JOÃO PAULO DE SOUSA CABRAL

ESTUDO DO MODO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

PORTO
1991

JOÃO PAULO DE SOUSA CABRAL

Instituto de Botânica «Dr. Gonçalo Sampaio», Faculdade de Ciências

Centro de Citologia Experimental

Universidade do Porto

ESTUDO DO MODO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

PORTO

1991

JOÃO PAULO DE SOUSA CABRAL
Assistente de Botânica da Faculdade de Ciências
Universidade do Porto

ESTUDO DO MODO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU DE DOUTOR APRESENTADA À FACULDADE DE CIÊNCIAS DA UNIVERSIDADE DO PORTO.

Orientador - Doutor Manuel Alexandre Teixeira da Silva
Serviço de Microbiologia
Faculdade de Medicina
Centro de Citologia Experimental
Universidade do Porto

PORTO
1991

Publicação subsidiada pelo
Instituto Nacional de Investigação Científica

À MEMÓRIA DE MEU PAI

PREFÁCIO

Adoptei nesta Dissertação o seguinte esquema: os métodos experimentais, os resultados e sua discussão encontram-se na sua maioria em artigos; a maioria destes foi já publicada ou sê-lo-á em breve; os restantes encontram-se em fase de apreciação em revistas estrangeiras da especialidade; os resultados complementares encontram-se distribuidos por três anexos. Os artigos e anexos são precedidos de uma discussão geral sobre os principais aspectos focados neste trabalho. Participei na execução do trabalho experimental, interpretação dos resultados e redacção do artigo número seis, de co-autoria com A. R. W. Smith.

Este trabalho não teria sido possível sem a orientação e ajuda amiga do Doutor Manuel Alexandre Teixeira da Silva e do Doutor Anthony R. W. Smith, *Reader* da Politécnica do Tamisa (Londres), o apoio do Prof. Dr. R. Salema, a colaboração do Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto e da Politécnica do Tamisa, onde realizei este trabalho, e do Instituto Nacional de Investigação Científica e da Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica, que subsidiaram os seus custos, incluindo parte das minhas deslocações a Londres. Agradeço ainda à Drª. Teresa Serra, à Engª M. Aboim-Inglês, e ao Dr. J. M. S. Martins, a discussão de algumas matérias contidas neste trabalho. Por fim, mas não por último, à Sílvia, que sempre me apoiou e encorajou na realização do presente trabalho.

Ao abrigo do disposto no número dois do artigo oitavo do Decreto-Lei nº 388/70, foram incluidas nesta Dissertação os seguintes artigos publicados:

CABRAL, J. P. S. 1989. Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability. *Microbios* **60**, 141-150.

CABRAL, J. P. S. 1990. Cupric ions induce both an efflux of potassium and low molecular weight metabolites in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters* **72**, 109-112.

CABRAL, J. P. S. 1990. Plasmolysis induced by very low concentrations of Cu^{2+} in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271, and its relation with cation fluxes. *Journal of General Microbiology* **136**, 2481-2487.

CABRAL, J. P. S. 1991. Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 341-344.

Foi ainda incluido o seguinte artigo aceite para publicação:

CABRAL, J. P. S. 1991. The antibacterial action of cupric ions in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters*.

ABREVIATURAS FREQUENTEMENTE UTILIZADAS NESTE TRABALHO

CFU	-	unidades formadoras de colónias.
CMC	-	concentração micelar crítica.
CTAB	-	brometo de cetiltrimetilamónio.
$[Cu^{2+}]_{inicial}$	-	concentração extracelular de Cu^{2+} no início da experiência.
$[Cu^{2+}]_{livre}$	-	concentração extracelular de iões Cu^{2+} livres, *i. e.*, não ligados a moléculas orgânicas.
$[Cu^{2+}]_{total}$	-	concentração extracelular total de iões Cu^{2+}.
DDC	-	dietilditiocarbamato de sódio.
ED_{50}	-	concentração de agente químico que inibe o crescimento em, ou de, 50 % das células
EDTA	-	ácido etilenodiaminotetracético.
$[K^+]_{in}$	-	concentração intracelular de K^+.
$[K^+]_{out}$	-	concentração extracelular de K^+.
LD_x	-	concentração de agente químico que inviabiliza *x* % da população num determinado tempo de tratamento.
MBC	-	concentração bactericida mínima.
MIC	-	concentração inibitória mínima.
NA	-	agar nutritivo.
NB	-	meio nutritivo.
NTA	-	ácido nitrilotriacético.
PC	-	fosfatidilcolina.
PIPES	-	ácido 1,4-piperazinadietanosulfónico.
RNA	-	ácido ribonucleico.
TRIS	-	Tris(hidroximetil)aminometano.
YGS	-	meio de extracto de levedura, glicerol e sais.

ÍNDICE

pg.

