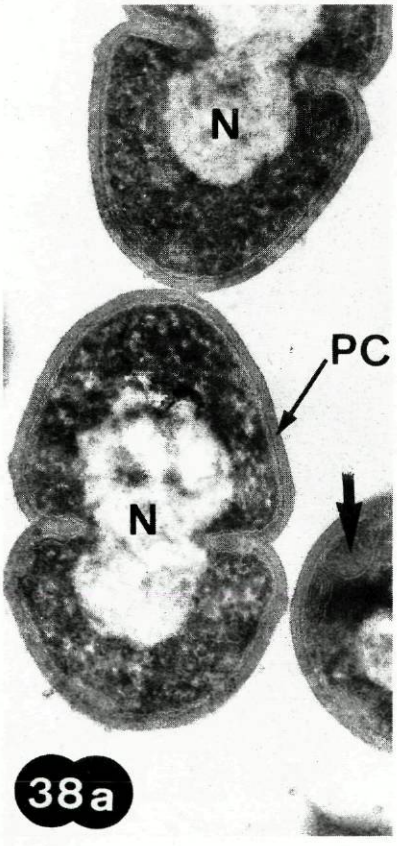
Fig. 39. Ultrastrutura de células não congeladas de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento cultivadas na presença de CAM, após 120 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,4 M (pH 6,8). Notar a parede celular intacta (PC). 33 600 X.



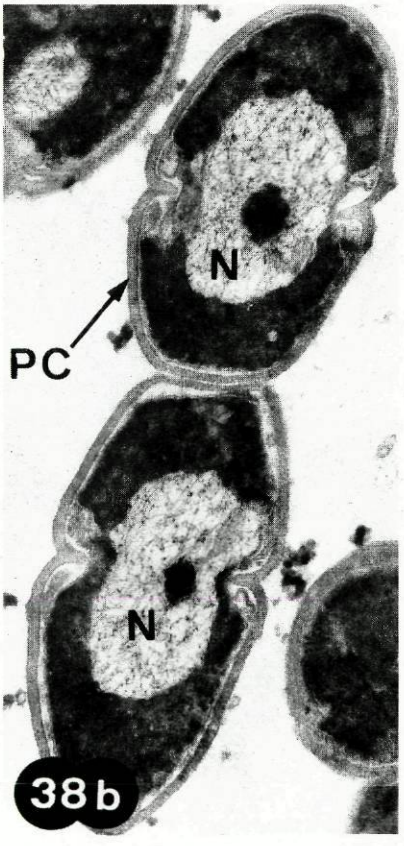
37a



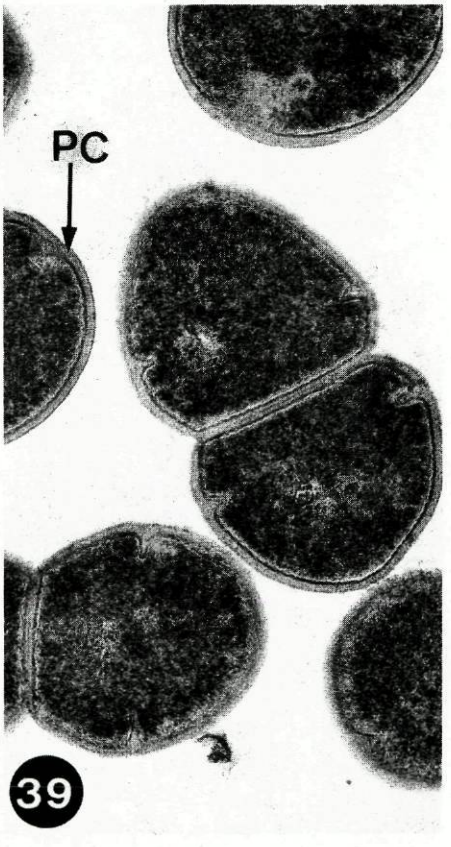
37b



38a



38b



39

Culturas		Tampão de incubação				
		Fosfato de sódio e potássio (pH 6,8)			Tris-HCl (pH 6,8)	
		0,3 M	0,4 M	0,05 M	0,1 M	0,2 M
Não congeladas	WT	23	21	93	92	92
	CAM	93	90	ND	ND	ND
	TET	93	92	ND	ND	ND
Congeladas*	WT	41	43	23	11	14
	CAM	90	90	92	91	91
	TET	93	92	91	92	90

Tabela VI. Efeito do CAM ou da TC na autólise de *S. faecium* . Células da fase exponencial de crescimento cultivadas na ausência de antibióticos (WT) ou na presença de CAM (10 μg/ml) ou TC (0,5 μg/ml), não congeladas ou congeladas, foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) e incubadas 120 min a 37 °C nos tampões indicados. A autólise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares. Os resultados indicados foram obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. ND - não determinado. * A congelação efectuou-se nos tampões usados posteriormente na incubação.

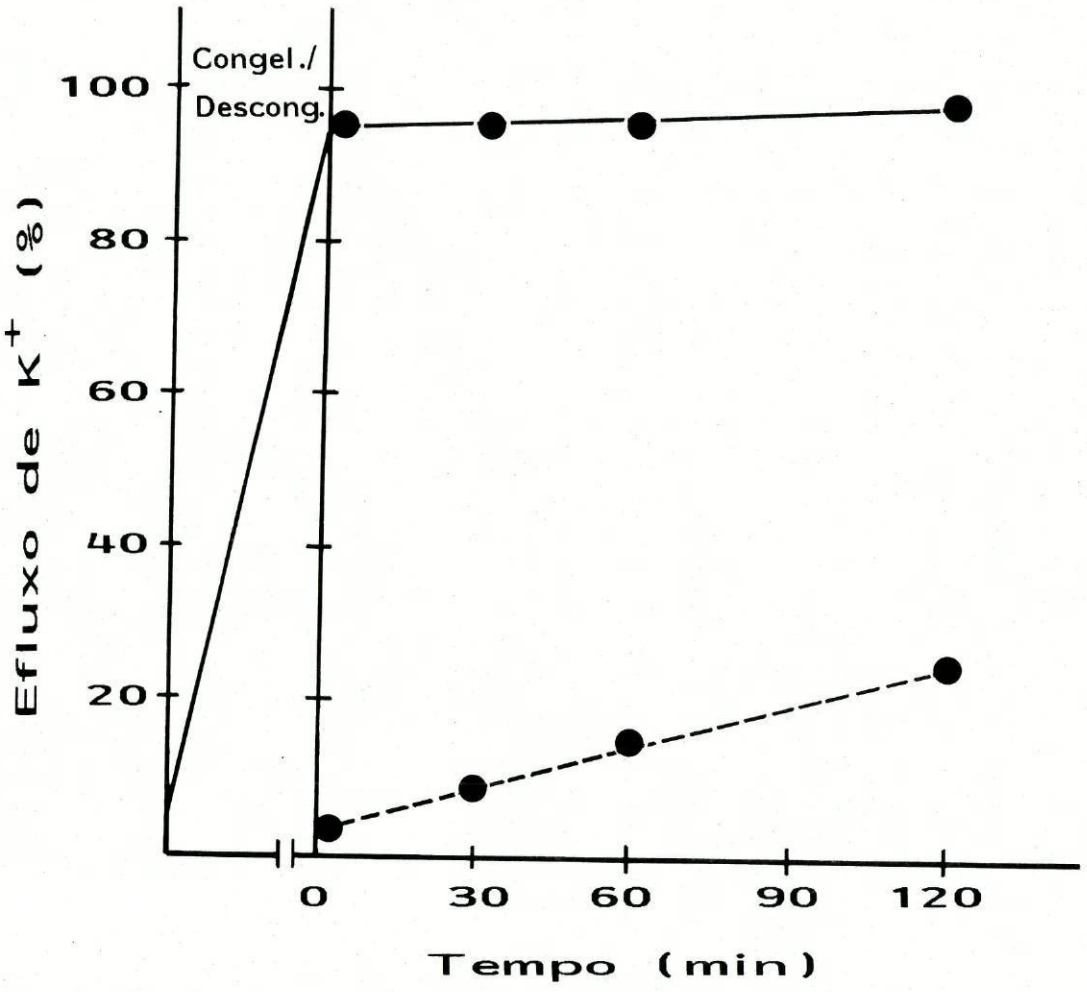


Fig. 40. Efluxo de K^+ após congelamento-descongelamento e/ou durante a incubação de células exponenciais de culturas CAM de *S. faecium* cultivadas durante 30 min na presença do antibiótico. Células não congeladas (---) ou previamente congeladas (—) foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6,8) e incubadas durante 120 min a 37 ^oC. Filtrados de amostras colhidas após congelamento--descongelamento ou durante a incubação foram usados para a determinação do K^+. Uma amostra paralela de cada suspensão foi fervida 30 min, filtrada e utilizada como controlo (100%).

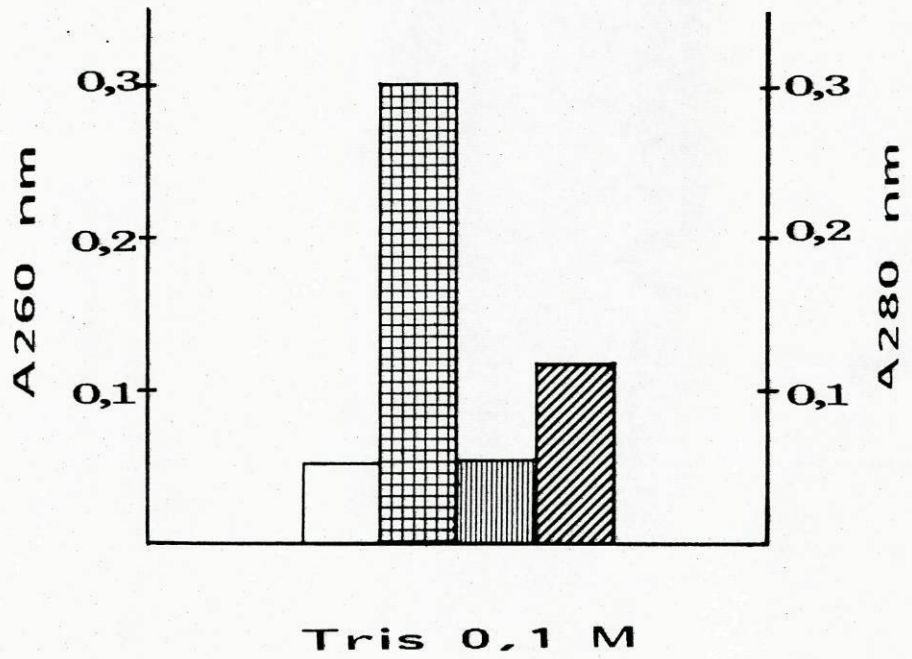


Fig. 41. Libertação de materiais que absorvem em UV de células não congeladas de *S. faecium* em diferentes condições. Filtrados de suspensões de células não congeladas (▭ , ▥) ou congeladas (▦ , ▨) ou no tampão indicado, foram utilizados para a determinação da A260 (▭, ▦) ou da A280 (▥ , ▨). Os filtrados foram obtidos imediatamente após a preparação das suspensões celulares (7,2 x 10^8 células/ml) ou imediatamente após o descongelamento dessas suspensões.

1.2.4.3. Mutantes de *S. faecium* deficientes na actividade autolítica

1.2.4.3.1. Características morfológicas

Os 85 mutantes que isolámos de *S. faecium* por mutação com EMS (Pooley *et al.*, 1972), conforme descrito em Materiais e Métodos, apresentaram diferentes taxas de crescimento em meio T com tempos de geração que variaram entre 32 min e 75 min. Basicamente, durante o crescimento celular foram observados três tipos de associações celulares: I - mutantes que crescem de modo semelhante à estirpe selvagem (Fig. 42a); II - mutantes que crescem em cadeias mais ou menos longas (Fig. 42b) e III - mutantes que crescem em forma de cachos, formados pela associação de células em número variado (Fig. 42c). Dos mutantes isolados, seleccionamos para este estudo um do tipo I, o mutante EC78 e outro do tipo II, o mutante EC31.

O mutante EC31 apresentou um crescimento mais lento (tempo de geração - 48 min) que o mutante EC78 (tempo de geração - 32 min) - Fig. 43; este último cresceu a uma taxa igual à observada com a estirpe selvagem. Durante o crescimento exponencial, o mutante EC31 cresceu em cadeias formadas por 10 a 20 células e na Fig. 44 pode ser observada a ultrastrutura de parte de uma dessas cadeias.

A determinação da espessura das paredes de células destes mutantes revelou que elas eram significativamente mais espessas que as da estirpe selvagem (Tabela VII, pag. 105). As paredes do mutante EC78 e do mutante EC31 possuem, em média, respectivamente mais 9,39 nm e 4,83 nm que as da estirpe selvagem.

1.2.4.3.2. Actividade autolítica dos mutantes EC31 e EC78

A Fig. 45 mostra os resultados obtidos com a cultura dos mutantes EC31 e EC78 e da estirpe selvagem de *S. faecium* em placas de meio ML. À volta da colónia do mutante EC78, o halo existente é extremamente reduzido, enquanto que o halo formado junto da colónia do mutante EC31, embora apreciável, é menor que o observado junto da colónia da estirpe selvagem.

A incubação destes mutantes nas condições que promoveram na estirpe selvagem a autólise de células não congeladas em tampão fosfato (ver secção 1.1.3.) ou a autólise induzida pelo congelamento prévio das culturas em tampões Tris-HCl (ver secção 1.2.1.1.) resultou em taxas muito reduzidas de autólise (Tabela VIII, pag. 107).

Os resultados ultrastruturais obtidos com amostras dos mutantes EC31 e EC78 (Figs. 46a e 46b), obtidas imediatamente após o descongelamento em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) quando comparadas com os obtidos com células não congeladas, incubadas no mesmo tampão (respectivamente Figs. 47a e 47b) mostraram que, nos dois casos, ocorreram durante o congelamento e descongelamento alterações ultrastruturais na matriz citoplasmática.

Além disso, as células do mutante EC31 perderam, durante esse tratamento prévio em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 6.8), 80 % do K^+ intracelular e materiais que absorvem a 260 nm em quantidades idênticas (A260 = 0,250) às obtidas com a estirpe selvagem quando submetida às mesmas condições (Figs. 8 e 15).

1.2.5. Influência da fase de crescimento na autólise celular

Realizámos experiências com células de culturas de *S. faecium* do início da fase estacionária (A520 = 1,050; Fig. 33) em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (pH 8,0), dado que parte do trabalho referente à lise induzida pela lisozima (Capítulo B) foi efectuada nestes tampões.

Quando se incubaram células não congeladas de *S. faecium* do início da fase estacionária de crescimento em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) não se verificou autólise (Tabela V, pag. 84). Os resultados obtidos com células previamente congeladas e incubadas durante duas horas naqueles tampões mostraram descidas não significativas dos valores da A520 (5 % para o tampão Tris-HCl e 4 % para o tampão fosfato de sódio e potássio).

Os estudos ultrustruturais realizados mostraram-se concordantes com os dados espectrofotométricos. Como podemos observar na Fig. 48, mesmo após duas horas de

incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), as células congeladas mantiveram a sua ultrastrutura.

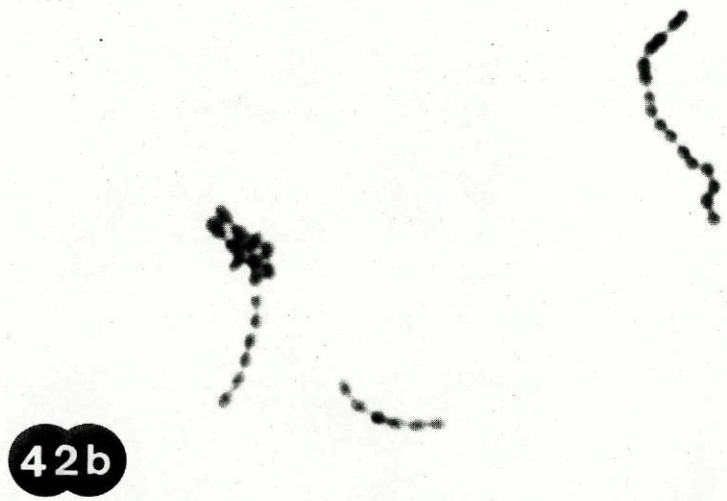
Quando células não congeladas ou previamente congeladas nos tampões acima citados foram incubadas nesses tampões, aos quais se adicionou $MgSO_4$ (10 mM) no início do processo autolítico, não foram observadas diferenças significativas em relação aos valores obtidos na sua ausência (Tabela V).

A adição de nucleases, DNase ou RNase ou DNase e RNase, na concentração final de 0,01 mg/ml ao tampão de incubação originou resultados idênticos aos obtidos nas experiências realizadas na ausência daquelas enzimas, excepto nos casos das células congeladas em Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) e incubadas neste tampão ao qual se adicionou DNase ou DNase e RNase (Tabela V); nestas situações, verificaram-se após 120 min de incubação descidas mais acentuadas dos valores iniciais da A520 das suspensões celulares (respectivamente 15 e 18 % em vez de 5 %, observada na ausência das nucleases).

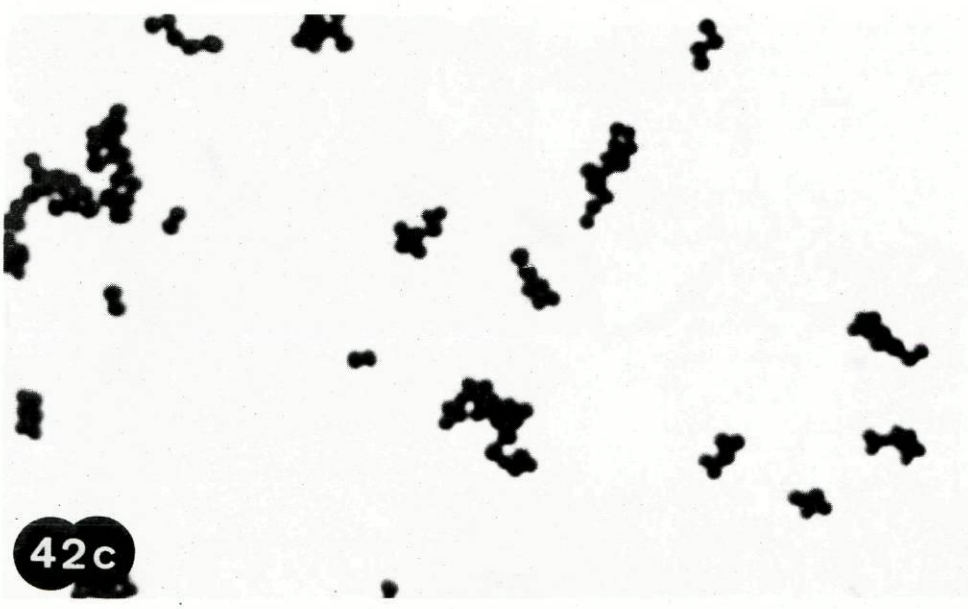
Fig. 42. Microfotografias ópticas de células de culturas da fase exponencial dos mutantes de *S. faecium* deficientes na actividade autolítica. (a) Mutante EC3; (b) Mutante EC26; (c) Mutante EC51. Notar os diferentes tipos de associações celulares (a) 6 000X; (b) 6 000 X; (c) 6 000 X.



42a



42b



42c

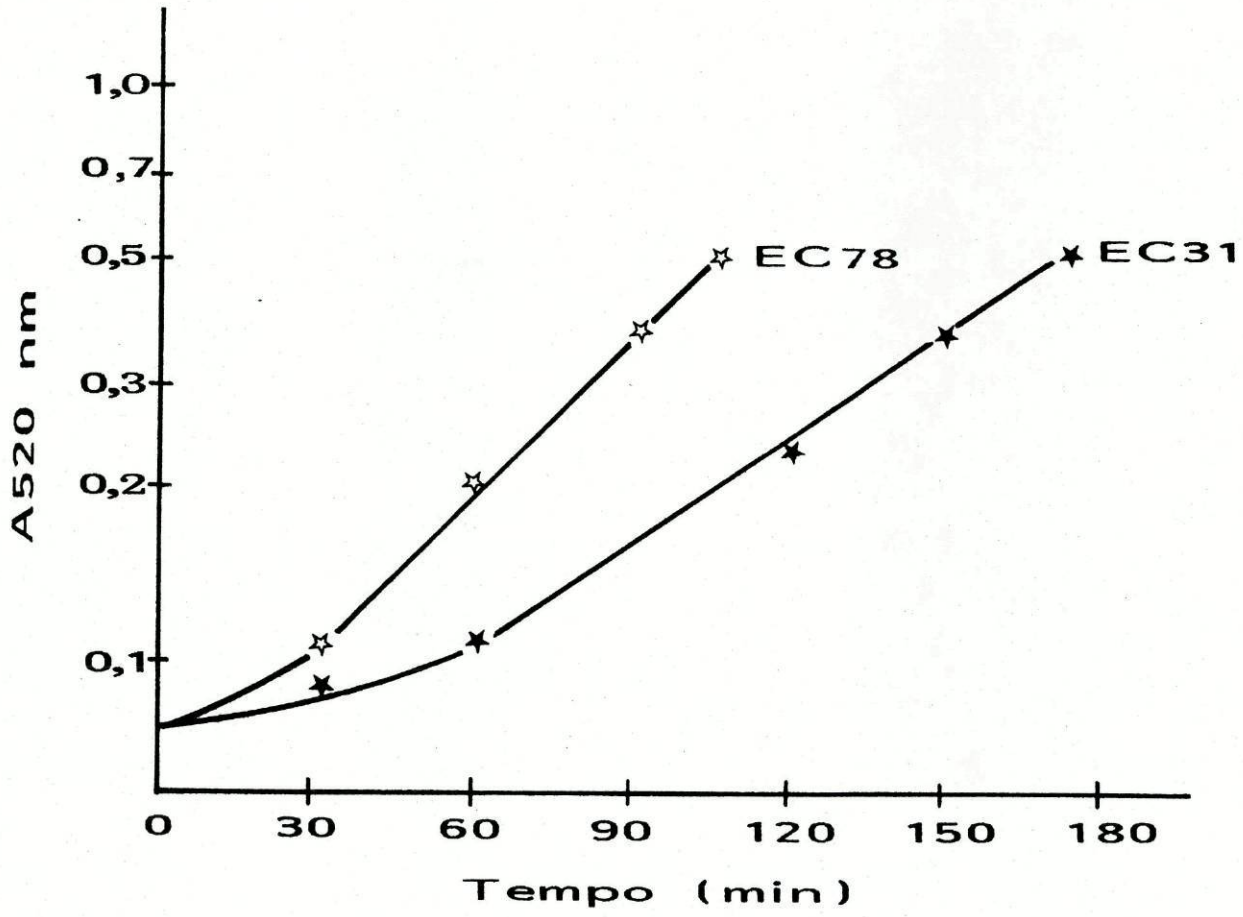


Fig. 43. Crescimento em meio T dos mutantes EC78 (☆) e EC 31 (★) de *S. faecium* deficientes na actividade autolítica.

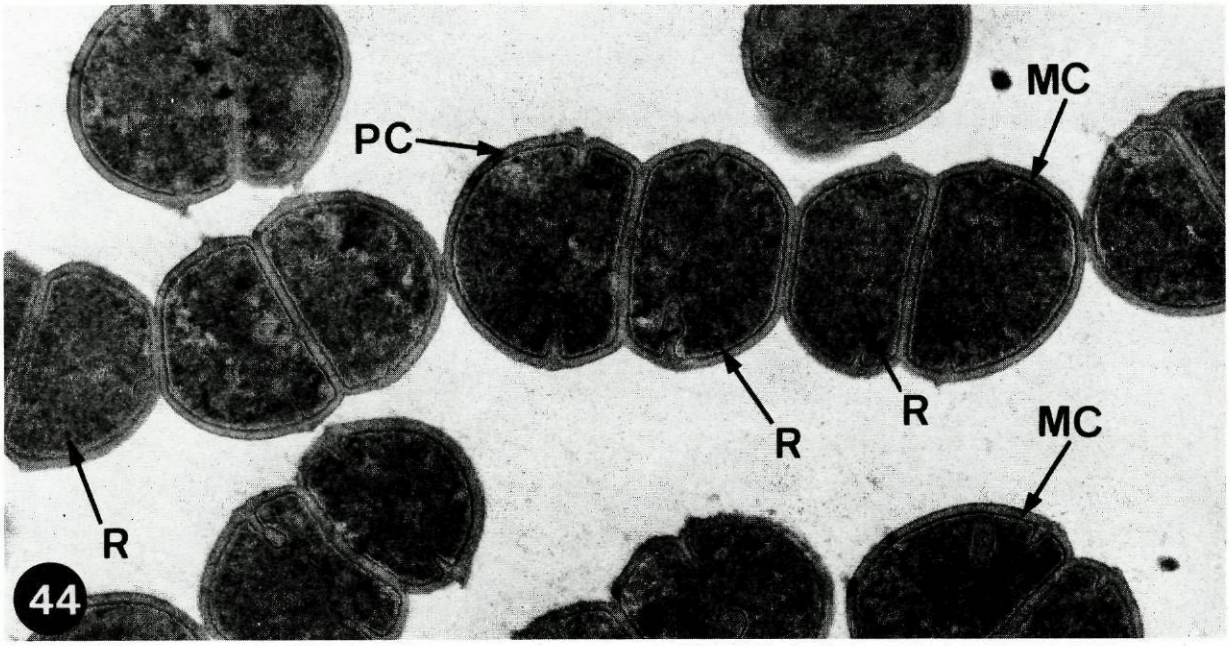
Espessura das paredes celulares da estirpe selvagem (WT) e dos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium*

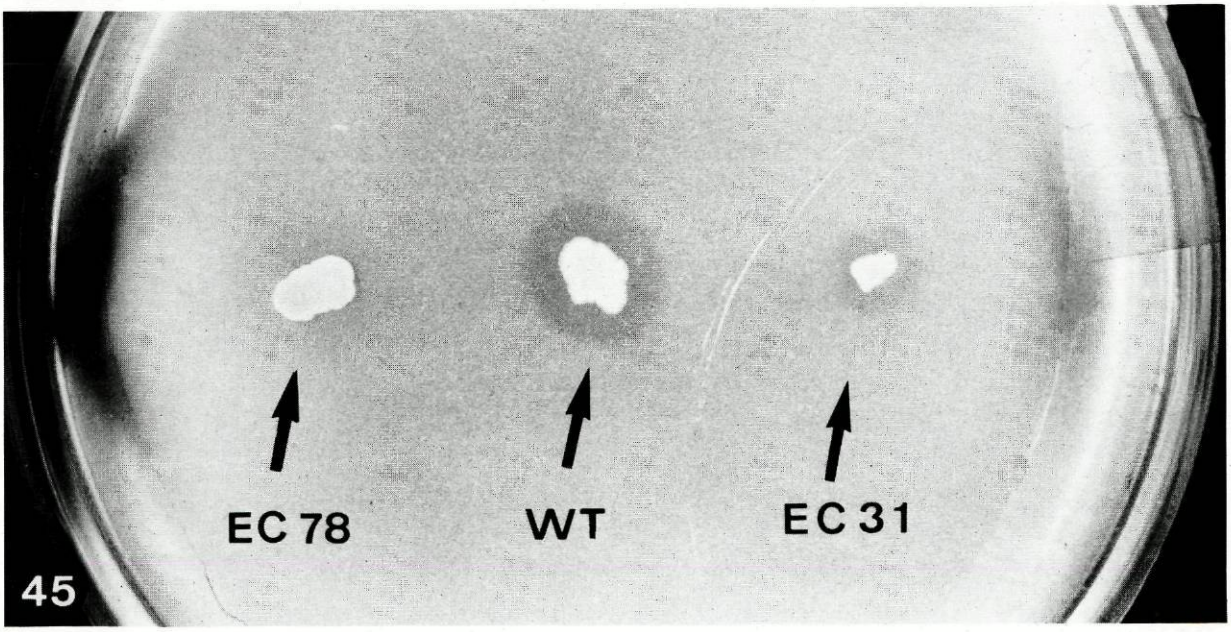
Culturas	Espessura da parede (nm ± D.P.)
WT	30,70 ± 1,93
EC31	35,53 ± 2,37
EC78	40,09 ± 2,14

Tabela VII. As determinações da espessura foram efectuadas a partir de positivos ou de negativos de microscopia electrónica. As diferenças observadas entre as espessura das paredes das células (WT) e (EC31) ou entre as paredes das células (WT) e (EC78) são significativas ($P < 0,01$).

Fig. 44. Ultrastrutura de células da fase exponencial de crescimento do mutante EC31 de *S. faecium*.. Notar o crescimento em cadeia, (MC) e na matriz citoplasmática a presença de ribossomas (R). PC - parede celular; MC - membrana citoplasmática. 35 200 X.

Fig. 45. Crescimento da estirpe selvagem (WT) e dos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium* em meio ML. Os halos formados à volta das colónias indicam a maior ou menor capacidade de cada estirpe para dissolver as células de *M. lysodeikticus* . A placa foi fotografada após 48 horas de incubação. Para detalhes ver Materiais e Métodos.


PC
MC
R
R
MC
R
44


EC 78
WT
EC 31
45

Autólise de S. faecium e dos mutantes EC31 e EC78

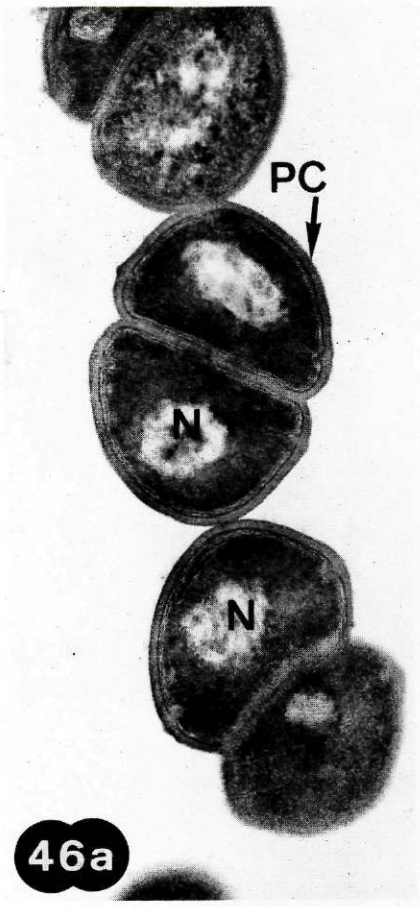
Condições experimentais	Estirpe	Tampão de incubação			
		Fosfato de sódio	Fosfato de sódio e potássio	Tris-HCl	
		0,3 M	0,4 M	0,05 M	0,1 M
Células não congeladas	WT	23	21	93	92
	EC31	94	ND	97	96
	EC78	ND	91	90	93
Células congeladas	WT	28	43	23	11
	EC31	92	ND	93	90
	EC78	ND	94	90	84

Tabela VIII. Células não congeladas ou congeladas * de culturas selvagens (WT) ou dos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) e incubadas nos tampões indicados (pH 6,8). A autólise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares. Os resultados indicados foram obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. ND - não determinado. * A congelação efectuou-se nos tampões usados posteriormente na incubação.

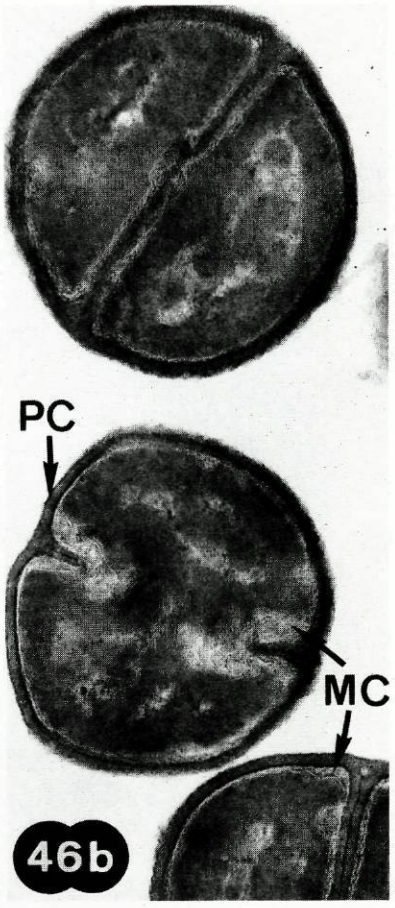
Fig. 46. Ultrastrutura de células dos mutantes EC31 (a) e EC78 (b) obtidas imediatamente após o congelamento-descongelamento em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas no tampão indicado. Notar a parede celular intacta (PC), a matriz citoplasmática com condensação do nucleóide (N), ausência de ribossomas e a membrana citoplasmática alterada (MC).
(a) 39 000 X; (b) 46 000 X.

Fig. 47. Ultrastrutura de células não congeladas da fase exponencial de crescimento dos mutantes EC31 (a) e EC78 (b) de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 ^{o}C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). Notar a ausência de degradação da parede celular (PC). (a) 44 400 X; (b) 43 200 X.

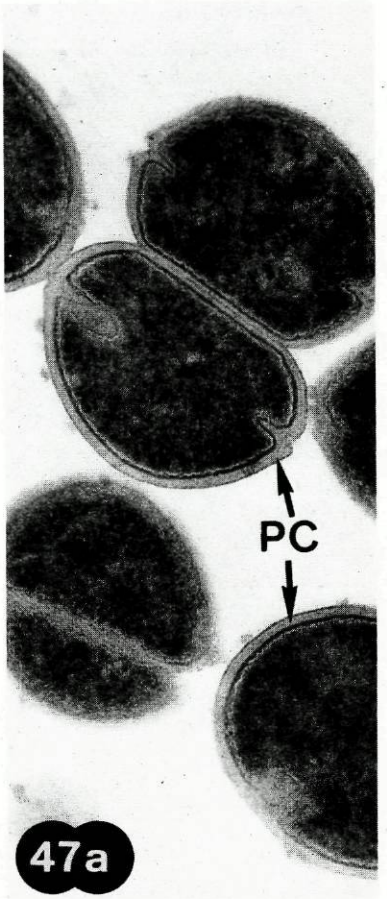
Fig. 48. Aspecto ultrastrutural de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 ^{o}C em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). As células da fase estacionária de crescimento foram congeladas no mesmo tampão antes da incubação. Notar a integridade da parede celular (PC). 54 600 X.



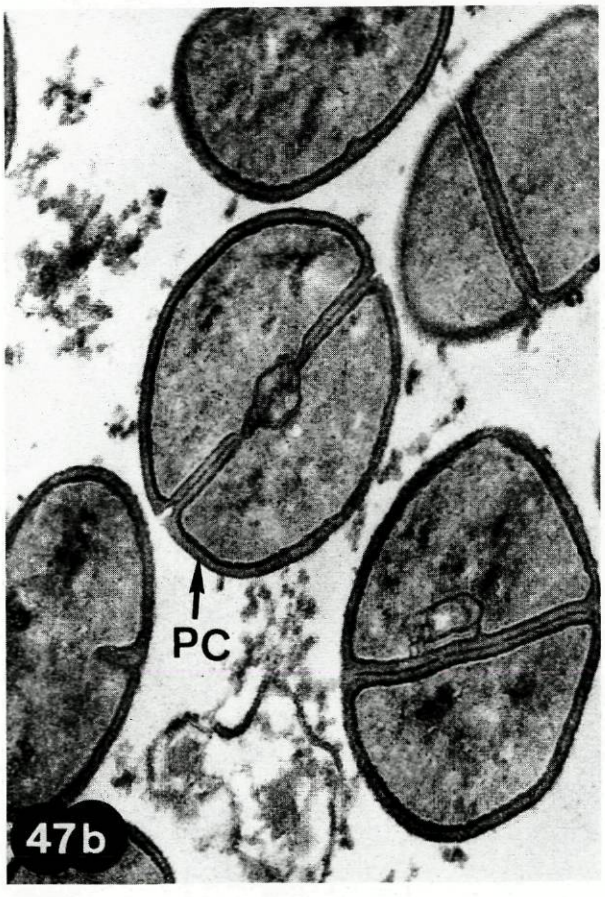
46a



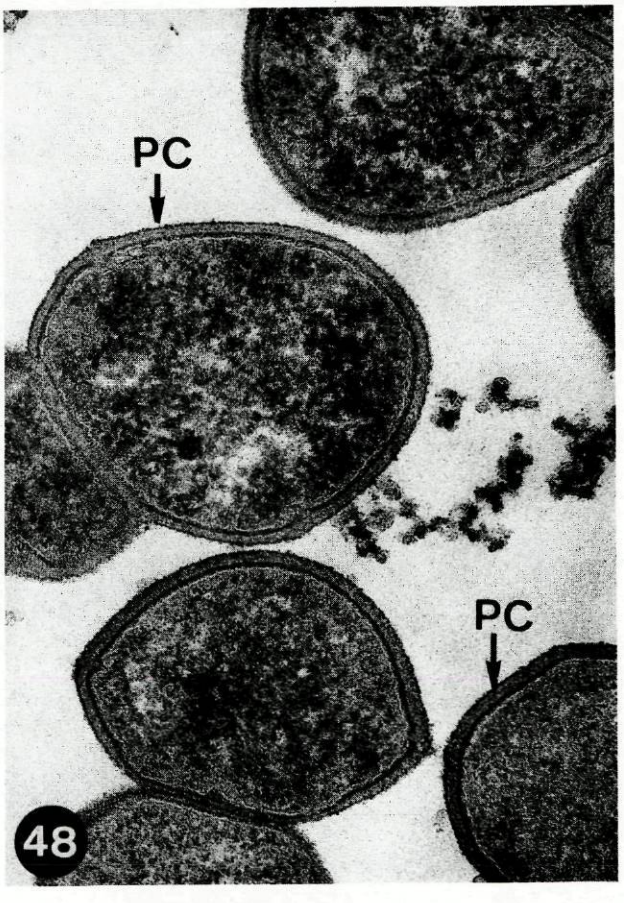
46b



47a



47b



48

1.2.6. Influência das condições de crescimento na autólise celular

Trabalhos anteriores mostraram que a presença de glucose no meio de crescimento de *S. faecium* provoca um decréscimo no pH da cultura (Gunsalus *et al.*, 1961; Santos Mota *et al.*, 1972) e que as membranas isoladas de culturas cultivadas na presença ou na ausência deste hidrato de carbono possuíam características diferentes (Santos Mota *et al.*, 1972).

No intuito de investigar se existiriam eventuais diferenças na autólise de *S. faecium* relacionadas com as condições de cultura, estudámos ainda este fenómeno em células cultivadas na ausência de glucose.

Contrariamente ao que se verificou com células cultivadas na presença de glucose ocorreu, nas culturas sem glucose, uma inibição no crescimento de *S. faecium* e o pH da cultura apresentou ao longo de três horas de incubação apenas uma ligeira descida em relação ao valor inicial (Fig. 49).

O estudo da autólise das células cultivadas no meio sem glucose foi realizado em tampões Tris-HCl e fosfato de sódio e potássio (pH 8,0), dado que parte do trabalho referente à lise induzida pela lisozima (Capítulo B) foi efectuado nestes tampões.

Após duas horas de incubação em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) as suspensões de células da fase exponencial, cultivadas na ausência de glucose e congeladas, revelaram uma diminuição respectivamente de 28 e 9 % em relação ao valor inicial da A520 das suspensões celulares - resultados idênticos aos observados com células cultivadas na presença de glucose (Tabelas II, pag. 58; Tabela III, pag. 76).

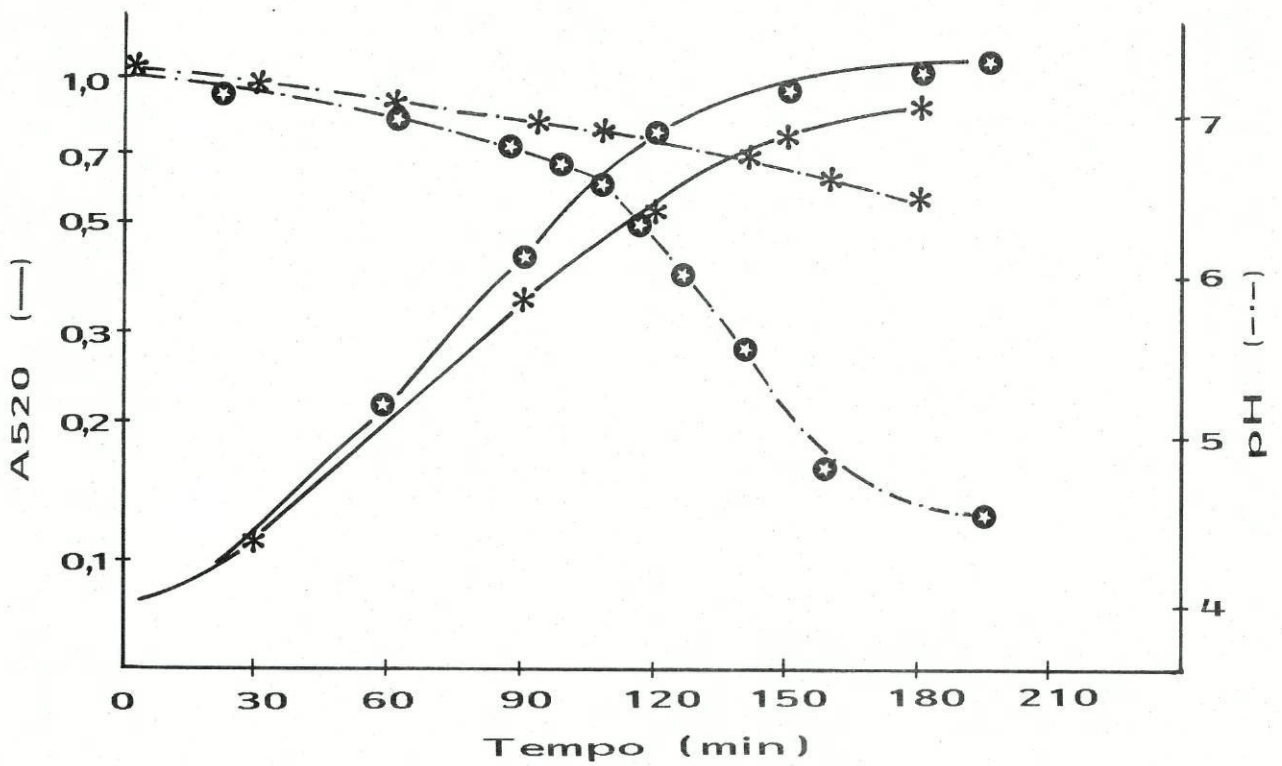


Fig. 49. Efeito da glucose no crescimento e no pH das culturas de *S. faecium* . O crescimento das culturas (—) foi efectuado em meio T com glucose (✪) ou sem glucose (*). O pH (-·-) foi determinado paralelamente ao longo da incubação.

2. Autólise de paredes celulares isoladas

Mostrámos anteriormente (secção 1.2.4.2.2.) que células de culturas CAM não autolisam quando incubadas nas condições que promovem uma extensa taxa de autólise das células de culturas WT. Idênticos resultados foram observados com os mutantes EC31 e EC78 (secção 1.2.4.3.2.) quando incubados nessas condições.

No intuito de uma melhor compreensão desses fenómenos e porque sabíamos que a autolisina E-1 de *S. faecium* tem grande afinidade para se ligar a paredes celulares isoladas (Shockman & Cheney, 1969; Joseph & Shockman, 1976) decidimos estudar a autólise de paredes celulares isoladas quer de células da estirpe selvagem, quer de células CAM, quer do mutante EC31 de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento, cultivados na presença de glucose. Além disso, era importante verificar a hipótese da autolisina E-1 poder estar presente nas células que não autolisaram uma vez que a ausência de autólise pode ser devida a um bloqueio existente apenas ao nível da expressão da actividade autolítica (Pooley & Shockman, 1970).

Paredes celulares isoladas quando suspensas (A450 = 0,200 - 0,210) e incubadas a 37 ^{o}C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 7,0) originaram diferentes taxas de autólise (Fig. 50). Essas taxas, quando expressas em unidades de actividade lítica - K (ver Materiais e Métodos) foram para as paredes isoladas de células das culturas WT, CAM e do mutante EC31, respectivamente de 0,92; 0,54 e 0,52. Na Fig. 51 pode observar-se a ultrastrutura de paredes isoladas de culturas CAM e de culturas WT, de *S. faecium*.

Nas experiências realizadas com paredes celulares isoladas de células de culturas WT, CAM e do mutante EC31, tratadas pelo SDS, não se observou autólise significativa; os valores de K encontrados para estas paredes foram respectivamente 0,34; 0,20 e 0,24.