RESUMO 1

INTRODUÇÃO - A UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE COBRE E DA DODINA NO CONTROLO DE DOENÇAS DE PLANTAS 5

Compostos de cobre 5

Dodina 9

ESTUDO DO MODO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE* 18

Introdução 18

1. O papel fundamental do K^+ no metabolismo bacteriano 19

1.1. As células bacterianas apresentam elevadas concentrações internas de K^+, que são mantidas pela permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática 19

1.2. O funcionamento de determinados sistemas enzimáticos e o crescimento das células bacterianas são directamente influenciados pelo K^+ 20

1.3. O K^+ é o principal responsável pela elevada pressão osmótica interna das células bacterianas 29

2. O efluxo de K^+ e de metabolitos de baixo peso molecular, induzido pelo Cu^{2+} e pela dodina em *P. syringae* 34

2.1. Os métodos utilizados no estudo do efluxo de K^+ induzido por agentes químicos 34

Quantificação do K^+ libertado 34

Determinação dos parâmetros do efluxo de K^+ 35

2.2. O efluxo de K^+ e de metabolitos de baixo peso molecular induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* 37

2.2.1. Os iões Cu^{2+} e Hg^{2+} induzem um efluxo de K^+ em células eucarióticas e procarióticas 37

2.2.2. O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* é um processo muito rápido 39

2.2.3. Nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}, o número de iões K^+ libertados é superior ao dobro do número de iões Cu^{2+} absorvidos 39

2.2.4. A relação entre o efluxo de K^+ e a saída de metabolitos de baixo peso molecular, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} 41

2.2.5. A plasmólise como consequência directa da saída da maior parte do K^+ intracelular, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} 42

2.2.6. O efluxo de K^+ como um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada» («all-or-nothing») 45

2.3. O efluxo de K^+ e de metabolitos de baixo peso molecular induzido pela dodina em *P. syringae* 50

2.3.1. Os anfífilos alteram a permeabilidade de membranas fosfolipídicas artificiais 50

2.3.2. A influência da concentração micelar crítica nas alterações da permeabilidade induzidas por anfífilos 52

2.3.3. Os anfífilos alteram a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática 53

2.3.4. A dodina altera a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células de fungos e de plantas 54

2.3.5. A destruição pela dodina da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*. A influência da concentração micelar crítica nas alterações da permeabilidade 56

3. A inibição, pelo Cu^{2+} e pela dodina, de algumas actividades metabólicas das células bacterianas 59

3.1. Inibição de sistemas enzimáticos pelo Cu^{2+} 59

3.2. Alterações no metabolismo de compostos carbonados induzidas pelo Cu^{2+} 60

3.3. Inibição de sistemas enzimáticos pela dodina 62

4. A actividade bacteriostática e bactericida dos iões cúpricos e da dodina 63

4.1. A actividade bacteriostática e bactericida dos iões cúpricos 63

4.1.1. A influência da composição do meio de cultura na toxicidade do Cu^{2+} 63

4.1.2. A actividade bacteriostática e bactericida do Cu^{2+} em diversas espécies bacterianas 66

4.2. A actividade biostática e biocida da dodina 67

4.2.1. A inibição pela dodina do crescimento de células de fungos e de plantas 67

4.2.2. A actividade bacteriostática e bactericida da dodina 71

5. A absorção de dodina pelas células de *P. syringae* e sua relação com a actividade antibacteriana 73

5.1. A isotérmica de absorção de dodina por células de fungos e de *P. syringae*. Níveis de saturação das células. Comparação com a absorção de outros anfífilos catiónicos em células bacterianas 73

5.2. A absorção de anfífilos catiónicos pelas células bacterianas e a formação de uma camada monomolecular à superfície das células 74

5.3. A relação entre a absorção da dodina e as alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática e da viabilidade em *P. syringae*. Comparação com outros anfífilos catiónicos 76

6. As alterações secundárias induzidas pela dodina nas células de *P. syringae*. Comparação com os resultados obtidos com outros anfífilos catiónicos 78

7. A interacção entre os grupos sulfidrilo e os iões cúpricos . 81

8. Quais os locais de ligação dos iões Cu^{2+}? 82

9. A relação entre as alterações no metabolismo e a viabilidade, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} 86

10. Os danos causados pela dodina na membrana citoplasmática das células de *P. syringae* são a causa primeira da morte ... 88

11. A relação entre os danos causados na membrana citoplasmática e a viabilidade, em células eucarióticas tratadas com antibióticos de polieno. As condições que influenciam a determinação da viabilidade das células expostas aos antibióticos de polieno 92

RESULTADOS E
CONCLUSÕES PRINCIPAIS 98

SUMMARY 109

BIBLIOGRAFIA 115

RESUMO

1.- Estudaram-se alguns aspectos do modo da acção antibacteriana do Cu^{2+} e do detergente catiónico dodina nas células da bactéria fitopatogénica *Pseudomonas syringae*. Foram estudadas as alterações da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática e do consumo de oxigénio, a absorção passiva, e as alterações ultrastruturais e de viabilidade.

2.- A cinética do efluxo do K^+ intracelular foi estudada por espectrometria de chama e utilizando um eléctrodo sensível ou específico para o K^+. Usando esta segunda técnica, foi possível estudar em pormenor a cinética do efluxo do K^+, tendo sido definidos três novos parâmetros: «Taxa de efluxo», «Taxa máxima de efluxo» e «Tempo para taxa máxima».

3.- O tratamento das células com Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} ou Zn^{2+}, não resulta num efluxo significativo de K^+, mas o Cu^{2+} e o Hg^{2+} induzem uma saída muito acentuada do K^+ intracelular. A N-etilmaleimida também causa uma saída significativa de K^+, mas a concentrações muito superiores às de Cu^{2+} ou Hg^{2+}, e a uma velocidade muito inferior à observada após tratamento com estes catiões divalentes.

4.- A um aumento da concentração de Cu^{2+}, corresponde um aumento da taxa máxima de efluxo de K^+ e da quantidade de K^+ libertado, e uma diminuição do tempo necessário para se atingir a taxa máxima. A quantidade de K^+ libertado em função do tempo, e a quantidade final de K^+ libertado em função da concentração de Cu^{2+}, seguem padrões sigmóides. Estes são linearizados quando os valores das concentrações de K^+ são convertidos em «probits», e os do tempo e da concentração de Cu^{2+} nos seus logaritmos, sugerindo que o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} é um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada».

5.- O Cu^{2+} causa um efluxo muito acentuado de K^+, mas uma libertação restrita de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose», indicando que o Cu^{2+} causa uma alteração específica e restrita da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática. O facto do número de iões K^+ libertados ser superior ao dobro do número de iões Cu^{2+} absorvidos, da saída do K^+ ser concomitante com a de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-

contendo-ribose», e estes incluirem moléculas aniónicas do «pool», sugere que a saída destes metabolitos, apesar de limitada, participa no restabelecimento da carga eléctrica das células expostas ao Cu^{2+}.

6.- A acentuada plasmólise das células expostas ao Cu^{2+} é provavelmente uma consequência directa do esvaziamento das células em K^+, e esta não ocorre na presença de catiões monovalentes, dado que estes são transportados para o interior das células restabelecendo, pelo menos parcialmente, a pressão osmótica interna.

A um aumento da concentração de Cu^{2+} corresponde um aumento da percentagem de células plasmolizadas, mas não da intensidade de plasmólise nas células afectadas. A percentagem de células plasmolizadas é uma função sigmóide da concentração de Cu^{2+}. A distribuição do índice de plasmólise na população de células afectadas é semelhante nas diferentes concentrações de Cu^{2+}. A plasmólise induzida pelo Cu^{2+} é assim provavelmente um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada».

7.- O Cu^{2+} inibe a respiração do glicerol, glucose e succinato, a níveis semelhantes, provavelmente como consequência de uma inibição de componentes da cadeia respiratória e/ou da H^+-ATP sintase.

8.- As células podem absorver mais de 2 % do seu peso seco em Cu^{2+}, sem serem saturadas por este metal. Os níveis de absorção passiva do Cu^{2+} e do Hg^{2+} são semelhantes, muito superiores aos de Cd^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}. Um tratamento das células com Ca^{2+} ou Mg^{2+}, pelo contrário, não resulta numa absorção significativa destes catiões. Existe uma correlação entre os níveis de absorção dos metais testados e a sua afinidade para a formação de ligações simples com os grupos funcionais mais abundantes nas células, e para a formação de quelatos. Os grupos sulfidrilo devem constituir uma fracção dos locais de ligação dos iões Cu^{2+} às células.

9.- A depleção das células em K^+ e a inibição da respiração estão provavelmente envolvidas na morte das células expostas ao Cu^{2+}, mas existe uma gama de concentrações de Cu^{2+} que induzem a saída da totalidade do K^+ intracelular e inibem completamente a respiração de *todas* as células, mas só causam a morte de uma fracção da população. Nas células que deram origem a colónias, o Cu^{2+} deve ter sido removido, pelos constituintes do meio de cultura, dos locais inibitórios, restabelecendo-se então a respiração e a acumulação do K^+ a níveis suficientes para se retomar o metabolismo.

A actividade bactericida do Cu^{2+} é muito mais intensa nos meios de suspensão água destilada e tampão Pipes, do que nos meios de cultura «Nutrient Broth» e «YGS», provavelmente devido ao facto dos constituintes dos meios de cultura terem ligado uma parte significativa dos iões cúpricos, reduzindo assim substancialmente a concentração de iões disponíveis para interacção com as células.