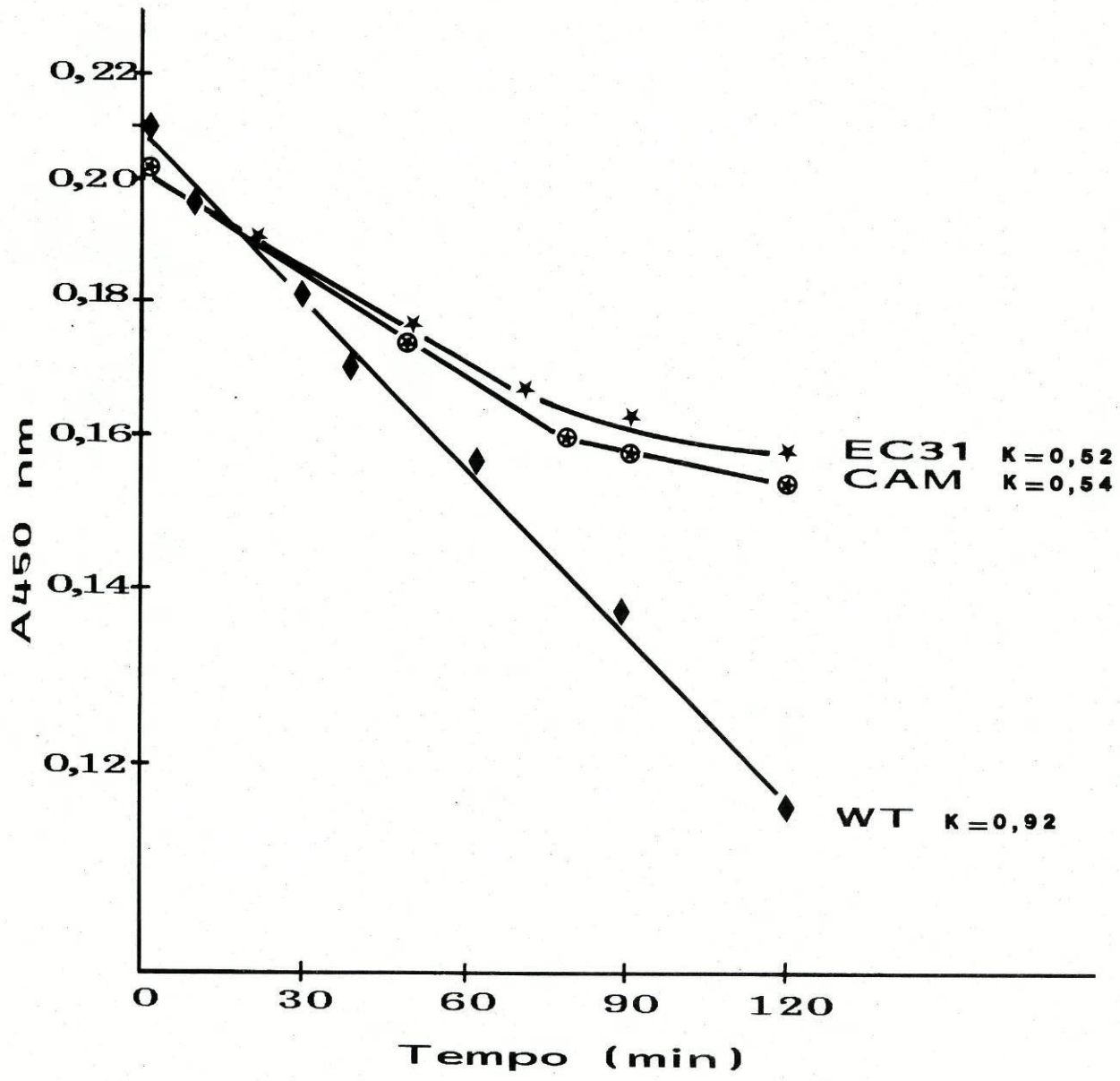
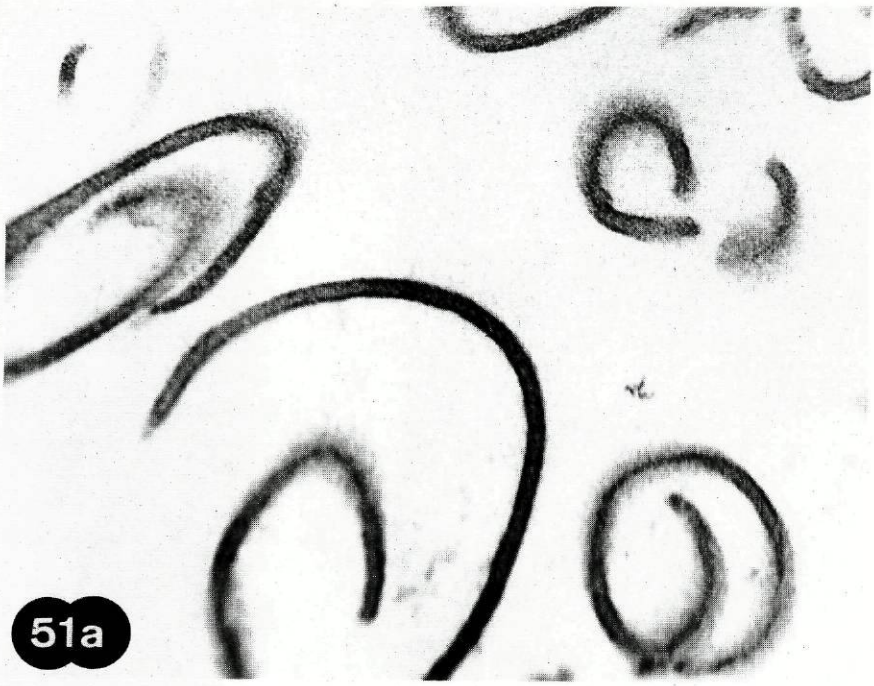


Fig. 50. Cinéticas da autólise de paredes celulares isoladas de culturas WT, CAM ou do mutante EC31 de *S. faecium* em tampão fosfato de sódio 0,1 M (pH 7,0). Símbolos: (♦) WT ; (⊛) CAM ; (✶) EC31; K= unidade de actividade lítica .

Fig. 51. Ultrastrutura de paredes celulares isoladas de culturas CAM (a) ou de culturas da estirpe selvagem (b) de *S. faecium* suspensas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 7,0). (a) 74 000 X; (b) 80 000 X.



51a



51b

3. Características das membranas isoladas após autólise em diversos tampões

O estudo das membranas isoladas foi realizado com células da fase exponencial de crescimento de*S. faecium* cultivado na presença de glucose.

A microscopia electrónica de membranas isoladas após autólise de bactérias congeladas e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 7,0) revelou uma estrutura bem definida tipo "unit membrane" (Fig. 52a), com perfil simétrico e com uma espessura de 6,25 ± 0,83 nm (Tabela IX, pag. 116).

Membranas isoladas após autólise de células congeladas e incubadas em Tris-HCl 0,05M (pH 7,0) revelaram um perfil simétrico do tipo "unit membrane", mas descontínuo (Fig. 52b) e com uma espessura de 5,68 ± 0,43 nm (Tabela IX).

Além disso, efectuou-se a determinação do conteúdo de proteínas das membranas isoladas nos dois tampões mencionados. Os resultados obtidos, a partir do mesmo número de bactérias congeladas, revelaram que as membranas isoladas após autólise em tampão Tris-HCl manifestam uma perda de 30 % do seu conteúdo proteico, quando comparado com os valores obtidos com membranas isoladas após autólise em tampão fosfato de sódio e potássio.

A análise electroforética em SDS-PAGE das proteínas das membranas isoladas após autólise quer no tampão fosfato, quer no Tris-HCl, revelou (Fig. 53) que as membranas isoladas neste último tampão, apresentavam um decréscimo no conteúdo de proteínas com pesos moleculares superiores a 30 000. Como evidencia a Fig. 54, os resultados obtidos com membranas isoladas em tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8) foram idênticos aos obtidos com tampão Tris-HCl.

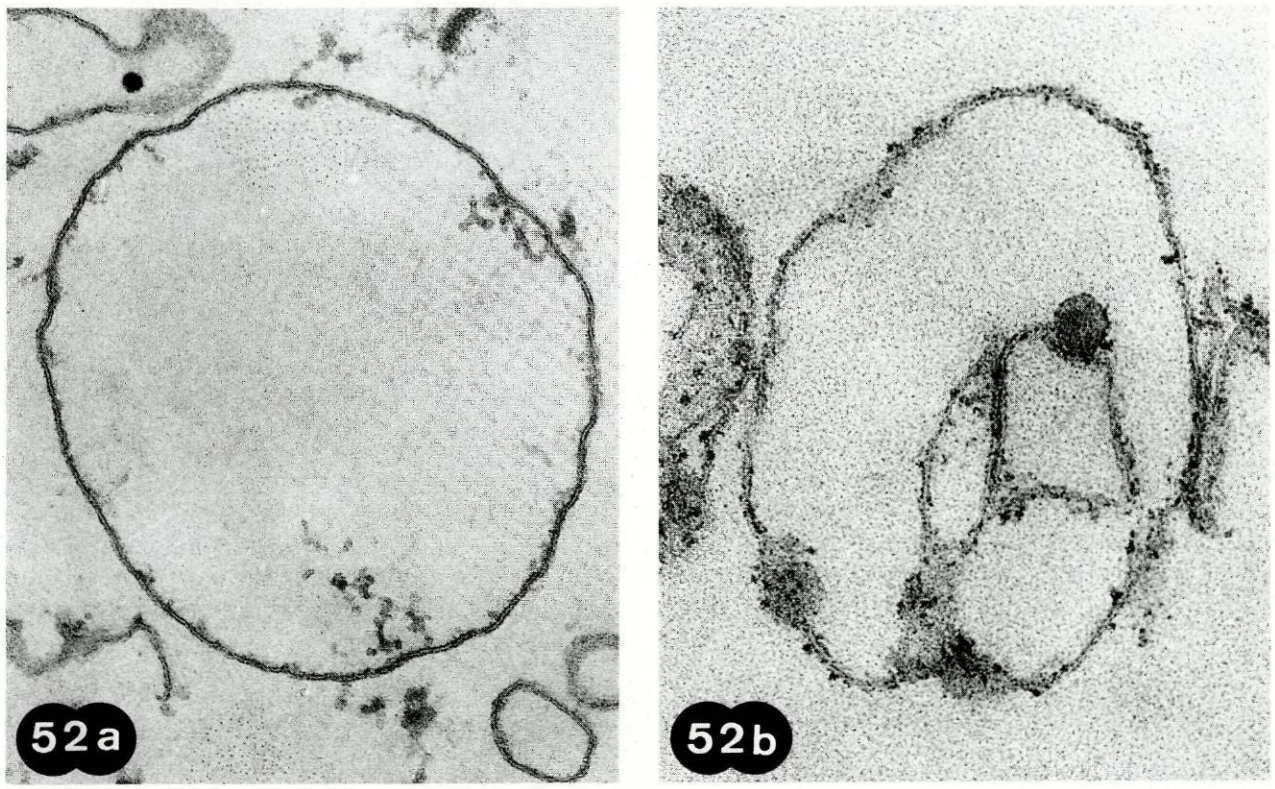


Fig. 52. Ultrastrutura de membranas isoladas de *S. faecium* . (a) Membranas isoladas após autólise em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 7,0) de células previamente congeladas no mesmo tampão. (b) Membranas isoladas após autólise em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0) de células congeladas no mesmo tampão. Notar a ultrastrutura pouco preservada das membranas isoladas em tampão Tris-HCl (b) em contraste com as membranas isoladas em tampão fosfato (a); notar ainda o perfil simétrico das membranas. (a) 64 000 X; (b) 64 000 X.

Influência das condições de isolamento na espessura das membranas de S. faecium

tampão de incubação	Lis (mg/ml)	Espessura (nm ± D.P.)	N.de determinações efectuadas
Fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0)	0,4	6.25 ±0,71	48
Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0)	0,05	7,11 ±1,23	16
Fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 7,0)	—	6,25 ± 0,54	40
Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0)	—	5.68 ±0,61	21

Tabela IX. As membranas foram isoladas após heterólise na presença de lisozima ou após autólise nos tampões indicados (para detalhes ver texto). A espessura das membranas (distância entre picos) foi determinada em negativos de microscopia electrónica.

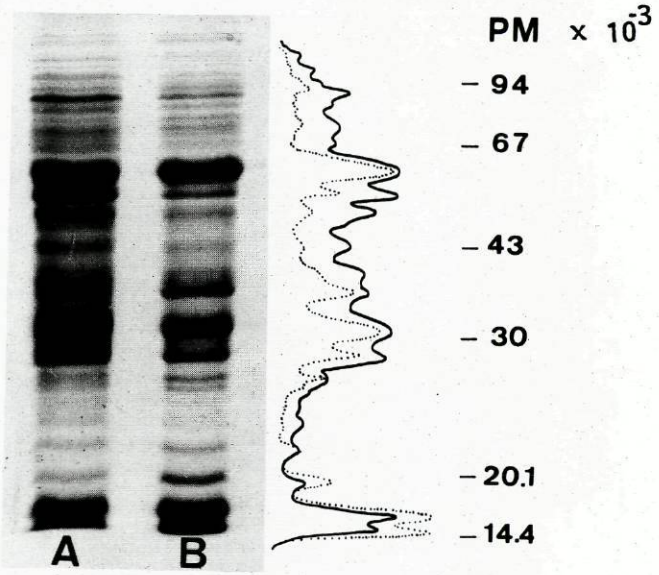


Fig. 53. SDS-PAGE de proteínas das membranas isoladas de *S. faecium* após autólise. (A) membranas de bactérias congeladas, descongeladas e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 7,0); (B) membranas de bactérias congeladas-descongeladas e incubadas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). Em (A) e (B) as amostras continham proteínas de membranas obtidas a partir do mesmo número de bactérias. Os traçados representam as bandas em A (—) e B (·····). Notar que a maior quantidade de proteínas das membranas isoladas após autólise em tampão fosfato, quando comparadas com as das membranas isoladas após autólise em tampão Tris-HCl, é devida principalmente à presença de proteínas com pesos moleculares superiores a 30 Kda.

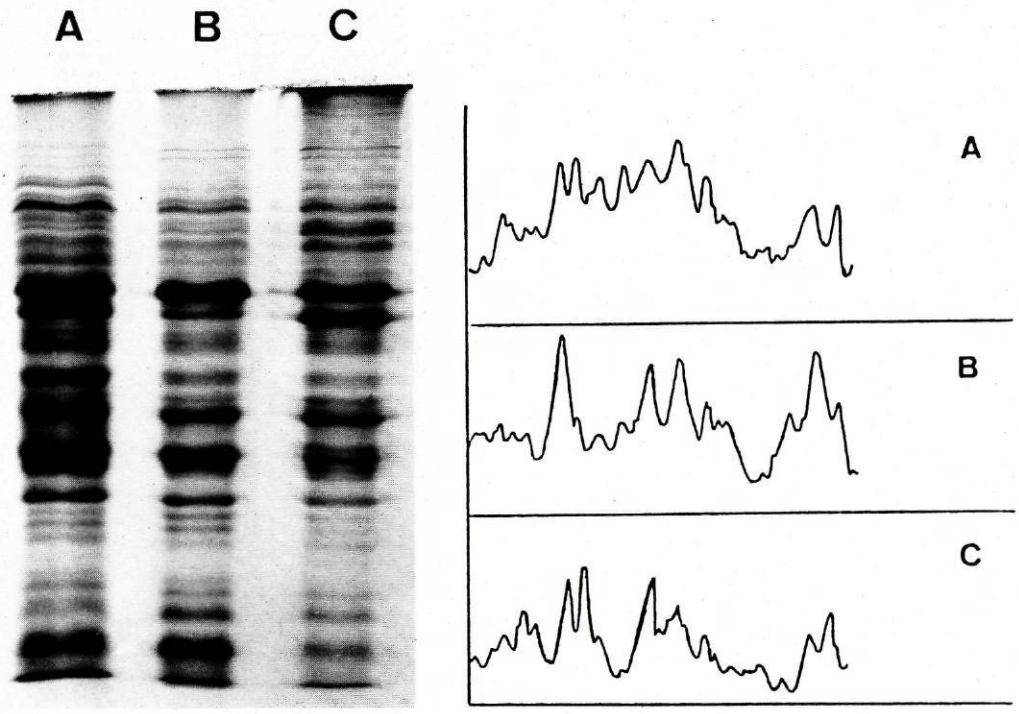


Fig. 54. SDS-PAGE de proteínas de membranas isoladas de *S. faecium* após autólise. (A) e (B) - conforme o descrito respectivamente em (A) e (B) na figura anterior; (C)- membranas de bactérias congeladas-descongeladas e incubadas em tampão Imidazol-HCl 0,05 M (pH 6,8). As amostras A, B e C continham proteinas obtidas a partir do mesmo número de células. Notar que é menor a quantidade de proteinas em (B) e (C) do que em (A).

4. DISCUSSÃO

Neste capítulo apresentámos resultados que evidenciam que o controlo da actividade autolítica de *S. faecium* pode ser quebrado por processos "in vitro".

Os resultados de espectrofotometria e de microscopia electrónica mostraram duas situações nas quais se observou uma extensa actividade autolítica de*S. faecium* :

i) autólise celular induzida pelo congelamento prévio das suspensões celulares em tampões Tris-HCl ou Imidazol-HCl - uma situação que não estava descrita na literatura;

ii) autólise celular observada com células não congeladas em tampões fosfato - uma situação já referida pelo grupo de Shockman, embora em condições diferentes das que utilizámos.

A participação do sistema autolítico de *S. faecium* nos casos de bacteriólise acima mencionados foi inferida dos seguintes dados:

a) Os mutantes (EC31 e EC78) que isolámos de *S. faecium* mostraram uma capacidade muito reduzida de autólise naquelas duas situações.

b) A exposição de culturas de *S. faecium* aos inibidores da síntese proteica (CAM ou TC) impediu a autólise observada naquelas duas situações.

c) A presença de NBS no tampão de incubação (Tris-HCl) resultou na completa inibição da bacteriólise extensa de células previamente congeladas-descongeladas e incubadas neste tampão.

O mutante EC31 apresenta uma taxa de autólise celular inferior à observada com as respectivas paredes isoladas. Para que a degradação celular seja visualizada através da espectrofotometria, basta que na parede ocorra apenas a hidrólise de um número limitado de ligações no peptidoglicano. Pelo contrário, para que a autólise das paredes celulares isoladas possa ser visualizada através daquele método, é necessária a hidrólise de muitas dessas ligações. Apesar disso, o mutante EC31 apresenta uma taxa mais elevada de autólise das paredes celulares isoladas do que as

respectivas células completas.

A taxa de autólise deste mutante, quando comparada com a da estirpe selvagem, é muito reduzida; de igual modo, a taxa de autólise das paredes isoladas é menor que a das paredes isoladas daquela estirpe; o seu valor revela que este mutante é deficiente na actividade autolítica, mas não é completamente desprovido dessa actividade.

As diferenças relativas observadas nas taxas de autólise de paredes isoladas deste mutante e nas da estirpe selvagem são menores que as observadas nas respectivas células completas, o que indica que este mutante além da deficiência de uma ou das duas enzimas do sistema autolítico, deve possuir um bloqueio ao nível da regulação ou do transporte dessas enzimas.

É possível que os fenótipos dos mutantes EC31 e EC78 resultem de várias mutações. A menor expressão da actividade autolítica pode ser o reflexo de uma menor produção da autolisina E-1, que por sua vez originaria paredes mais espessas (Pooley *et al* ., 1972), e da menor produção da hidrolase E-2 mas, pode também reflectir uma deficiência na regulação ou no transporte de uma, de outra ou das duas enzimas ou reflectir ainda a falta de uma delas, por exemplo da E-2. A maior espessura das paredes dos mutantes EC31 e EC78 em relação à estirpe selvagem, originada pela deficiência na autolisina E-1, pode também explicar, em parte, a menor taxa de autólise quer das paredes isoladas, quer das células destes mutantes, dado que, para que nestes possam ser observadas taxas semelhantes às da estirpe selvagem, é necessária a hidrólise de um maior número de ligações β (1→4) no peptidoglicano.

Além disso, é provável que estes mutantes possuam paredes com uma composisão química alterada que pode, por si só, contribuir para a menor taxa de autólise observada, dado que se verificou que as reduzidas taxas de autólise apresentadas por mutantes isolados de outras bactérias eram devidas aos efeitos combinados da baixa actividade das enzimas do sistema autolítico e da composição química das suas paredes (Forsberg & Rogers,1974).

Estas considerações, aliadas ao facto de não termos analisado a composição química das paredes nem quantificado as enzimas E-1 e E-2 destes mutantes, indicam a

necessidade de futuros trabalhos bioquímicos para esclarecer estas questões. Além disso, para esclarecer se a taxa de autólise das células é devida a uma deficiência na regulação ou no transporte destas enzimas, será necessário realizar também estudos genéticos.

Os valores das taxas de autólise das paredes celulares isoladas e tratadas com o SDS (menores que os observados com as paredes não tratadas) são esperados, dado que a ligação deste detergente aniónico às proteínas origina a desnaturação destas, a perda da actividade enzimática (Nelson, 1971; Ne'eman *et al.*, 1971; Jones *et al.*, 1973; Helenius & Simons, 1975) e a libertação de pelo menos algumas proteínas não ligadas covalentemente à parede celular (Amano & Williams, 1984; Umeda *et al.*, 1987). As taxas observadas mostram que a autolisina E-1 de *S. faecium*, não covalentemente ligada à parede (Pooley *et al* ., 1970; Shockman & Cheney, 1969), e/ou a hidrolase E-2 não foram, nas nossas condições experimentais, totalmente removidas, ou pelo menos inactivadas, por este detergente. Adicionalmente, a hipótese recentemente levantada por Umeda *et al* . (1987) de que o SDS altera a configuração dos ácidos teicóicos da parede, embora necessite de mais dados experimentais, não deve ser desprezada, dado que os polímeros acessórios da parede celular - ácidos teicóicos e teicurónicos - desempenham um papel importante quer na ligação de pelo menos alguma autolisina às respectivas paredes celulares, quer no controlo da hidrólise do peptidoglicano por estas enzimas ligadas à parede (Herbold & Glaser 1975; Ghuysen, 1977; Robson & Baddiley, 1977; Beveridge, 1981). Parece-nos pois de admitir que uma possível alteração originada pelo SDS na configuração dos ácidos teicóicos da parede possa dificultar a hidrólise das ligações ß (1—>4) do peptidoglicano quer pela autolisina E-1, quer pela hidolase E-2 de *S. faecium* .

O crescimento em cadeia do mutante EC31 poderá ser devido a deficiências nas próprias enzimas E-1 ou E-2 ou à diferente composição química das suas paredes. Admitindo a primeira das hipóteses, parece que a hidrolase E-2, pelo facto de ser uma proteína que se encontra numa forma activa no meio em que se cultiva a estrirpe selvagem (Shockman *et al.*, 1987, em publicação) parece ser a enzima provavelmente implicada na separação celular; a presença nesse meio da forma

desnaturada da autolisina E-1 (Shockman *et al.*, 1987, em publicação) faz com que esta enzima seja uma pior candidata responsável pelo fenómeno em questão. Mutantes deficientes na actividade autolítica isolados de *S. faecalis* (Pooley *et al .*, 1972; Shungu *et al .*, 1979) e de outras espécies de bactérias , nomeadamente *S. aureus* (Chatterjee *et al .*, 1976) e *B. subtilis* (Fein & Rogers, 1976) mostraram também um crescimento em cadeia.

O facto do mutante EC78 crescer a uma taxa semelhante à observada com a estirpe selvagem, não obstante apresentar uma taxa de autólise muito reduzida em relação a esta estirpe, parece mostrar que apenas parte da actividade das enzimas do sistema autolítico ou parte da actividade de uma delas é necessária para o crescimento celular.

A exposição de *S. faecium* ao CAM origina a condensação do nucleóide e a desorganização parcial dos ribossomas - resultados concordantes com os obtidos por outros autores (Kellenberger *et al.*, 1958; Murray, 1960; Franklin & Granboulan 1966; Morgan *et al.*, 1967; Daneo-Moore & Higgins, 1972). O congelamento e descongelamento das culturas CAM em tampões Tris-HCl originou elevados efluxos de K^+ intracelular e alterações ultrastruturais importantes - não só se acentuou a condensação do nucleóide como também os ribossomas (já parcialmente desorganizados nas células de culturas) deixaram de ser visíveis. Este último facto poderá possivelmente ser explicado pela elevada perda de materiais intracelulares, nomeadamente o K^+ que, de acordo com Sykes (1971), juntamente com o Mg^{2+}, é essencial para a manutenção da integridade ribossómica.

Enquanto que as células expostas à acção do CAM apresentam, nas nossas condições experimentais, uma reduzida taxa de autólise, as paredes celulares isoladas dessas células apresentam uma redução menor dessa taxa em relação às taxas de autólise das paredes celulares isoladas da estirpe selvagem.

É possível que *S. faecium* quando cultivado na presença de CAM possua paredes celulares alteradas dado que Johannsen *et al.* (1983) e Reinicke *et al.* (1983) mostraram com outras bactérias que a restrição da síntese proteica induzida pelo CAM provoca alterações nas paredes celulares, aumentando nomeadamente o número de grupos O-acetil.

Por outro lado, as enzimas do sistema autolítico são sintetizadas nos ribossomas e provavelmente deixarão de formar-se durante a exposição das células àquele antibiótico. A explicação da elevada inibição da autólise das células expostas a este agente bacteriostático através deste facto, implicaria que aquelas enzimas tivessem uma semi-vida curta; contudo, pelo menos a autolisina E-1 de *S. faecium* possui uma longa semi-vida - vários tempos de geração (Pooley & Shockman, 1970). Além disso, as células das culturas CAM possuem paredes mais espessas e tal facto poderá ser o reflexo da reduzida actividade da autolisina E-1 o que deverá também contribuir para a reduzida taxa de autólise.

Tendo presentes estas considerações, os nossos resultados indicam (como explicámos anteriormente a propósito do mutante EC31) que a reduzida taxa de autólise de células cultivadas na presença de CAM poderá ser devida essencialmente a :

a) um bloqueio ao nível do transporte ou da regulação das enzimas do sistema autolítico, dado que as paredes celulares isoladas - que contêm autolisina E-1 e a muramidase E-2 (Shockman & Cheney, 1969; Shockman *et al* ., 1987, em publicação) - apresentam taxas de autólise menos reduzidas que as células intactas e/ou b) a uma provável modificação da parede celular - substrato sobre o qual actuam as enzimas do sistema autolítico; esta modificação, a ocorrer, deve também ser responsável pela taxa de autólise observada com as paredes isoladas destas células.

Os nossos resultados, embora realizados em diferentes condições experimentais, são concordantes com os de Pooley & Shockman (1970) e os de Sayare *et al* . (1972), na medida em que estes autores encontraram em mutantes deficientes na actividade autolítica taxas de autólise celular inferiores às das respectivas paredes celulares isoladas.

As células de *S. faecium* expostas à acção da TC apresentam uma reduzida taxa de autólise (semelhante à que se observa com as células expostas ao CAM) em relação à taxa das células da estirpe selvagem. O facto de não termos isolado as paredes celulares dessas células impede-nos de discutir com mais pormenor este caso, embora sejam de esperar resultados idênticos aos obtidos com o CAM, dado que

estes dois antibióticos, cloranfenicol e tetraciclina, possuem um mecanismo de acção semelhante.

Tinha sido mostrado anteriormente que a NBS provoca a inactivação química das proteínas por reacção com os aminoácidos tirosina, triptofano e histidina (Ramachandran & Witkop, 1967) e é capaz de provocar inibição da actividade autolítica de *S. faecium* (Cornett & Shockman, 1978). Os nossos resultados foram concordantes com os daqueles autores e mostraram, através da microscopia electrónica, que este composto, como era de esperar, actua nesta bactéria não só a nível das enzimas do sistema autolítico impedindo a degradação da parede celular, mas também a nível das proteínas em geral, dadas as alterações observadas no citoplasma. Deste modo, o uso deste composto nos estudos de fenómenos da autólise e, como veremos no Capítulo B de lise induzida pela lisozima, requer a análise ultrastrutural para uma interpretação correcta de resultados. Idênticas alterações ultrastruturais foram observadas em *Pseudomonas fluorescens* na presença da NBS (Parente & Silva,1981; Parente, 1984).

Os resultados apresentados neste capítulo mostram que a expressão da actividade autolítica em *S. faecium* ocorre em tampões Tris-HCl apenas quando as células são neles previamente congeladas-descongeladas antes da incubação e que, nestas condições, é mais extensa a pH 6,8 do que a pH 8,0. Este último dado é explicado pelo facto da actividade das enzimas do sistema autolítico ser maior a pH 6,8 (Shockman *et al.*, 1967a; Sayare *et al.*, 1972). Bactérias não congeladas quando incubadas nos tampões Tris-HCl não perdem o controlo do sistema autolítico, isto é, não autolisam. O congelamento-descongelamento das bactérias de modo mais lento (passando por 4 ^{o}C, - 20 ^{o}C e - 70 ^{o}C) não altera os resultados obtidos indicando dentro de certos limites, a não influência nas taxas de autólise, do modo como é efectuada a congelação.

O congelamento-descongelamento de *S. faecium* em tampões Tris-HCl provocou grandes alteracões na permeabilidade da membrana citoplasmática, conforme se deduz dos elevados efluxos de K^{+} intracelular e de materiais que absorvem em UV,

e alterações ultrastruturais na matriz citoplasmática incluindo a ausência de ribossomas. O elevado efluxo de K^+ intracelular, observado após o descongelamento nestes tampões, pode ser responsável pela desintegração dos ribossomas (Sykes, 1971). A alteração do perfil normal assimétrico para simétrico só se verifica quando o sistema autolítico endógeno tem expressão. As células que autolisaram apresentam invariavelmente um perfil simétrico de membrana provavelmente devido à perda dos anfifilos do folheto externo, dado que foi mostrado por Silva (1984) que, bactérias de Gram-positivo sujeitas a situações (diferentes das aqui referidas) que provocam lesões na membrana citoplasmática apresentam sempre um perfil simétrico. Porque nesta bactéria o anfifílo de superficie é o ácido lipoteicóico (Shockman & Slade, 1964) parece-nos que, a autólise induzida pelo congelamento-descongelamento e incubação em tampões Tris-HCl poderia ser explicada pela alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática (sem perda do ácido lipoteicóico), ocorrida durante o congelamento-descongelamento, posterior libertação deste ácido e consequente (ou simultâneo), descontrolo do sistema autolítico endógeno, verificado durante a incubação. A presença do ácido lipoteicóico no tampão usado na formação de autoplastos de *S. faecium* (Joseph & Shockman, 1975) apoia a ideia atrás expressa.

O congelamento de *S. faecium* em tampões Tris-HCl revelou ser um processo capaz de activar o sistema autolítico endógeno e de permitir a obtenção rápida de membranas isoladas, livres de enzimas estranhas (como por exemplo a lisozima de que falaremos no Capítulo B), mas alteradas, dado que possuem uma ultrastrutura pouco preservada, são mais finas e apresentam um decréscimo de 30 % no conteúdo proteico; estas características indicam que este tampão não deve ser utilizado no isolamento de membranas desta bactéria.

A activação do sistema autolítico de *S. faecium* parece ser um processo posterior à alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática originada pelo congelamento-descongelamento em tampões Tris-HCl ou Imidazol-HCl. Apesar das alterações de permeabilidade constituirem provavelmente um factor importante no mecanismo em discussão, o facto de ocorrerem alterações de permeabilidade da

membrana citoplasmática sem a activação das enzimas do sistema autolítico é uma questão não esclarecida - o congelamento-descongelamento em tampão Imidazol-HCl 0,4 M conduz à perda total do K^+ intracelular, mas não aumenta a taxa de autólise celular.

Estudos anteriores mostraram que o tampão Tris-HCl não é fisiologicamente inerte (Voss, 1967); este composto aumenta a permeabilidade da membrana exterior de *E. coli* através da ruptura de interaçcões iónicas (Shcindler & Teuber, 1978; Irvin *et al.*, 1981) e altera a permeabilidade das membranas do retículo sarcoplásmico (Alonso *et. al .*, 1979).

Os nossos resultados mostraram ainda que a autólise de *S. faecium* é também induzida pelo Imidazol-HCl (embora numa extensão menor que em Tris-HCl) apenas quando usado no congelamento e que este tratamento prévio induz alterações ultrastruturais no conteúdo celular e na membrana citoplasmática - efluxos elevados de K^+ e de materiais intracelulares que absorvem em UV.

A comparação dos resultados obtidos em Tris-HCl e em Imidazol-HCl indica que os efeitos descritos para o tampão Tris-HCl não são específicos dessa molécula, mas dependem sobretudo das características fisíco-químicas comuns ao Tris-HCl e ao Imidazol-HCl, como foi sugerido por Alonso *et al.* (1979). Contudo, em contraste com os resultados dos trabalhos acima citados, o nosso estudo mostrou que as alterações celulares que originaram uma extensa expressão da actividade autolítica endógena apenas ocorreram quando as bactérias foram expostas àquelas moléculas durante o congelamento-descongelamento.

Jolliffe & Doyle (1981) mostraram que a autólise de *B. subtilis* pode ser induzida por tratamentos que alteram os gradientes quer eléctrico, quer de pH das membranas celulares e consideraram que esse mecanismo pode ser aplicável a outras bactérias, inclusivé a *S. faecium*. É possível que o congelamento em tampões Tris-HCl ou em Imidazol-HCl desencadeie a actividade autolítica desta bactéria através desse mecanismo.

Porém, na indução da autólise através de congelamento, descongelamento e incubação nos tampões Tris-HCl e Imidazol-HCl podem estar envolvidas alterações

na parede celular (aparentemente intacta após o descongelamento) que poderiam originar a acção descontrolada das enzimas do sistema autolítico endógeno de *S. faecium* facilitando, por exemplo, a libertação do ácido lipoteicóico ou alteração na própria autolisina E-1, por exemplo, através da activação da sua forma latente.

Em contraste com os tampões Tris-HCl e Imidazol-HCl, os tampões fosfato (de sódio ou de sódio e potássio) promovem, em condições apropriadas, a autólise de células não congeladas, resultados concordantes com os realizados com esta bactéria por Shockman *et al* . (1961) e por Shungu *et al* . (1979). Contudo, as nossas condições experimentais e as utilizadas por aqueles autores são diferentes, pelo que se torna difícil a comparação dos resultados. O congelamento e descongelamento das células em tampões fosfato (com molaridades superiores a 0,25 M) ou no próprio meio de cultura não provoca alterações ultrastruturais significativas, não aumenta as taxas de autólise das células não congeladas e os efluxos quer de K^+, quer de materiais que absorvem em UV, são inferiores aos observados nos tampões Tris-HCl e Imidazol-HCl.

A razão de termos obtido idênticas taxas de autólise em tampão fosfato com células das fases exponencial e estacionária deve-se provavelmente ao facto das experiências terem sido realizadas com células do início desta última fase. Por outro lado, a expressão da actividade autolítica de *S. faecium* é pouco significativa nas condições em que estes estudos comparativos foram efectuados - pH 8,0. Contudo, mesmo a este pH, as células da fase exponencial quando congeladas e incubadas em tampões Tris-HCl apresentam taxas de autólise superiores às da fase estacionária. Tal facto poderá ser devido a uma maior susceptibilidade de alteração da membrana citoplasmática das células metabolicamente mais activas (da fase exponencial), o que por sua vez origina o descontrolo da actividade das enzimas do sistema autolítico.

Shockman *et al.* (1961) e Shockman (1967a) mostraram que a falta de glucose no meio de cultura inibe a síntese do peptidoglicano. Porém, dado que o estudo da autólise das células da fase exponencial de *S. faecium* cultivado na ausência de

glucose foi realizado unicamente por espectrofotometria, não obtivemos diferenças nas taxas de autólise destas células e nas das células cultivadas na presença de glucose; contudo, estes resultados não significam que a falta deste hidrato de carbono no meio de crescimento não tenha provocado alteracões celulares. Adicionalmente, o facto destas experiências terem sido realizadas a pH 8,0 constitui também um factor desfavorável para o estudo em questão. A ausência do estudo ultrastrutural das células cultivadas na ausência de glucose impede-nos de discutir com mais pormenor a influência da falta deste hidrato de carbono no meio de cultura na autólise de *S. faecium*.

Contudo, a análise electroforética em SDS-PAGE das proteínas de membranas isoladas após heterólise com lisozima de células cultivadas na ausência de glucose (Fig. 96) revela um perfil proteico diferente do obtido, nas mesmas condições, de membranas de células cultivadas na presença daquele hidrato de carbono. Adicionalmente, o estudo da heterólise induzida pela lisozima, que realizámos em diferentes condições com células cultivadas na ausência deste hidrato de carbono (e que discutiremos na secção 4. do Capítulo B), apoiam a ideia de que a ausência de glucose no meio de cultura deve provocar, para além das diferenças de perfis proteico (Fig. 96) e fosfolipídico das membranas observado por Santos Mota *et al*. (1972), outras alterações ultrastruturais nas células.

O efeito inibitório dos catiões divalentes na expressão da actividade autolítica tinha sido observado em bactérias de Gram-negativo (Rayman & Macleod, 1975; Leduc & Van Heijenoort, 1980; Leduc *et al*., 1982; Parente & Silva, 1984 ; Parente, 1984) e de Gam-positivo (Poiares & Silva, trabalho com *B. subtilis* não publicado). Os nossos resultados foram concordantes com os apresentados por aqueles autores e mostraram que a adição de Mg^{2+} ao tampão Tris-HCl conferiu alguma estabilização à membrana citoplasmática, inibiu a autólise de *S. faecium*, mas não evitou o elevado efluxo de K^{+} intracelular. Lindsay & Glaser (1976) mostraram que o Mg^{2+}estimulava a actividade autolítica em *B. subtilis*, o que não nos parece provável que ocorra no nosso modelo experimental.

A possibilidade de que a RNase, dada a sua natureza catiónica, pudesse activar o

sistema autolítico de *S. faecium* como foi descrito em *S. aureus* (Wecke *et al* ., 1982) é regeitada, dado que os nossos resultados demonstram que a presença da RNase, mesmo em concentrações elevadas (0,5 mg/ml), não induz a actividade das enzimas do sistema autolítico.

Pelo contrário, verificou-se uma acentuada estimulação da actividade autolítica endógena de *S. faecium* quando esta bactéria foi previamente congelada e incubada na presença da DNase; contudo, a estimulação da actividade autolítica não se deve à acção directa da DNase sobre a autolisina E-1 de *S. faecium*, mas sim à activação desta por enzimas proteolíticas contaminantes da própria DNase. Trabalhos anteriores mostraram que a autolisina de *S. faecium* é activável por uma variedade de proteinases (Shockman *et al* ., 1967a; Shockman & Cheney, 1969; Cornett *et al* ., 1979). A descida acentuada A520 das suspensões de células da fase exponencial de crescimento congeladas e incubadas em tampão Tris-HCl na presença de DNase deve-se possivelmente a 2 factores cumulativos, que provavelmente ocorrem pela seguinte ordem:

a) agressão da membrana citoplasmática provocada pelo congelamento-descongelamento em tampão Tris-HCl;

b) activação da forma latente da autolisina E-1 pelas enzimas proteolíticas contaminantes da DNase.

Tais conclusões foram inferidas das observações de que a DNase não teve efeito em células não congeladas ou previamente congeladas em tampão fosfato e que a adição do PMSF, inibidor da actividade proteolítica, reduziu drasticamente a descida da A520 das suspensões celulares.

CAPÍTULO B

LISE DE *S. FAECIUM* INDUZIDA PELA LISOZIMA

1. Lise celular

O estudo da influência de diferentes parâmetros na lise de *S. faecium* induzida pela lisozima em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio pH 8,0 e nalguns casos pH 7,0 foi baseado, em parte, nas condições de Konings *et al*. (1973) utilizadas na lise de *B. subtilis*. Ainda com o mesmo objectivo, estudámos o efeito desta enzima muralítica em células possuidoras de um sistema autolítico deficiente, os mutantes EC31 e EC78.

1.1. Efeito do congelamento prévio das suspensões celulares

Em todas as experiências realizadas com células não congeladas ou congeladas, das fases exponencial ou estacionária de crescimento cultivadas na presença de glucose, não foram encontradas diferenças significativas nas taxas de lise induzida pela lisozima. Deste modo, os resultados apresentados serão os obtidos com células congeladas, a não ser quando explicitamente se indique a inexistência de congelação.

1.2. Influência do tampão de incubação

Nesta secção, apresentaremos apenas os resultados obtidos com células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento cultivadas na presença de glucose.

1.2.1. Tampão fosfato

Células de *S. faecium* da fase exponencial (A520 = 0,5-0,6) não congeladas ou previamente congeladas e incubadas durante 120 min a 37 ^{o}C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com lisozima (0,4 mg/ml) não apresentaram decréscimo da A520 das suspensões celulares (Tabela X, pag. 135).

Contudo, a espectrofotometria não revela as alterações morfológicas ocorridas

nas células ao longo da incubação e o estudo ultrastrutural que realizámos mostrou que, neste caso, não existe correlação entre o grau de degradação da parede celular (Figs. 55a, 55c,55d) e o de bacteriólise (Tabela X; Fig. 59).

Amostras previamente congeladas revelaram que, após 10 min de incubação (Fig. 55a), a degradação da parede celular já se havia iniciado e que, na matriz citoplasmática tinham ocorrido alterações - condensação do nucleóide no centro da célula, material mais electronodenso disposto à periferia e ausência de ribossomas visíveis. Estas amostras apresentaram ainda blocos de lisozima, precipitada pelo fixador aldeído (comparar Fig. 55a com Fig. 55b). Aos 15 min de incubação (Fig. 55c), em alguns locais, a membrana citoplasmática apresentava já um perfil simétrico, enquanto que noutros mantinha o perfil normal assimétrico. Passados mais 15 min de incubação (Fig. 55d), a parede encontrava-se bastante degradada, a membrana citoplasmática mostrava um perfil simétrico generalizado e, na matriz citoplasmática, o material mais electronodenso apresentava-se mais condensado. Após duas horas de incubação (Fig. 55e), embora a degradação da parede das células estivesse completa e se tivesse perdido a sua forma, continuaram visíveis blocos de materiais com diferentes densidades electrónicas: na periferia, os materiais mais electronodensos (condensados) e na zona central da célula, materiais com baixa densidade electrónica onde são visíveis fibrilas de DNA. A presença dos materiais com elevada densidade aos electrões ao longo de todo o processo de incubação deve-se possivelmente à formação de um complexo formado pela lisozima e os grupos acídicos da célula e justifica a não descida dos valores iniciais da A520 (Tabela X).

A presença da DNase (0,01 mg/ml) e do Mg^{2+} (10 mM) no tampão de incubação contendo lisozima (0,4 mg/ml) provocou uma pequena clarificação das suspensões celulares (Tabela X) e o estudo ultrastrutural correspondente (Fig. 56) mostrou-se concordante com os dados espectrofotométricos obtidos - na matriz citoplasmática as fibrilas de DNA não são visíveis e os blocos de material electronodenso são menos compactos que os observados na presença exclusiva da lisozima (Fig. 55e).

No intuito de verificar a hipótese da descida observada ser motivada pela

presença de enzimas proteolíticas contaminantes da DNase, estudámos nesta situação, o efeito do PMSF. Os resultados obtidos na presença deste inibidor da actividade proteolítica foram semelhantes aos observados na sua ausência (Tabela X).

Um efeito estimulatório da lise celular ocorrida na presença da lisozima foi observado neste tampão na presença da RNase (0,01 mg/ml) (Tabela X). Amostras obtidas após 30 min de incubação apresentaram uma descida de 53% do valor inicial da A520 das suspensões celulares e revelaram a degradação parcial da parede celular com perda da forma da célula (Fig. 57a). Após duas horas de incubação, verificou-se uma descida de 77% do valor inicial da A520, tendo as microfotografias revelado a presença de numerosas vesículas contendo, apenas em alguns casos, material electronodenso (Fig. 57b).

A bacteriólise mais extensa foi registada quando as células foram expostas à acção conjunta da lisozima, da RNase, da DNase e do Mg^{2+} (Tabela X). Após duas horas de incubação eram visíveis, quase exclusivamente, vesículas de membrana (Fig. 58). Também neste caso, na presença do PMSF não se registaram diferenças significativas na A520 obtida, dado que após duas horas de incubação obtiveram-se, com células não congeladas ou previamente congeladas, valores respectivamente de 19 e 11% em relação ao seu valor inicial.

Uma lise significativa ocorreu também, quando células não congeladas incubadas durante 60 ou 90 min em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M na presença de lisozima (0,4 mg/ml) foram expostas à acção da RNase (0,01 mg/ml), da DNase (0,01 mg/ml) e de 10 mM de Mg^{2+} (Fig. 59).

Sempre que se incubou esta bactéria na presença de lisozima e de $MgSO_4$ observou-se a desorganização celular, a degradação total da parede celular, a presença de materiais electronodensos e de membranas com perfil simétrico (não mostrado) - fenómeno idêntico ao ocorrido na presença exclusiva daquela muralisina (Fig. 55e).

A incubação de *S. faecium* em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M

contendo lisozima (0,4 mg/ml), $MgSO_4$ (10mM) e sacarose (0,5 M) originou protoplastos possuidores de uma membrana citoplasmática com perfil normal assimétrico (Fig. 60).