10.- A dodina induz um pronunciado efluxo de K^+, fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose», indicando que este detergente, ao contrário do Cu^{2+}, induz uma alteração inespecífica e extensa da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática. A quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento e a taxa máxima de efluxo aumentam pronunciadamente ao atingir-se a concentração micelar crítica, sugerindo que são as micelas os principais agentes danificadores da membrana citoplasmática.

11.- Ao contrário do Cu^{2+}, a dodina inibe a respiração do succinato a concentrações superiores às necessárias para inibir a respiração do glicerol. Provavelmente a dodina inibe o consumo de oxigénio primeiro de uma forma indirecta como resultado de uma drenagem de coenzimas das células, seguida por uma interacção directa com componentes da cadeia respiratória e/ou a H^+-ATP sintase.

12.- Enquanto que o processo de libertação do K^+ intracelular induzido pela dodina se completa essencialmente em alguns minutos de exposição a este detergente, a libertação de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» prolonga-se por várias horas, a uma taxa aproximadamente constante. As concentrações de dodina que induzem uma elevada taxa de efluxo destes metabolitos causam uma diminuição do número de ribossomas e um aumento do número de células lisadas com o tempo. Concentrações mais elevadas reduzem a intensidade destas alterações e causam uma coagulação do citoplasma. A dodina induz provavelmente uma degradação enzimática do RNA e das células, e esta é inibida por concentrações elevadas de detergente por desnaturação das enzimas autolíticas, nomeadamente das RNases.

13.- A dodina induz a formação de diversas estruturas membranares, «blebs», expansões da membrana exterior e figuras mielínicas intracelulares, observáveis após 1 min de tratamento. As moléculas de dodina são assim particularmente adequadas para a formação de bicamadas artificais, mas também apresentam a capacidade de atravessar facilmente membranas celulares, o que sugere que a molécula deste

detergente não é excessivamente hidrofóbica nem hidrofílica. O moderado coeficiente de partição octanol-água da dodina apoia esta interpretação.

14.- A absorção de dodina pelas células é um processo rápido. A isotérmica da absorção é do tipo «S», indicando que a uma primeira fase de absorção coperativa se segue uma do tipo «Langmuiriano». A absorção cooperativa deve-se provavelmente à absorção de micelas de dodina, à coagulação do citoplasma e à formação dos sistemas mielínicos intracelulares, e a absorção Langmuiriana, à saturação das células com moléculas de detergente.

Na saturação, as células absorvem elevadas quantidades de detergente (aprox. 25 % do peso seco), correspondentes a mais de cinco vezes a quantidade necessária para a formação de uma hipotética monocamada superficial. Estudos de ultrastrutura sugerem, no entanto, que esta estrutura não se formou nas células, e que os elevados níveis de absorção se devem à formação das diferentes estruturas membranares e à coagulação do citoplasma.

15.- Um aumento da concentração de dodina resulta num aumento concomitante da quantidade de metabolitos do «pool» libertados das células e do número de células não-viáveis. A morte da grande maioria da população está associada ao efluxo da maioria dos metabolitos do «pool» e à absorção de quantidades apreciáveis de detergente. Os danos causados pela dodina na membrana citoplasmática são assim provavelmente a causa primeira da morte, e esta deve ocorrer quando as lesões são de tal forma extensas que não podem ser reparadas quando as células são colocadas à superfície do meio de cultura.

A actividade bactericida da dodina, ao contrário do Cu^{2+}, não é muito influenciada pela composição do meio de cultura ou suspensão, aumentando acentuadamente ao atingir-se a concentração micelar crítica.

16.- A dodina só causa significativas alterações estruturais, lesões na membrana citoplasmática, degradação do RNA, lise e morte celular, a concentrações superiores à concentração micelar crítica, sugerindo que, ao contrário de outros detergentes catiónicos, são as micelas os principais agentes da actividade antibacteriana da dodina.

INTRODUÇÃO

A UTILIZAÇÃO DE COMPOSTOS DE COBRE E DA DODINA NO CONTROLO DE DOENÇAS DAS PLANTAS.

Compostos de cobre.

Na história da luta química contra as doenças das plantas, os sais de cobre desempenharam sempre um papel relevante, podendo considerar-se o sulfato de cobre como um dos mais antigos e importantes fitofármacos (Almeida, 1940; Horsfall, 1956; Evans, 1973).

Walker (1965) apresentou as principais etapas da história da luta química contra as doenças das plantas. Uma das primeiras utilizações de que há registo, do sulfato de cobre no controlo de doenças de plantas, foi a de Schulthess em 1761, no tratamento das sementes de trigo contra a «cária» causada por *Tilletia caries*. De Boissieu e Bordenave recomendavam, em 1767, o uso do sulfato de cobre como agente conservador da madeira. Prevóst, em 1807, demonstrou em estudos laboratoriais, a acção tóxica do sulfato de cobre nos esporos de *Tilletia caries*, e realçou a importância do tratamento das sementes, no controlo da cária do trigo. Bollman, em 1862, e Dreisch, em 1873, preconizavam a adição de cal ao sulfato de cobre para tratamento das sementes de trigo contra a cária, mas foi com Millardet, professor de Botânica da Universidade de Bordéus, que esta mistura fungicida, posteriormente designada de «calda bordalesa», adquiriu uma importância extraordinária, que se manteve até aos nossos dias (*cf.* também Almeida, 1940 e Evans, 1973). O «míldio» da videira foi detectado pela primeira vez em França por Millardet, em 1878, num viveiro de plantas importadas dos Estados Unidos da América do Norte. Esta doença rapidamente atingiu proporções calamitosas, dado que os compostos com enxofre então utilizados não eram eficazes. Na região onde vivia Millardet, era costume antigo, para evitar o roubo dos cachos, aspergir as videiras que ladeavam os caminhos, com uma mistura de cal e sulfato de cobre. Millardet observou que as plantas tratadas com esta mistura não apresentavam sintomas de míldio, ao contrário das restantes que eram fortemente afectadas por esta doença. Baseado nestas observações, Millardet propôs, em 1885, a utilização da calda bordalesa no combate ao míldio da videira, recomendação rapidamente seguida nas principais regiões

vitícolas europeias. Este investigador francês demonstrou, em estudos laboratoriais, que o principal agente activo da calda bordalesa era o sulfato de cobre e não a cal, como era então opinião geral. A utilização da calda bordalesa veio a revelar-se crucial para o futuro da cultura da vinha, dado o carácter devastador do míldio, podendo considerar-se como o ponto de partida da moderna utilização de fitofármacos na agricultura. No princípio do século XX, inicia-se a utilização dos fungicidas em pó. Em 1902, Tubeuf propôs a utilização do carbonato de cobre em pó para tratamento das sementes de trigo contra a cária, e em 1918, Sanders e Kelsall, advogavam a substituição da calda bordalesa por uma mistura de hidróxido de cálcio e sulfato de cobre em pó. Os fungicidas orgânicos começaram a ser utilizados na agricultura no início da década de 1910-1920, mas nos anos 30, os fungicidas inorgânicos, nomeadamente alguns novos compostos de cobre, voltaram a ser objecto de intensa investigação. O oxicloreto de cobre e o sulfato de cobre são os compostos que entram na composição dos fungicidas e bactericidas com cobre mais utilizados actualmente em Portugal.

Serão referidos seguidamente alguns estudos recentemente publicados sobre a utilização dos compostos de cobre no controlo de bacterioses de plantas cultivadas.

Grimm (1987) estudou a eficácia de compostos de cobre (solução aquosa de cupramónio e oxicloreto de cobre) no controlo do «tumor bacteriano» causado por *Agrobacterium tumefaciens* em macieiras jovens infectadas naturalmente pela bactéria, tendo observado que, enquanto que 37 % das plantas não tratadas quimicamente apresentavam tumores, só 10 % das plantas tratadas os apresentavam, concluindo que os compostos de cobre testados podem controlar aceitavelmente a doença, constituindo uma alternativa efectiva aos compostos de mercúrio.

O controlo da «podridão em anel» («ring rot») da batateira causada por *Corynebacterium sepedonicum* tem apresentado dificuldades, dado que o agente patogénico pode sobreviver por muitos meses à superfície do material e equipamento utilizados na cultura da batateira, e dado que muitos agentes químicos se têm revelado ineficazes no controlo desta doença. Na década de 70, o cobre-8-quinolinolato (cobre-8-hidroxiquinolina, óxina-cobre) foi introduzido para o controlo da podridão em anel da batateira, e em 1981 era registado, nos Estados Unidos da América do Norte, como desinfectante do equipamento para esta cultura (*cf.* Easton & Nagle, 1985). Num estudo comparativo sobre a sobrevivência de *Corynebacterium sepedonicum* à superfície de plantas e de equipamento inoculados com suspensões desta espécie e pós-tratados com cobre-8-quinolinolato, Easton & Nagle (1985) verificaram que as densidades populacionais à superfície do equipamento (mas não

as presentes na batata de semente) eram significativamente reduzidas pela acção deste composto de cobre.

Bazzi & Calzolari (1986) referem que em plantas de alface inoculadas experimentalmente com *Pseudomonas cichorii*, e pós-tratadas com compostos de cobre, a pulverização com calda bordalesa industrial ou oxicloreto de cobre reduziu significativamente o número de plantas com sintomas de «murchidão bacteriana».