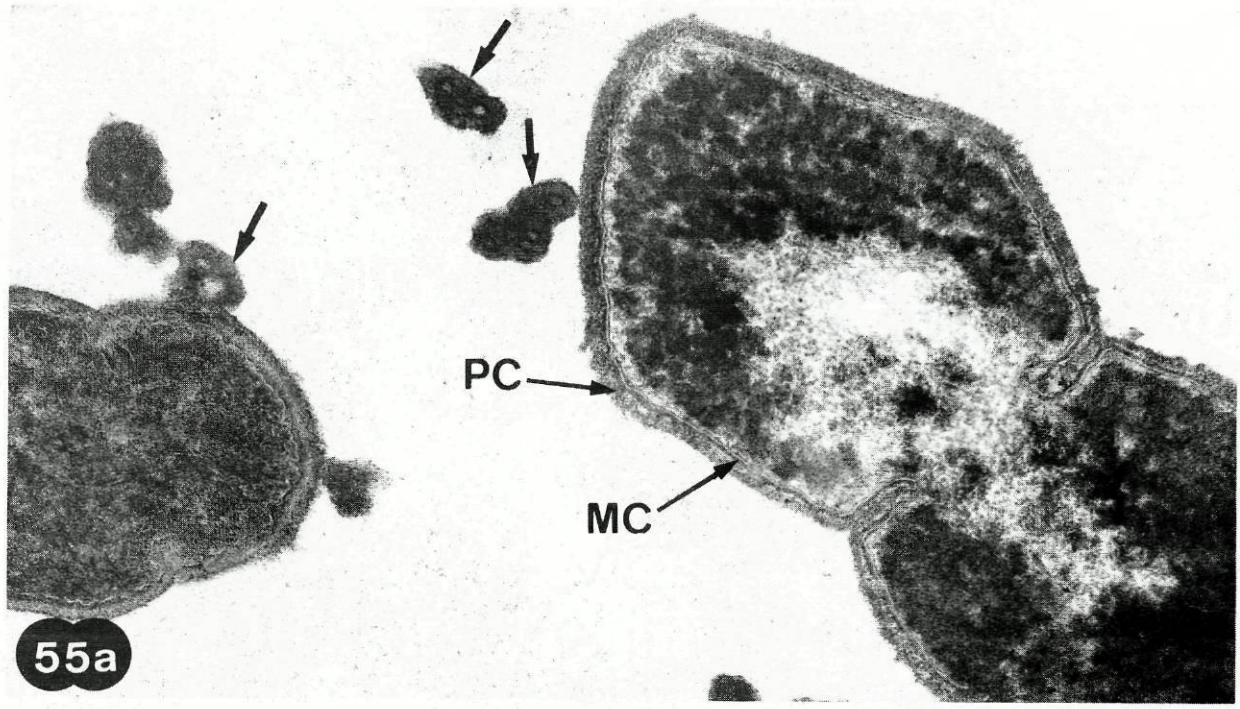
Experiências paralelas realizadas com células da fase exponencial, congeladas e incubadas durante 120 min em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 7,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml) não apresentaram decréscimo da A520 das suspensões celulares. De modo idêntico ao verificado a pH 8,0, a A520 registada após 120 min de incubação a 37 ^{o}C apresentou um aumento de 6 % em relação ao valor incial (não mostrado).

Influência de vários parâmetros na actividade da lisozima em S. faecium

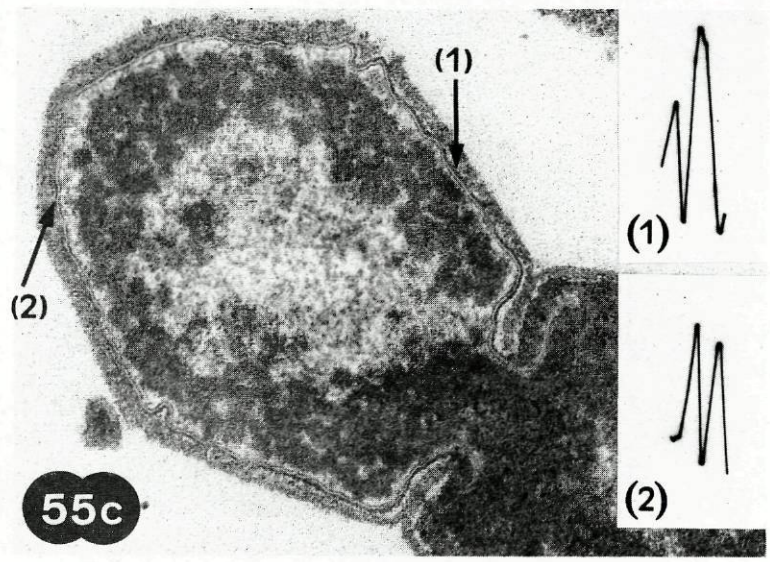
Condições experimentais		% da A520 inicial com a adição de: Lis.	Lis + RNase	Lis + DNase e $MgSO_4$	Lis + RNase + DNase $MgSO_4$
Células não congeladas					
tampão fosfato	A	105	23	86	15
0,05 M (pH 8,0)	B	100	26	64	15
tampão Tris-HCl	A	106	104	96	60
0,05 M (pH 8,0)	B	107	105	89	63
Células congeladas*					
tampão fosfato	A	106	24	81	12
0,05 M (pH 8,0)	B	101	26	68	17
tampão Tris-HCl	A	106	101	91	61
0,05 M (pH 8,0)	B	105	104	88	59

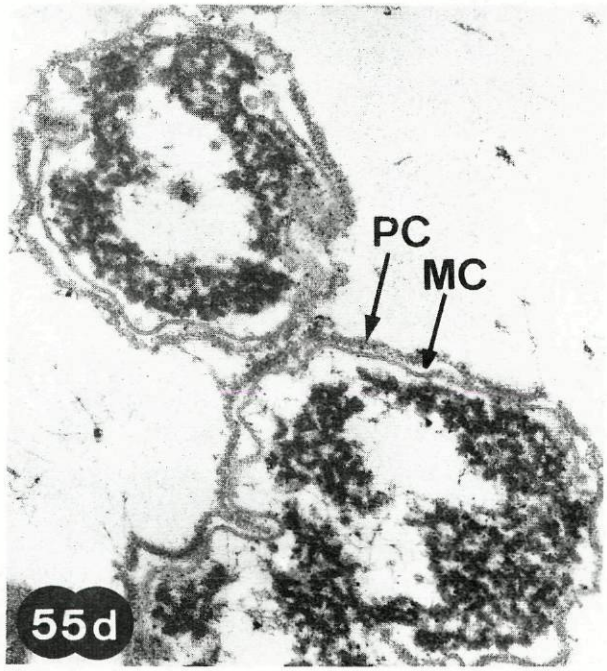
Tabela X. Células de *S. faecium* da fase exponencial (A) ou do início da fase estacionária (B) de crescimento, não congeladas ou previamente congeladas, foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) e incubadas em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de lisozima (0,4 mg/ml), de nucleases (0,01 mg/ml) e de Mg^{2+} (10 mM) conforme se indica. A lise foi seguida pela leitura da A520 durante 120 min a 37 °C. Os valores indicados na tabela representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. * O congelamento efectuou-se nos tampões a utilizar posteriormente na incubação.

Fig. 55. Ultrastrutura de células de *S. faecium* em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo 0,4 mg/ml de lisozima. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. (a) Células após 10 min de incubação. Notar o início da degradação da parede celular, a presença de material electronodenso e de lisozima livre (setas) ou ligada às bactérias; (b) lisozima coagulada pelos fixadores. Uma solução de 0,4 mg/ml de lisozima feita em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) foi fixada para microscopia electrónica pelo processo usado nas outras experiências; (c) células após 15 min de incubação. Notar, em alguns locais, o perfil simétrico da membrana citoplasmática. Em (1) e (2) encontram-se inseridos os traçados densitométricos da membrana, efectuados nos locais assinalados; (d) células após 30 min de incubação; (e) células após 120 min de incubação. Notar as alterações da matriz citoplasmática, a degradação progressiva e generalizada da parede celular e a perda da forma das bactérias. MC - membrana citoplasmática; PC - parede celular; (a) 66 000 X; (b) 48 000 X; (c) 64 000 X; (d) 40 000 X; (e) 50 000 X.


PC
MC
55a


55b


(1)
(2)
(1)
(2)
55c


PC
MC
55d

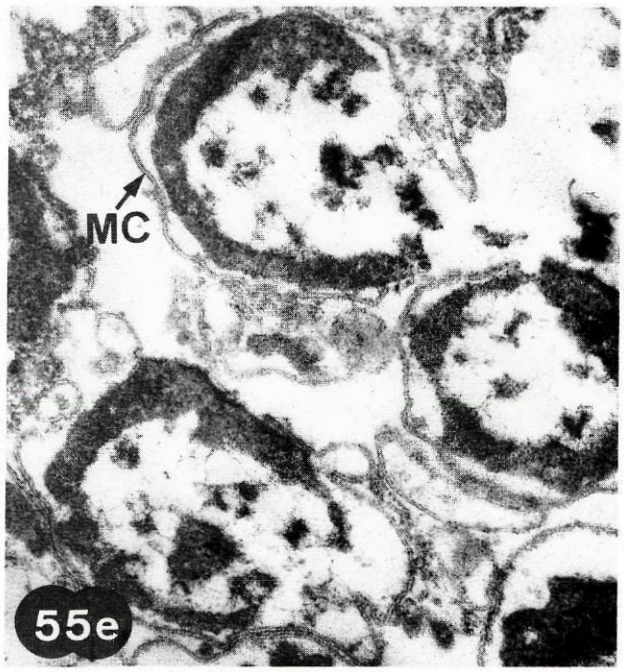
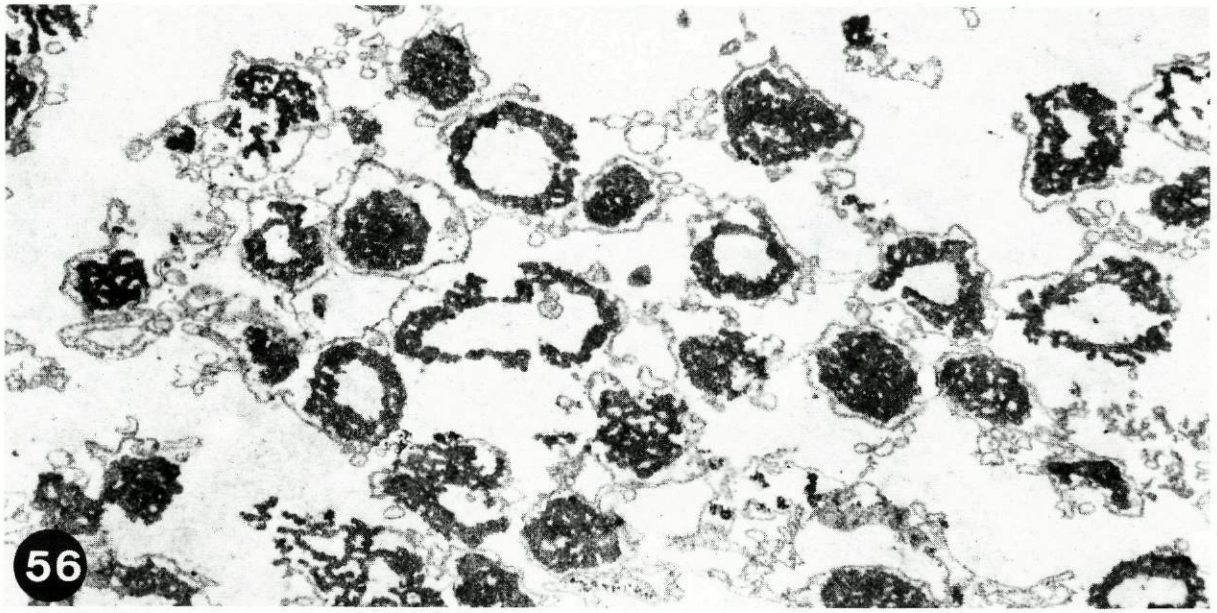

MC
55e

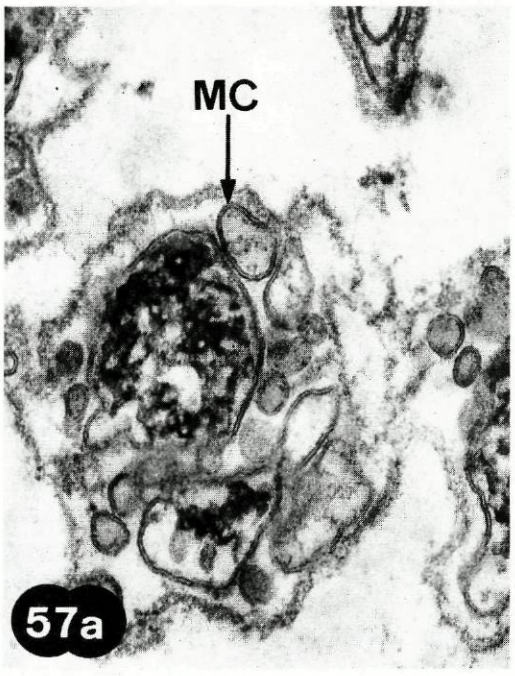
Fig. 56. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas no tampão indicado antes da incubação. Notar a ausência de parede celular e na matriz citoplasmática a presença de material electronodenso disposto na periferia. 25 000 X.

Fig. 57. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após (a) 30 min ou (b) 120 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml) e RNase (0,01 mg/ml). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar na Fig. 57b a presença de menores quantidades de material electronodenso do que nas Figs. 55e e 56. PC - parede celular; MC - membrana citoplasmática. (a) 56 000 X; (b) 44 000 X.

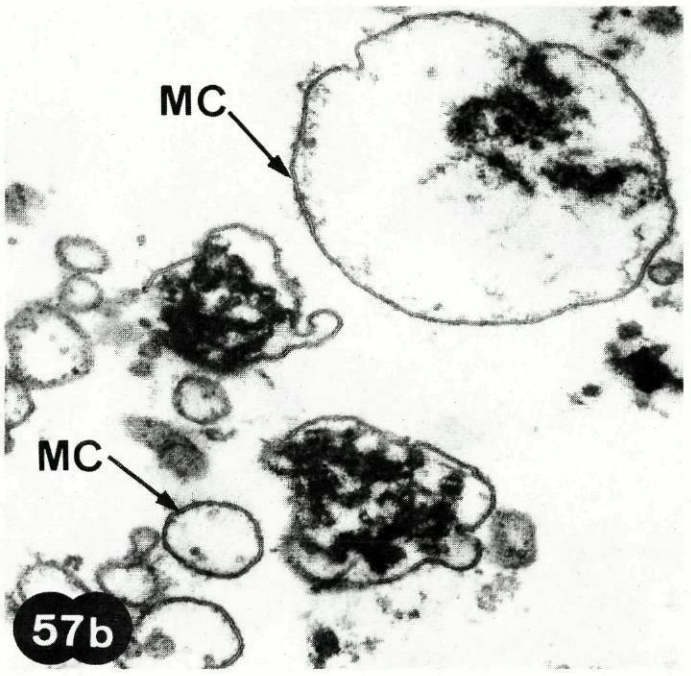
Fig. 58. Membranas isoladas de células de *S. faecium* obtidas após 120 min de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml), RNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. 48 000 X.



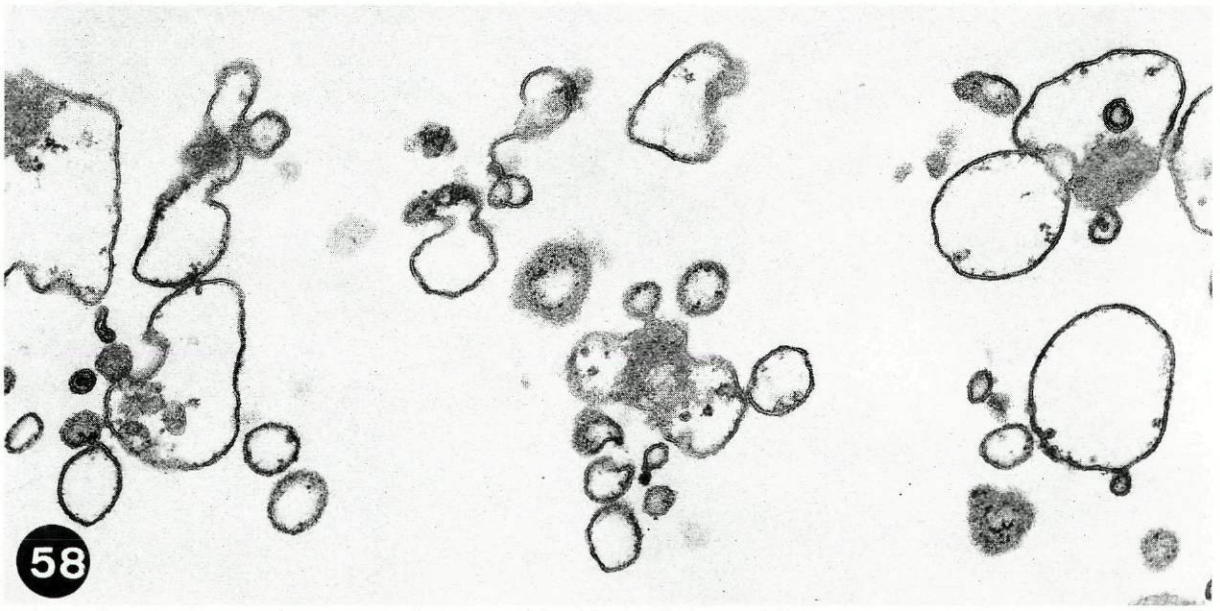
56



57a



57b



58

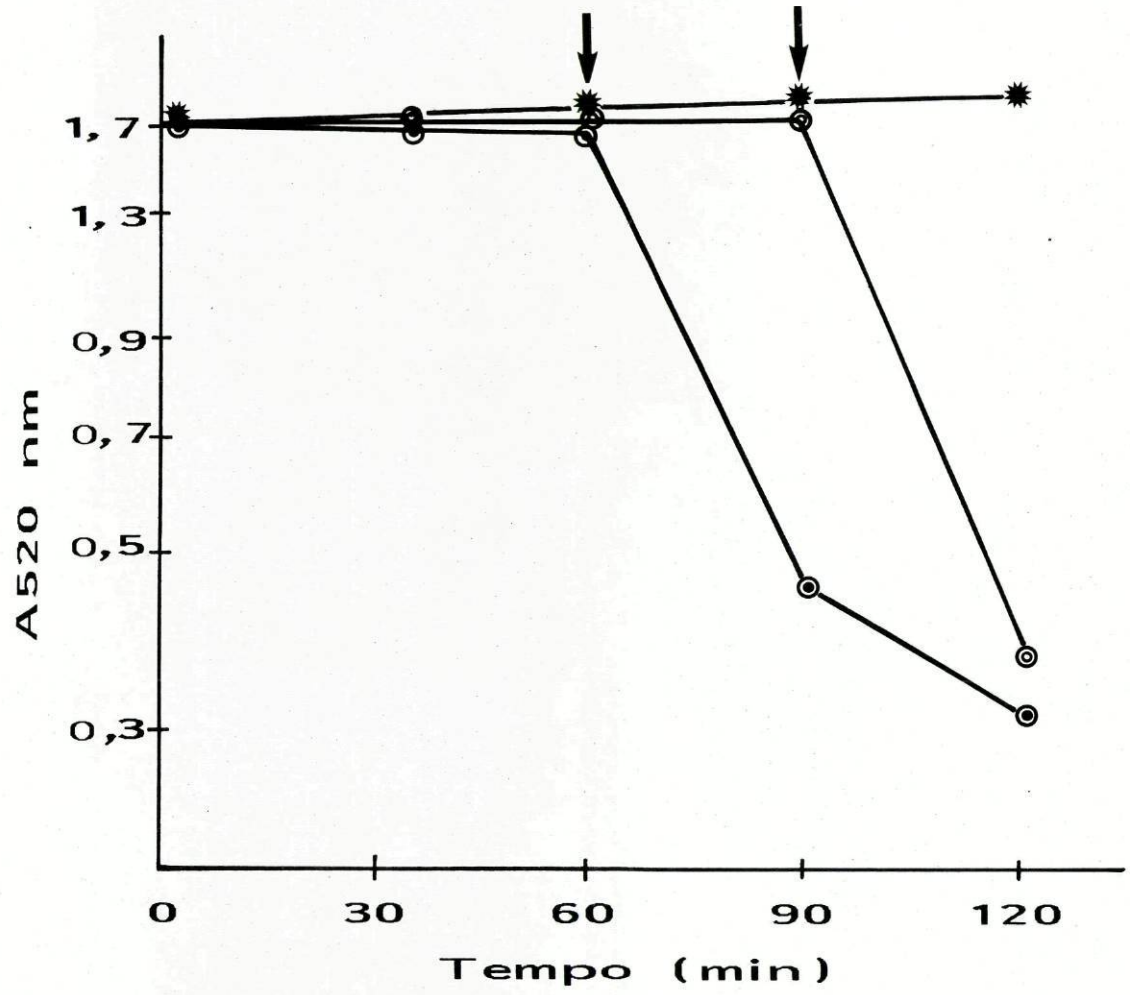


Fig. 59. Efeito da adição de nucleases e do Mg^{2+} a suspensões de células *S. faecium* tratadas com lisozima. Células da fase exponencial de crescimento foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M pH 8,0 com 0,4 mg/ml de lisozima e incubadas 120 min a 37 °C. Aos 60 min (⊙) ou 90 min (◎) foram adicionadas RNase (0,01 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM); (✹) controlo sem nucleases ou Mg^{2+}.

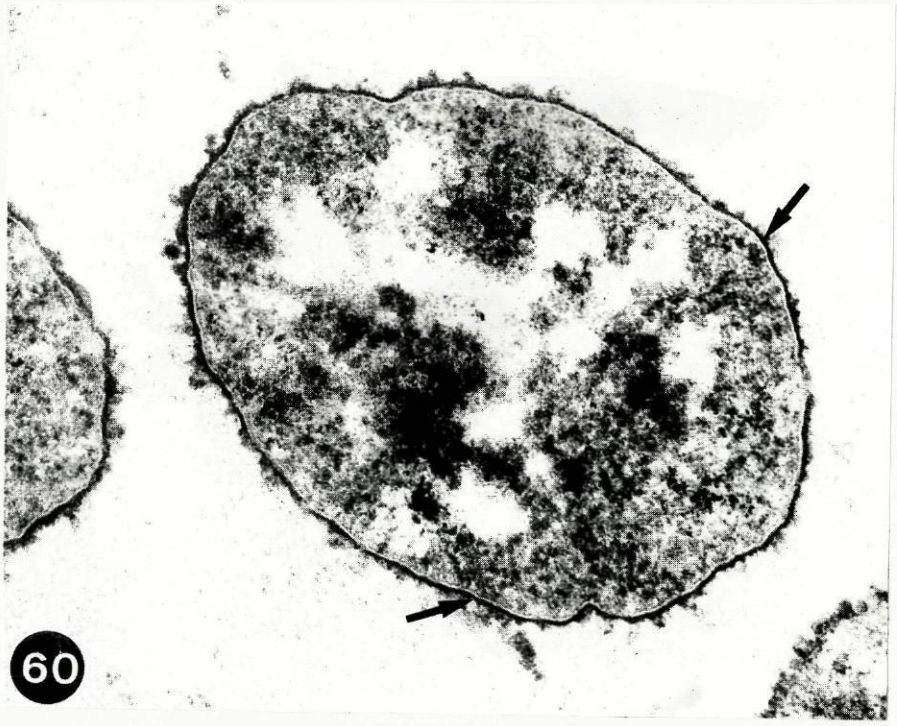


Fig. 60. Protoplastos de células de *S. faecium* após degradação da parede celular pela lisozima durante 60 min. As células da fase exponencial de crescimento previamente congeladas foram incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de lisozima (0,4 mg/ml), de $MgSO_4$ (10 mM) e de sacarose (0,5 M). Notar a assimetria da membrana citoplasmática (seta). 64 000 X.

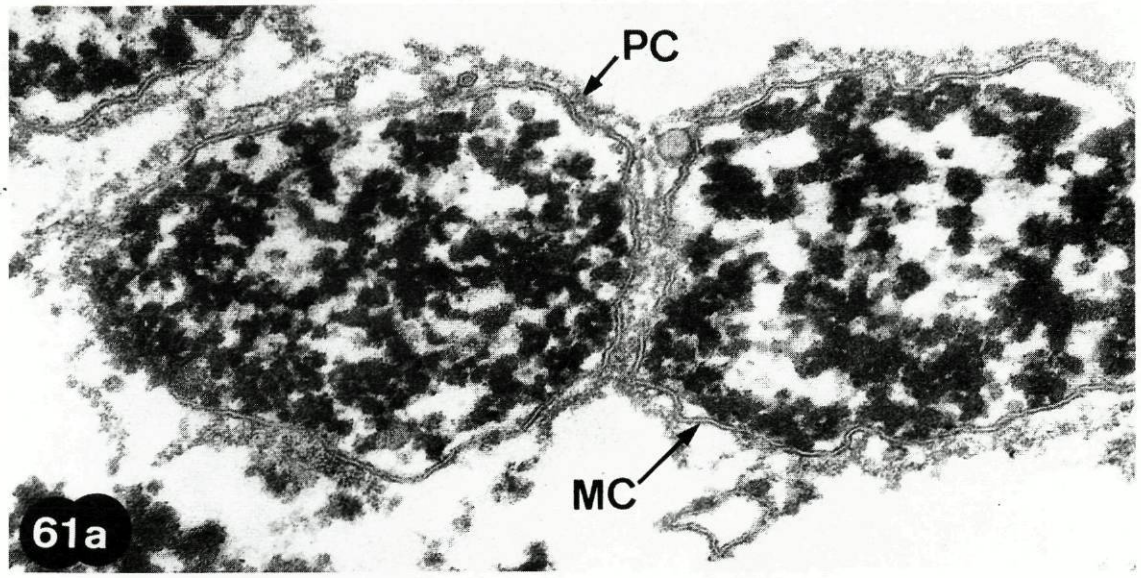
1.2.2. Tampão Tris-HCl

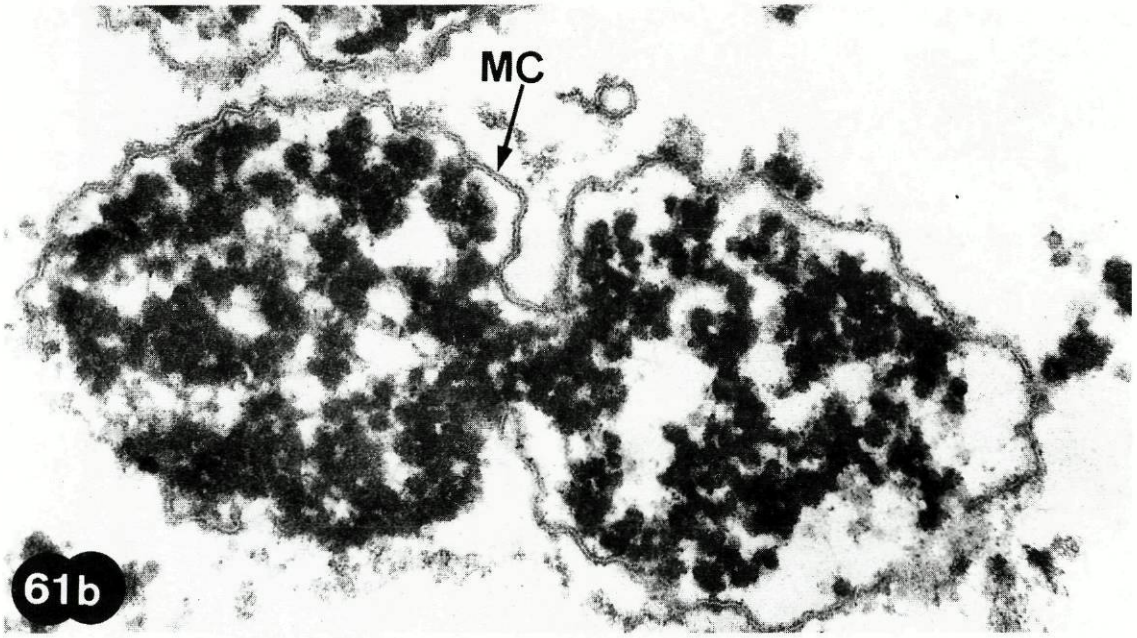
Os resultados obtidos por espectrofotometria com células da fase exponencial de *S. faecium* não congeladas ou previamente congeladas e incubadas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) foram idênticos aos descritos para o tampão fosfato, excepto quando as células foram expostas à acção da lisozima e da RNase ou da lisozima, da RNase, da DNase e do Mg^{2+}; nestas situações, em comparação com os resultados observados em tampão fosfato de sódio e potássio, foram observadas descidas menores dos valores iniciais da A520 das suspensões celulares (Tabela X, pag. 135).

O estudo ultrastrutural mostrou que, neste tampão, a degradação da parede celular é mais rápida do que em tampão fosfato 0,05 M (pH 8,0). Após 15 min de incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M contendo lisozima (Fig. 61a), a degradação da parede celular era já muito extensa, a membrana citoplasmática mostrava perfil simétrico (comparar com a Fig. 55c) e a matriz citoplasmática apresentava morfologia alterada com zonas uniformemente dispersas de DNA e material electronodenso. Contudo, apesar da rápida degradação da parede celular, geralmente completa após 60 min de incubação (Fig. 61b), a forma da célula e as alterações da matriz citoplasmática foram frequentemente mantidas ao longo de todo o processo (Fig. 61c). A presença constante de quantidades significativas de material intracelular electronodenso justifica os valores da percentagam da A520 inicial registados (Tabela X).

A bacteriólise das células da fase exponencial, não congeladas ou congeladas, expostas duas horas neste tampão à acção da lisozima e da RNase ou à acção da lisozima, da RNase, da DNase e do Mg^{2+} (Tabela X; Fig. 62a, 62b) apresentou cinéticas perfeitamente sobreponíveis (não mostrado) e foi inferior à obtida ao fim do mesmo tempo de incubação em tampão fosfato na presença das mesmas enzimas (comparar Figs. 57b com 62a; Figs. 58 com 62b).

Fig. 61. Ultrastrutura de células de *S. faecium* em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo 0,4 mg/ml de lisozima. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. (a) Células após 15 min de incubação. Notar a degradação parcial da parede celular (PC), o perfil simétrico da membrana citoplasmática (MC) e a presença de material electronodenso. (b) Células após 60 min de incubação. (c) Células após 120 min de incubação. Notar que a forma da célula foi mantida ao longo das duas horas de incubação apesar da completa degradação da parede celular. (a) 64 800 X; (b) 67 200 X; (c) 33 600 X.


PC
MC
61a


MC
61b

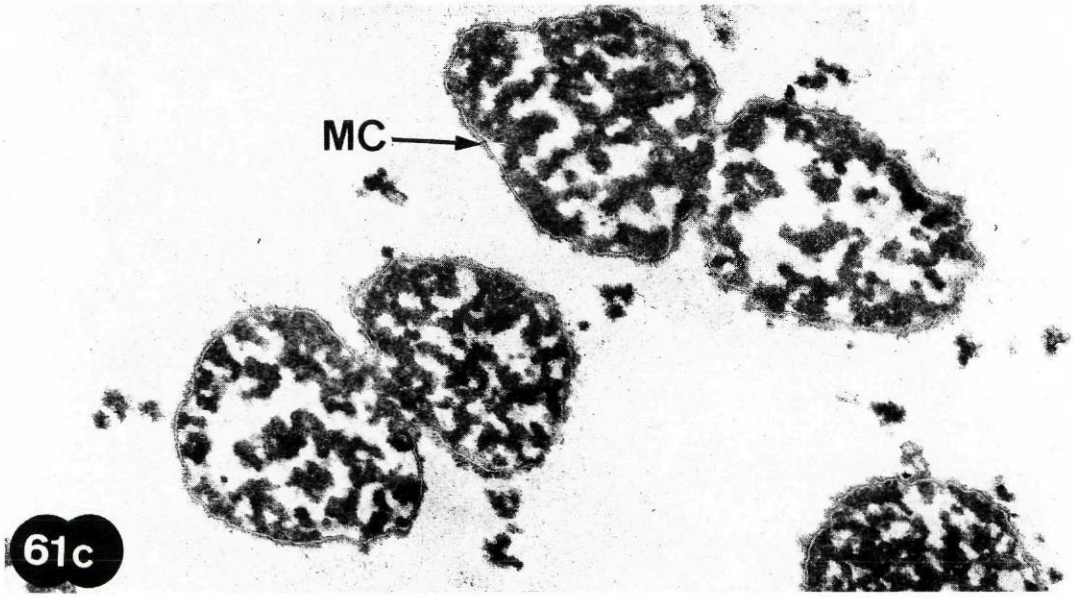
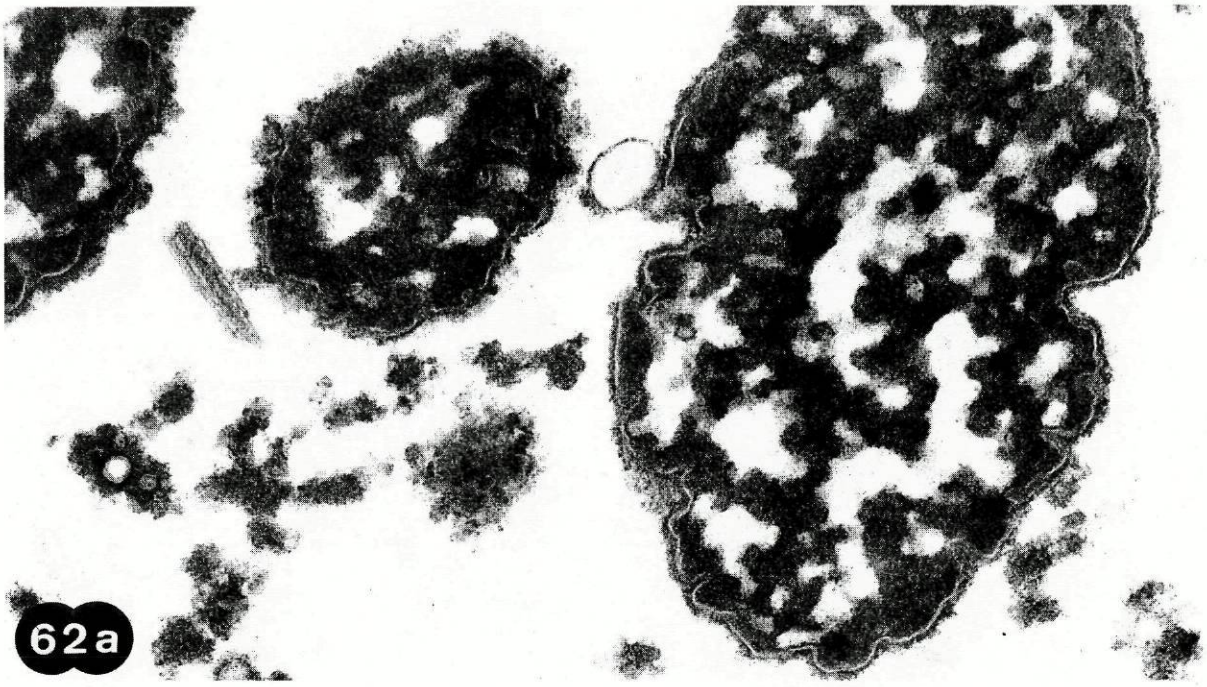
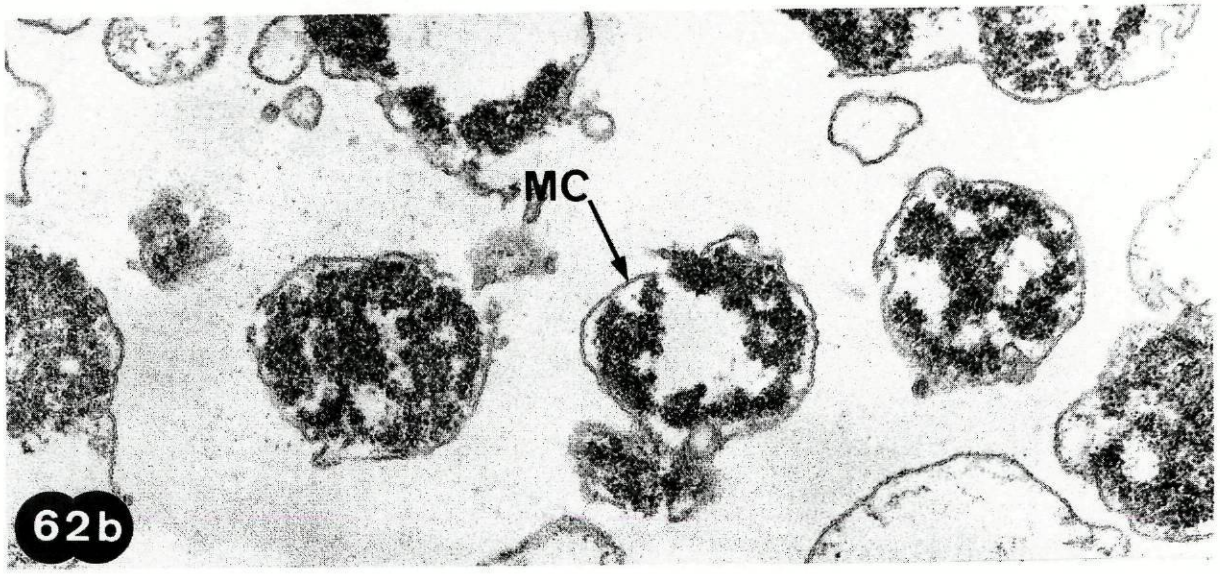

MC
61c

Fig. 62. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 120 min de incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml) e RNase (0,01 mg/ml) (a) ou RNase (0,01 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM) (b). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar em (a) a presença de grandes quantidades de material electronodenso e em (a) e (b) a ausência de parede celular. MC - membrana citoplasmática. (a) 69 000 X; (b) 39 000 X.



62a



62b

1.3. Ligação da lisozima às bactérias

Quando as células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento, cultivadas na presença de glucose, foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), verificou-se uma acentuada ligação desta enzima às bactérias. A Fig. 63 mostra que, durante os primeiros 5 min de incubação, 35-40 % da enzima encontra-se ligada às bactérias, isto é, dos 0,56 pg de lisozima disponíveis por cada célula de *S. faecium* , cerca de 0,2 - 0,22 pg aderiram a cada bactéria.

A análise electroforética das proteínas presentes nos filtrados das suspensões celulares, obtidos a diferentes tempos ao longo da incubação, apoia esta conclusão (Fig. 64a).

Uma quantidade de lisozima semelhante à acima referida aderiu a cada célula bacteriana sempre que, a suspensões celulares efectuadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com A520 = 0,260 (8,8 x 10^7 células/ml), se adicionou lisozima na concentração final de 0,05 mg/ml - uma situação em que não se verifica bacteriólise. Após 120 min de incubação, a A520 apresentou uma descida de 3 % em relação ao valor inicial e os resultados ultrastruturais (não mostrados), concordantes com os dados de espectrofotometria, foram semelhantes aos apresentados na Fig. 55e.

Quando as células foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) com lisozima (0,4 mg/ml) verificou-se que a ligação desta enzima às bactérias foi mais rápida do que a observada em tampão fosfato (Fig. 63). Nos primeiros 5 min de incubação, quase toda a enzima (90-95 %) existente na suspensão se encontrava ligada às células bacterianas, isto é, cerca de 0,50 - 0,53 pg/célula de *S. faecium*. A análise electroforética das proteínas presentes nos filtrados (Fig. 64b) mostrou-se concordante com a determinação da concentração de proteínas (Fig. 63); de modo idêntico, a determinação da concentração de proteínas e análise electroforética dos sedimentos das células expostas a esta muralisina revelaram a presença de quantidades apreciáveis da enzima ligada aos restos celulares (não mostrado).

Nas experiências realizadas com células suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 7,0) com lisozima (0,4 mg/ml) verificou-se, de acordo com a determinação da concentração das proteínas contidas nos filtrados das suspensões celulares (Fig. 63) e a correspondente análise electroforética (Fig. 64c), que a ligação da lisozima às bactérias foi mais lenta que a observada em tampões fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) (Figs. 63, 64a e 64b).

A análise electroforética das proteínas das membranas isoladas de células da fase exponencial incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com lisozima, RNase, DNase e Mg^{2+} (Fig. 58) revelou que a lisozima está ligada a esta estrutura celular (Fig. 65).

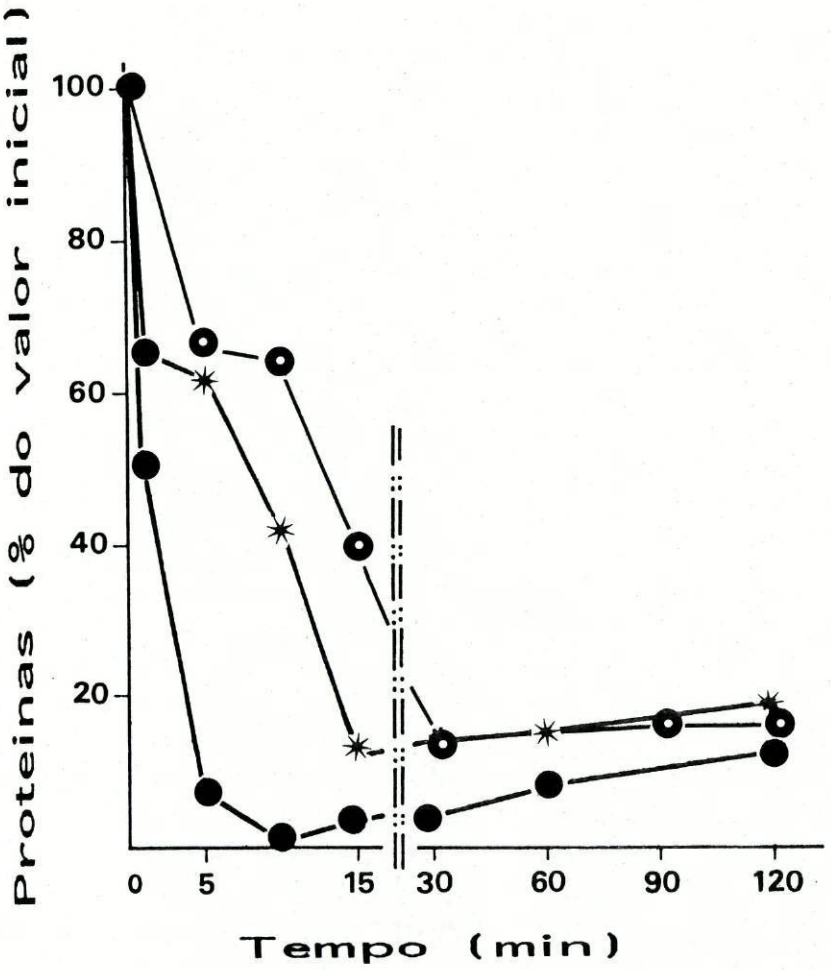
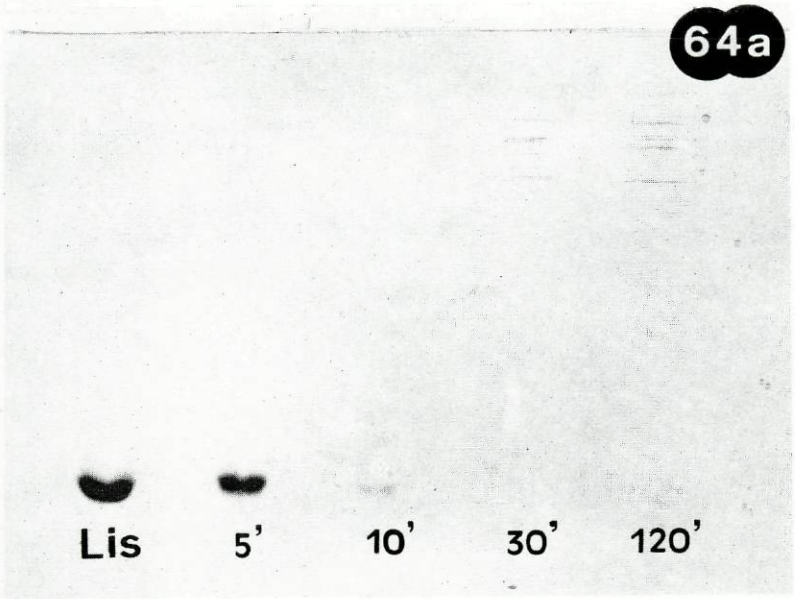
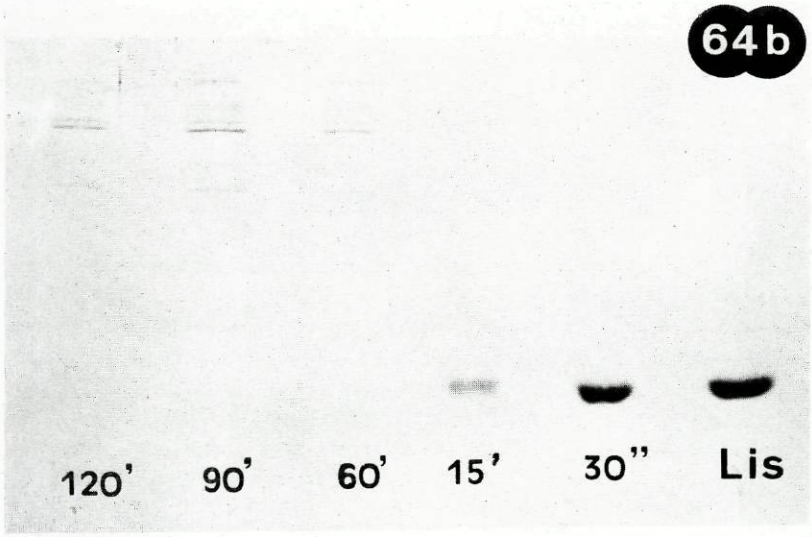


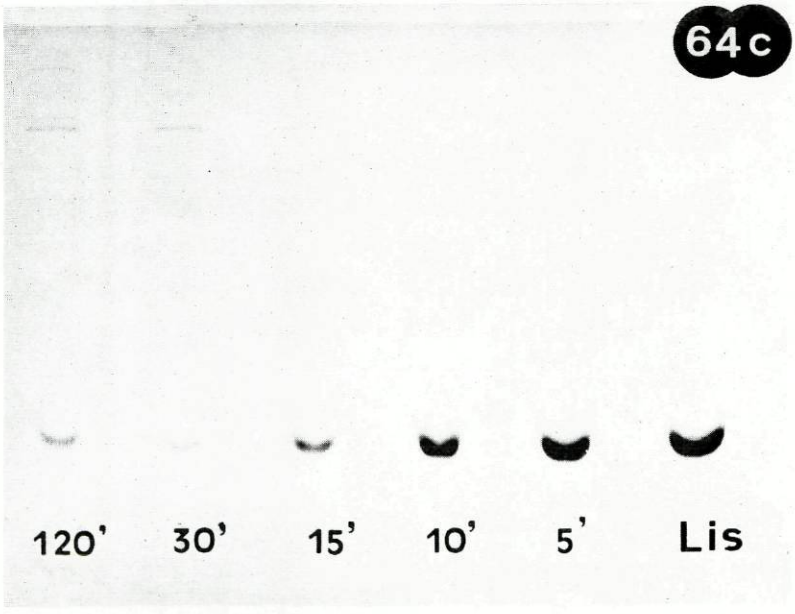
Fig. 63. Ligação da lisozima a *S. faecium* . Suspensões de 7,2 x 10^8 células/ml, tratadas com 0,4 mg/ml de lisozima foram incubadas a 37 ^oC em tampões fosfato de sódio e potássio 0,05 M com pH 8,0 (✳) ou com pH 7,0 (⊙) ou em (●) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0). Amostras retiradas a diferentes tempos de incubação foram filtradas e a quantidade de proteínas foi determinada nesses filtrados (ver detalhes no texto).

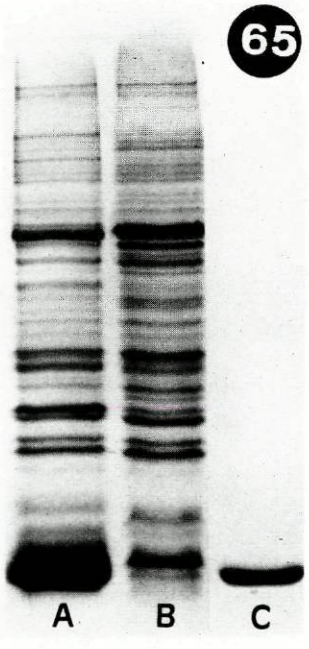
Fig. 64. SDS-PAGE de proteínas contidas nos filtrados das suspensões de *S. faecium* expostas à lisozima (0,4 mg/ml) em (a) tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0), ou em (b) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) ou em (c) tampão fosfato de sódio e potássio (pH7,0). As amostras da lisozima e dos filtrados das suspensões celulares foram previamente concentradas (ver Materiais e Métodos)

Fig. 65. SDS-PAGE de proteínas de membranas isoladas de *S. faecium* após heterólise com lisozima (0,4 mg/ml), RNase (0,01 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) (A) ou após autólise em tampão fosfato de sódio e potássio 0,02 M (pH 7,0) (B). Padrão de lisozima (C) . Notar que a lisozima (P.M.= 14 KDa) está presente em (A) mas não em (B).


64a
Lis
5'
10'
30'
120'


64b
120'
90'
60'
15'
30"
Lis


64c
120'
30'
15'
10'
5'
Lis


65
A
B
C

1.3.1. Influência da razão lisozima/massa bacteriana na lise de *S. faecium*

Os resultados que descrevemos nas secções anteriores indicam que *S. faecium*, quando suspenso em tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) contendo lisozima capta uma quantidade significativa desta enzima. No intuito de verificar a hipótese de essa ligação ser responsável pela ausência da bacteriólise observada nas condições estudadas apesar da completa degradação da parede celular (Figs. 55e e 61c), decidimos realizar as experiências que se seguem.

Suspensões de células ($7,2 \times 10^8$ células/ml) de *S. faecium* da fase exponencial não congeladas ou congeladas, quando expostas à acção da lisozima na concentração final de 0,01 - 0,4 mg/ml, originaram diferentes taxas de lise que dependeram do tampão utilizado na preparação dessas suspensões. Assim, a Fig. 66 mostra que, quando as células foram suspensas no tampão fosfato de sódio e potássio 0,1M, a taxa de lise observada aumentou à medida que foram utilizadas concentrações mais elevadas de lisozima. Deste modo, a bacteriólise mais extensa ocorreu na concentração de 0,4 mg/ml, isto é, quando cerca de 0,56 pg de enzima estavam disponíveis por célula bacteriana. Pelo contrário, quando se utilizou o tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M, foi obtida uma bacteriólise máxima para a concentração de 0,05 mg/ml de lisozima, o que corresponde a 0,07 pg de enzima/célula bacteriana.

A Fig. 67 mostra que as cinéticas máximas de lise de células não congeladas ou congeladas, nas duas situações acima referidas, são idênticas.

O estudo ultrastrutural de amostras obtidas após 15 ou 30 min de incubação em tampão fosfato 0,1 M na presença de lisozima (0,4 mg/ml) mostrou (Figs. 68a e 68b) que a degradação da parede celular neste tampão é mais lenta do que a observada em tampões fosfato ou Tris-HCl 0,05 M (comparar Figs. 68a com 55c e 61a; Figs. 68b com 61b). Além disso, a Fig. 68a mostra ainda que quantidades significativas de lisozima se encontravam livres no tampão de incubação, isto é, não ligadas às bactérias, aparecendo como blocos de material precipitado pelo fixador aldeído (ver

também Fig. 55b). Contudo, após duas horas de incubação (Fig. 68c), as células encontravam-se extensamente degradadas - os restos celulares eram constituídos por membranas com perfil simétrico, fibrilas de DNA, protoplastos lisados e outros componentes não identificáveis.A concentração elevada e relativamente constante (entre 60 a 80 %) das proteínas contidas nos filtrados das suspensões celulares (não mostrado) foi apoiada pela análise electroforética das proteínas contidas nos filtrados dessas suspensões (Fig. 69) e revelou que a ligação da lisozima às bactérias era significativamente menor quando a incubação se efectua em tampão fosfato 0,1 M do que nos tampões anteriormente referidos (Figs. 64a - 64c).

A ocorrência de extensa bacteriólise de *S. faecium* mencionada anteriormente e avaliada por espectrofotometria após duas horas de incubação em tampão fosfato 0,05 M (pH 8,0) contendo 0,05 mg/ml de lisozima foi confirmada pela observação ultrastrutural (Fig. 70) - apenas eram visíveis membranas com perfil simétrico, fibrilas de DNA e constituintes celulares não identificáveis.

Realizámos também experiências com células da fase exponencial suspensas em tampões Tris-HCl (pH 8,0) cujos resultados de espectrofotometria se encontram na Fig. 71; células expostas à acção da lisozima (0,4 mg/ml) em tampão Tris-HCl 0,1M não lisaram, tendo-se verificado um aumento da absorvância inicial (Fig. 71) com um máximo registado após 15 min de incubação. Os resultados ultrastruturais de amostras obtidas ao longo da incubação (Figs. 72a e 72b) foram concordantes com os dados espectrofotométricos porque, não obstante a completa degradação da parede celular, na matriz citoplasmática estiveram sempre presentes ao longo da incubação quantidades significativas de materiais electronodensos. Além disso, a análise electroforética das proteínas contidas nos filtrados de suspensões celulares mostrou que a ligação da lisozima às células bacterianas ocorreu rapidamente (Fig. 73).

Contudo, uma extensa bacteriólise foi observada em Tris-HCl (0,05 M ou 0,1 M), quando se utilizou lisozima na concentração final de 0,05 mg/ml (Fig. 71). Estes dados espectrofotométricos foram também apoiados pelos resultados ultrastruturais que revelaram uma rápida e extensa degradação das bactérias

(Figs. 74a e 74b). O congelamento prévio das células em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) não aumentou a bacteriólise observada na presença da lisozima (0,05 mg/ml), dado que os valores de absorvância obtidos com células não congeladas ou previamente congeladas ao longo da incubação foram idênticos (Fig. 71).

Experiências paralelas realizadas com células não congeladas ou previamente congeladas expostas à acção da lisozima em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 7,0), revelaram resultados idênticos aos obtidos a pH 8,0. Assim, após 120 min de incubação a 37 ^{o}C as suspensões celulares (7, 2 x 10 ^{8} células/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 7,0) contendo lisozima (0,2 ou 0,4 mg/ml) apresentaram respectivamente, descidas de 93 e 95% do valor inicial da A520 para as células não congeladas, e de 94 e 95% para as células congeladas - comparar estes valores com os obtidos nestas condições a pH 8,0 (Fig. 66).

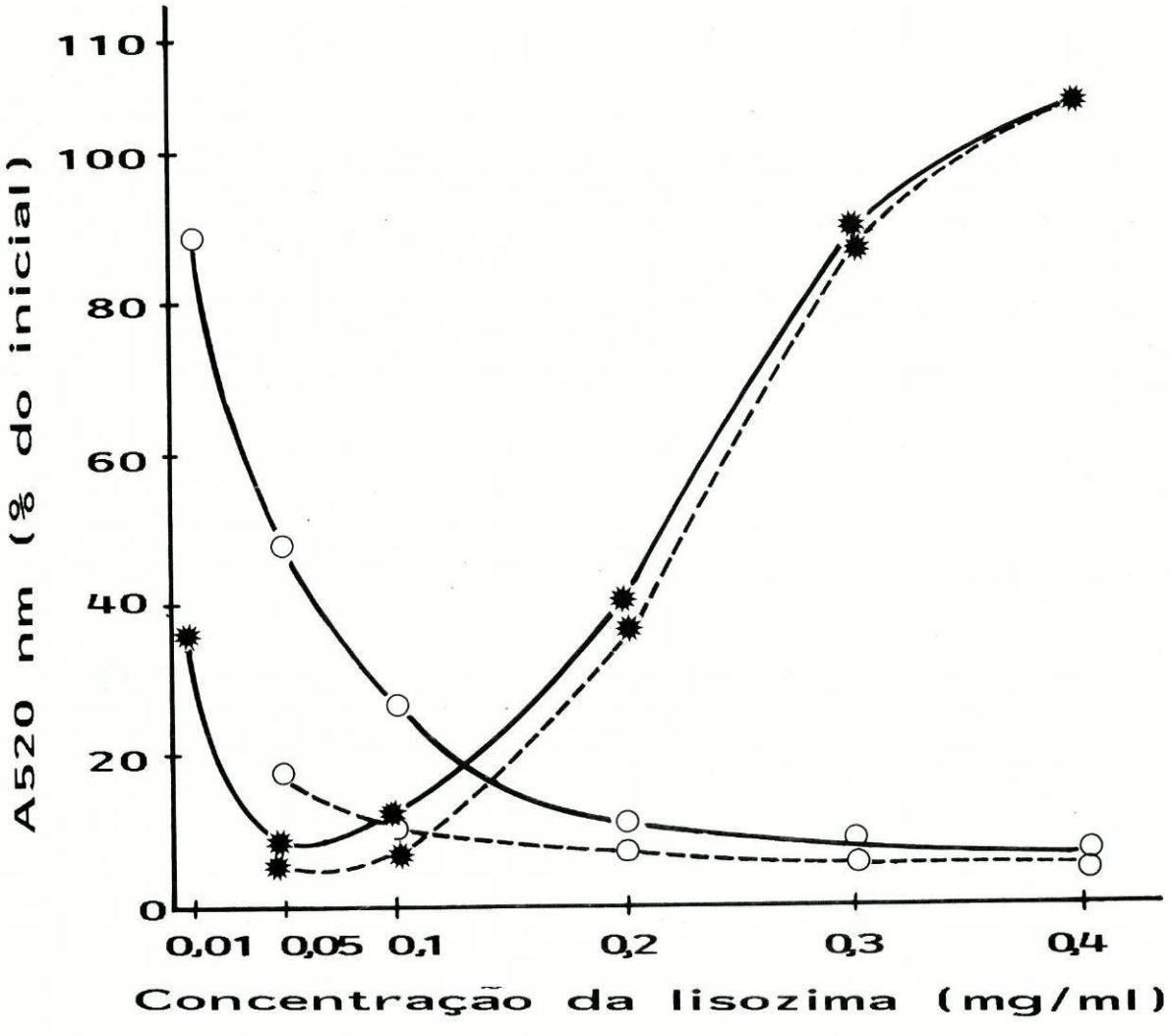


Fig. 66. Efeito da concentração da lisozima e do tampão na lise de *S. faecium* . Células não congeladas (- - -) ou congeladas (—) foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) em (✸) tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) ou em (○) 0,1 M (pH 8,0) na presença de diferentes concentrações de lisozima (0,01 - 0,4 mg/ml). As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. Os resultados representam os valores obtidos aos 120 min de incubação.

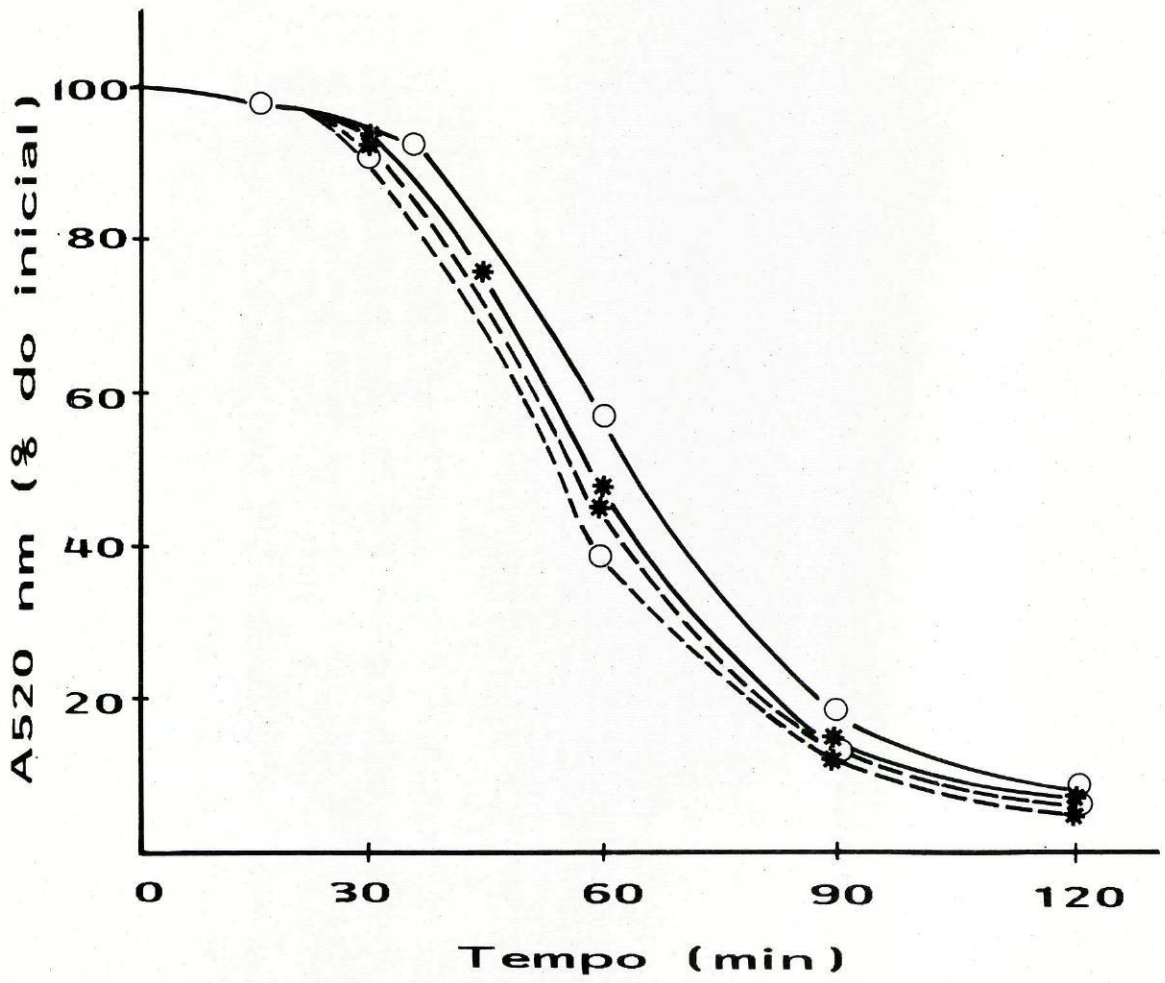
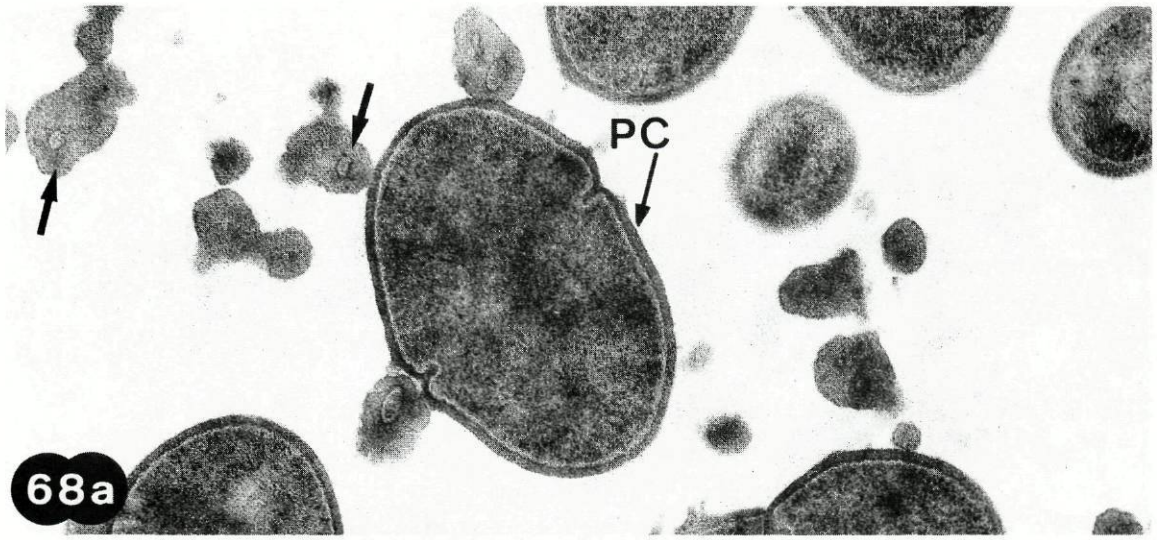
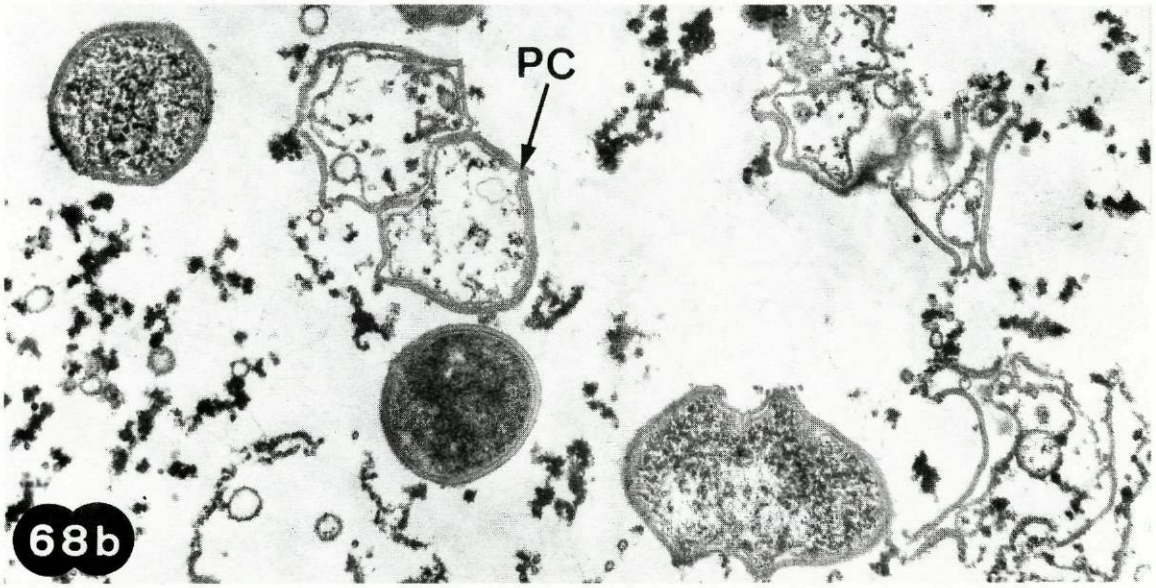


Fig. 67 Cinéticas da lise de *S. faecium* em diferentes condições. Células não congeladas (---) ou congeladas (—) foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) na presença de 0,4 mg/ml de lisozima (○) ou em 0,05 M (pH 8,0) na presença de 0,05 mg/ml de lisozima (✱). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado.

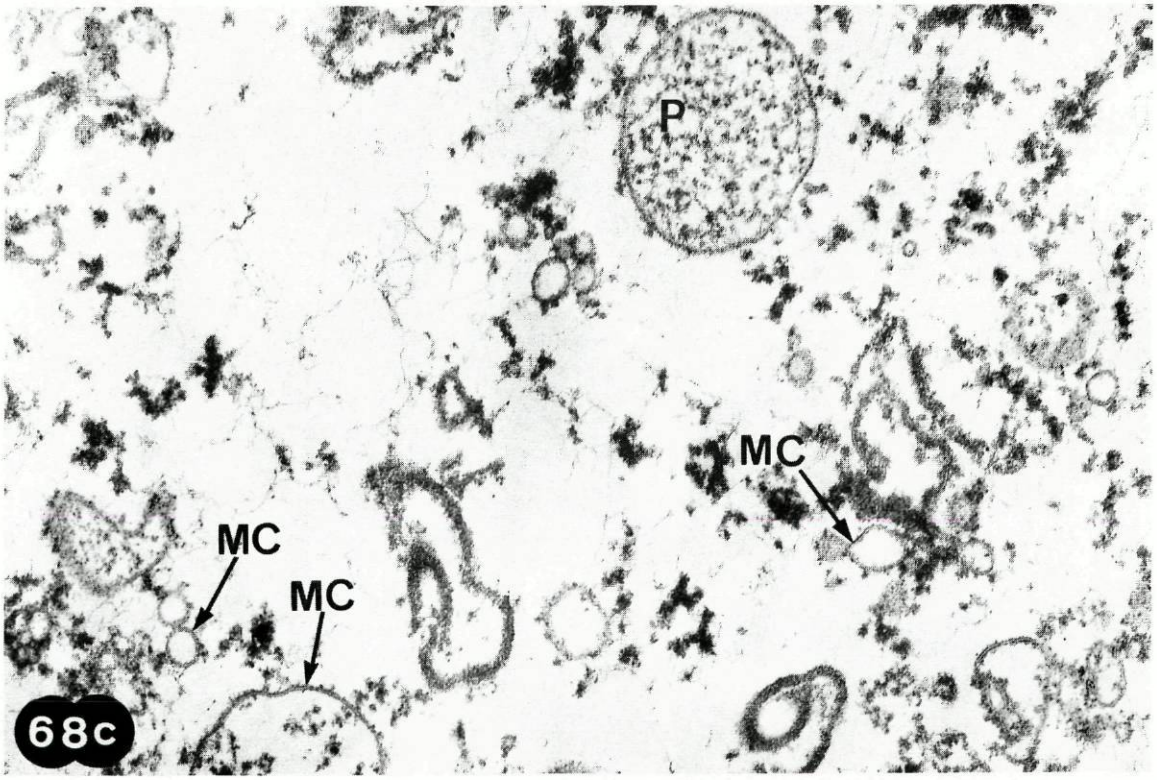
Fig. 68. Ultrastrutura de células de *S. faecium* suspensas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml) após (a) 15 min ou (b) 60 min ou (c) 120 min de incubação. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar em (a) a presença da lisozima livre ou ligada às bactérias (setas); comparar com Fig. 55b. Notar em (c) a presença de vesículas da membrana citoplasmática (MC), protoplastos lisados (P) com membrana simétrica e fibrilas de ácido desoxirribonucleico. PC - parede celular. (a) 40 000X; (b) 27 600 X; (c) 60 000 X.



68a



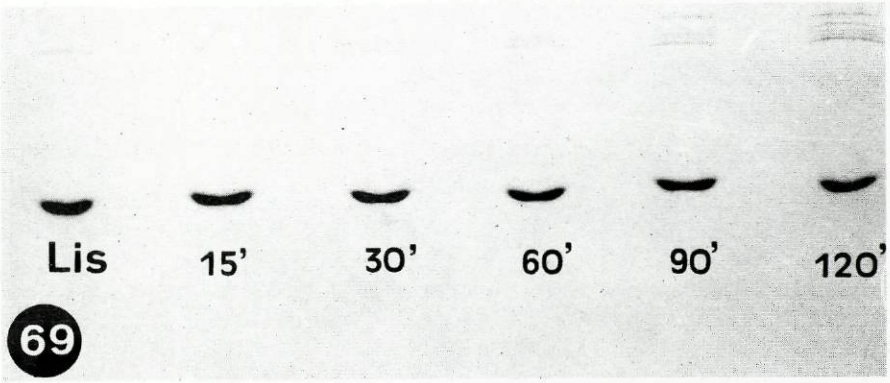
68b



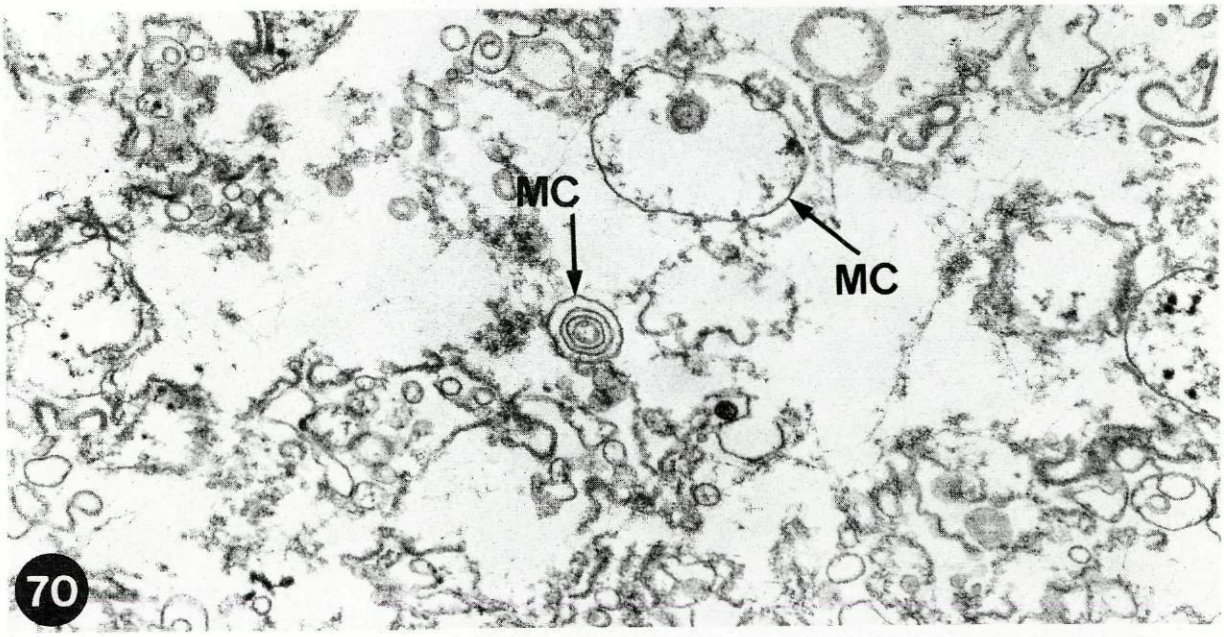
68c

Fig. 69. SDS-PAGE de proteínas contidas nos filtrados das suspensões de *S. faecium* expostas à acção da lisozima (0,4 mg/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0). As amostras de lisozima e dos filtrados das suspensões celulares, obtidos aos tempos indicados, foram previamente concentradas (ver Materiais e Métodos).

Fig. 70. Restos celulares de *S. faecium* após 120 min de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com 0,05 mg/ml de lisozima. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. MC - membrana citoplasmática com perfil simétrico. 25 000 X.



69



70

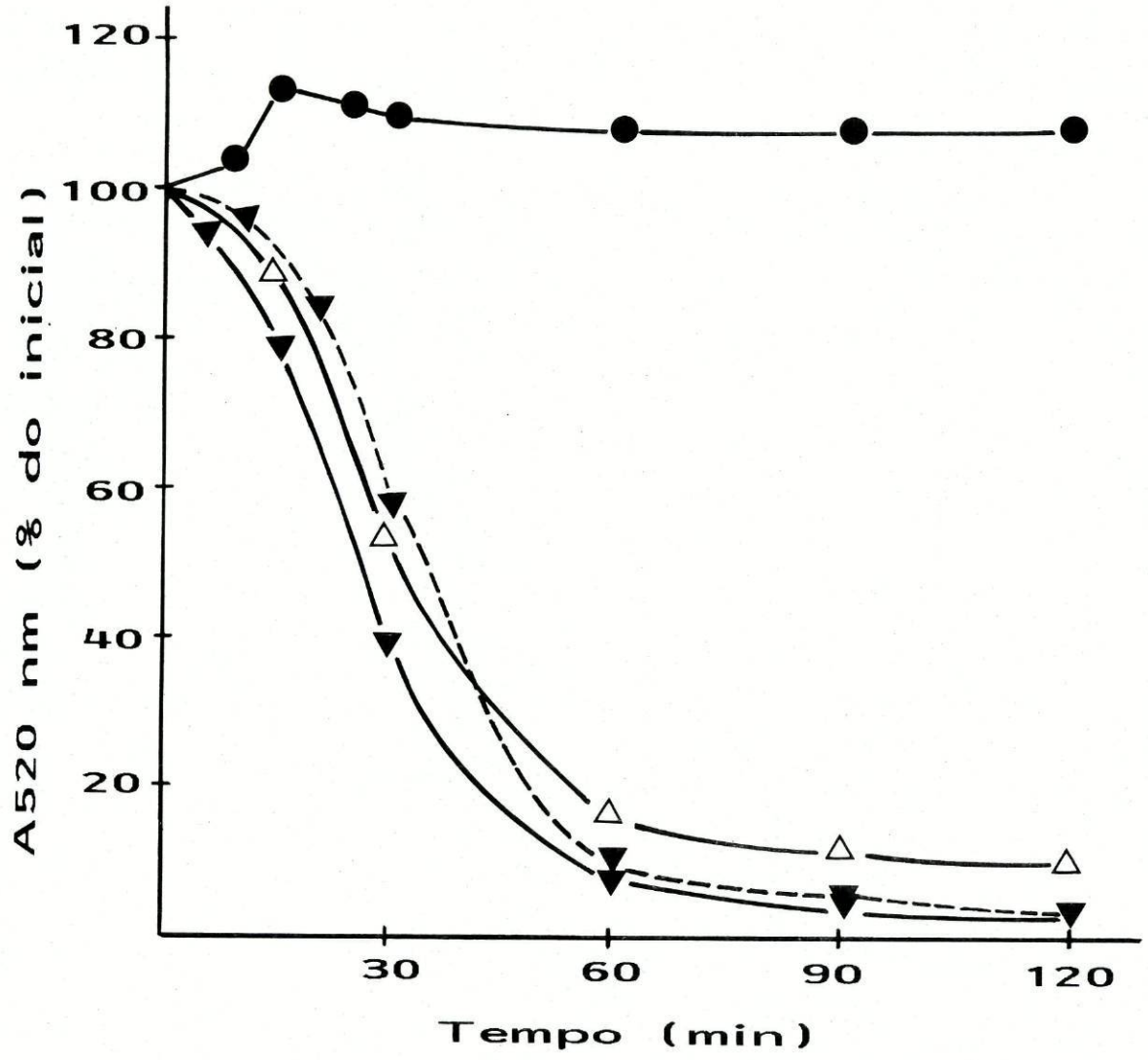
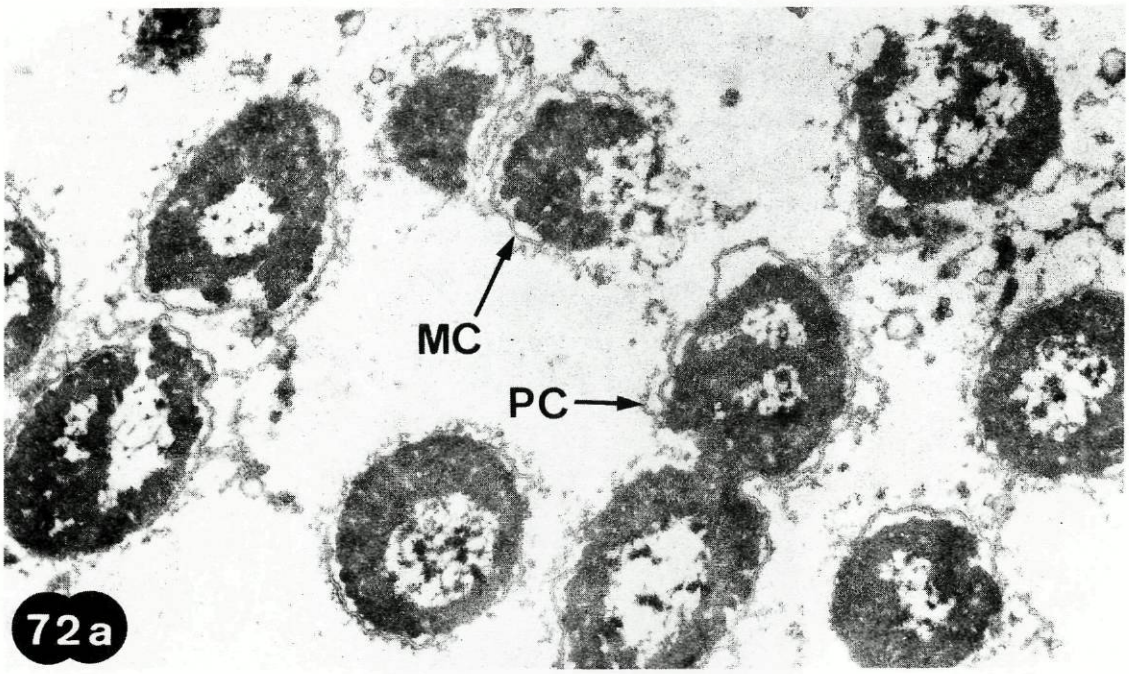
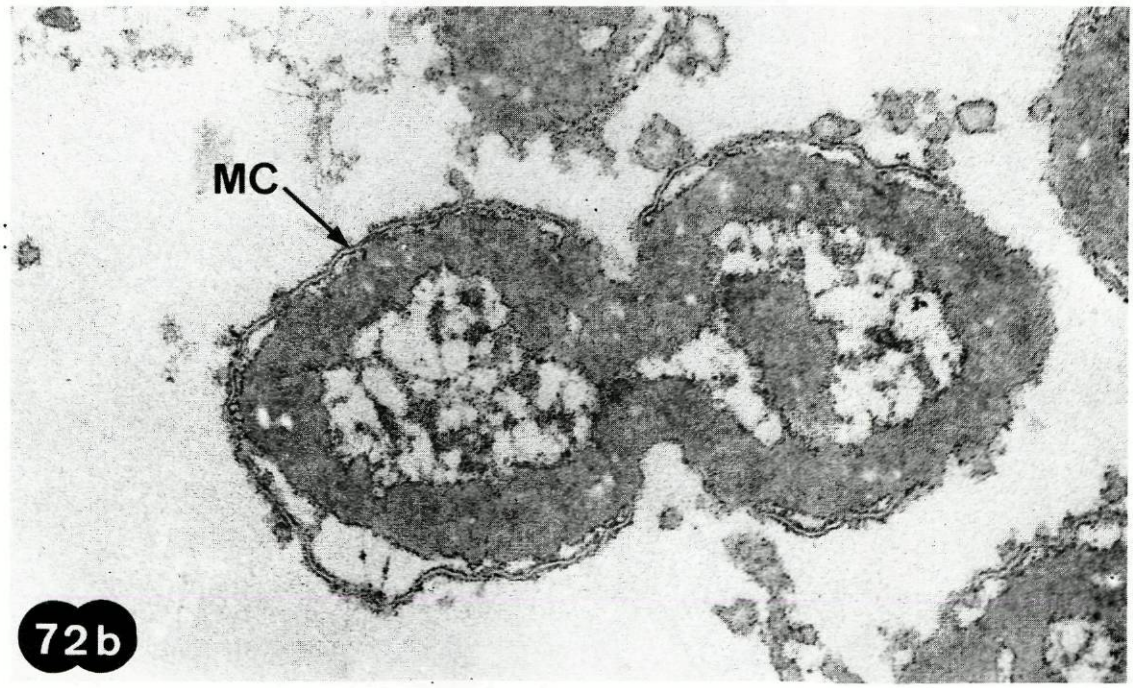


Fig. 71. Cinéticas da lise de *S. faecium* em tampões Tris-HCL na presença de lisozima. Suspensões de células (7,2 x 10^8 células/ml) não congeladas (---) ou congeladas (—) foram incubadas durante 120 min a 37 ^oC, em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0) na presença de 0,4 mg/ml (●) ou 0,05 mg/ml (△) de lisozima ou em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) na presença de 0,05 mg/ml de lisozima (▼). As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado.

Fig. 72. Ultrastrutura de células de *S. faecium* expostas à acção da lisozima (0,4 mg/ml) em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). (a) Células após 60 min ou (b) 120 min de incubação a 37 ^{o}C. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar em (a) e (b) a presença de material electronodenso e a manutenção da forma da bactéria, não obstante a perda total da parede celular (PC). MC - membrana citoplasmática. (a) 45 000 X; (b) 67 500 X.



72a



72b

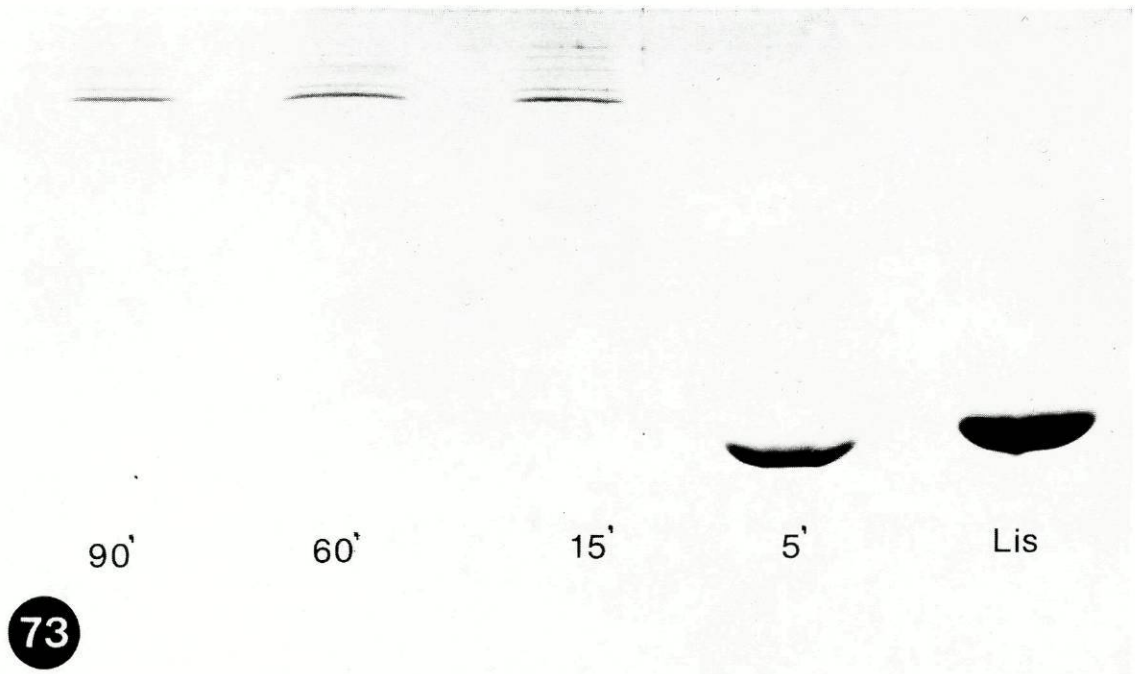
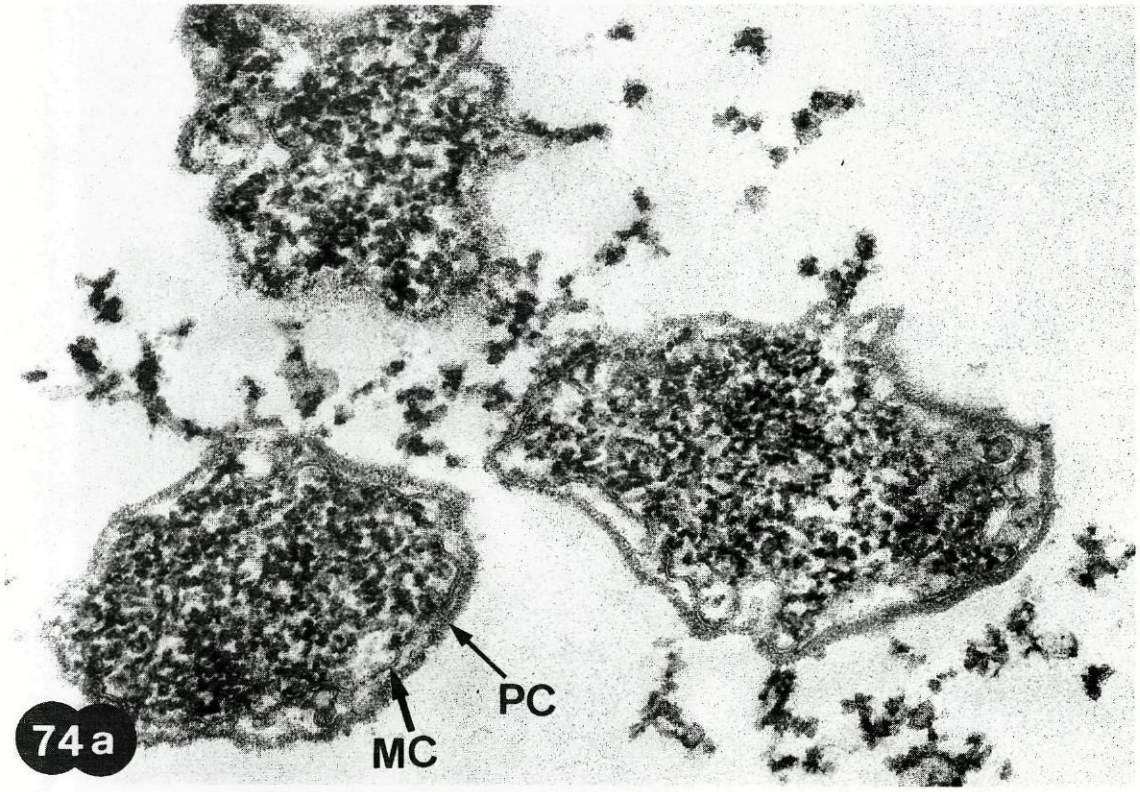
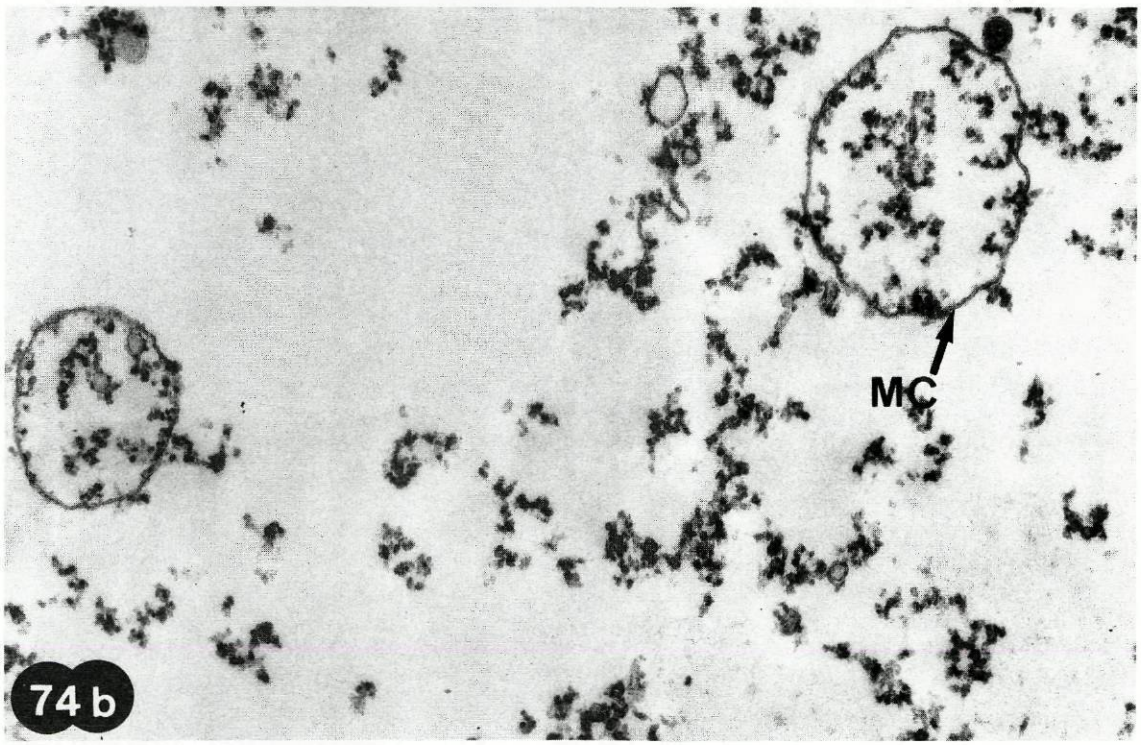


Fig. 73. SDS-PAGE de proteínas contidas nos filtrados das suspensões de *S. faecium* expostas à lisozima (0,4 mg/ml) em tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0). As amostras de lisozima e dos filtrados das suspensões celulares, colhidas aos tempos indicados, foram previamente concentradas (para detalhes ver Materiais e Métodos).