A «queimadura em auréola» («halo blight») causada por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* é uma doença importante do feijoeiro, transmitindo-se o agente patogénico pela semente, pelo que a utilização de sementes não infectadas contribui substancialmente para um controlo eficaz da doença (Tamietti & Garibaldi, 1984). Num estudo comparativo da acção de diversos bactericidas na desinfecção de sementes de feijoeiro, verificou-se que, tanto em sementes inoculadas experimentalmente como em sementes naturalmente infectadas, os compostos de cobre reduziam significativamente o nível de contaminação das sementes tratadas (Tamietti & Garibaldi, 1984). O melhor tratamento consistiu na imersão das sementes numa solução aquosa de sulfato de cobre a 1 % durante trinta minutos, reduzindo-se o nível de contaminação em 71 a 91 % (em relação ao controlo não tratado). A associação do sulfato de cobre com a estreptomicina ou com o hipoclorito de sódio não resultou em melhor controlo da doença. Tamietti & Garibaldi concluiram que para um controlo efectivo da mancha bacteriana do feijoeiro será necessário combinar o tratamento químico com outras medidas sanitárias, nomeadamente a produção de sementes de feijoeiro em áreas que apresentem condições climáticas desfavoráveis para a multiplicação do agente patogénico, e, durante a cultura, o arranque de plântulas contaminadas, combinado com a pulverização da parte aérea com compostos cúpricos de forma a reduzir-se a infecção da vagem.

Nos Estados Unidos da América do Norte, a «mancha bacteriana» («bacterial speck») do tomateiro, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, tem sido responsável por uma importante redução na quantidade, e sobretudo na qualidade do tomate produzido (Jardine & Stephens, 1987). Em plantas pulverizadas com compostos de cobre (sulfato de cobre amoniacal ou oxicloreto de cobre), e pós-inoculadas experimentalmente com o agente patogénico, os tratamentos químicos reduziram significativamente o número de frutos com lesões e o número de frutos classificados comercialmente como refugo (Colin & Chafik, 1986). Num estudo realizado também em plantas inoculadas artificialmente com *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, Colin & McCarter (1983) referem que o hidróxido de cobre e o carbonato de cobre e amónio reduziram acentuadamente a infecção das folhas e dos frutos, e que o hidróxido de

cobre, mesmo aplicado sete dias antes da inoculação experimental com a suspensão bacteriana, reduziu significativamente o número de lesões por planta. Concluiu-se que a aplicação de compostos de cobre pode ser suficiente para um controlo efectivo da doença. Opiniões opostas a estas foram apresentadas por Jardine & Stephens (1987) que referiram que, se os compostos de cobre fossem aplicados dois ou mais dias antes ou após a inoculação experimental com o agente patogénico, a doença não era significativamente reduzida pelo tratamento químico, concluindo que não era possível controlar quimicamente a doença se as condições climáticas fossem altamente favoráveis para o seu desenvolvimento. O controlo químico desta doença com compostos de cobre também se pode revelar ineficaz quando as estirpes indígenas se tornam resistentes ao Cu^{2+} (*cf.* Cooksey, 1988). Estes factos foram tomados em consideração por Cooksey (1988) que propôs, e demonstrou a eficácia de uma forma nova de controlar esta doença. Pela pulverização com hidróxido de cobre, seguida da inoculação de uma estirpe de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* não-patogénica mas resistente ao Cu^{2+}, juntamente com uma estirpe patogénica mas não-resistente ao Cu^{2+}, obteve-se uma redução na infecção significativamente maior do que com a simples pulverização com o hidróxido de cobre, ou com a inoculação destas duas estirpes na ausência de tratamento químico prévio. Cooksey concluiu que estirpes não patogénicas de *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* que mantenham a capacidade de colonizar epifiticamente as superfícies da planta do tomateiro e competir com o agente patogénico relativamente aos locais de infecção, poderão ser utilizadas com sucesso no controlo biológico da doença; se adicionalmente estas estirpes forem resistentes ou tornadas resistentes (por engenharia genética) ao Cu^{2+}, o controlo pode ser melhorado com a aplicação de compostos de cobre.

Em áreas da cultura do pimenteiro em que os compostos de cobre têm sido usados persistentemente nas últimas décadas, também têm sido detectadas estirpes de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* altamente resistentes ao Cu^{2+} (Adaskaveg & Hine, 1985). Os compostos cúpricos têm-se revelado ineficazes no controlo desta doença em plantas inoculadas experimentalmente com estirpes resistentes, mas eficazes quando as estirpes não são resistentes ao Cu^{2+} (Marco & Stall, 1983; Adaskaveg & Hine, 1985).

Em plantas de «feijão-frade» (*Vigna sinensis*) inoculadas experimentalmente com *Xanthomonas campestris* pv. *vignicola*, os compostos de cobre, hidróxido de cobre e carbonato de cobre e amónio, reduziram a severidade da doença avaliada tanto na folha como no caule, mas só o segundo composto causou um aumento significativo da produção (Gitaitis *et al.*, 1986).

Em citrinos pulverizados com diversos compostos de cobre, Leite *et al.* (1987) referiram que, na maioria dos cultivares testados, os produtos cúpricos (oxicloreto de cobre e hidróxido de cobre) reduziram significativamente a incidência da infecção natural do «cancro bacteriano» causado por *Xanthomonas campestris* pv. *citri* em folhas e frutos. Não se obteve, no entanto, um controlo total da doença, pelo que foi sugerido que para se atingir este fim será também necessária a utilização de variedades resistentes ao cancro bacteriano.