Fig. 74. Ultrastrutura de células de *S. faecium* em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) com lisozima (0,05 mg/ml). (a) Células após 30 min de incubação. (b) restos celulares após 120 min de incubação. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a extensa lise observada. PC - parede celular; MC - membrana citoplasmática com perfil simétrico (a) 51 200 X; (b) 33 600 X.



74a



74b

1.3.2. Aumento da absorvância induzida pela lisozima

Sempre que células congeladas ou não congeladas de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento foram expostas à acção da lisozima em condições que não permitem a bacteriólise, a adição da enzima provocou um aumento dos valores iniciais da A520 das suspensões celulares. Este aumento atingiu um máximo entre 15-30 min de incubação e dependeu da razão lisozima/massa celular. A Fig. 71 revela que ocorre um máximo da A520 quando células congeladas foram incubadas em tampão Tris-HCl contendo lisozima (0,4 mg/ml). Assim, a adição de 0,4 mg/ml de lisozima às suspensões bacterianas com um grande número de células/ml originou aumentos menores que os obtidos com suspensões de bactérias pouco concentradas; os aumentos ocorridos nos três tampões estudados - fosfato de sódio e potássio 0,05 M ou Tris-HCl 0,05 M ou 0,1 M (pH 8,0) - são linearmente correlacionáveis com a concentração bacteriana (Fig. 75).

1.4. Avaliação da participação da actividade autolítica na lise induzida pela lisozima

Mostrámos anteriormente (secção 1.3.1.) que suspensões celulares de *S. faecium* tratadas com lisozima em determinadas condições apresentaram descidas significativas dos valores iniciais da A520 (Figs. 66 e 71).

Como possíveis causas dessas perdas de absorvância considerámos três hipóteses:

a) activação do sistema autolítico de *S. faecium* pela lisozima ou por proteinases contaminantes das nucleases;
b) participação do sistema autolítico de *S. faecium* e da lisozima;
c) acção muralítica exclusiva da lisozima.

Deste modo, estudámos o efeito dum inibidor da actividade proteolítica -

PMSF - e de inibidores da actividade autolítica - CAM e NBS - em suspensões de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento, cultivado na presença de glucose e tratado com lisozima em diferentes tampões.

Contudo, para analisar de forma mais exaustiva as hipóteses atrás colocadas, tornou-se pertinente o estudo da acção daquela enzima nos mutantes EC31 e EC78, deficientes na actividade autolítica (ver capítulo A, secção 1.2.4.3.).

Finalmente, e ainda com o mesmo objectivo, era importante realizar o estudo da acção da lisozima em paredes celulares isoladas quer dos mutantes EC31 e EC78, quer de *S. faecium* cultivado na ausência ou na presença de CAM, dado que a actividade daquela muralisina pode ser mais directamente comparada quando se usam paredes celulares isoladas como substrato (Shockman *et al* ., 1968).

1.4.1. Influência do fluoreto de fenilmetassulfonilo

Quando suspensões de células de *S. faecium* da fase exponencial foram incubadas 120 min a 37 ^{o}C com lisozima, RNase e/ou DNase e Mg^{2+} ou lisozima e RNase em tampões fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl 0,05 M na presença de PMSF (1 mM), observaram-se resultados idênticos aos obtidos na ausência deste inibidor da actividade proteolítica (Tabela XI, pag. 162). O congelamento prévio das suspensões celulares naqueles tampões não alterou de forma significativa os resultados obtidos com células não congeladas (Tabela XI).

Os resultados que acabámos de apresentar indicam que a extensa bacteriólise de *S. faecium* observada em determinadas situações na presença da lisozima não é devida à activação do sistema autolítico endógeno de *S. faecium* por enzimas proteolíticas contaminantes da DNase e eventualmente da lisozima ou da RNase.

1.4.2. Influência do cloranfenicol e da N-bromossuccinimida

Mostrámos no capitulo A (secções 1.2.4.1. e 1.2.4.2.) que a presença da NBS no

tampão de incubação ou do CAM no meio de cultura provocava uma inibição da actividade autolílica de *S. faecium* , mesmo quando incubado em condições que promovem uma extensa autólise das bactérias não expostas àqueles inibidores da actividade autolítica.

Como podemos observar na Fig. 76, não se observou lise celular sempre que se incubaram células da fase exponencial de culturas CAM, não congeladas ou congeladas, em tampões fosfato de sódio e potássio 0,05 M ou 0,1 M contendo respectivamente 0,05 ou 0,4 mg/ml de lisozima - condições que promovem uma extensa lise das células das culturas da estirpe selvagem.

O estudo ultrastrutural de amostras de células de culturas CAM não congeladas, obtidas após duas horas de incubação em tampões fosfato de sódio e potássio 0,05 M com lisozima (0,05 mg/ml) revelou bactérias com paredes não degradadas e ausência de ribossomas (Fig. 77); além disso, estas amostras mostraram ainda blocos de lisozima livre precipitada pelo fixador aldeído; células possuidoras de parede celular foram também observadas após duas horas de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M com 0,4 mg/ml de lisozima (não mostrado).

A influência da NBS na lise de *S. faecium* na presença da lisozima foi estudada apenas em células incubadas em tampão Tris-HCl (pH 8,0),dado que aquele composto, quando adicionado a suspensões celulares em tampão fosfato, provoca precipitação. Células da fase exponencial congeladas, quando expostas duas horas à acção da lisozima (0,05 mg/ml) em tampão Tris-HCl 0,05 M contendo NBS (1mM), apresentavam uma inibição total da lise celular - a absorvância inicial das suspensões permaneceu constante durante todo o tempo de incubação. Como mostrámos anteriormente (Figs. 71; 74a-74b), bactérias não congeladas ou previamente congeladas, quando expostas à acção da lisozima (0,05 mg/ml) em Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) na ausência da NBS, registaram uma extensa lise celular.

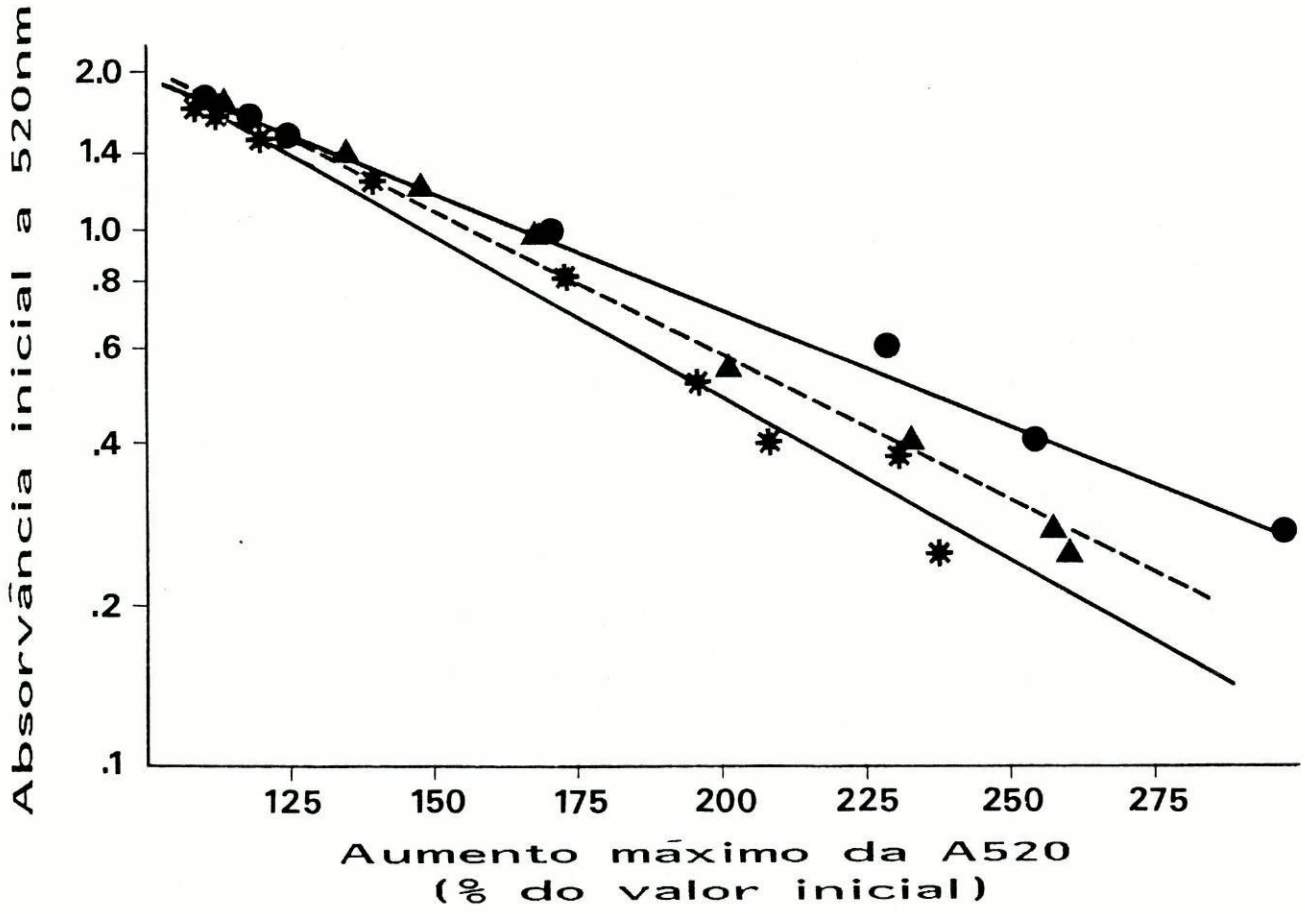


Fig. 75. Aumento da A520 de suspensões celulares de *S. faecium* tratadas com lisozima em tampões Tris-HCl ou tampão fosfato de sódio e potássio. A absorvância inicial das suspensões (0,2-1,7) foi designada por 100%. A adição de 0,4 mg/ml de lisozima às diferentes suspensões provocou um aumento na absorvância inicial. O valor mais elevado da A520 de cada suspensão foi registado como % do valor inicial (para detalhes ver texto). Símbolos: (✱) tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0); (●) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0); (▲) tampão Tris-HCl 0,1 M (pH 8,0).

Influência do PMSF na lise de S.faecium induzida pela lisozima

Culturas		Tampão de incubação					
		Fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0)			Tris-HCl 0,05 M (pH8,0)		
		Lis+ RNase	Lis+DNase Mg^{2+}	Lis + DNase+ RNase+ Mg^{2+}	Lis+ RNase	Lis+ DNase+ Mg^{2+}	Lis+ DNase+ RNase+ Mg^{2+}
Não congeladas	A	23	86	15	104	96	60
	C	21	ND	19	ND	ND	69
Congeladas	A	24	81	12	101	91	61
	C	27	87	11	ND	89	68

Tabela XI. Células não congeladas ou congeladas* foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) e incubadas durante 120 min a 37 °C, nas condições indicadas na presença (C) ou na ausência (A) de PMSF (1 mM). As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. A lisozima, DNase, RNase e o Mg^{2+} foram adicionados respectivamente nas concentrações finais de 0,4 ; 0,01; 0,01 mg/ml e 10 mM. A lise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares. Os resultados indicados representam os obtidos aos 120 min e estão expressos como % do valor inicial. ND-não determinado. *A congelação efectuou-se nos tampões usados posteriormente na incubação.

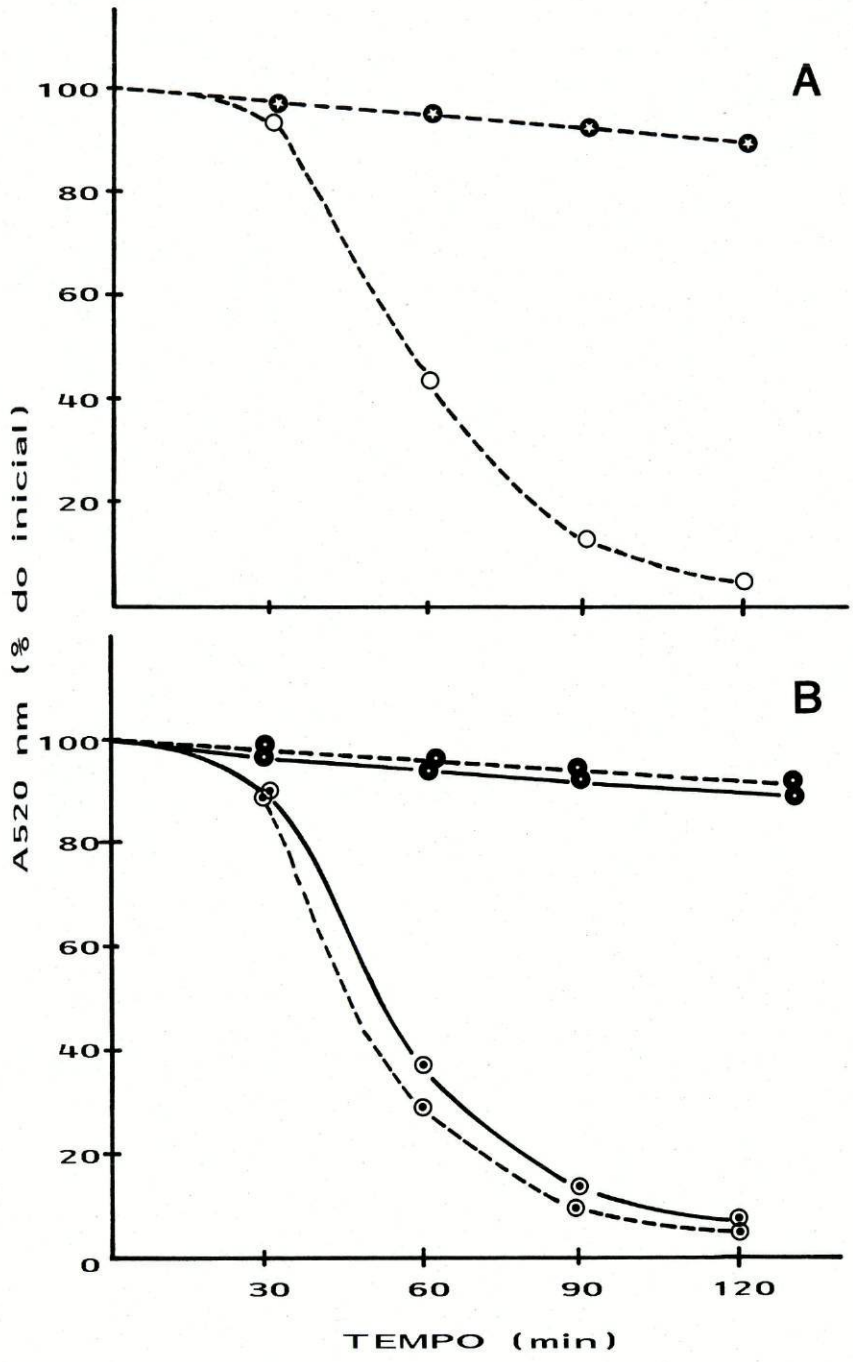


Fig. 76. Cinéticas da lise de células não congeladas (---) ou congeladas (—), colhidas na fase exponencial de crescimento, de culturas selvagens (⊙ , ○) ou CAM (● , ✪) de *S. faecium* incubado a 37 °C em tampões fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de 0,05 mg/ml de lisozima (A) ou 0,1 M (pH 8,0) na presença de 0,4 mg/ml de lisozima (B). As suspensões continham 7,2 x 10^8 células /ml. Notar em (A) e (B) a reduzida taxa de lise das células expostas ao CAM.

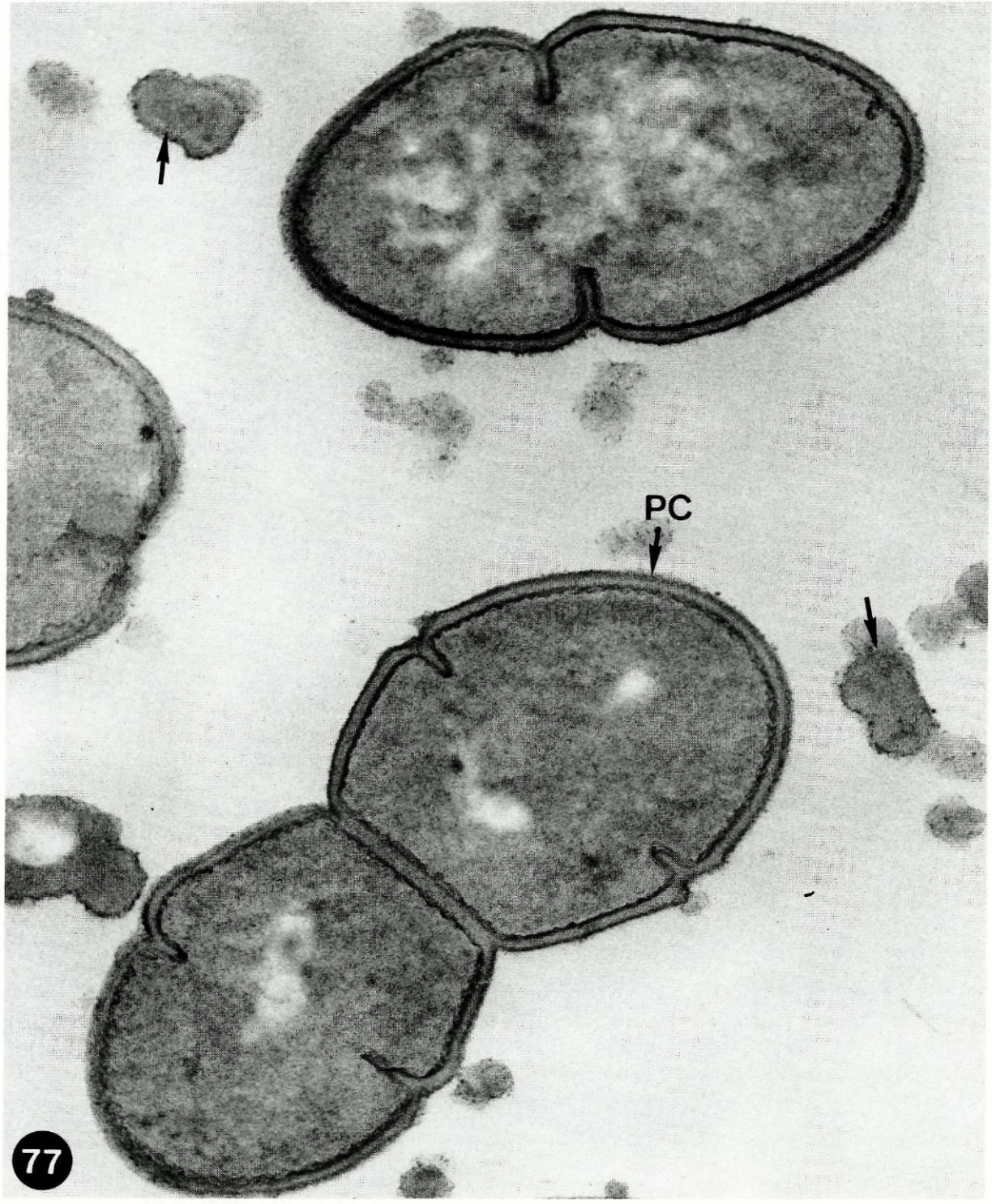


Fig. 77. Ultrastrututra de células de *S. faecium* expostas ao CAM após 120 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato 0,05 M (pH 8,0) na presença de 0,05 mg/ml de lisozima. As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. Notar que não se observou degradação da parede celular (PC) e que após duas horas de incubação são visíveis blocos livres de lisozima (setas) precipitada pelo fixador aldeído. PC - parede celular. 67 200 X.

1.4.3. Acção da lisozima nos mutantes EC31 e EC78 de *S. faecium*

Dado que os mutantes EC31 e EC78 não autolisam (ver Capitulo A, secção 1.2.4.3.) deveriam constituir modelos óptimos para verificar a influência do sistema autolítico endógeno na acção muralítica da lisozima.

Células dos mutantes EC31 ou EC78 da fase exponencial de crescimento (A520 = 0,5-0,6) não congeladas ou congeladas, quando incubadas 120 min a 37 ^{o}C em tampões fosfato de sódio e potássio 0,05 M ou 0,1 M (pH 8,0) na presença de diferentes concentrações de lisozima, não apresentaram lise celular significativa, mesmo nas condições que promovem uma extensa bacteriólise da estirpe selvagem (Tabela XII, pag. 167).

Na Fig. 78 pode observar-se o aspecto ultrastrutural do mutante EC31 após duas horas de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M com lisozima (0,05 mg/ml). Esta microfotografia revela que, nestas condições e contrariamente ao que acontece com a estirpe selvagem, a parede celular deste mutante permaneceu intacta.

A imagem ultrastrutural do mutante EC78 após duas horas de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M contendo lisozima (0,4 mg/ml), documentada na Fig. 79a, revela paredes celulares pouco degradadas; contudo, nestas condições, quando amostras paralelas foram fixadas unicamente pelo tetróxido de ósmio, observou-se em numerosas células uma degradação significativa da parede celular (Fig. 79b); utilizando o mesmo método de fixação, foram obtidas idênticas imagens deste mutante após duas horas de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M com 0,05 mg/ml de lisozima (não mostrado).

Curiosamente, quando nestes mutantes a acção da lisozima foi estudada em tampões Tris-HCl (pH 8,0) obtivemos resultados diversos dos que acabámos de descrever. Como revela a Fig. 80, sempre que a incubação se efectuou em tampões Tris-HCl 0,05 M na presença de diversas concentrações de lisozima, observou-se uma clarificação das suspensões celulares dependente da concentração de enzima utilizada.

O estudo ultrastrutural de amostras de células não congeladas do mutante EC78, após duas horas de incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M contendo lisozima (0,4 mg/ml), mostrou que as células estavam desprovidas de parede celular e que a matriz citoplasmática possuía quantidades apreciáveis de materiais electronodensos (Fig. 81a).

A Fig. 81b mostra que o mutante EC31, após duas horas de incubação no tampão referido no parágrafo anterior, contendo 0,05 mg/ml de lisozima, também perdeu completamente a parede celular.

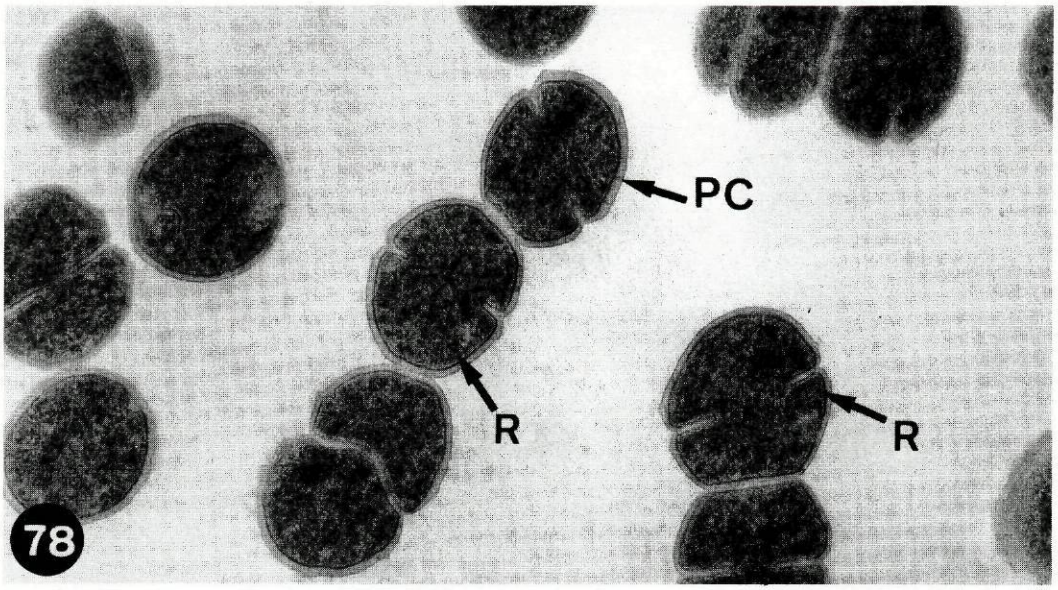
Influência da concentração da lisozima e do tampão na lise de S.faecium e dos mutantes EC31 e EC78

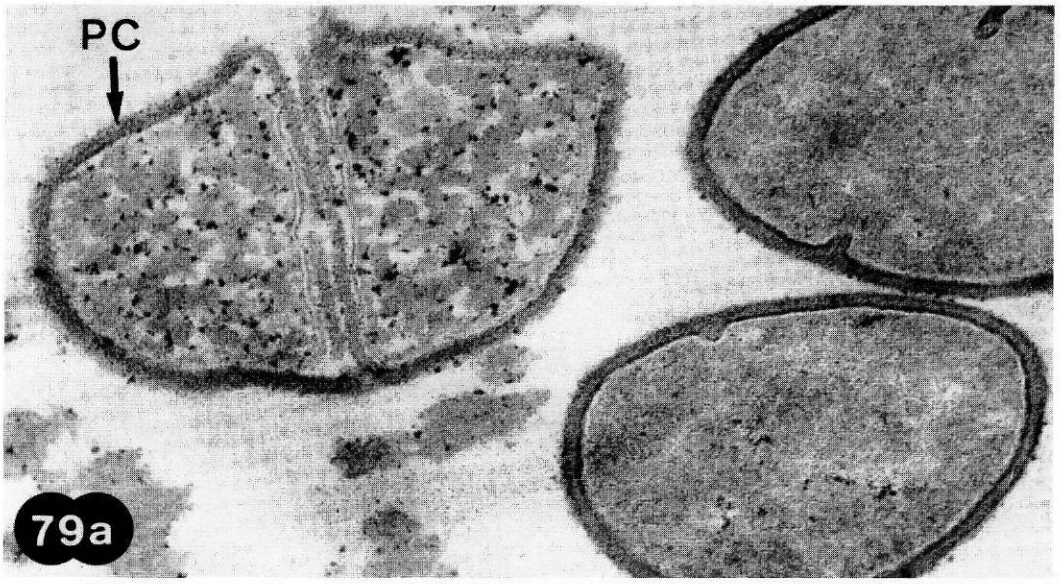
Condições experimentais		Estirpe	Lisozima (mg/ml)					
			0,01	0,05	0,1	0,2	0,3	0,4
Células não congeladas		EC31	ND	93	92	95	99	103
	0,05M	EC78	ND	59	61	89	100	104
		WT	ND	5	6	36	93	105
Tampão fosfato de sódio		EC31	94	93	94	ND	ND	95
e potássio (pH 8,0)	0,1M	EC78	ND	89	88	88	87	90
		WT	ND	18	12	7	6	5
Células congeladas		EC31	ND	86	87	89	90	96
	0,05M	EC78	ND	63	67	88	103	104
		WT	34	9	13	40	95	106
Tampão fosfato de sódio		EC31	ND	95	95	ND	95	95
e potássio (pH 8,0)	0,1M	EC78	ND	86	85	81	81	80
		WT	89	48	27	10	8	6

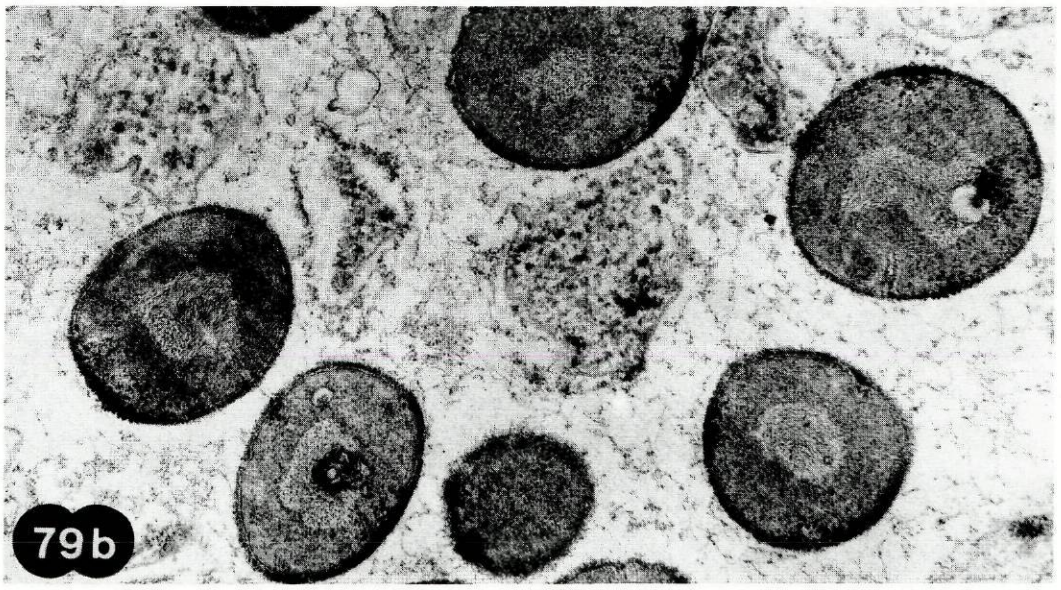
Tabela XII. Células não congeladas ou congeladas* de *S. faecium* e dos mutantes EC31 e EC78 foram suspensas ($7,2 \times 10^8$ células/ml) nos tampões indicados e incubadas 120 min a 37 °C na presença de diferentes concentrações de lisozima. As células foram colhidas na fase exponencial de crescimento. A lise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares. Os resultados indicados representam os obtidos aos 120 min de incubação e estão expressos como % do valor inicial. ND - não determinado; *a congelação efectuou-se nos tampões a utilizar posteriormente na incubação.

Fig. 78. Aspecto ultrastrutural do mutante EC31 da fase exponencial de crescimento, não congelado, após duas horas de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo 0,05 mg/ml de lisozima. Notar a parede celular intacta (PC) e na matriz citoplasmática a presença de ribossomas (R). 28 800X.

Fig. 79. Aspecto ultrastrutural do mutante EC78 após duas horas de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) contendo 0,4 mg/ml de lisozima. (a) amostra fixada pelo G A e pelo tetróxido de ósmio; (b) amostra fixada pelo tetróxido de ósmio. As células da fase exponencial de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar em (a) o início da degradação da parede celular (PC) e em (b) a degradação acentuada de numerosas células. (a) 60 000 X; (b) 32 400 X.


PC
R
R
78


PC
79a


79b

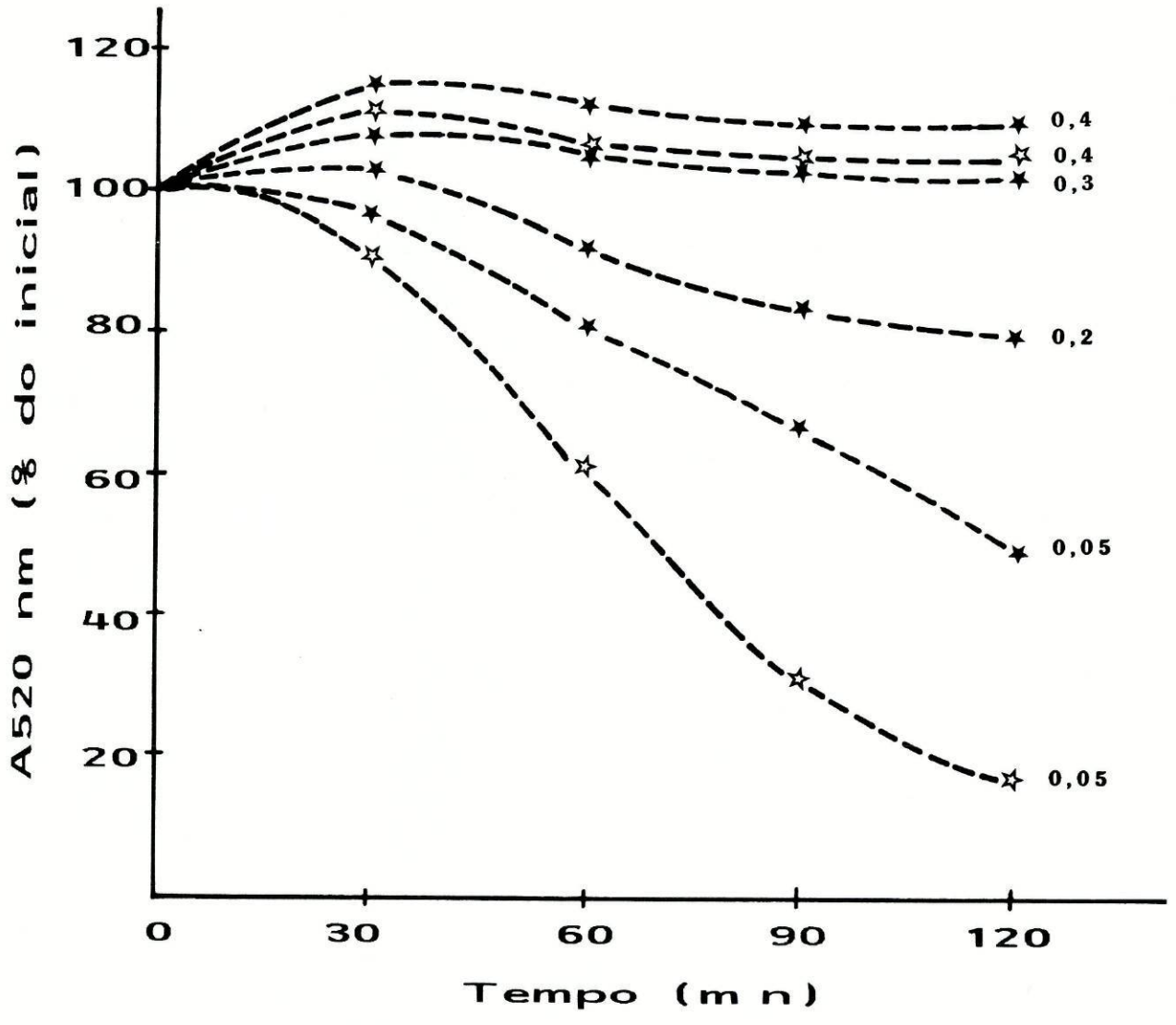
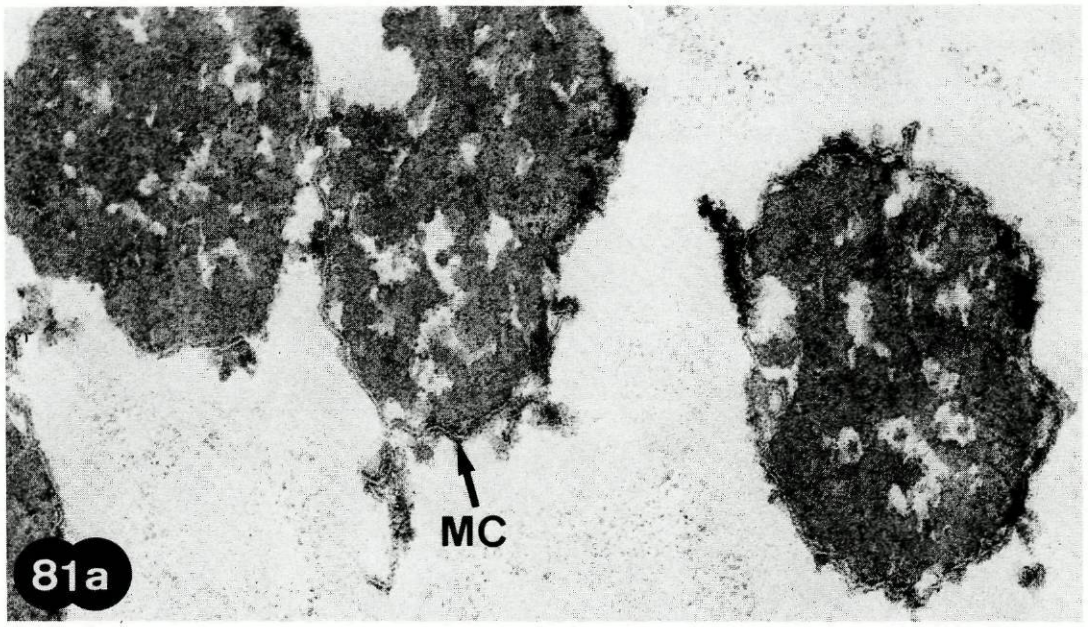
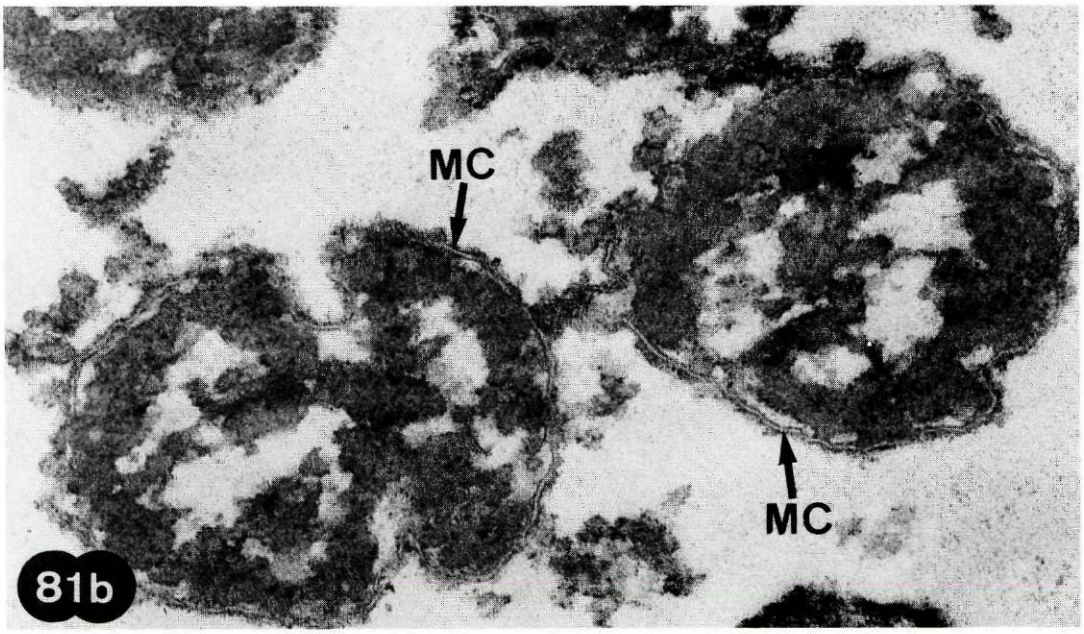


Fig. 80. Cinéticas da lise dos mutantes EC31 e EC78 induzida por diferentes concentrações de lisozima em tampão Tris-HCl. Células da fase exponencial de crescimento foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) e incubadas 120 min a 37 ^oC em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) na presença das concentrações de lisozima indicadas (em mg/ml). Os valores registados estão expressos como % do valor inicial da A520 das suspensões celulares. Símbolos: (✶) mutante EC31; (✡) mutante EC78.

Fig. 81. Ultrastrutura do mutante EC78 (a) e do mutante EC31 (b) não congelados, incubados em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0), durante 120 min a 37 ^{o}C com lisozima, respectivamente nas concentrações de 0,4 e 0,05 mg/ml. Notar nas duas situações a completa ausência da parede celular. MC - membrana citoplasmática. (a) 60 000 X; (b) 64 000 X.


MC
81a


MC
MC
81b

1.5. Influência da idade da cultura na eficiência de lise

Experiências realizadas com células de *S. faecium* do início da fase estacionária (A520 = 1,050; ver Fig. 33) forneceram resultados de espectrofotometria idênticos aos descritos com células da fase exponencial de crescimento incubadas em diferentes condições, nos tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) - Tabela XIII. Contudo, a degradação da parede celular não ocorreu com o mesmo ritmo nestes dois tipos de células.

A análise ultrastrutural de amostras obtidas após 15 min, 30 min ou 120 min de exposição à acção da lisozima (0,4 mg/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (Figs. 82a - 82c) mostrou que a degradação da parede das células da fase estacionária por aquela enzima muralítica é mais lenta do que a observada com a das células da fase exponencial (comparar Fig. 82a com Fig. 55c; Fig. 82b com Fig. 55d); nas células da fase estacionária, após duas horas de incubação, observaram-se ainda restos da parede celular (Fig. 82c), contrariamente ao observado com as células da fase exponencial (Fig. 55e).

A comparação das amostras da fase estacionária (Fig. 83) com as da fase exponencial (Fig. 57) incubadas no tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M contendo lisozima e RNase ou no tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (respectivamente Fig. 84 e 61) reforça a conclusão de que as paredes das células da fase estacionária são mais resistentes à acção degradativa da lisozima que a parede das células da fase exponencial.

Influência das condições de crescimento na lise de *S. faecium* induzida pela lisozima

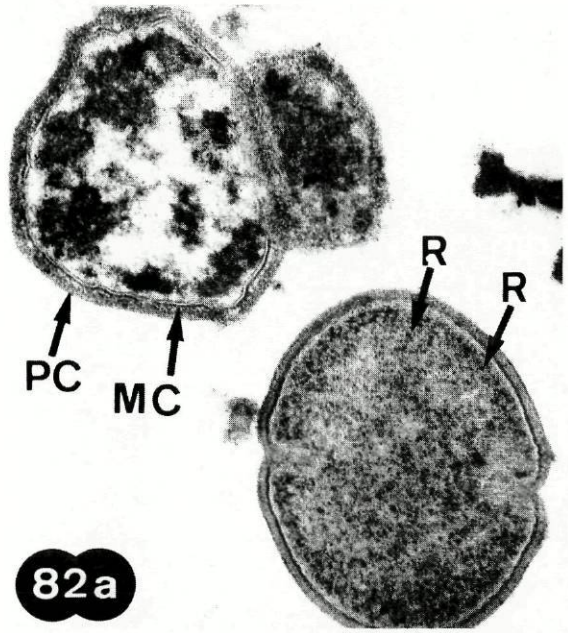
Condições Experimentais		% da A520 inicial com a adição de:			
		Lis	Lis + RNase	Lis + DNase + Mg SO 4	Lis + RNase + DNase + Mg SO 4
Fase exponencial					
Tampão fosfato 0,05M (pH 8,0)	A	106	24	81	12
	D	96	25	59	8
Tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0)	A	106	101	91	61
	D	105	98	59	59
Fase estacionária					
Tampão fosfato 0,05M (pH 8,0)	A	101	26	68	17
	D	92	27	ND	12
Tampão Tris-HCl 0,05M (pH 8,0)	A	105	104	88	59
	D	102	95	49	48

Tabela XIII. Células exponenciais ou estacionárias de *S. faecium* crescidas em meio com glucose (A) ou sem glucose (D) foram suspensas (7,2 x 10^8 células/ml) e incubadas 120 min a 37 ^{o}C nas condições indicadas. As células das fases exponencial ou estacionária de crescimento foram congeladas * antes da incubação. A lise foi seguida pela determinação da A520 das suspensões celulares. Os resultados indicados representam os obtidos aos 120 min de incubação e estão expressos como % do valor inicial. *A congelação efectuou-se nos tampões a utilizar posteriormente na incubação. ND-não determinado.

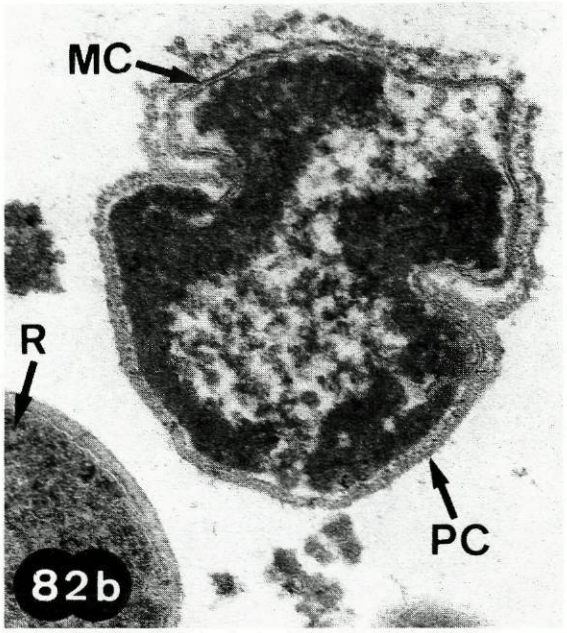
Fig. 82. Ultrastrutura de células congeladas de *S. faecium*, da fase estacionária de crescimento, após (a) 15 min, (b) 30 min ou (c) 120 min de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) com lisozima (0,4 mg/ml). Notar aos 15 min de incubação a presença de ribossomas (R) na matriz citoplasmática das células intactas; comparar Figs. 82a com 55c, Figs. 82b com 55d e Figs. 82c com 55e. MC - membrana citoplasmática.
(a) 43 200 X ; (b) 54 000 X; (c) 54 000 X.

Fig. 83. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 30 min de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de lisozima (0,4 mg/ml) e de RNase (0,01 mg/ml). As células da fase estacionária de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. MC - membrana citoplasmática. PC - parede celular. Comparar com Fig. 57a. 64 800 X.

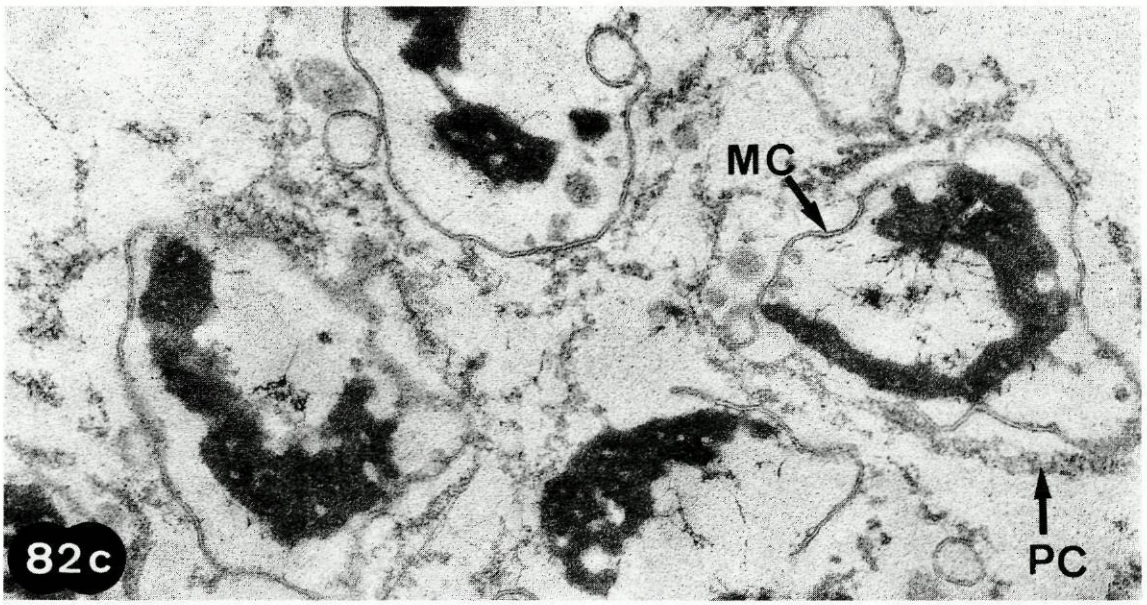
Fig. 84. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 60 min de incubação em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml). As células da fase estacionária de crescimento foram congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar a degradação generalizada da parede celular (PC) e a membrana citoplasmática com perfil simétrico (MC). Comparar com Fig. 61b. 51 300 X.



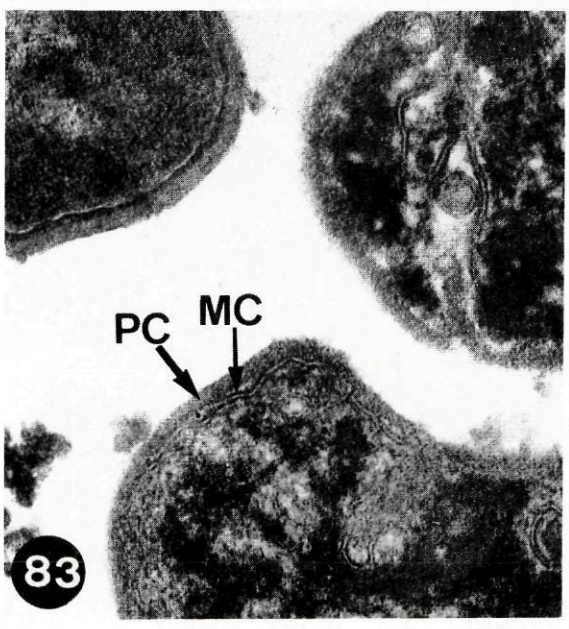
82a



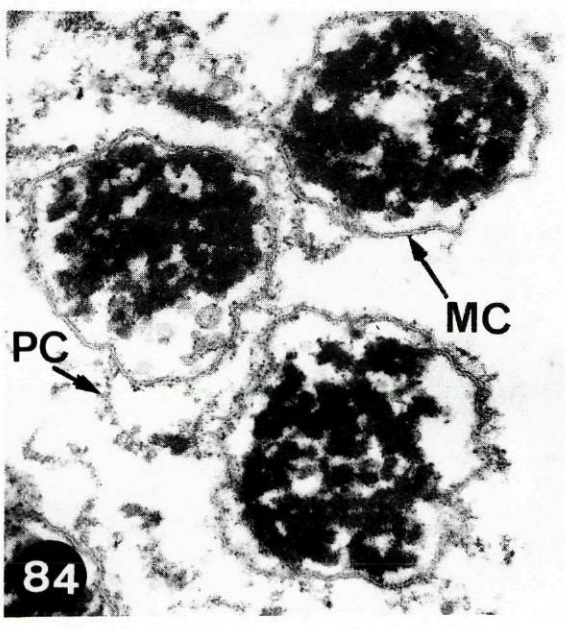
82b



82c



83



84

1.6. Influência das condições de crescimento na eficiência de lise

Mostrámos no Capítulo A (secção 1.2.6) a influência da glucose no crescimento e na autólise de *S. faecium*. No intuito de avaliar se nesta bactéria as condições de crescimento interferiam na lise induzida pela lisozima, realizámos também o estudo da hetrerólise com células cultivadas na ausência de glucose (meio T_1).

Os resultados referentes à lise induzida pela lisozima nas células das fases exponencial ou estacionária de crescimento cultivadas na presença ou na ausência de glucose encontram-se na Tabela XIII, pag. 172. Este estudo de espectrofotometria revelou que as descidas dos valores da A520 das suspensões celulares foram semelhantes, excepto quando no tampão de incubação contendo lisozima se adicionou DNase (0,01mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM). A Fig. 85 mostra que as cinéticas de lise (em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M contendo lisozima, DNase e Mg^{2+}) das células cultivadas no meio sem glucose é mais rápida e extensa, do que a das células cultivadas no meio com glucose; idênticos valores foram obtidos quando no tampão de incubação contendo lisozima se adicionou Mg^{2+}(não mostrado).

Os estudos ultrastruturais realizados quer em tampão fosfato, quer em tampão Tris-HCl, mostraram que a membrana citoplasmática das células cultivadas no meio sem glucose, possuía quantidades menores de materiais electronodensos a ela agregados (Fig. 86a e Fig. 87), do que a das células cultivadas no meio com glucose (Fig. 86b e Fig. 56).

A degradação pela lisozima da parede das células cultivadas na ausência de glucose foi mais rápida nas da fase exponencial do que nas da fase estacionária; células desta última fase, após duas horas de incubação com lisozima (0,4 mg/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) apresentaram ainda vestígios da parede celular degradada (Fig. 88b) enquanto que, em idênticas condições, nas células da fase exponencial ocorreu a degradação completa desta estrutura (Fig. 88a). A degradação das células da fase exponencial após 60 min de incubação em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M contendo lisozima, DNase e Mg^{2+} (Fig. 89a), quando comparada com a ocorrida nas células da fase estacionária incubadas nessas

condições (Fig. 89b), exemplifica também a maior resistência das células desta última fase à acção muralítica da lisozima.

Independentemente da fase de crescimento, a degradação celular foi mais rápida quando a lisozima actuou em tampão Tris-HCl (Fig. 90a e 90b) do que em tampão fosfato (Fig. 91b e 91b); ao fim de uma hora, nas células incubadas em tampão Tris-HCl contendo lisozima e Mg^{2+}, a parede celular tinha sido totalmente degradada (Fig. 91a), enquanto que as células em tampão fosfato apresentavam esta estrutura, ainda que muito degradada (Fig. 91b).

A degradação das células das fases exponencial ou estacionária, cultivadas na ausência de glucose, quando expostas unicamente à acção da lisozima (repectivamente Figs. 88a e 88b), foi semelhante à observada com células das fases exponencial (Fig. 55e) ou estacionária (Fig. 82) provenientes do meio com glucose quando submetidas ao mesmo tratamento. Idênticas imagens foram obtidas com células cultivadas nos dois tipos de meios quando incubadas na presença da lisozima em tampões Tris-HCl (comparar Figs. 90a com 61a e Figs. 90b com 55c).

Na bacteriólise induzida pela lisozima em *S. faecium* , cultivado na ausência de glucose, verificou-se um efeito estimulatório da RNase, sobretudo quando associada à DNase e ao Mg^{2+} (Tabela XIII) - um resultado que corrobora os anteriormente obtidos com células cultivadas no meio provido de glucose (meio T).

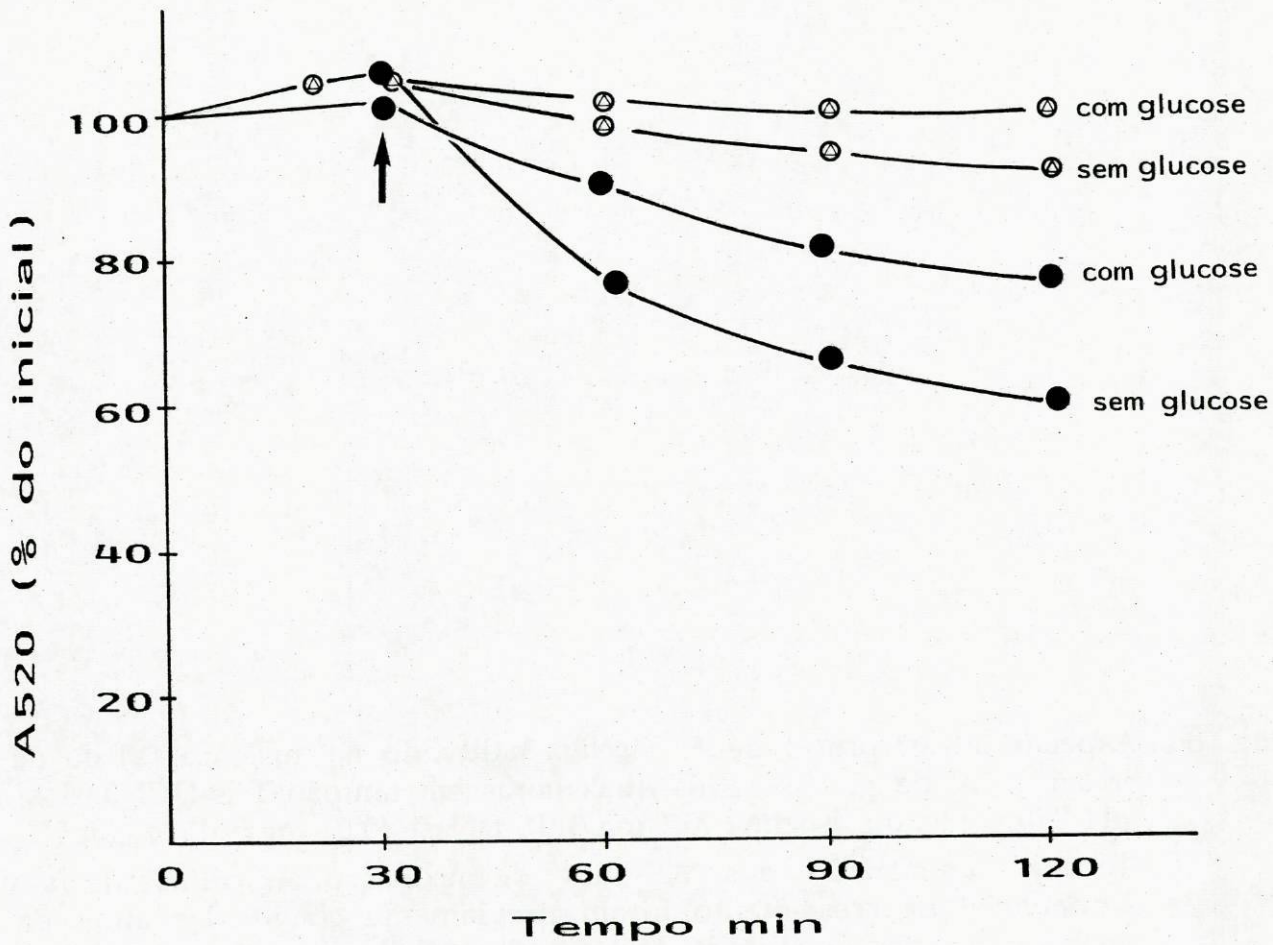
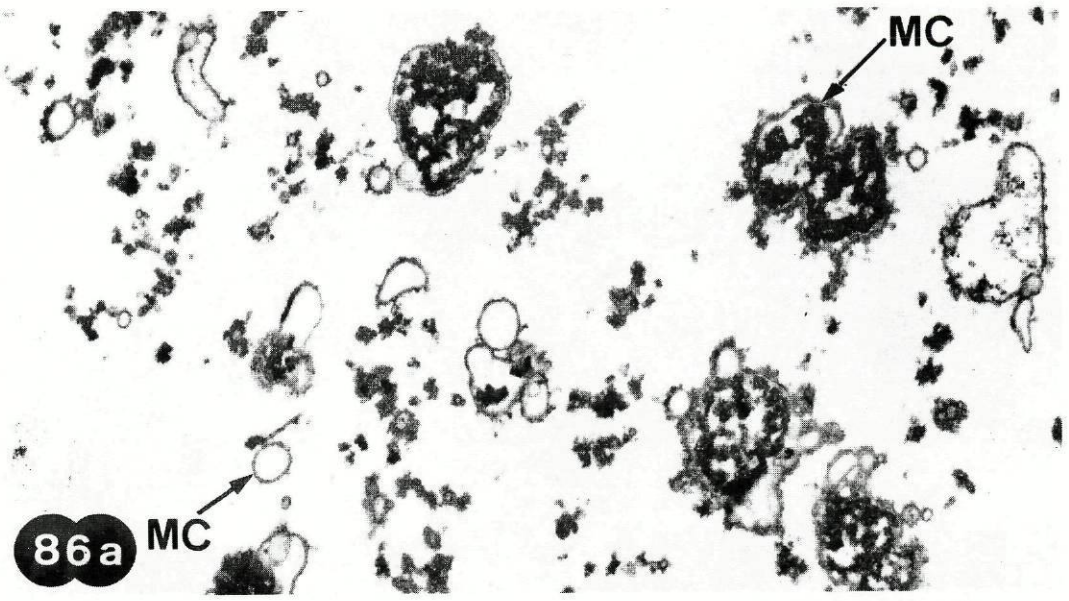
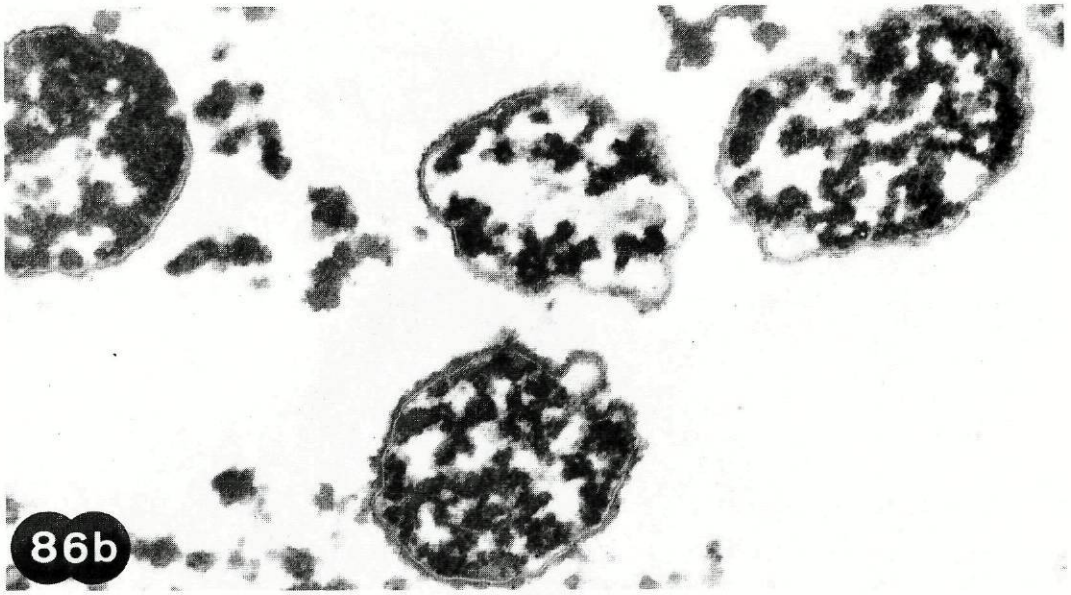


Fig. 85. Influência da glucose na lise de *S. faecium* induzida pela lisozima. Células da fase exponencial de crescimento e cultivadas na presença ou na ausência de glucose (conforme indicado) foram previamente congeladas e incubadas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo 0,4 mg/ml de lisozima (◬) ou 0,4 mg/ml de lisozima, 0,01 mg/ml de DNase e 10 mM de $MgSO_4$ (●) adicionado aos 30 min de incubação (seta).

Fig. 86. Aspecto ultrastrutural de *S. faecium* cultivado na ausência (a) ou na presença (b) de glucose após duas horas em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e $MgSO_4$ (10 mM) adicionado aos 30 min de incubação. As células da fase exponencial de crescimento foram previamente congeladas antes da incubação no tampão indicado. MC - membrana citoplasmática (a) 28 800 X; (b) 46 000 X.

Fig. 87. Ultrastrutura de células de *S. faecium* cultivado em meio sem glucose após 120 min de incubação a 37 ^{o}C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e $MgSO_4$ (10 mM) adicionado aos 30 min de incubação. As células da fase exponencial foram previamente congeladas antes da incubação no tampão indicado. MC - membrana citoplasmática com perfil simétrico. 64 800 X.


MC
MC
86a


86b

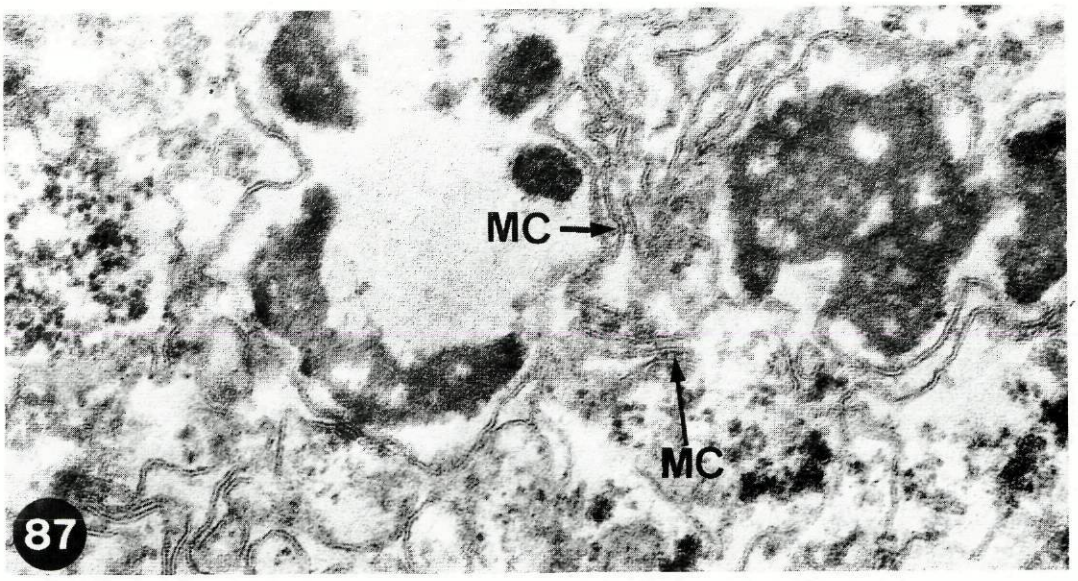
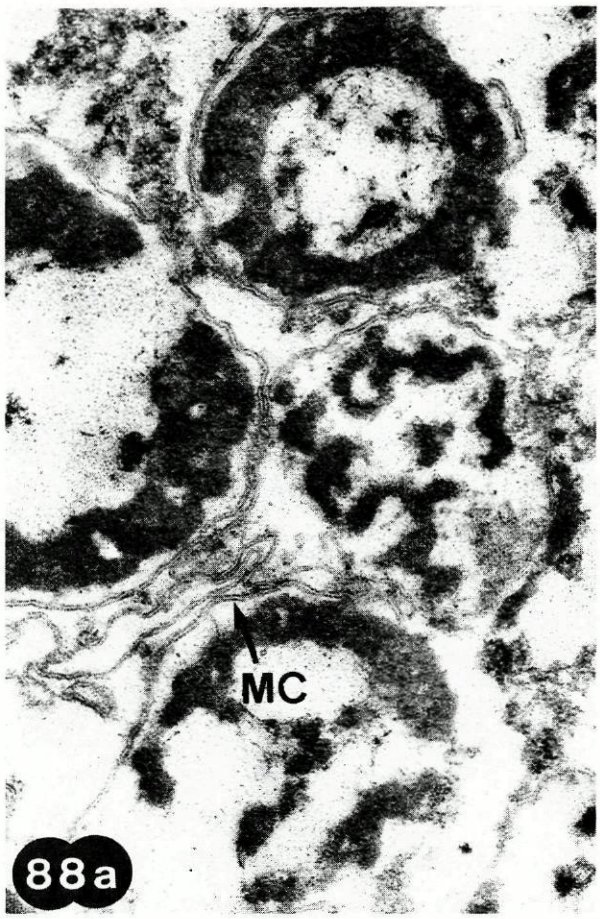
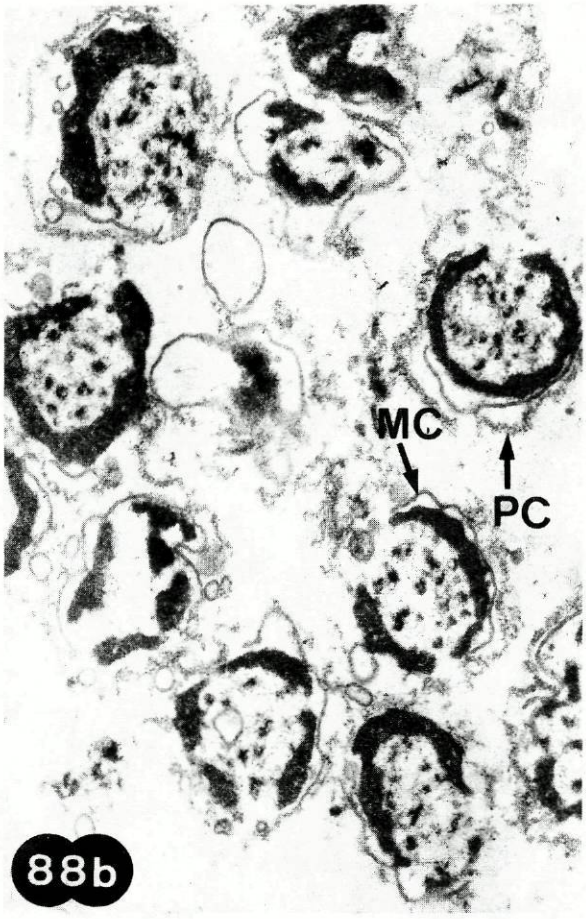
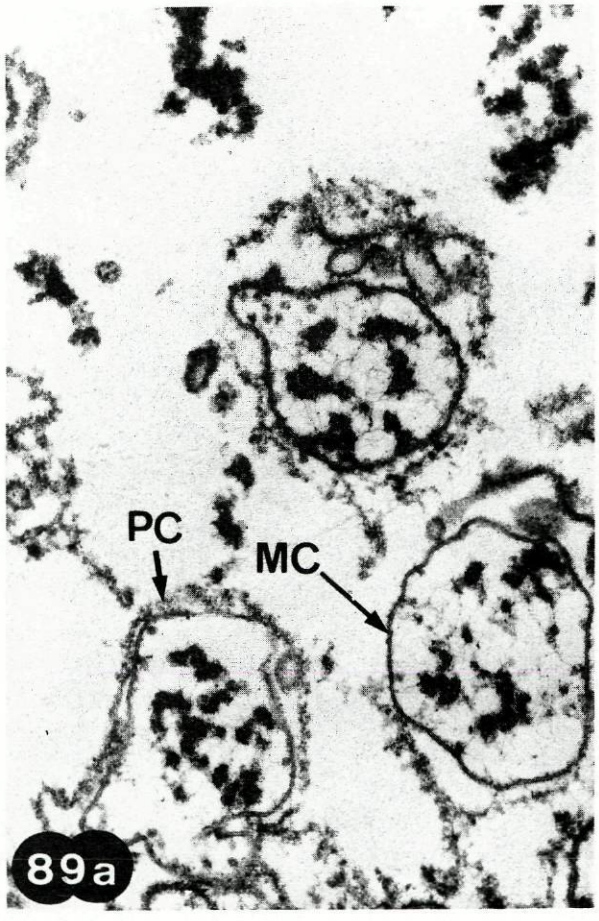

MC
MC
87

Fig. 88. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após duas horas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) na presença de lisozima (0,4 mg/ml). As células das fases exponencial (a) ou estacionária (b) de crescimento foram cultivadas na ausência de glucose, e congeladas antes da incubação no tampão indicado. Notar em (b) a presença da parede celular degradada (PC). MC - membrana citoplasmáticacom perfil simétrico.
(a) 62 400 X; (b) 22 400 X.

Fig. 89. Ultrastrutura de células de *S. faecium* após 60 min de incubação a 37 °C em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e $MgSO_4$ (10 mM) adicionado aos 30 min de incubação. As células foram cultivadas na ausência de glucose, colhidas na fase exponencial (a) ou estacionária (b) de crescimento e congeladas antes da incubação. PC - parede celular; MC- membrana citoplasmática.
(a) 57 600 X; (b) 17 600 X.


MC
88a


MC
PC
88b


PC
MC
89a

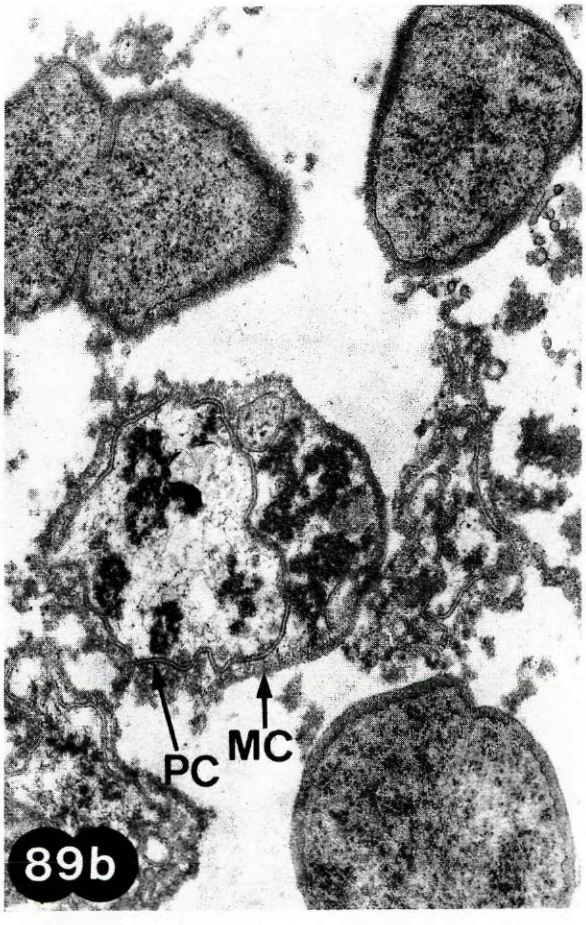
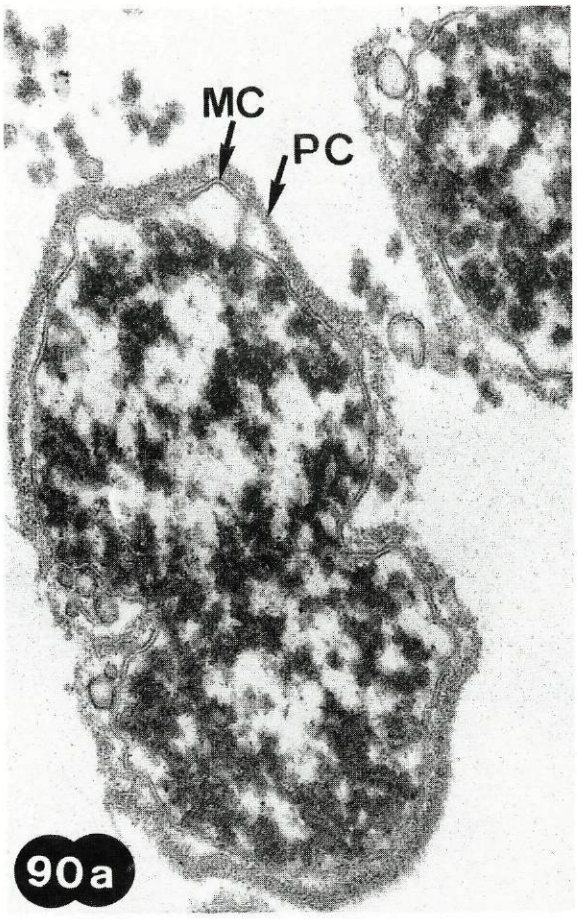
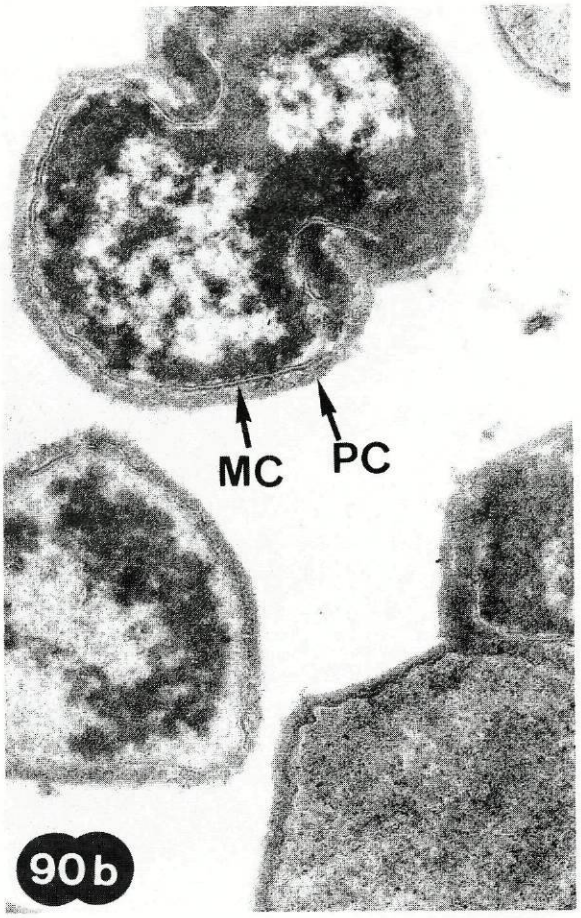

PC
MC
89b

Fig. 90. Ultrastrutura de células *S. faecium* após 15 min de incubação na presença de lisozima (0,4 mg/ml) em (a) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) ou em (b) tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0). As células da fase exponencial de crescimento foram cultivadas em meio sem glucose. MC - membrana citoplasmática com perfil simétrico; PC - parede celular.
(a) 60 000 X; (b) 37 500 X.

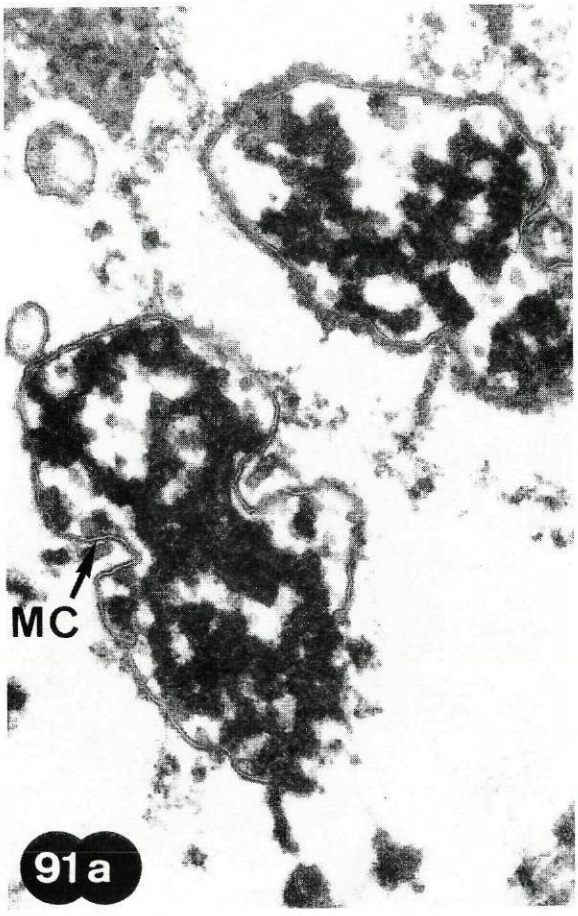
Fig. 91. Ultrastrutura de células da fase estacionária de *S. faecium* após 60 min de incubação na presença de lisozima (0,4 mg/ml) e de Mg^{2+} (10 mM) em (a) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) ou em (b) tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0). As células foram cultivadas em meio sem glucose. MC - membrana citoplasmática com perfil simétrico; PC - parede celular.
(a) 50 000 X; (b) 48 000 X.



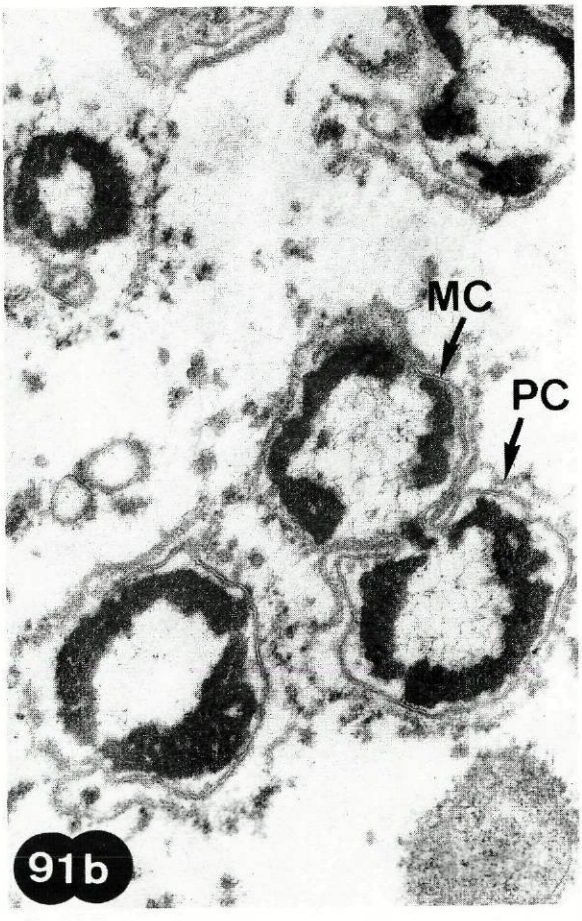
90a



90b



91a



91b

2. Lise de paredes celulares isoladas

Os estudos realizados mostram que ocorre em condições apropriadas uma lise acentuada de *S. faecium* em tampões fosfato contendo lisozima (seccão 1.3.1.) e uma redução marcada do grau de lise das bactérias cultivadas na presença de CAM (secção 1.4.2.). Mostrámos ainda que os mutantes EC31 e EC78, deficientes na actividade autolítica, revelam uma reduzida taxa de lise celular induzida por esta muralisina (secção 1.4.3.). Por outro lado, as taxas de autólise das paredes celulares isoladas de células de culturas CAM ou de células do mutante EC31 foram inferiores às das paredes celulares isoladas de células da estirpe selvagem (capítulo A, secção 2.).

No intuito de avaliar se na reduzida taxa de lise induzida pela lisozima quer nas células CAM, quer nas dos mutantes, participa uma menor sensibilidade das paredes a esta muralisina, estudou-se a acção da lisozima nas paredes isoladas daquelas células e compararam-se esses resultados com os obtidos com paredes isoladas de células da estirpe selvagem, sujeitas às mesmas condições. Foram ainda realizados estudos paralelos em paredes previamente tratadas com SDS.

A Fig. 92A mostra que as paredes isoladas de células de culturas CAM ou do mutante EC31 lisam menos por acção da lisozima do que as isoladas das células da estirpe selvagem. Os valores de K (ver Materiais e Métodos, secção 2.4.2.) obtidos em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) com lisozima (0,05 mg/ml) foram 1,72; 0,78 e 0,82 respectivamente, para as paredes isoladas das células da estirpe selvagem, CAM e do mutante EC31.

A incubação destes dois tipos de paredes, previamente tratadas com SDS, em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) contendo lisozima originou taxas de lise inferiores às verificadas com paredes isoladas não tratadas por aquele detergente; os valores de K encontrados foram respectivamente 0,76; 0,56 e 0,24, para paredes isoladas de células da estirpe selvagem, do mutante EC31 ou de culturas CAM.

Os valores de K destas taxas indicam que as paredes isoladas quer de células de

culturas CAM, quer do mutante EC31, constituem pior substrato para a acção muralítica da lisozima, do que as paredes isoladas das células da estirpe selvagem.

A Fig. 93a mostra a degradação das paredes isoladas de células da estirpe selvagem, após 50 min de incubação nas condições referidas na Fig. 92A; as paredes isoladas das células de culturas CAM, quando incubadas 50 min nessas condições, permaneceram intactas (Fig. 93b) mas, após duas horas de incubação apresentaram-se já parcialmente degradadas (Fig. 93c).

As imagens ultrastruturais de amostras incubadas nas condições referidas na Fig. 92B mostraram ausência de degradação das paredes isoladas quer da estirpe selvagem (Figs. 94a), quer das células CAM incubadas 50 min (Fig. 94b), ou 120 min (Fig. 94c).

3. Características das membranas isoladas por heterólise induzida pela lisozima

Mostrámos anteriormente que células de *S. faecium* cultivadas na presença de glucose,quando tratadas com lisozima em tampões fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl (pH 8,0),captam quantidades apreciáveis desta enzima (secções 1.2.1. e 1.2.2.) e sugerimos (secção 1.2.1.) a possibilidade da sua ligação extensa a grupos acídicos da célula bacteriana. No intuito de verificar se a lisozima se ligava à membrana citoplasmática, realizámos a análise electroforética das proteínas de membranas isoladas de células cultivadas quer na presença, quer na ausência de glucose, após heterólise com lisozima.

O estudo ultrastrutural das membranas isoladas após heterólise em tampão fosfato revelou que possuem um perfil simétrico (Fig. 58) e que são significativamente mais espessas ($P < 0,01$) que as obtidas após autólise quer em tampão fosfato, quer em tampão Tris-HCl (Tabela IX, pag. 116).

As análises electroforéticas das proteínas das membranas isoladas de células previamente congeladas em tampões fosfato de sódio e potássio (Fig. 65) ou Tris-HCl (Fig. 95) contendo lisozima RNase, DNase e Mg^{2+} mostraram quantidades apreciáveis desta muralisina - 30 - 40 % das proteínas totais das membranas - associadas à

membrana citoplasmática.

Membranas isoladas de células cultivadas na ausência de glucose após heterólise em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) contendo lisozima (0,4 mg/ml), RNase (0,01 mg/ml), DNase (0,01 mg/ml) e Mg^{2+} (10 mM) revelaram um perfil simétrico e continuo, tipo "unit membrane" (não mostrado), semelhante ao observado na Fig. 58. A análise electroforética das proteínas destas membranas mostrou um perfil proteico contendo também lisozima, mas diferente do obtido com as membranas das células cultivadas na presença daquele hidrato de carbono (Fig. 96).

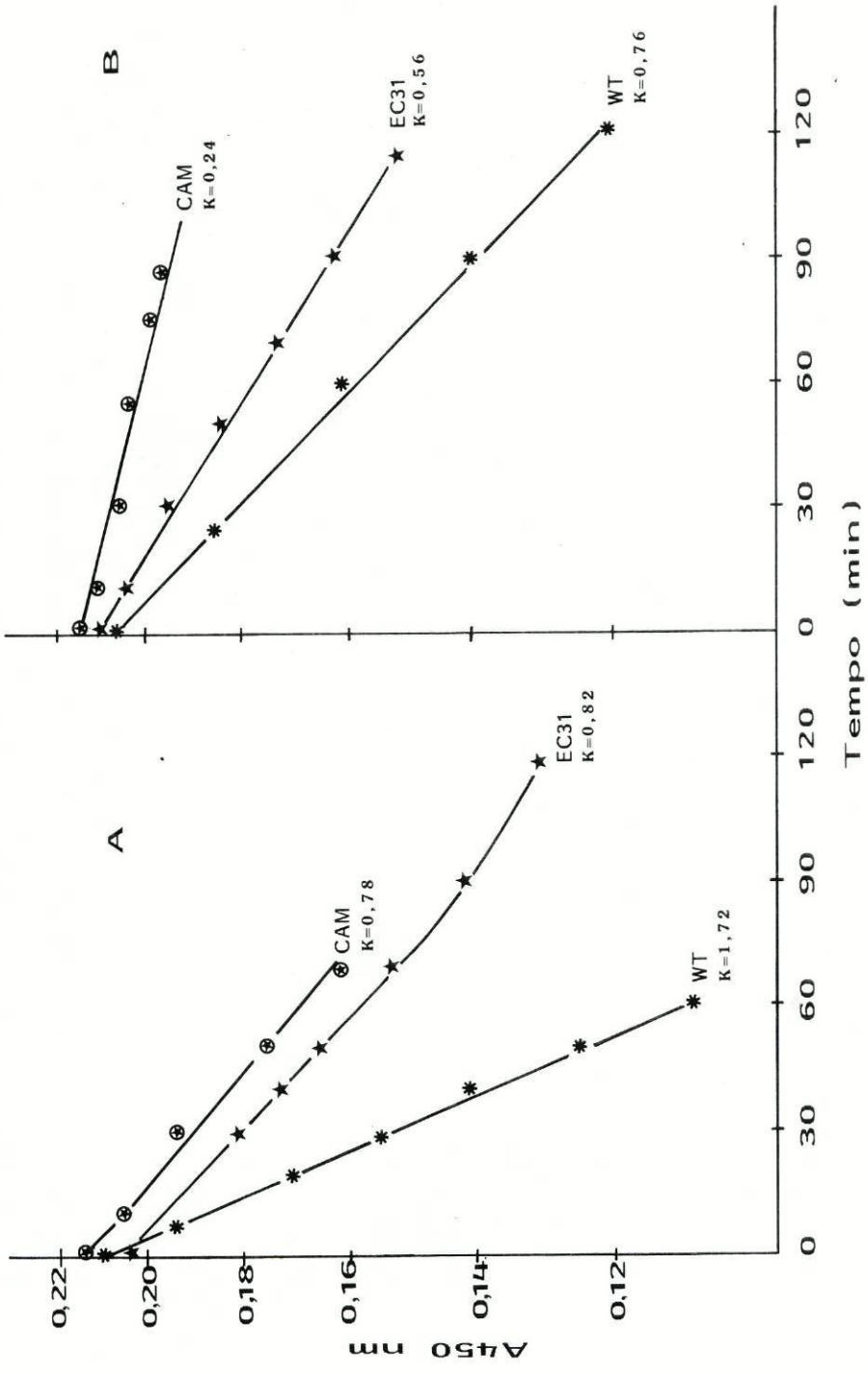
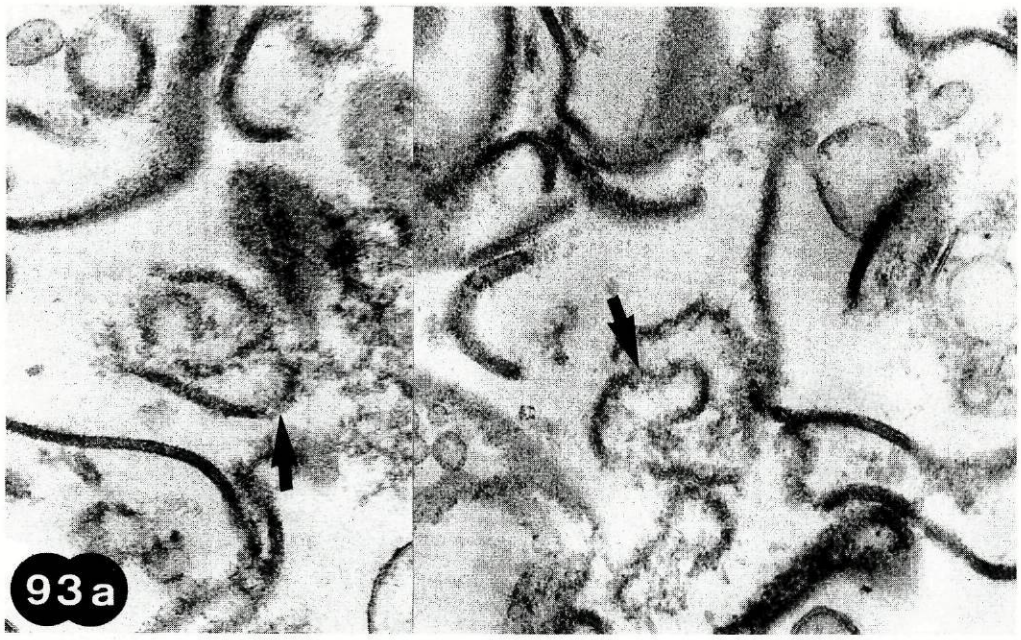


Fig. 92. Efeito da lisozima em paredes isoladas de células de culturas selvagens (WT), CAM e do mutante EC31 de *S. faecium* contendo autolisina (A) ou tratadas pelo SDS (B). As paredes foram suspensas (A520 = 0,200-0,210) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) e incubadas 120 min a 37 °C na presença de 0,05 mg/ml de lisozima. K = unidade de actividade lítica (ver Materiais e Métodos).