Os aspectos mais salientes dos trabalhos citados podem ser resumidos da seguinte forma: (i) Os compostos de cobre parecem apresentar uma intensa actividade inibitória do crescimento bacteriano, sendo eficazes no controlo de doenças causadas por microrganismos pertencentes aos principais géneros de bactérias fitopatogénicas. (ii) A ocorrência de estirpes com elevada resistência ao Cu^{2+} provavelmente só se verifica nas culturas submetidas durante longos períodos de tempo à aplicação de compostos de cobre. (iii) Nas situações em que os compostos de cobre *per se* se tornaram ineficazes no controlo da doença, a inoculação das plantas com estirpes não-patogénicas mas resistentes ao Cu^{2+} (pertencentes à mesma espécie do agente patogénico), combinada com o tratamento químico, pode resultar num controlo aceitável da doença.

Dodina.

A dodina (monoacetato de dodecilguanidina) foi introduzida no mercado de fungicidas no fim da década de 50 pela «American Cyanamid Company» sob o nome comercial de «Cyprex» (Jepson, 1961). A dodina tem sido utilizada sobretudo no tratamento do «pedrado» da macieira e da pereira causados por *Venturia inaequalis* e *Venturia pyrina*, respectivamente, e da «mancha foliar» da cerejeira causada por *Coccomyces hiemalis* e *Coccomyces lutescens*.

Em Portugal, o «pedrado» é a doença mais importante das pomóideas (Cruz, 1973) e pode-se afirmar que, a nível mundial, só não é grave nas regiões muito áridas ou nas com temperaturas médias muito elevadas (Walker, 1965). Para um tratamento eficaz de uma micose das plantas é indispensável um conhecimento pormenorizado do ciclo de vida do fungo, e das principais vias de infecção e factores que as influenciam. Os peritécios de *Venturia inaequalis* formam-se durante o inverno, na manta morta. Os ascósporos são expelidos durante as chuvas quentes da primavera,

sendo disseminados pelo vento. O período em que ocorre a libertação dos ascósporos estende-se geralmente por alguns meses. Os ascósporos germinam à superfície das folhas. O tubo de germinação penetra a cutícula e o micélio forma-se sobre esta. As infecções primárias pelos ascósporos só ocorrem nas folhas que permanecem humedecidas por um determinado período de tempo, que é tanto menor quanto mais perto de 20 °C for a temperatura. Ao fim de alguns dias, os conidióforos com os conídios são visíveis à superfície das lesões. A temperatura óptima para a conidiogénese, numa atmosfera saturada de vapor de água, é de 15 a 20 °C. Os conídios que permaneceram durante o inverno à superfície das plantas também podem causar infecções primárias na primavera, mas os conídios são sobretudo responsáveis pelas infecções secundárias que ocorrem nas folhas e nos frutos, principalmente durante os períodos chuvosos. A temperatura óptima para a germinação dos conídios é de aproximadamente 22 °C. Antes da queda das folhas, o micélio presente na zona sub-cuticular penetra no mesófilo, onde se formam os primórdios dos peritécios (Butler & Jones, 1949; Westcott, 1950; Darpoux *et al.*, 1961; Walker, 1965; Geoffrion, 1969). O ciclo do «pedrado» da pereira é muito semelhante ao da macieira (Westcott, 1950). O ciclo da «mancha foliar» da cerejeira inicia-se na primavera com a infecção pelos ascósporos presentes nos apotécios que permaneceram durante o inverno à superfície das folhas na manta morta. A doença alastra no fim da primavera e verão através da infecção secundária por macroconídios que se formam em acérvulos (Heald, 1933; Westcott, 1950; Eisensmith & Jones, 1981).

Estas características do ciclo do pedrado das pomóideas e da mancha foliar da cerejeira determinam o tipo de medidas que devem ser tomadas para o controlo destas doenças. As infecções primárias podem ser evitadas com as seguintes medidas: tratamento químico das plantas, antes da queda das folhas, para evitar a formação dos ascocarpos; tratamento químico da manta morta ou sua remoção e destruição, para eliminar os ascocarpos formados; e tratamento químico das plantas quando as condições climáticas são favoráveis para a infecção das folhas pelos ascósporos. As infecções secundárias podem ser controladas evitando a produção de conídios e a infecção das plantas por estes esporos (Heald, 1933; Butler & Jones, 1949; Westcott, 1950; Darpoux *et al.*, 1961).