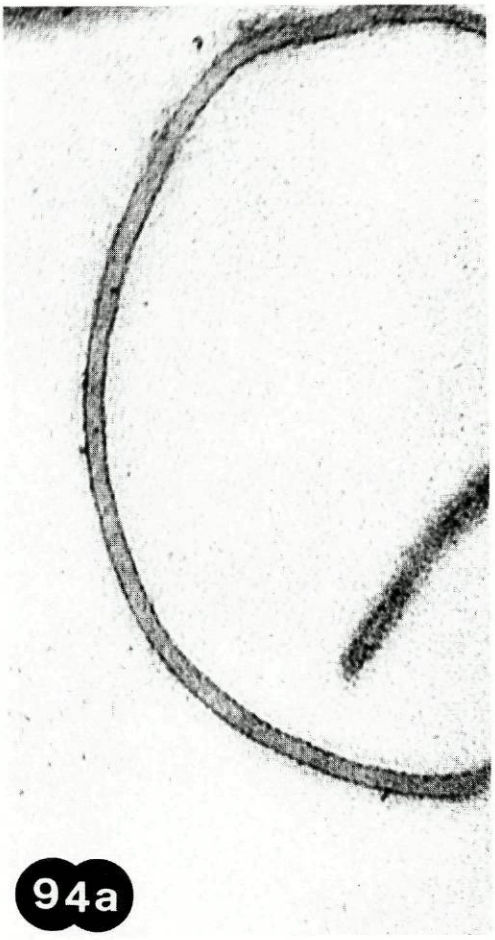
Fig. 93. Ultrastrutura de paredes isoladas de células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento cultivado na ausência ou na presença de CAM (10 μg/ml) e expostas à acção da lisozima (0,05 mg/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0). (a) Paredes isoladas da estirpe selvagem após 50 min de incubação; (b) e (c) paredes isoladas de células de culturas CAM expostas respectivamente 50 ou 120 min à acção daquela muralisina. Notar em (a) e (c) a degradação das paredes celulares isoladas (setas).
(a) 72 000 X; (b) 93 000 X; (c) 86 400 X.


93a


93b


93c

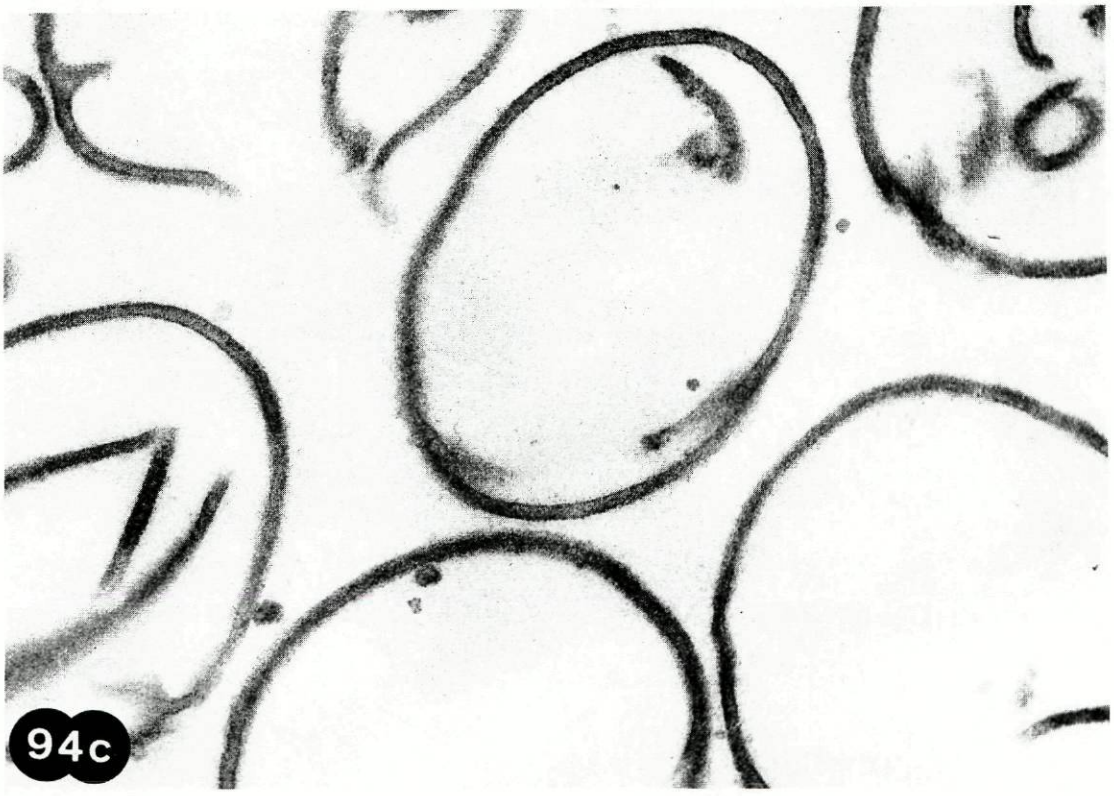
Fig. 94. Ultrastrutura de paredes isoladas de células de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento, cultivado na ausência ou na presença de CAM (10 μg/ml), tratadas com SLS e expostas a 37 °C à acção da lisozima (0,05 mg/ml) em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0). (a) Paredes isoladas da estirpe selvagem após 50 min de incubação; (b) e (c) paredes isoladas de células de culturas CAM expostas respectivamente 50 ou 120 min à acção daquela muralisina. Notar a ausência de alterações degradativas. (a) 93 600 X; (b) 85 800 X; (c) 72 000 X.



94a



94b



94c

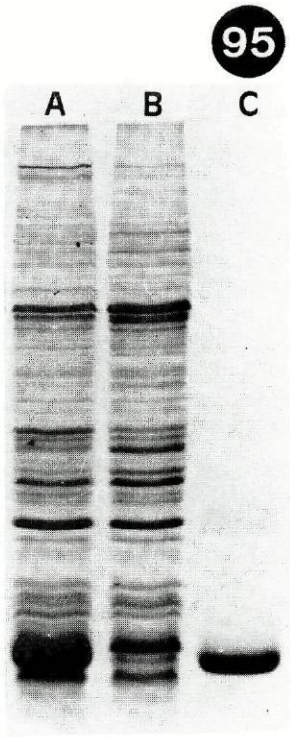


Fig. 95. SDS-PAGE de proteínas das membranas isoladas após heterólise com lisozima (0,05 mg/ml) em (A) tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 8,0) ou (B) após autólise em tampão Tris-HCl 0,05 M (pH 7,0). (C) Padrão de lisozima (P.M. = 14 Kda). Notar que a lisozima está presente em (A) mas não em (B). (Para detalhes ver Materiais e Métodos).

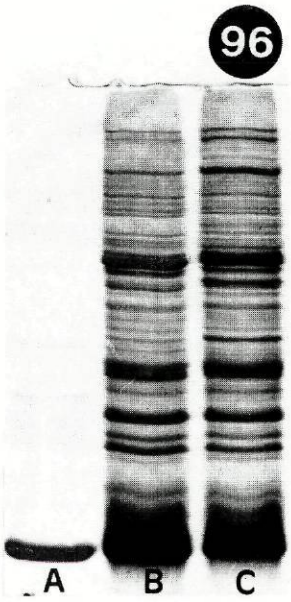


Fig. 96. SDS-PAGE de proteínas de membranas isoladas após heterólise com lisozima em tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0) de células da fase exponencial cultivadas na presença (B) ou na ausência (C) de glucose. (A) Padrão de lisozima (P.M. = 14 Kda).

4. DISCUSSÃO

Os resultados apresentados neste capítulo indicam de forma clara que a degradação extensa da parede celular de *S. faecium* induzida pela lisozima em meios hipotónicos nem sempre conduz à lise celular.

Como mostram os estudos ultrastruturais realizados, as paredes de *S. faecium* da fase exponencial de crescimento ou do início da fase estacionária, cultivadas na presença ou na ausência de glucose, foram completamente degradadas pela lisozima na concentração de 0,4 mg/ml presente nos tampões Tris-HCl ou fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0); o mesmo fenómeno ocorreu com as células da fase estacionária quando incubadas na presença da mesma concentração desta muralisina no tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Contudo, em todas estas situações a A520 das suspensões celulares não diminuiu porque os restos celulares, constituídos por material electronodenso e membranas, são abundantes.

Estes resultados mostram que os fenómenos líticos não devem ser interpretados unicamente na base de resultados de espectrofotometria - um método simples e rápido mas que não revela as alterações morfológicas ocorridas nas células - mas devem ser complementados por estudos de microscopia electrónica e de bioquímica. Trabalhos realizados em bactérias de Gram-negativo revelaram também que amostras possuidoras de idênticos valores de absorvância podem apresentar diferenças morfológicas profundas (Parente, 1984).

No caso do tratamento com 0,4 mg/ml de lisozima nos tampões Tris-HCl, a forma de *S. faecium* foi mantida. Por outro lado, as determinações das proteínas contidas nos filtrados das suspensões celulares e a sua análise electroforética em SDS-PAGE indicam que as células de *S. faecium* expostas à lisozima nos tampões Tris-HCl (0,05 M ou 0,1 M, pH 8,0) ou no de fosfato de sódio e potássio 0,05 M, pH 8,0 captam quantidades significativas desta enzima muralítica, sendo essa ligação mais rápida e mais extensa no caso dos tampões Tris-HCl. Em concordância com os resultados obtidos com outras bactérias (Westmacott & Perkins, 1979; Metcalf & Deibel, 1969) a ligação desta enzima, em quantidades significativas, às células de *S.*

faecium é acompanhada por um aumento da A520 das suspensões celulares. A taxa de autólise de células congeladas em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) é reduzida pela adição de 0,4 mg/ml de lisozima.

Estes resultados, quando analisados em conjunto, sugerem que a ligação de quantidades apreciáveis de lisozima a *S. faecium* impede a bacteriólise, não obstante a perda completa da protecção mecânica que nas células completas lhe é conferida pela parede celular. Os nossos resultados mostraram-se concordantes com os obtidos com outras bactérias por diferentes autores (Metcalf & Deibel, 1973; Pollock *et al.*, 1981; Cho *et al.*, 1982; Wilkens *et al.*, 1982).

A ausência de bacteriólise observada nas situações que são acompanhadas por uma forte ligação da lisozima a *S. faecium* parece ser devida à estabilização dos componentes intracelulares por esta enzima. Deste modo, seria de esperar um aumento da bacteriólise através da redução da quantidade de lisozima disponível por bactéria (porém suficiente para degradar a parede celular). De facto, nas situações em que não se verificou bacteriólise, uma redução de oito vezes na relação enzima/célula (nas suspensões com $7,2 \times 10^8$ células/ml reduziu-se a concentração da lisozima de 0,4 mg/ml para 0,05 mg/ml) resultou numa extensa bacteriólise de *S. faecium*. Convem notar ainda que, nas condições estudadas, para baixas concentrações de lisozima os tampões utilizados possuíam uma fraca força iónica: 0,1445 - tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M, pH 8,0 ; 0,01675 - tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 e 0,0335 - tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 8,0. Por outro lado, uma extensa bacteriólise de *S. faecium* foi obtida em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M, pH 8,0 (força iónica = 0,2905) contendo concentrações elevadas de lisozima - 0,2; 0,3 ou 0,4 mg/ml. Estes resultados indicam claramente que a ligação desta enzima às células de *S. faecium* é controlada pela força iónica do meio no qual as bactérias são suspensas; a quantidade de iões presentes no tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0), superior às dos tampões Tris-HCl 0,1 M ou 0,05 M (pH 8,0) ou mesmo à do tampão fosfato de sódio e potássio 0,05 M (pH 8,0), é capaz de competir com a lisozima na ligação desta molécula catiónica aos grupos da célula carregados negativamente. Um aumento na força iónica do tampão resulta num aumento da taxa de lise induzida pela lisozima, quando presente em concentrações superiores às

necessárias para a degradação da parede celular, porque reduz a ligação desta aos componentes intracelulares da bactéria. Idênticas conclusões foram obtidas em estudos efectuados com outras bactérias de Gram-positivo em condições experimentais diferentes das que utilizámos (Davies *et al* ., 1969; Chang & Carr, 1971). Esta conclusão é também concordante com trabalhos anteriores que mostram que os catiões podem competir entre si na ligação à parede das células (Webb, 1972; Cabral & Silva, 1984).

Os nossos resultados mostram que uma diminuição de pH conduz a uma menor ligação da lisozima às células de *S. faecium* - um resultado concordante com os de Sussman & Lowry (1955)

Em conclusão, quanto menor for a força iónica e mais elevado o pH (pelo menos na gama 7,0 - 8,0) do tampão utilizado na heterólise induzida pela lisozima, maior é a ligação desta enzima à célula bacteriana. A ligação de natureza electrostática da lisozima aos grupos acídicos da célula, nomeadamente à parede bacteriana (Salton, 1951), é um resultado esperado, dado que a lisozima é um catião com um ponto isoeléctrico entre pH 10,5 e 11,0 (Lenhinger, 1977).

A estabilização de *S. faecium* pela lisozima não pode ser atribuida à ligação desta enzima aos componentes acídicos da membrana citoplasmática que verificámos ocorrer, dado que as membranas isoladas após lise das células pela lisozima em tampão fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo RNase, DNase e Mg^{2+} contêm quantidades significativas de lisozima a elas ligadas - resultados que mostram que a ligação desta enzima muralítica às membranas não é capaz de evitar a bacteriólise.

Enquanto que o isolamento das membranas de *S. faecium* após autólise requer um longo período de incubação, a bacteriólise na presença da lisozima permite o seu isolamento de um modo relativamente rápido; contudo, os resultados que acabámos de discutir mostram que, quando se utiliza este processo nas condições descritas, temos de considerar que uma proteína estranha - a lisozima - está presente em quantidades importantes no conteúdo proteico das membranas isoladas. Assim, parece que o isolamento de membranas após autólise em tampão fosfato, não

obstante ser um método relativamente longo, é o que permite isolar membranas não contaminadas por enzimas exógenas e com menores lesões. Contudo, durante os fenómenos da autólise e da lise induzida pela lisozima ocorre sempre alteração do perfil normal assimétrico da membrana para simétrico, sugerindo que as membranas isoladas naquelas condições perderam o ácido lipoteicóico, componente constante das membranas nativas. O método da sonicação, além de originar membranas muito fragmentadas é longo, dado que requer numerosas centrifugações diferenciais e, além disso, as membranas observadas durante o isolamento de paredes, também possuiam perfil simétrico. Parece, pois, poder afirmar-se que dos vários métodos conhecidos nenhum é capaz de permitir o isolamento de membranas de *S. faecium* e provavelmente de outras bactérias num estado próximo do nativo.

Dado que a lisozima se liga aos componentes intracelulares conforme se deduz dos resultados electroforéticos, a desintegração destes deveria aumentar a taxa de heterólise de *S. faecium*. De facto, o uso de RNase em tampões fosfato (0,05 M, pH 8,0) ou de RNase, DNase e Mg^{2+} nos tampões Tris-HCl ou fosfato (0,05 M, pH 8,0) contendo lisozima, aumentou consideravelmente a taxa de bacteriólise, mesmo quando nestes tampões de baixa força iónica se utilizou lisozima na concentração de 0,4 mg/ml - resultados idênticos aos observados em *B. subtilis* (Konings *et al* ., 1973). A adição das duas nucleases e do Mg^{2+} ao tampão de incubação contendo lisozima conduz à desintegração dos restos celulares ricos em RNA e fibrilas de DNA, os quais contém grupos carregados negativamente capazes de captar a enzima. Aliás, a adição das duas nucleases e do Mg^{2+} no fim da degradação da parede de *S. faecium* pela lisozima em tampão fosfato de sódio e potássio (0,05 M, pH 8,0) - uma situação que não conduz à bacteriólise apesar da completa degradação da parede celular - resultou num rápido e extenso decréscimo da A520 das suspensões celulares.

A que se deve a bacteriólise de *S. faecium* que ocorre em determinadas condições na presença da lisozima? Nessa bacteriólise há a participação conjunta da lisozima e das enzimas do sistema autolítico endógeno desta bactéria ou ela deve-se

exclusivamente à acção muralítica da lisozima?

A nossa interpretação é de que o sistema autolítico de *S. faecium* não tem participação significativa na bacteriólise induzida pela lisozima nesta bactéria nas condições por nós estudadas, dado que :

a) Bactérias previamente congeladas e incubadas em tampões Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) - um processo capaz de activar as enzimas do sistema autolítico endógeno de *S. faecium* - apresentam uma bacteriólise na presença daquela muralisina (0,4 mg/ml) idêntica à das células não congeladas (ver Tabela X e Fig. 135). Se nesta degradação celular tivesse participado o sistema autolítico endógeno então, a taxa de bacteriólise das células previamente congeladas deveria ser mais elevada do que a das células não congeladas ou, no mínimo, deveriam apresentar cinéticas mais rápidas de lise, o que não se verifica.

b) A bacteriólise de *S. faecium* observada em tampões fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo lisozima, nucleases e Mg^{2+} foi idêntica na presença ou na ausência de PMSF - um inibidor da actividade proteolítica capaz de impedir a activação do sistema autolítico endógeno de *S. faecium* (quando previamente congelado) pelas enzimas proteolíticas contaminantes da DNAse (ver Capítulo A, secção 1.2.3.1.).

c) Os resultados ultrastruturais mostram que as características da degradação da parede de *S. faecium* ocorridas na presença da lisozima, e as induzidas através da activação do sistema autolítico endógeno desta bactéria, são muito diferentes. A degradação da parede celular desta bactéria em tampões contendo lisozima quer quando integrada na célula completa (Figs. 55a, 55c, 55d; 61a; 72a; 82a, 82b; 84; 89a, 89b; 90a e 91b), quer quando isolada (Fig. 93a), é generalizada e progressiva; pelo contrário, a degradação originada por activação das enzimas do sistema autolítico endógeno é topologicamente localizada - inicia-se sempre junto das zonas dos septos (Pooley *et al* ., 1969; Shockman *et al* . , 1967b) e depois estende-se a outros locais da parede, mas sempre em zonas bem definidas (Figs. 10; 14b; 14d; 18; 19a; 19b; 22b; 25 e 26).

d) Nas condições experimentais utilizadas, as actividades da lisozima e das

enzimas do sistema autolítico endógeno de *S. faecium* não se sobrepõem; pelo contrário, enquanto que a heterólise das células congeladas em tampões fosfato de sódio e potássio ou Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo 0,05 mg/ml de lisozima é extensa, a autólise das células congeladas nos mesmos tampões é reduzida (especialmente no caso do tampão fosfato). Idêntica conclusão pode ser retirada da comparação dos resultados de células não congeladas ou congeladas de *S. faecium* em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M (pH 8,0) contendo 0,4 mg/ml de lisozima com os dos obtidos neste tampão na ausência desta enzima.

e) A degradação total das paredes das células dos mutantes EC31 e EC78 em tampão Tris-HCl (0,05 M, pH 8,0) contendo lisozima mostra que a ausência de actividade autolítica neste tampão (Capítulo A, secção 1.2.4.3.2.) não impede que esta enzima exerça a sua acção muralítica.

Taxas de lise semelhantes foram obtidas em tampão fosfato de sódio e potássio 0,1 M com pH 7,0 ou pH 8,0 contendo lisozima (0,2 e 0,4 mg/ml); porém, como nestas situações as lises obtidas foram extensas, julgamos que experiências adicionais a pH 7,0 (pH mais apropriado que o pH 8,0 para a actividade das enzimas do sistema autolítico) necessitam de ser realizadas com concentrações menores de lisozima, para que este parâmetro possa ser valorizado.

Estes resultados levam-nos a pensar que, nas condições experimentais ensaiadas, a participação do sistema autolítico de *S. faecium* não tem expressão significativa nas situações em que a lisozima tem efeito acentuado porque a degradação resultante da fraca actividade das enzimas do sistema autolítico desta bactéria é, nestas condições, totalmente encoberta pela acção generalizada da lisozima na parede celular.

A possibilidade de que em algumas experiências com lisozima uma das nucleases usadas, a RNase, devido às suas características policatiónicas, activasse o sistema autolítico endógeneo de *S. faecium* - um efeito descrito em *S. aureus* (Wecke *et al* ., 1982) - é regeitada pela observação de que a RNase isolada, mesmo quando utilizada na concentração de 0,5 mg/ml, é incapaz de induzir a autólise desta bactéria (Capitulo A, secção 1.2.3.2.). Wecke *et al.* (1982) mostraram que não só a

RNase, mas também a lisozima, devido às suas características policatiónicas, induziam a actividade autolítica de *S. aureus*. Em contraste com os resultados daqueles autores, os nossos resultados mostraram que a remoção da parede de *S. faecium* pela lisozima deve-se à acção muralítica directa daquela enzima na parede celular.

A ausência de bacteriólise de *S. faecium* observada na presença da lisozima e de NBS - um inibidor da actividade autolítica - é um resultado esperado, dado que a lisozima, sendo uma proteína, deve ser inactivada por este composto através da sua ligação aos aminoácidos tirosina, triptofano e histidina (Ramachandran & Witkop, 1967, Cornett & Shockman, 1978). Deste modo, a utilização de NBS no estudo da bacteriólise induzida pela lisozima não permite esclarecer se a degradação celular se deve unicamente à acção desta muralisina ou se ela é devida à acção conjunta das enzimas do sistema autolítico endógeno e da lisozima. Aliás, este composto é por si só altamente danificante para a célula bacteriana (Fig. 32a e 32b) e, deste modo, o seu uso no estudo dos fenómenos líticos, sobretudo se não acompanhados por estudos ultrastruturais, pode levar a interpretações incorrectas de resultados. Idênticas observações foram feitas por Parente (1984) a propósito do uso deste composto em bactérias de Gram-negativo.

Mostrámos ainda que a lisozima estando presente nas condições que promovem a extensa bacteriólise de estirpe selvagem, não degrada as células dos mutantes EC31 e EC78, nem as células das culturas CAM. Estes resultados poderiam levar-nos a pensar que a lisozima só actuaria na presença de um sistema autolítico endógeno activo.

Porém, o facto dos mutantes EC31 e EC78 e das células das culturas CAM apresentarem uma parede celular significativamente mais espessa que a estirpe selvagem constitui, só por si (como explicámos na secção 4. do Capitulo A), um obstáculo adicional a vencer pela lisozima. Por outro lado, como dissemos anteriormente, a degradação das paredes das células dos mutantes EC31 e EC78 em tampão Tris-HCl 0,05 M, pH 8,0 contendo lisozima mostra que a ausência de

actividade autolítica neste tampão (Capítulo A, secção 1.2.4.3.2.) não impede que esta enzima exerça a sua acção muralítica em tampões Tris-HCl degradando completamente a parede das células destes mutantes.

A ocorrência de degradação extensa pela lisozima das paredes dos mutantes EC31 e EC78 em tampão Tris-HCl, mas não em tampão fosfato de sódio e potássio, reforça a conclusão obtida com a estirpe selvagem, de que o tampão Tris-HCl é melhor veículo do que o tampão fosfato de sódio e potássio para a lisozima exercer a acção degradativa sobre a parede celular. A razão pela qual esta enzima é capaz de, em duas horas, degradar completamente a parede das células destes mutantes em tampão Tris-HCl mas não em tampão fosfato de sódio e potássio, poderá ser explicada pela baixa força iónica do tampão Tris-HCl (cerca de 9 vezes inferior, para a mesma molaridade e pH, à do tampão fosfato) que facilita a ligação da lisozima à parede das células.

Os resultados ultrastruturais do mutante EC78 obtidos em amostras após duas horas de incubação em tampão fosfato na presença de 0,4 mg/ml de lisozima (Fig. 79a) sugerem que esta enzima tem maior dificuldade em se ligar às paredes celulares deste mutante do que às da estirpe selvagem. Por outro lado, amostras paralelas, fixadas apenas com tetróxido de ósmio, mostraram que a lisozima é capaz de degradar a parede celular deste mutante (Fig. 79b). A menor degradação observada em amostras fixadas pelo GA e pelo tetróxido de ósmio, em relação à observada em amostras (incubadas nas mesmas condições) fixadas exclusivamente pelo tetróxido de ósmio deve-se aos seguintes factos :

a) A fixação das amostras quando feita exclusivamente pelo tetróxido de ósmio requer uma centrifugação prévia das suspensões celulares (antes da adição do fixador), o que permite a actuação da lisozima durante essa centrifugação;

b) O tetróxido de ósmio actua mais lentamente que o GA (Silva, 1975; Silva *et al* ., 1976b) e, deste modo, permite à lisozima exercer, na presença deste fixador, a sua acção muralítica durante mais algum tempo.

A maior resistência do mutante EC78 à acção muralítica da lisozima pode ser devida a alterações estruturais e/ou de composição química das suas paredes celulares em relação à estirpe selvagem, dado que o mutante E81 de *S. faecalis* ATCC

9790 apresenta reduzidas taxas de autólise e alterações estruturais e de natureza química (Pooley *et al* ., 1972). Futuros trabalhos de natureza bioquímica - a análise dos componentes químicos da parede destes mutantes - precisam de ser realizados para testar a hipótese aqui colocada.

O facto da lisozima não degradar a parede celular do mutante EC31 em tampão fosfato e ser capaz de a degradar nesse tampão, embora a taxas reduzidas quando actua sobre as paredes isoladas, é um resultado explicável; enquanto que a lisozima só tem acesso à superfície externa da parede das células intactas, nas paredes isoladas ela pode ligar-se às duas superfícies desta estrutura. O facto da parede deste mutante ser totalmente degradada pela lisozima em tampão Tris-HCl, dá suporte a esta explicação, dado que neste tampão, a ligação da lisozima à superfície externa da parede das células é facilitada pela baixa força iónica deste tampão.

A menor taxa de lise induzida pela lisozima nas paredes isoladas do mutante EC31 em relação às isoladas das células da estirpe selvagem pode ser o reflexo (como explicámos na secção 4. do Capítulo A) da maior espessura daquelas paredes ou, como dissemos anteriormente, da existência de alterações estruturais e/ou de natureza química nessas paredes que as tornam menos favoráveis à acção muralítica desta enzima.

Os resultados obtidos na presença da lisozima com paredes isoladas tratadas pelo SDS mostram, independentemente das possíveis alterações que este detergente possa induzir nos ácidos teicóicos da parede (Umeda *et al* ., 1987) e, deste modo, dificultar o acesso da lisozima às ligações ß (1—> 4) do peptidoglicano, que as paredes do mutante EC31 constituem pior substrato para a acção muralítica da lisozima que as paredes isoladas da estirpe selvagem - a possível modificação provocada pelo SDS deve ter igual reflexo nos dois tipos de paredes.

Uma das consequências da actuação do cloranfenicol nas células de *S. faecium* é a maior espessura das suas paredes celulares, quando comparada à das células não expostas a este agente bacteriostático. Este facto explica parcialmente a integridade da parede das células de culturas CAM quando expostas à acção da lisozima. Porém, se admitíssemos unicamente esta causa seria de esperar uma

degradação visível, ainda que menor - fenómeno que nas nossas condições experimentais não se observa. Os resultados ultrastruturais (Fig. 77) sugerem ainda que a lisozima apresenta dificuldade de ligação às paredes destas células. Possivelmente nas paredes das células das culturas CAM ocorreram alterações químicas. Esta hipótese está de acordo com trabalhos anteriores que referem que as paredes de *S. aureus*, após tratamento com este antibiótico, contêm um maior número de grupos O-acetil (Johansen *et al* ., 1983; Reinicke *et al.*, 1983). O aumento do nível destes grupos foi considerado responsável pela resistência de *S. faecalis* (Abrams, 1958) e de outras espécies de bactérias (Brumfitt *et al* ., 1958; Ghuysen & Strominger, 1963a, 1963b) à lisozima. Estes resultados indicam que nas células de culturas CAM a lisozima tem dois obstáculos a vencer - por um lado, a maior espessura da parede e por outro, uma possível modificação química dessa estrutura.

O facto das paredes celulares isoladas das células de culturas CAM apresentarem uma menor taxa de lise na presença da lisozima do que as células intactas deve-se à maior superfície de exposição a esta enzima apresentada pelas paredes após o seu isolamento. Esta conclusão é apoiada pela observação de que as paredes celulares isoladas das células de culturas CAM foram (ao fim de duas horas de incubação) degradadas pela lisozima (Fig. 93c),enquanto que as células incubadas durante o mesmo tempo na presença desta muralisina permaneceram intactas (Fig. 77).

A menor taxa de lise das paredes isoladas de células de culturas CAM observada na presença da lisozima, em relação às paredes isoladas das células da estirpe selvagem não expostas à acção deste antibiótico, pode ser o reflexo da maior espessura daquelas paredes e/ou, como dissemos anteriormente, da existência de alterações químicas nessa estrutura.

Os resultados obtidos na presença da lisozima com paredes isoladas de células da estirpe selvagem e de culturas CAM de *S. faecium*, tratadas pelo SDS, mostram que estas últimas constituem pior substrato para a acção muralítica da lisozima. A explicação que apresentámos para o mutante EC31 em relação à estirpe selvagem, aplica-se integralmente a esta situação.

A observação de que as células de *S. faecium* da fase exponencial lisam sob a

acçãoda lisozima mais depressa do que as células da fase estacionária poderia sugerir, de acordo com a interpretação de Shockman (1968), que na heterólise desta bactéria ocorrida nas condições experimentais mencionadas a actividade autolítica e a lisozima têm uma acção conjunta.

Porém, todas as experiências realizadas na presença desta enzima muralítica com células da fase exponencial de crescimento indicam a não participação das enzimas do sistema autolítico endógeno desta bactéria na degradação celular. A interpretação de que as diferenças observadas na presença da lisozima, com células das fases exponencial ou estacionária, são devidas à participação do sistema autolítico desta bactéria, não tem apoio no resultados que obtivemos. Mais lógico será admitir que em *S. faecium* possa ocorrer, tal como em *L. fermemtum*, um aumento no número de grupos O-acetil à medida que as células entram na fase estacionária tornando-as resistentes à lisozima (Logardt & Neujhar, 1975); a presença destes grupos no ácido N-acetilmurâmico foi considerada não só por Logardt & Neujhar, mas também por outros autores (Abrams, 1958; Brumfitt, 1958), um factor de resistência à lisozima. Além disso, as diferenças observadas na resistência destes dois tipos de células - uma vez mais detectada unicamente através da análise ultrastrutural - não são profundas, o que nos parece lógico dado que, das células estudadas as que se mostraram mais resistentes à acção muralítica da lisozima são do início da fase estacionária de crescimento (A520 = 1,0 -1,1; Fig. 33), isto é, foram incubadas durante mais 45 min do que as células da fase exponencial.

O facto das células de *S. faecium* cultivadas na ausência de glucose apresentarem uma taxa maior de heterólise nos tampões com lisozima e Mg^{2+} ou com lisozima, DNase e Mg^{2+} do que as células cultivadas na sua ausência é uma consequência da falta deste hidrato de carbono no meio de cultura, dado que Shockman (1967) mostrou que a ausência de glucose no meio de crescimento das bactérias inibe da síntese do peptidoglicano.

RESUMO

E

CONCLUSÕES

RESUMO E CONCLUSÕES

Porque os fenómenos da degradação bacteriana - **Autólise e Heterólise induzida pela lisozima** - são complexos e as respostas a numerosas questões com eles relacionadas estão longe de terem sido totalmente compreendidas, decidimos realizar o seu estudo em bactérias de Gram-positivo - *Streptococcus faecium* ATCC 9790 e nos mutantes deficientes na actividade autolítica, EC31 e EC78, que isolámos desta estirpe. Estes fenómenos foram analisados por espectrofotometria (nas gamas do vísivel e em UV), por microscopia electrónica de transmissão (cortes ultrafinos) e por métodos bioquímicos (determinações quantitativas de proteínas, análises electroforéticas de proteínas em geis de poliacrilamida e quantificação de efluxos de K^+ em fotometria de chama).

Se é certo que podemos dizer que não foram completamene atingidos os objectivos propostos, dos resultados obtidos podemos inferir as seguintes conclusões:

Em *S. faecium* as características da degradação da parede celular, resultante da autólise e da heterólise induzida pela lisozima - só analisáveis através do estudo ultrastrutural - é o que melhor distingue estes dois fenómenos. Enquanto que na autólise a degradação das paredes é topologicamente localizada, na heterólise induzida pela lisozima, ela é generalizada.

O facto de que a lisozima se liga aos grupos da parede celular carregados negativamente e a distribuição destes nesta estrutura ser uniforme, explica a degradação generalizada, isto é, permite a hidrólise generalizada das ligações ß (1→4) do peptidoglicano por aquela enzima muralítica.

A indução da actividade autolítica de *S. faecium* pode ser eficientemente conseguida pela incubação de células não congeladas em tampões fosfato (de sódio ou de sódio e potássio) ou pelo congelamento-descongelamento e incubação em tampões Tris-HCl ou Imidazol-HCl, sendo as taxas de autólise variáveis consoante a molaridade do tampão utilizado. As agressões provocadas nas células pelos tampões

Tris-HCl e Imidazol-HCl quando usados na congelação a baixas temperaturas (-70°C), nomeadamente a alteração da permeabilidade da membrana citoplasmática, dependem das características físicas e químicas destes tampões e, deste modo, a variação observada nas taxas de autólise com a molaridade do tampão utilizado é uma consequência lógica.

A dificuldade em autolisar apresentada pelos mutantes EC31 e EC78 pode ser o reflexo de várias mutações. Estes mutantes podem possuir quantidades inferiores quer de autolisina E-1, quer de muramidase-2, mas as reduzidas taxas de autólise que apresentam podem também reflectir uma deficiência na regulação ou no transporte de uma, de outra ou das duas enzimas. Além disso, uma possível alteração na composição química das paredes menos favorável para a acção das enzimas do sistema autolítico, poderá também contribuir para as reduzidas taxas de autólise destes mutantes.

O facto dos mutantes EC78 e EC31 crescerem respectivamente a uma taxa semelhante e a uma taxa inferior em relação à estirpe selvagem, não obstante apresentarem reduzidas taxa de autólise em relação a esta estirpe, mostra a dificuldade em atribuir às autolisinas um papel fisiológico no crescimento celular.

A força iónica e o pH do tampão influenciam a autólise de *S. faecium* ; a força iónica do tampão tem influência na heterólise induzida pela lisozima.

Na extensa taxa de heterólise a pH 8,0 induzida pela lisozima em *S. faecium* a participação das enzimas do sistema autolítico endógeno não tem expressão significativa, dado que a degradação resultante da fraca actividade destas enzimas àquele pH, é totalmente encoberta pela acção generalizada da lisozima na parede celular.

Por outro lado, a degradação total da parede dos mutantes EC31 e EC78 pela lisozima em tampões Tris-HCl, pH 8,0 indica que esta enzima é capaz de exercer a sua acção muralítica na presença de sistemas autolíticos com actividade extremamente reduzida.

A existência de lisozima ligada às membranas de *S. faecium* isoladas após heterólise na presença daquela enzima é uma ocorrência esperada, dado os grupos fosfato e outros grupos acídicos dos componentes membranares constituirem locais apropriados para a ligação desta molécula catiónica. A presença da lisozima nessas membranas é um aspecto que deve ser tomado em atenção, dado que esta proteína não faz parte do normal conteúdo proteico membranar. O isolamento de membranas em tampões Tris-HCl é um método rápido que permite isolar membranas não contaminadas mas as características destas membranas - possuem uma ultrastrutura pouco preservada, são mais finas e apresentam um decréscimo de 30% no conteúdo proteico - indicam que este método de isolamento não é apropriado para a obtenção de membranas de *S. faecium*. Assim, parece que o isolamento de membranas após autólise em tampão fosfato, não obstante ser um método relativamente longo, é o que permite isolar membranas não contaminadas e com menores lesões. Contudo, durante os fenómenos da autólise e da lise induzida pela lisozima ocorre sempre alteração do perfil normal assimétrico da membrana para simétrico, sugerindo que as membranas isoladas naquelas condições perderam o ácido lipoteicóico, componente constante das membranas nativas.

O Mg^{2+} inibe a autólise celular de *S. faecium* , sobretudo quando presente na congelação-descongelação e incubação das células em tampão Tris-HCl. Tal facto parece ser devido a este ião poder eventualmente evitar, não a alteração de permeabilidade da membrana, observada após o congelamento-descongelamento, mas a libertação do ácido lipoteicóico da membrana citoplasmática e deste modo impedir, pelo menos em algumas células, a sua desorganização durante a incubação, dado que na presença do Mg^{2+} é possível observar protoplastos num tampão hipotónico.

A DNase bem como a RNase (mesmo quando utilizada em concentrações elevadas) não induzem a autólise de *S. faecium*. A elevada taxa de autólise de células congeladas observada na presença da DNase em tampões Tris-HCl deve-se à activação da autolisina E-1 pelas enzimas proteolíticas contaminantes da DNase.

O efeito estimulatório apresentado pela DNase na bacteriólise induzida pela lisozima deve-se à hidrólise do DNA por aquela enzima, dado que a falta do ácido desoxiribonucleico, nomeadamente dos seus grupos fosfato, reduz os locais de ligação da lisozima à célula bacteriana.

O facto de termos realizado o estudo comparativo da influência da fase de crescimento na lise induzida pela lisozima com células do meio da fase exponencial e do início da fase estacionária, explica que não tenhamos observado diferenças significativas no grau de lise induzida pela lisozima nestes dois tipos de células.

As taxas semelhantes de autólise observadas em tampão fosfato de sódio e potássio que encontrámos naqueles dois tipos de células explicam-se pela razão expressa no parágrafo anterior e ainda pelo facto de termos realizado as experiências em tampões com pH 8,0 - um pH não apropriado para a actividade das enzimas do sistema autolítico.

A lisozima não exerce a sua acção muralítica na presença de NBS porque provavelmente é inactivada por este composto. Tal facto sugere que a NBS não deve ser utilizada no estudo da heterólise induzida pela lisozima ou por outras proteínas, como por exemplo a mutanolisina.

Aliás, a utilização de NBS, nos estudos da heterólise e da autólise, a não ser acompanhada por análises ultrastruturais, é pouco recomendada, dado que este composto provoca alterações (não líticas) na célula bacteriana.

As reduzidas taxas de autólise das células de *S. faecium* previamente expostas à acção do CAM ou da TC poderão ser devidas a um conjunto de factores:

a) menor produção das enzimas do sistema autolítico, E-1 e E-2;

b) existência de um bloqueio ao nível da expressão da actividade dessas enzimas;

c) alteração da composição química ou de estrutura das paredes das paredes.

A grande resistência das paredes quer dos mutantes EC31 e EC78, quer das células CAM de *S. faecium* à acção muralítica da lisozima poderá ser explicada, em

parte, pela maior espessura das paredes destas células, mas a provável modificação química dessas paredes deve contribuir também para essa resistência. A maior superfície de exposição à lisozima das paredes isoladas das células de *S. faecium* cultivadas com CAM explica a sua menor resistência a esta enzima muralítica, relativamente às células intactas.

Ao longo deste trabalho deixámos sugestões que, julgamos, ajudarão no futuro a resolver pelo menos parte das interrogações ainda existentes acerca dos fenómenos da autólise e da heterólise induzida pela lisozima em *S. faecium*.

BIBLIOGRAFIA

BIBLIOGRAFIA

Abrams, A. (1958). O-acetyl groups in the cell wall of *Streptococcus faecalis* . *J. Biol. Chem* . **230**,949-959. Citado por Shockman *et al* . , 1961 e 1968.

Allwood, M. C. & Russel, A. D. (1968). Thermally induced ribonucleic acid degradation and leakage of substances from the metabolic pool in *Staphylococcus aureus.J. Bacteriol* . **95**,345-349.

Allowood, M. C. & Hugo , W. B. (1971). The leakage of cations and amino acids from *Staphylococcus aureus* exposed to moist heat, phenol and dinitrophenol. *J. Appl. Bacteriol* . **34**,369-375.

Alonso, G. L., Arrigó, D. M. & De Fermani, S. T. (1979). Effect of Tris (hydroxymethyl) aminomethane on isolated sarcoplasmic reticulum vesicules. *Arch. Biochim. Biophys* . **198**,131-136.

Amano, K.-I. & Williams, J. C. (1983). Peptidoglycan of *Legionella pneumophila* : apparent resistance to lysozyme-hydrolysis correlates with a high degree of peptide cross-linking. *J. Bacteriol* . **153**,520-526.

Amano, K.-I. and Williams, J. C. (1984). Sensitivity of *Coxiella burnetii* peptidoglycan to lysozyme hydrolysis and correlation of sacculus rigidity with peptidoglycan-associated proteins. *J. Bacteriol* . **160**,989-993.

Anderson, C. W., Baum, P. R. & Jestland, R. S. (1973). Processing of adenovirus 2 induced proteins. *J. Virol.* **12**,241-253.

Baddiley, J. (1972). *Essays in Biochemistry* **8**, 35-77. Citado por Baddiley, J., 1981.

Baddiley, J. (1981). Overview of the chemistry and biochemistry of bacterial walls and unique prokariotic polymers. In *ß-Lactam Antibiotics* , pp. 13-30. M. Salton & G. D. Shockman (eds.). Academic Press, New York.

Barrett, J. F., Dolinger, D. L., Schramm, V. L. & Shockman, G. D. (1984). The mechanism of soluble peptidoglycan hydrolysis by an autolytic muramidase. A processive exodisaccharidase. *J. Biol. Chem.* **259**,11818-11827.

Beveridge, T. J. (1981). Ultrastructure, chemistry, and function of the bacterial wall. *Intern. Rev. Cytol.* **72**,229-317.

Beveridge, T. J. (1987). Wall ultrastructure: how little we know. *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, I. 1-2).

Beveridge, T. J. & Murray, R. G. Z. (1980). Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis. J. Bacteriol.* **141**,876-887.

Bishop, D. G., Op den Kamp, A. F. & van Deenen, L. L. M. (1977). The distribution of lipids in the protoplast membranes of *Bacillus subtilis* . A study with phospholipase C and trinitrobenzenesulphonic acid. *Eur. J. Biochem.* **80**,381-391.

Boylan, R. J., Mendelson, N. H., Brooks, D. & Young, F. E. (1972). Regulation of the bacterial cell wall: analysis of a mutant of *Bacillus subtilis* defective in biosynthesis of teichoic acid. *J. Bacteriol.* **112**,281-290.

Brown, W. C., Fraser, D. K. & Young, F. E. (1970). Problems in purification of a *Bacillus subtilis* autolytic enzyme caused by association with teichoic acid. *Biochim. Biophys. Acta* **198**,308-315.

Brumfitt, W., Wardlaw. A. C., & Park, J. T. (1958). Development of lysozyme-resistence in *Micrococcus lysodeikticus* and its association with an increased O-acetyl content of the cell wall. *Nature (London)* **181**,1783-1784. Citado por Logardt & Neujahr , 1975.

Cabral, J. P. S. & Silva, M. T. (1984). Binding of copper to *P. syringae* : a chemical and morphological study. *Proc. 2nd Working Group on Pseudomonas syringae . Pathovars* : 43-44. The Helenic Phytopathological Society.

Chang, K. Y. & Carr, C. W. (1971). Studies on the structure and function of lysozyme. 1. The effect of pH and cation concentration on lysozyme activity. *Biochim. Biophys. Acta* **229**,496-503.

Chassy, B. M. & Giuffrida, A. (1980). Method for the lysis of Gram-positive, asporogenous bacteria with lysozyme. *Appl. Environ. Microbiol.* **39**,153-158.

Chatterjee, A. N. (1969). Use of bacteriophage-resistant mutants to study the nature of the bacteriophage receptor site of *Staphylococcus aureus* . *J. Bacteriol.* **98**,519-527.

Chatterjee, A. N., Wong, W., Young, F. E. & Gilpin, R. W. (1976). Isolation and characterization of a mutant of *Staphylococcus aureus* deficient in autolytic activity. *J. Bacteriol.* **125**,961-967.

Cho, M.-I., Holt, S. C., Iacono, V. J. & Pollock, J. J. (1982). Effects of lysozyme and inorganic anions on the morphology of *Streptococcus mutans* BHT: electron microscopic examination. *J. Bacteriol.* **151**,1498-1507.

Cleveland, R. F., Wicken, A. J., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D. (1976a). Inhibition of wall autolysis in*Streptococcus faecalis* by lipoteichoic acid and lipids. *J. Bacteriol.* **126**,192-19.

Cleveland, R. F., Daneo-Moore, L., Wicken, A. J. & Shockman, G. D. (1976b). Effect of lipoteichoic acid and lipids on lysis of intact cells of *Streptococcus faecalis. J. Bacteriol.* **127**,1582-1584.

Cleveland, R. F., Höltje, J.-V., Wicken, A. J., Tomasz, A., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D. (1975). Inhibition of bacterial wall lysins by lipoteichoic acids and related compounds. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **67**,1128-1135.

Clewell, D. B. (1981). Plasmids, drug resistance, and gene transfer in the genus *Streptococcus. Microbiol. Rev* . **45**,409-436.

Coleman, S. E., van De Rijn, I. & Bleiweis, A. S. (1970). Lysis of grouped and ungrouped streptococci by lysozyme. *Infect. Immun* **2**,563-569.

Coley, J., Tarelli, E., Archibald, A. R. & Baddiley, J. (1978). The linkage between teichoic acid and peptidoglycan in bacterial cell wall. *FEBS Lett* . **88**,1-9.

Cornett, J. B., Johnson, C. A. & Shockman, G. D. (1979). Release of autolytic enzyme from *Streptococcus faecium* cell walls by treatment with dilute alkali. *J. Bacteriol.* **138**,699-704.

Cornett, J. B. & Shockman, G. D. (1978). Cellular lysis of *Streptococcus faecalis* induced with Triton X-100. *J. Bacteriol.* **135**,153-160.

Daneo-Moore, L. & Higgins. M. L. (1972). Morphokinetic reaction of *Streptococcus faecalis* (ATCC 9790) cells to the specific inhibition of macromolecular synthesis: nucleoid condensation on the initiation of protein synthesis. *J. Bacteriol* . **109**, 1210-1220.

Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D. (1977). The bacterial cell surface in growth and division. *Cell Surf. Rev* . **4**,597-715.

Davies, R. C., Neuberger, A. & Wilson, B. M. (1969). The dependence of lysozyme activity on pH and ionic strength. *Biochim. Biophys. Acta* **178**,294-305.

Dezélée, P. & Shockman, G. D. (1975). Studies of the formation of peptide cross-links in the cell wall peptidoglycan of *Streptococcus faecalis. J. Biol. Chem.* **250**, 6806-6816.

Dolinger, D. L., Schramm, V. L. & Shockman, G. D. (1987). Covalent modification of Sf

muramidase of *Streptococcus faecium* with a unique nucleotide. *American Society of Microbiology ConferenceAnt. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, 1. 24).

Dolinger, D., Said, I., Ghuysen, J.-M., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D. (1987). Evidence that muramidase-2 of *Streptococcus faecium* and penicillin binding proteins 1 and 5 are identical. *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, I. 45).

Doyle, R. J., McDannel, M. L., Streips, U. N., Birdsell, D. C. & Young, F. E. (1974). Polyelectrolyte nature of bacterial teichoic acids. *J. Bacteriol.* **118**,606-615.

Doyle, R. J., Mobley, H. L. T., Jolliffe, L. K. & Streips, U. N. (1981). Restricted turnover of cell wall of *Bacillus subtilis. Curr. Microbiol.* **5**,19-22.

Epstein, W. & Schultz, S. G. (1968). Ion transport and osmoregulation in bacteria. In *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-Forms,* pp. 186-193. L. Guze (ed.). Williams & Wilkins Co., Baltimore.

Ellwood, D. C. & Tempest, D. W. (1969). Control of teichoic acid and teichuronic acid biosyntheses in chemostat cultures of *Bacillus subtilis* var. *niger. Biochem. J.* **111**,1-5.

Fan, D. P. (1970). Autolysin(s) of *Bacillus subtilis* as dechaining enzyme. *J. Bacteriol.* **103**,494-499.

Fan, D. P. & Beckman, M. M. (1971). Mutant of *Bacillus subtilis* demonstrating the requirement of lysis for growth. *J. Bacteriol.* **105**,629-636.

Fan, D. P. & Beckman, M. M. (1972). New centrifugation technique for isolating enzymes from large cell structures: isolation and characterization of two *Bacillus subtilis* autolysins. *J. Bacteriol.* **109**,1258-1265.

Fan, D. P., Beckman, M. M. & Cunningham, W. P. (1972). Ultrastructural studies on a mutant of *Bacillus subtilis* whose growth is inhibited due to insufficient autolysin production. *J. Bacteriol.* **109**,1247-1257.

Fein, J. E. (1979). Possible involvement of bacterial autolytic enzymes in flagellar morphogenesis. *J. Bacteriol .* **137**,933-946.

Fein, J. E. & Rogers, H. J. (1976). Autolytic enzyme-deficient mutants of *Bacillus subtilis* 168. *J. Bacteriol.* **127**, 1427-1442.

Fischer, W., Rösel, P. & Koch, H. U. (1981). Effect of alanine ester substitution and other structural features of lipoteichoic acids on their inhibitory activity against autolysins of *Staphylococcus aureus . J. Bacteriol .* **146**,467-475.

Fitz-James, P. C. & Hancock, R. (1965). The initial structural lesion of penicillin action in *Bacillus megaterium . J. Biophys. Biochem. Cytol.* **26**,657-667. Citado por Silva, M. T., 1981.

Fleming, A. (1922). On a remarkable bacteriolytic element found in tissues and secretions. *Roy. Soc. Proc .* **93**,306-317.

Forsberg, C. W. & Rogers, H. J. (1974). Characterization of *Bacillus licheniformis* 6346 mutants which have altered lytic enzyme activities. *J. Bacteriol.* **118**, 358-369.

Forsberg, C. W. Wyrick, P. B., Ward, J. B. & Rogers H. J. (1973). Effect of phosphate limitation on the morphology and wall composition of *Bacillus licheniformis* and its phosphoglucomutase-deficient mutants. *J. Bacteriol.* **113**,969:984.

Fox, E. N. (1974). M proteins of group A streptococci. *Bacteriol. Rev.* **38**,57-86.

Franklin, R. M. & Granboulan, N. (1966). Ultrastructure of *Escherichia coli* cells infected with bacteriophage R17. *J. Bacteriol .* **91**,834-848.

Funahara, J. & Nikaido, H. (1980). Asymmetric localization of lipopolysaccharides on the outer membrane of *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol*. **141**,1463-1465

Garrett, A. J. (1965). Rapid extraction of phosphorus during periodate oxidation of isolated cell walls of *Staphylococcus aureus* (Oxford). *Biochem. J.* **95**,6c-8c.

Ghuysen, J.-M. (1968). Use of bacteriolitic enzyme in determination of wall structures and their role in cell metabolism. Bacteriol. Rev . **32**,425-464.

Ghuysen, J. -M. (1977). Biosynthesis and assembly of bacterial cell walls. *Cell Surf. Rev.* **4**,463-595.

Ghuysen, J.-M. & Strominger, J. L. (1963a). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* , strain copenhagen. I. Preparation of fragments by enzymatic hydrolysis. *Biochemistry* **2**,1110-1119.

Ghuysen, J.-M. & Strominger, J. L. (1963b). Structure of the cell wall of *Staphylococcus aureus* , strain copenhagen. II. Separation and structure of disaccharides. *Biochemistry* **2**,1119-1125.

Ghuysen, J.-M., Tipper, D. J. & Strominger J. L. (1966). Enzymes that degrade bacterial cell walls.*Meth. Enzymol* . **8**,685-699.

Giesbrecht, P., Wecke, J. & Reinicke, B. (1976). On the morphogenesis of the cell wall of staphylococci. *Int. Rev. Cytol.* **44**,225-317.

Glaser, L., Ionesco, H. & Schaeffer, P. (1966). Teichoic acids as components of a specific phage receptor in *Bacillus subtilis*. *Biochim. Biophys. Acta* **124**,415-417.

Goodell, W. & Tomasz, A. (1980). Alteration of *Escherichia coli* murein during amino acid starvation. *J. Bacteriol.* **144**,1009-1016.

Goodman, H., Pollock, J. J., Iacono, V. J. Wong, W. & Shockman, G. D. (1981a). Peptidoglycan loss during hen egg white lysozyme-inorganic salt lysis of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* **146**,755-763.

Goodman, H. , Pollock, J. J. , Katona, L. I. , Iacono, V. J. , Cho, M.-I. & Thomas, E. (1981b). Lysis of *Streptococcus mutans* by hen egg white lysozyme and inorganic sodium salts. *J. Bacteriol.* **146**,764-774.

Grula, E. A. & Hartsell, S. E. (1954). Lysozyme and morphological alterations induced in *Micrococcus lysodeikticus* . *J. Bacteriol.* **68**,171-177.

Grütter, M. G. & Matthews, B. W. (1982). Amino acid substitutions far from the active site of bacteriophage T_4 lysozyme reduce catalytic activity and suggest that the C-terminal lobe of the enzyme participates in substrate binding. *J. Mol. Biol.* **154**,525-535.

Gunsalus, I. C., Shuster, C. W. (1961). In *The bacteria*. R. Y. Stainer & I. C. Gunsalus (eds.). Academic Prees, New York.

Hay, J. B., Archibald, A. R. & Baddiley, J. (1965). The molecular structure of bacterial walls. *Biochem. J.* **97**,723-730.

Hayashi, H., Araki, Y. & Ito, E. (1973). Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from bacilli as a factor responsible for resistance to lysozyme. *J. Bacteriol.* **113**,592-598.

Helenius, A. & Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochim. Biophys, Acta* **415**,29

Hemphill, H. E. & Whitelely, H. R. (1975). Bacteriophages of *Bacillus subtilis* . *Bacteriol. Rev.* **39**, 257-315.

Heptinstall, S. Archibald, A. R. & Baddiley, J. (1970). Teichoic acids of membrane function in bacteria. *Nature (London)* **225**, 519- 521.

Herbold, D. R. & Glaser, L. (1975). *Bacillus subtils* N-acetylmuramic acid L-alanine

amidase. *J. Biol. Chem.* **250**,1676-1682.

Higgins, M. L., Pooley, H. M. & Shockman, G. D. (1970). Site of initiation of cellular autolysis in *Streptococcus faecalis* as seen by electron microscopy. *J. Bacteriol.* **103**,504-512.

Höltje, J. V. & Tomasz, A. (1975a). Lipoteichoic acid: a specific inhibitor of autolysin activity in pneumococcus . *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**,1690-1694.

Höltje, J. V. & Tomasz, A. (1975b). Biological effects of lipoteichoic acids. *J. Bacteriol.* **124**,1023-1027.

Höltje, J. V. & Tomasz, A. (1975c) Specific recognition of choline residues in the cell wall teichoic acid by the N-acetylmutamyl-L-alanine amidase of *Pneumococcus*. *J. Biol. Chem.* **250**,6072-6076

Houtsmuller, U. M. T. & van Deenen, L. L. M. (1964). On the accumulation of amino acid derivates of phosphatidylglycerol in bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **84**, 96-98.

Huff, E. (1982). Lipoteichoic acid, a major amphiphile of Gram-positive bacteria that is not readily extractable. *J. Bacteriol.* **149**,399-402.

Hughes, A. H., Stow, M. Hancock, I. C. & Baddiley, J. (1971). Function of teichoic acids and effect of novobiocin on control of Mg^{2+} at the bacterial membrane. *Nature New Biology* **229**,53-55.

Iacono, V. J., MacKay, B. J., DiRienzo, S. & Pollock, J. J. (1980). Selective antibacterial properties of lysozyme for oral microorganisms. *Infect. Immun.* **29**,623-632.

Irvin, R. T., MacAlister T. J. & Costerton, J. W. (1981). Tris (hydroxymethyl) aminomethane buffer modification of *Escherichia coli* outer membrane permeability. *J. Bacteriol.* **145**,1397-1403.

Iwasaki, H., Shimada A. & Ito, E. (1986). Comparative studies of lipoteichoic acids from several *Bacillus* strains. *J. Bacteriol.* **167**,508-516.

Jacob. A. E. & Hobbs, S. J. (1974). Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *J. Bacteriol.* **117**,360-372.

Janczura, E., Perkins, H. R. & Rogers, H. J. (1961). Teichuronic acid: a mucopolysaccharide present in wall preparations from vegetative cells of *Bacillus subtilis* . *Biochem . J .* **80**,82-93.

Johannsen, L., Labischinski, H., Reinicke, B., Giesbrecht, P. (1983). Changes in the chemical structure of walls of *Staphylococcus aureus* grown in the presence of chloramphenicol. *FEMS Microbiol. Lett.* **16**,313-316.

Jolliffe, L. K. & Doyle, R. J. (198l). The energized membrane and cellular autolysis in *Bacillus subtilis* . *Cell* **25**, 753-763.

Jolliffe, L. K., Doyle, R. J. & Streips, U. N. (1980). Extracellular proteases modify cell wall turnover in *Bacillus subtilis* . *J. Bacteriol.* **141**, 1199-1208.

Jones, D. & Shattock, P. M. F. (1960). The location of the group antigen of group D streptococcus. *J. Bacteriol.* **23**,335. Citado por Shockman & Slade, 1964.

Jones, M. N., Skinner, H. A., Tipping, E., Wilkinson, A. (1973). The interaction between ribonuclease A and surfactants. *Biochem . J .* **135**,231-236.

Joseph, R. & Shockman, G. D. (1975). Cellular localization of lipoteichoic acid in *Streptococcus faecalis* . *J. Bacteriol* . **122**,1375-1386.

Joseph, R. & Shockman, G. D. (1976). Autolytic formation of protoplasts (autoplasts) of *Streptococcus faecalis:* location of active and latent autolysin. *J. Bacteriol.* **127**, 1482-1493.

Kaback, H. R. (1970). Preparation and characterization of bacterial membranes.

Methods in Enzymology **22**,99-120.

Kariyama, R. & Shockman, G. D. (1987). Two kinds of rhamnose containing polysaccharide in cell walls of *Streptococcus faecium* . *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bact. Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, I. 12).

Kawamura, T. & Shockman, G. D. (1983b). Evidence for the presence of a second peptidoglycan hydrolase in *Streptococcus faecium* . *FEMS Microbiol. Lett.* **19**, 65-69.

Kawamura, T. & Shockman, G. D. (1983a). Purification and some properties of the endogenous, autolytic N-acetylmuramoylhydrolase of *Streptococcus faecium* , a bacterial glycoenzyme. *J. Biol. Chem.* **258**,9514-9521.

Kaya, S., Yokoyama, K., Araki, Y. & Ito, E. (1984). N- acetylmannosaminyl (1—>4) N-acetylglucosamine, a linkage unit between glycerol teichoic acid and peptidoglycan in cell walls of several *Bacillus* strains. *J. Bacteriol.* **158**,990-996.

Kellenberger, E., Ryter, A. & Sechand, J. (1958). Electron microscope study of DNA-containing plasms. II. Vegetative and mature phage DNA as compared with normal bacterial nucleoids in different physiological states. *J. Biophys. Biochem. Cytol* . **4**,671-678.

Koch. A. L. (1985). How bacteria grow and divide in spite of internal hydrostatic pressure. *Can. J. Microbiol.* **31**,1071-1084.

Kolenbrander, P. E. & Ensign, J. C. (1968). Isolation and chemical structrure of the peptidoglycan of *Spirillun serpens* cell walls. *J. Bacteriol.* **95**,201-210.

Kojima, N., Araki, Y. & Ito, E. (1985). Structure of the linkage units between ribitol theichoic acids and peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **161**,299-306.

Konings, W. N., Bisschop, A., Veenhuis, M. & Vermeulen, C. A. (1973). New procedure for the isolation of membrane vesicles of *Bacillus subtilis* and an electron microscopy study of their ultrastructure. *J. Bacteriol.* **116**,1456-1465.

Krause, R. M. & McCarty, M. (1961). Studies on the chemical structure of the streptococcal cell wall of the groups A and A-variant streptococci. *J. Exp. Med,* **114**,127-140

Krogstad, D. J., Smith, R. M., Moellering, Jr., R. C. & Parquette, A. R. (1980). Visualization of cell-cell contact during conjugation in *Streptococcus faecalis* . *J. Bacteriol.* **141**,963-967.

Krulwich, T. A., Ensign, J. C., Tipper, D. J. & Strominger, J. L. (1967). Sphere-rod morphogenesis in *Arthrobacter crystallopoietes*. I. Cell wall composition and polysaccharides of the peptidoglycan. *J. Bacteriol.* **94**,734-740.

Lambert, P. A., Hancock, I. C. & Baddiley, J. (1977). Occurrence and function of membrane teichoic acids. *Biochim. Biophysis. Acta* **472**,1-12

Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T_4. *Nature (London)* **227**,680-685.

Leduc, M. & van Heijenoort, J. (1973). An unusual type of bacterial cell-wall in a mutant of *Bacillus subtilis* 168. *Eur. J. Biochem.* **37**,389-400.

Leduc, M. & van Heijenoort, J. (1980). Autolysis of *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **142**,52-59.

Leduc, M., Kasra, R. & van Heijenoort, J. (1982). Induction and control of the autolytic system of *Escherichia coli. J. Bacteriol.* **152**,26-34.

Lehninger, A. L. (1977). *Biochemistry* . Worth Publishers, Inc. New York.

Lindmark, R., Movitz, J. & Sjöquist, J. (1977). Extracellular protein A from a

methicillin-resistant strain of *Staphylococcus aureus*. *Eur. J. Biochem.* **74,** 623-628.

Lindsay, B. & Glaser, L. (1976). Characterization of the N-acetylmuramic acid L-alanine amidase from *Bacillus subtilis* . *J. Bacteriol* . **127,**803-811.

Logardt, I.-M. & Neujahr, H. Y. (1975). Lysis of modified walls from *Lactobacillus fermentum* . *J. Bacteriol.* **124,** 73-77.

Lopez, R., García, E., García, P., Ronda, C., & Tomasz, A. (1982). Choline-containing bacteriophage receptors in*Streptococcus pneumoniae* . *J. Bacteriol.* **151,**1581-1590.

Lopez, R., Sanchéz-Puelles, J. M., Ronda, C., García, P., García, J. L. & García, E. (1987). Biological role(s) of the pneumococcal N-acetylmuramic acid-L-alanine amidase. In *Streptococcal Genetics* , pp. 185-188. J. J. Ferretti & R. Curtiss III (eds.). Am. Soc. Microbiol, Washington, D. C.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. & Randall, R. J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193,**265-275.

Luft, J. H. (1961). Improvements in epoxy resin embedding methods. *J. Biophys. Biochem. Cytol.* **9,**409-412.

Machtiger, N. A. & Fox, F. (1973). Biochemistry of bacterial membranes. *Ann. Rev. Biochem.* **22,** 575-600.

Marquis, R. E. (1987). Turgor pressure and the physical properties of cell walls. *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bact. Cell Surface Assembly and Function*. (Abstracts, I. 1-3).

Mathews, T. H., Doyle, R. J. & Strips, U. N. (1979). Contribution of peptidoglycan to the binding of metal ions by the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Curr. Microbiol.* **3,**51-53.

Matthews, B. W., Remington, S. J. , Grütter, M. G. & Anderson, W. F. (1981). Relation between hen egg white lysozyme and bacteriophage T_4 lysozyme: evolutionary implications. *J. Mol. Biol.* **147,**545-558.

Metcalf, R. H. & Deibel, R. H. (1969). Differential lytic response of enterococci associated with addition order of lysozyme and anions. *J. Bacteriol.* **99,**674-680.

Metcalf, R. H. & Deibel, R. H. (1972). Growth of *Streptococcus faecium* in the presence of lysozyme. *Infect. Immun.* **6,**178-183.

Metcalf, R. H. & Deibel, R. H. (1973). Effect of lysozyme on enterococcal viability in low ionic environments. *J. Bacteriol.* **113,**278-286.

Meyer, P. D. & Wouters, J. T. M. (1987). Lipoteichoic acid from *Bacillus subtilis* subsp. *niger* WM: isolation and effects on cell wall autolysis and turnover. *J. Bacteriol.* **169,**973-980.

Mitchell, P. & Moyle, J. (1957). Autolytic release and osmotic properties of "protoplasts" from *Staphylococcus aureus*. *J. Gen. Microbiol.* **16,**184-194. Citado por Daneo-Moore & Shockman, 1977.

Morgan, C. , Rosenkranz, H. S. , Carr, H. S. & Rose, H. (1967). Electron microscopy of chloramphenicol-treated *Escherichia coli* . *J. Bacteriol.* **93,**1987-2002.

Movitz, J. (1976). Formation of extracellular protein A by *Staphylococcus aureus* . *Eur. J. Biochem.* **68,**291-299.

Murray. R. G. E. (1960). The Internal Structure of the Cell. In *The Bacteria.* vol. I, pp. 35. J. C. Gunsahes & R.Y. Stainer (eds.). Academic Press Inc., New York.

Ne'eman, Z. V. I. , Kahane, I. & Razin, S. (1971). Characterization of the mycoplasm membrane proteins. II. Solubilization and enzymatic activities of *Acholeplasma laidlawii* membrane proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **249,**169-176.

Nelson, C. A. (1971). The binding of detergents to proteins. I. The maximum of dodecyl

sulfate bound to proteins and the resistence to binding of several proteins. *J. Biol. Chem.* **246**,3895-3901.

Nermut, M. V. (1967). The ultrastructure of the cell wall of *Bacillus megaterium* . *J. Gen. Microbiol.* **49**,503-512.

Neujahr, H. Y., Börstad, B. & Logardt, I.-M. (1973). Factors affecting the resistance of *Lactobacillus fermenti* to lysozyme. *J. Bacteriol.* **116**,694-698.

Noller, E. C. & Hartsell, S. E. (1961a). Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae* . I. Lysis by four lytic systems utilizing lysozyme. *J. Bacteriol.* **81**,482-491.

Noller, E. C. & Hartsell, S. E. (1961b). Bacteriolysis of *Enterobacteriaceae*. II. Pre-and co-lytic treatments potentiating the action of lysozyme. *J. Bacteriol* . **81**, 492-499.

Op den Kamp, J. A. F., van Iterson, W. & van Deenen, L. L. M. (1967). Studies on the phospholipids and morphology of protoplasts of *Bacillus megaterium* . *Biochim. Biophysis. Acta* **135**,862-884.

Osborn, M. J., Rick, P. D., Lehmann, V., Rupprecht, E. & Singh, H. (1974). Structure and biogenesis of the all envelope of Gram-negative bacteria. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**,52-65. Citado por Parente, A. M. , 1984.

Parente, A. M. (1984). Lise de bactérias de Gram-negativo. Estudo espectrofotométrico e ultrastrutural em *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. Tese de Doutoramento apresentada à Universidade do Porto.

Parente, A. M. & Silva, M. T. (1984). Ultrastructural aspects of autolysis of *Pseudomonas fluorescens* induced by osmotic shock. *J. Gen. Microbiol.* **130**, 1459-1470.

Paton, J. C., May, B. K. & Elliot, W. H. (1978). Membrane phospholipid asymmetry in *Bacillus amyloliquefaciens* . *J. Bacteriol.* **135**,393-401.

Pestka, S. (1971). Inhibitors of ribosome functions. *Ann. Rev. Biochem.* **40**, 697-710.

Pirie, N. W. (1973). *Ann. Rev. Microb* ..**27**, 119-131. Citado por Beveridge, 1981.

Pollock, J. J., Katona, L. I., Goodman, H., Cho, M.-I. & Iacono, V. J. (1981). Bacteriolysis of *Streptococcus mutans* BHT by lysosyme and inorganic anions normally present in human saliva. *Arch. Oral Biol.* **26**,711-716.

Pooley, H. M. (1976). Turnover and spreading of old wall during surface growth of *Bacillus subtilis* . *J. Bacteriol.* **125**,1127-1138.

Pooley, H. M. & Karamata, D. (1984a). Flagellation and the control of autolysin activity in *Bacillus subtilis* . In *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* , pp. 13-19. C. Nombela (ed.). Elsevier Science Publisher. B. V, Amsterdam.

Pooley, H. M. & Karamata, D. (1984b). Genetic analysis of autolysin-deficient and flagellaless mutants of *Bacillus subtilis* . *J. Bacteriol.* **160**,1123-1129.

Pooley, H. M. & Karamata, D. (1987). Can the synthesis of wall anionic polymers in *Bacillus subtilis* be a lethal target for antiobiotics? *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, III. III-5).

Pooley, H. M., Porres-Jùan, J. M. & Shockman, G. D. (1970). Dissociation of an autolytic enzyme-cell wall complex by treatment with unusually high concentration of salt. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **38**,1134-1140.

Pooley, H. M. & Shockman, G. D. (1969). Relationship between the latent form and the active form of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis* . *J. Bacteriol* . **100**, 617-624.

Pooley, H. M. & Shockman, G. D. (1970). Relationship between the location of autolysin, cell wall synthesis, and the development of resistance to cellular

autolysis in *Streptococcus faecalis* after inhibition of protein synthesis. *J. Bacteriol.* **103**,457-466.

Pooley, H. M., Shockman, G. D., Higgins, M. L. & Porres-Juan, J. (1972). Some properties of two autolytic-defective mutants of *Streptococcus faecalis* ATCC 9790. *J. Bacteriol.* **109**,423-431.

Ramachandran, L. K. & Witkop, B. (1967). N-bromosuccinimide cleavage of peptides. *Meth. Enzymol.* **11**, 283-299.

Ranhand, J. M., Leonard, C. G. & Cole, R. M. (1971). Autolytic activity associated with competent group H streptococci. *J. Bacteriol.* **106**,257-268.

Rayman, M. K. & MacLeod, R. A. (1975). Interaction of Mg^{2+} with peptidoglycan and its relation to the prevention of lysis of a marine pseudomonad. *J. Bacteriol.* **122**, 650-659.

Reinicke, B., Blümel, P. C. & Giesbrecht, P. (1983). Reduced degradability by lysozome of staphylococcal cell walls after chloramphenicol treatment. *Arch. Microbiol.* **135**,120-124.

Robson, R. L. & Baddiley, J. (1977). Role of teichuronic acid in *Bacillus licheniformis* : defective autolysis due to deficiency of teichuronic acid in a novobiocin-resistant mutant. *J. Bacteriol.* **129**,1051-1058.

Rogers, H. J. (1963). The bacterial cell wall. The result of adsorption, structure or selective permeability ? *J. Gen. Microbiol.* **32**,19-24.

Rogers, H. J. (1970). Bacterial growth and the cell envelope. *Bacteriol. Rev.* **34**,194-214.

Rogers, H. J. (1979). The function of bacterial autolysins. In *Microbial Polysaccharides and Polysaccharases* , pp. 237-268. R. C. W. Berkeley, G. W. Gooday & D. C. Ellwood (eds.). Academic Press, New York.

Rogers, H. J. (1981). Some unsolved problems concerned with the assembly of the walls of Gram-positive organisms. In *ß - Lactam Antibiotics* , pp. 87-100. M. R. J. Salton & G. D. Shockman (eds.). Academic Press, New York

Rogers, H. J. (1987). The bacterial surface- When does it begin and end? *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, VIII. VIII).

Rogers, H. J., Perkins, J. R. & Ward. J. B. (1980). In *Microbial Cell Walls and Membranes* , pp. 437-460. Chapman & Hall, London. Citado por Koch, A. L., 1985.

Rogers, H. J. & Wright, G. (1986). Effects of ethanol and other 1-alkanols on cell autolysis and macromolecular synthesis by *Bacillus subtilis* . *J. Gen. Microbiol.* **132**,1221-1229.

Rosenthal, R. S. & Shockman, G. D. (1975). Characterization of the presumed peptide croos-links in the soluble peptidoglycan synthesized by protoplasts of *Streptococcus faecalis* ATCC 9790. *J. Bacteriol.* **124**,410-418

Rothman, J. E. & Kennedy, E. P. (1977). Asymmetrical distribution of phospholipds in the membrane of *Bacillus megaterium. J. Mol . Biol.* **110**,603-618.

Ryter, A. & Kellenberger, E. (1958). Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acid deoxyribonucléique. I. Les nucléoides de bactèries en croissance active. *Z. Naturforsch.* **13 b**,597-605.

Said, I., Marri, L., Massidda, O., Fazari, S. & Daneo-Moore, L. (1987). Penicillin binding proteins of a muramidase-2 mutant of *S. faecium* 9790. *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, I. 41).

Saint-Blancard, J., Chuzel, P., Mathieu, Y., Perrot, J. & Jollès, P. (1970). Influence of pH

and ionic strenght on the lysis of *Micrococcus lysodeikticus* cells by six human and four avian lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* **220**,300-306.

Saint-Blancard, J., Maurel, J. P., Constant, J. F., Berthou, J. & Jollès. (1981). Influence of pH and ionic strength on the lysis of *Micrococcus luteus* cells by hen lysozyme at low (20 °C) and high (physiological, 40 °C) temperature. *Bioscience Reports* , **1**, 119-123.

Salton, M. R. J. (1952). Cell walls of *Micrococcus lysodeikticus* as the substrate of lysozyme. *Nature (London)* **170**,746-747.

Salton, M. R. J. (1957). The properties of lysozyme and its action on microorganisms. *Bacteriol. Rev.* **21**, 82-99.

Salton, M. R. J. (1958). The lysis of micro-organisms by lysozyme and related enzymes. *J. Gen. Microbiol.* **18**,481-490.

Salton, M. R. J. (1961). The anatomy of the bacterial surface. *Bacteriol. Rev.* **25**,77-99.

Salton, M. R. J. & Pavlik, J. G. 1960. Studies of the bacterial cell wall. VI. Wall composition and sensitivity to lysozyme. *Biochim. Biophys. Acta* **39**,398-407.

Sanchez-Puelles, Ronda, C., Garcia, J. L., Garcia, P., Rubens, Lopez, R. & Garcia, E. (1986). Searching for autolysin functions. Characterization of a pneumococcal mutant deleted in the *lyt* A gene. *Eur. J. Biochem.* **158**,289-293.

Santos-Mota, J. M., Op den Kamp, J. A. F., Verheij, H. M. & van Deenen, L. L. M. (1970). Phospholipids of *Streptococcus faecalis* . *J. Bacteriol.* **104**,611-619.

Santos Mota, J. M., Silva, M. T. & Guerra, F. C. (1972). Variations in the membranes of *Streptococcus faecalis* related to different cultural conditions. *Arch. Mickrobiol.* **83**,293-302.

Sasaki, Y., Araki, Y. & Ito, E. (1983). Structure of teichoic-acid-glycopeptide complexes from cell walls of *Bacillus cereus* AHU 1030. *Eur. J. Biochem.* **132**,207-213.

Sayare, M., Daneo-Moore, L. & Shockman, G. D. (1972). Influence of macromolecular biosynthesis on cellular autolysis in*Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **112**, 337-344.

Schindler, P. R. G. & Teuber, T. (1978). Ultrastructural study of *Salmonella typhimurium* treated with membrane-active agents: specific reaction of dansylchloride with cell envelope components. *J. Bacteriol.* **135**,198-206.

Schleifer, K. H. & Kandler, O. (1972). Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* **36**,407-477.

Seto, H. & Tomasz, A. (1974). Early stages in DNA binding and uptake during genetic transformation of pneumococci. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **71**,1493-1498.

Seto, H., Lopez, R. & Tomasz, A. (1975). Cell surface-located deoxyribonucleic acid receptors in transformable pneumococci. *J. Bacteriol.* **122**,1339-1350.

Shockman, G. D. (1965). Symposium on the fine structure and replication of bacteria and their parts. IV. Unbalanced cell-wall synthesis: autolysis and cell-wall thickening. *Bacteriol. Rev.* **29**,345-358.

Shockman. G. D. & Barrett, J. F. (1983). Structure, function and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* **37**,501-527.

Shockman. G. D. & Cheney, M. C. (1969). Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis* . V. Nature of the autolysin-cell wall complex and its relationship to properties of the autolytic enzyme of *Streptococcus faecalis* *J. Bacteriol.* **98**, 1199-1207.

Shockman, G. D., Conover, M. J., Kolb, J. J., Phillips, P. M., Riley, L. S. & Toennies, G. (1961). Lysis of *Streptococcus faecalis* . *J. Bacteriol.* **81**,36-43.

Shockman, G. D., Daneo-Moore, L. , Cornett, J. B. & Mychajlonka, M. (1979). Does penicillin kill bacteria? *Rev. Infect. Dis.* **1**,787-796.

Shockman, G. D. , Daneo-Moore, L. & Higgins, M. L. (1974). Problems of cell wall and membrane growth, enlargement, and division.*Ann. N. Y. Acad. Sci.* **235**,161-197.

Shockman, G. D., Daneo-Moore, L., McDowell, T. D. & Wong W. (1981). Function and structure of the cell wall - its importance in the life and death of bacteria. *ß - Lactam Antibiotics* , pp. 31-65. M. R. J. Salton & G. D. Shockman (eds.). Academic Press, New York.

Shockman. G. D., Dolinger, D. & Daneo-Moore, L. (1987). The autolytic peptidoglycan hydrolase of *Streptococcus faecium* : two unusual enzymes.*(em publicação).*

Shockman. G. D., Dolinger, D., Schramm, V., Daneo-Moore, L., Mays, J. & Kariyama, R. (1987). The autolytic peptidoglycan hidrolases of *Streptococcus faecium* : two unusual enzymes. *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function.* (Abstracts, II. II-5).

Shockman. G. D., Kawamura, T., Barrett, J. & Dolinger, D. (1983). The autolytic system of *Streptococcus faecium* . In *The Target of Penicillin* , pp. 165-172. R. Hakenbeck, J. V. Höltje & H. Labischinski (eds.). Walter de Gruyter & Co, Berlin.

Shockman. G. D., Kawamura, T., Barrett, J. & Dolinger, D. (1985). The autolytic peptidoglycan hydrolases of *Streptococcus faecium. Ann. Microbiol.* .(Inst. Pasteur) **136A**,63-66.

Shockman, G. D., Kolb, J. J. & Toennies, G. (1958). Relations between bacterial cell wall synthesis, growth phase and autolysis. *J. Biol. Chem* . **230**,961-977.

Shockman, G. D., Pooley, H. M. & Thompson, J. S. (1967b). Autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis* . III. Localization of the autolysin at the sites of cell wall synthesis. *J. Bacteriol* . **94**,1525-1530.

Shockman, G. D. & Slade, H. D. (1964). The cellular location of the streptococcal group D antigen. *J. Gen. Microbiol.* **37**, 297-305.

Shockman, G. D., Thompson, J. S. & Conover, M. J. (1967a). The autolytic enzyme system of *Streptococcus faecalis* . II. Partial characterization of the autolysin and its substrate. *Biochemistry* **6**,1054-1065.

Shockman, G. D. , Thompson, J. S. & Conover, M. J. (1968). The relationship of autolysin to lysozyme sensitivy of *Streptococcus faecalis* ATCC 9790. In *Microbial Protoplasts, Spheroplasts and L-forms* , pp. 248-260. L. B. Guze (ed). Williams & Wilkins Co./ Baltimore.

Shungu, D. L., Cornett, J. B. & Shockman, G. D. (1979). Morphological and physiological study of autolytic-defective *Streptococcus faecium* strains. *J. Bacteriol.* **138**,598-608.

Silva, M. T. (MCMLXII). Possibilidades do método de coloração de Piechand em citologia bacteriana. *Folia Anat. Universitatis Conimbrigensis* **XXXVI**, 1-10.

Silva, M. T. (1967). Electron microscopic aspects of membrane alterations during bacterial cell lysis. *Exp. Cell Res.* **46**,245-251.

Silva, M. T. (1975). The ultrastructure of the membranes of gram-positive bacteria as influenced by fixatives and membran-damaging treatments. In "*Biomembranes - Lipids , Proteins and Receptors* " Ed. R. M. Burton & L. Packer.

Silva, M. T. (1979). Lise induzida por detergentes em bactérias aeróbias de Gram-positivo. Prova Complementar do Doutoramento em Microbiologia, apresentada à Universidade do Porto.

Silva, M. T. (1980). Bacterial membranes. *Ciência Biológica (Portugal)* **5**,241-244.

Silva, M. T.(1984). The use of transmission electron microscopy of ultrathin sections for the characterization of the ultrastructure of normal and damaged bacterial membranes. In *Biomembranes: Dynamics and Biology* , pp. 1-35. R. M. Burton & F. C. Guerra (eds.). Plenum Publishing Corporation, New York.

Silva, M. T., Polónia, J. J., Macedo, M. A. E. & Macedo, P. M. (1979). Membrane splitting induced by lipophilic molecules. *Biol. Cellulaire* **35**,175-182.

Silva, M. T., Santos-Mota, J. M., Melo, J. V. C. & Guerra, F. C. (1971). Uranyl salts as fixatives for electron microscopy. Study of the membrane ultrastructure and phospholipid loss in bacilli. *Biochim. Biophys. Acta* **233**,513-520.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Macedo, M. A. E., Polónia, J. & Parente, A. M. (1976a). Effects of phenethyl alcohol on *Bacillus* and *Streptococcus* . *J. Bacteriol.* **127**, 1359-1369.

Silva, M. T., Sousa, J. C. F., Polónia, J. J., Macedo, M. A. E. & Parente, A. M. (1976b). Bacterial mesosomes. Real structures or artifacts? *Biochim. Biophys. Acta* **443**,92-105.

Singer, S. J. & Nicolson, G. L. (1972). The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science* **175**,720-731.

Sjödahl, J. (1977). Repetitive sequences in protein A from *Staphylococcus aureus* . *Eur. J. Biochem.* **73**,343-351.

Slade, H. D. & Shockman, G. D. (1963). The protoplasts membrane and the group D antigen of *Streptococcus faecalis* . *Iowa State J. Sci.* **38**,83-96. Citado por Joseph, R. & Shockman, G. D. 1975.

Smolelis, A. N. & Hartsell, S. E. (1952). Factors affecting the lytic activity of lysozyme. *J. Bacteriol.* **63**,665-674.

Stewart, C. R. & Marmur, J. (1970). Increase in lytic activity in competent cells of *Bacillus subtilis* after uptake of deoxyribonucleic acid. *J. Bacteriol.* **101**, 449-455.

Stolp, H. & Starr, M. 1965. Bacteriolysis. *Ann. Rev. Microbiol.* **19**,79-104.

Strominger, J. L. & Ghuysen, J. M. (1967). Mechanisms of enzymatic bacteriolysis. Cell walls of bacteria are solubilized by action of either specific carbohydrases or specific peptidases. *Science* **156**,213-221.

Studer, R. E. & Karamata, D. (1987). Cell wall proteins in *Bacillus subtilis* . *American Society of Microbiology Conference Antib. Inhib. Bacterial Cell Surface Assembly and Function* . (Abstracts , I. 13).

Sussman, A. S. & Lowry, R. J. (1955). Physiology of the cell surface of *Neurospora* ascopores I. Cation binding properties of the cell surface.*J. Bacteriol* . **70**,675-685.

Sykes,J. (1971). Centrifugal techniques for the isolation and caracterization of subcellular components from bacteria. *Meth. Microbiol.* **5b:** 55-207. Citado por Parente, A. M., 1984.

Tipper, D. J. & Wright, A. (1979). The structure and biosynthesis of bacterial cell walls. In*The Bacteria* , vol. VII, pp. 291-426. J. R. Sokatch & L. N. Ornston (eds.). Academic Press, New York.

Tomasz, A. (1968). Biological consequences of the replacement of choline by ethanolamine in the cell wall of pneumococcus: chain formation, loss of transformability and loss of autolysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **59**,86-93

Tomasz, A. (1979). From penicillin-binding proteins to the lysis and death of bacteria: a 1979 view. *Rev. Infect. Dis.* **1**,434-467.

Tomasz, A. (1984). Building and breaking of bonds in the cell wall of bacteria - the role for autolysins. In *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis* , pp. 3-12. C.

Nombela (ed.). Elsevier Science Publishers, B. V. , Amsterdam.
Tomasz, A. & Waks, S. (1975). Mechanism of action of penicillin: triggering of the pneumococcal autolytic enzymic by inhibitors of cell wall synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **72**,4162-4166.
Tomasz, A. & Westphal, M. (197)1. Abnormal autolytic enzyme in a pneumococcus with altered teichoic acid composition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68**,2627-2630.
Tsien, H. C., Shockman, G. D. & Higgins, M. L. (1978). Structural arrangement of polymers within the wall of *Streptococcus faecalis*. *J. Bacteriol.* **133**,372-386.
Umeda, A , Ueki, Y. & Amako, K. (1987). Structure of the *Staphylococcus aureus* cell wall determined by the freeze-substitution method. *J. Bacteriol.* **169**,2482-2487.
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. Ultrastruct. Res* . **43**,483-497.
Vazquez, D. (1964). The binding of chloramphenicol by ribosomes from *Bacillus megaterium* . *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **15**,464-468.
Venable, J. H. &. Coggeshall, R. (1965). A simplified lead citrate stain for use in electron microscopy. *J. Cell Biology* **25**,407-408.
Vorbeck, M. L. & Marinetti, G. V. (1965). Intracellular distribution and characterization of the lipids of *Streptococcus faecalis* (ATCC 9790). *Biochemistry* **4**,296-305.
Voss, J. G. (1967). Effects of organic cations on the Gram-negative cell wall and their bactericidal activity with ethylenediaminetetra-acetate and surface active agents. *J. Gen. Microbiol.* **48**,391-400.
Ward, J. B. (1973). The chain length of the glycans in bacterial cell walls. *Biochem. J.* **133**,395-398.
Ward, J. B. (1981). Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. *Microbiol. Rev.* **45**, 211-243.
Ward, J. B. & Williamson, R. 1984. Bacterial autolysins: specificity and function. In *Microbial Cell Wall Synthesis and Autolysis*, pp. 159-166. C. Nombela (ed.). Elsevier Science Publishers, B. V. , Amsterdam.
Warth, A. D. & Strominger, J. L. (1971). Structure of the peptidoglycan from vegetative cell walls of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry* **10**,4349-4358.
Webb, M. (1970). Interrelationships between the utilization of magnesium and the uptake of other bivalent cations by bacteria. *Biochim. Biophys. Acta* **222**, 428-439.
Wecke, J., Lahav, M., Ginsburg, I. & Giesbrecht, P. (1982). Cell wall degradation of *Staphylococcus aureus* by lysozyme. *Arch. Microbiol.* **131**,116-123.
Weibull, C. (1953). The isolation of protoplast from *Bacillus megaterium* by controlled treatment with lysozyme. *J. Bacteriol.* **66**,688-698.
Weibull, C. (1973). Electron microscope studies on aldehyde-fixed unstained microbial cells. *J. Ultrastruct. Res.* **43**,150-159.
Weidel, W. & Pelzer, H. (1964). Bag-shaped macromolecules - a new outlook on bacterial cell walls. *Adv. Enzymol.* **26**,193-232. Citado por Tomasz, A., 1984 .
Welsch, M. (1958). Lysis by agents of microbial origin. *J. Gen. Microbiol.* **18**,491-497.
Westmacott, D. & Perkins, H. R. (1979). Effects of lysozyme on *Bacillus cereus* 569: rupture of chains of bacteria and enhancement of sensitivity to autolysins. *J. Gen. Microbiol.* **115**,1-11.
Wicken, A. J. & Baddiley, J. (1963). Structure of intracellular teichoic acids from group D streptococci. *Biochem J.* **87**,54-62.
Wicken, A. J. & Knox, K. W. (1975). Lipoteichoic acids: a new class of bacterial antigen.

Science **187,** 1161-1167.

Wilkens, T. J., Goodman, H., MacKay, B. J., Iacono, V. J. & Pollock, J. J. (1982). Bacteriolysis of *Streptococcus mutans* GS5 by lysozyme, proteases and sodium thiocynate. *Infect. Immun.* **38,**1172-1180.

Williamson, R. & Tomasz, A. (1980). Antibiotic-tolerant mutants of *Streptococcus pneumoniae* that are not deficient in autolytic activity. *J. Bacteriol.* **144,**105-113.

Williamson, R. & Ward, J. B. (1981). Deficiency of autolytic activity in *Bacillus subtilis* and *Streptococcus pneumoniae* is associated with a decreasead permeability of the wall. *J. Gen. Microbiol.* **125,**325-334.

Woese, C. R.(1981). Archaebacteria. *Sci. Amer.* **244,**94-106.

Yoneyama, T., Koike, Y., Arakawa, H., Yokoyama, K., Sasaki, Y. Kawamura, T., Araki, Y., Ito, E. & Takao, S. (1982). Distribution of mannosamine and mannosaminuronic acid among cell walls of *Bacillus* species.*J. Bacteriol.* **149,** 15-21.

Young, F. E. (1967). Requirements of glucosylated label teichoic acid for adsorption of phage in *Bacillus subtilis* 168. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **68,** 2377-2384.