Dado que as infecções primárias e secundárias por *Venturia inaequalis* podem ocorrer num período de tempo muito dilatado, se se conhecerem com exactidão os factores que as influenciam (principalmente os climáticos), é possível levar a cabo um esquema racional de tratamentos químicos, com uma aplicação de fungicidas restringida às épocas mais favoráveis à infecção, caso contrário, estes tratamentos

têm que ser regulares, não muito espaçados, e abrangendo um longo período de tempo (*cf.* Boué & Chaffurin, 1978; Cruz, 1980; Boureau & Olivier, 1984). Muitos dos esquemas de tratamentos propostos para o «pedrado» da macieira consistem assim, como será referido seguidamente, na aplicação de um número muito elevado de tratamentos químicos.

Quando a dodina foi introduzida no mercado, os fungicidas então utilizados (à base de enxofre e de sulfato de cobre) não controlavam satisfatoriamente o pedrado das pomóideas e a mancha foliar da cerejeira.

Serão apresentadas de seguida as principais etapas do estudo do controlo de doenças de plantas pela dodina.

Após a introdução da dodina no mercado de fungicidas, são publicados estudos importantes sobre a utilização deste fungicida no controlo do «pedrado» da macieira e da pereira, e da «mancha foliar» da cerejeira. Nestes trabalhos é comparada a eficácia da dodina com a de outros fungicidas então utilizados no controlo destas doenças.

Cation (1957) apresentou os resultados de um ensaio de dois anos em que se comparou a eficácia de vários fungicidas no controlo de *Coccomyces hiemalis* em cerejeira. Dos fungicidas testados, o Cyprex revelou-se o mais eficaz no controlo desta doença. Pela aplicação de quatro pulverizações de Cyprex obteve-se um controlo adequado da doença, apresentando os frutos um aspecto normal, sem acastanhamento dos pedicelos.

Powell *et al.* (1958) referiram os resultados de um ensaio comparativo sobre a eficácia de vários fungicidas no controlo do pedrado da macieira, e um estudo sobre a influência da forma de aplicar o Cyprex no controlo desta doença. Dos vários fungicidas testados, o Cyprex revelou-se o mais efectivo no controlo do pedrado em três variedades de macieira, obtendo-se, com a aplicação de oito pulverizações com Cyprex, um controlo quase total da doença. Em quatro variedades de macieira, a pulverização com Cyprex conferiu uma protecção adequada contra a infecção, durante aproximadamente trinta dias, tendo sido concluido que, excepto quando se verifiquem condições de pluviosidade adversas, o Cyprex é efectivo no controlo do pedrado da macieira.

Inman & Weihing (1959) estudaram a eficácia de vários fungicidas no controlo de *Coccomyces lutescens* em cerejeira, tendo observado que com a aplicação de onze pulverizações de Cyprex se obtinham resultados muito mais satisfatórios do que com a utilização de sete outros fungicidas.

Tunis & Sudds (1959) apresentaram os resultados de um ensaio de dois anos

sobre o controlo, pelo Cyprex, do pedrado, em três variedades de macieira. Pela aplicação de catorze pulverizações com Cyprex, obteve-se um controlo excelente da doença nas três variedades testadas, tanto das infecções foliares como nas dos frutos.

Após esta primeira fase em que o objectivo dos estudos publicados era o de estabelecer um esquema de tratamentos eficaz no controlo do pedrado das pomóideas e da mancha foliar da cerejeira, verifica-se uma segunda fase em que se pretende determinar quais os factores que influenciam o controlo, pela dodina, destas doenças.

No trabalho de Albert & Lewis (1962) foi estudada a influência de aplicações de Cyprex no desenvolvimento do pedrado da macieira. De árvores pulverizadas a intervalos regulares com Cyprex, foram retiradas folhas em que foram quantificados três parâmetros: densidade de conídios à superfície da folha, densidade de conídios nas lesões e taxa de germinação dos conídios. As árvores utilizadas neste trabalho apresentavam um elevado inóculo potencial: eram numerosas as lesões foliares nas plantas não tratadas quimicamente, a densidade de esporos nas lesões era muito elevada e os esporos apresentavam uma alta taxa de germinação. Obtiveram-se os seguintes resultados principais: (i) A aplicação de Cyprex, com intervalos de três semanas, na concentração de uma libra por cem galões (1 lb 100 gal^{-1}, aproximadamente 120 g hl^{-1} e 4.2 mM) causou, logo após o primeiro tratamento, uma redução acentuada na densidade dos esporos e na sua taxa de germinação. (ii) Se o Cyprex era aplicado em soluções mais diluídas, era menor a redução na densidade e na taxa de germinação de esporos, mas mesmo aplicado em concentrações de 0.3 a 0.5 lb 100 gal^{-1}, o número de esporos nas folhas tratadas era substancialmente inferior aos presentes em plantas não tratadas quimicamente, e a taxa de germinação dos esporos diminuia drasticamente após a segunda pulverização. Albert & Lewis concluiram que, apesar do potencial de infecção ser elevado, a aplicação da dodina controlou eficazmente a doença. Dado que se reduziu tanto a densidade de conídios, como a sua taxa de germinação, este esquema de tratamentos foi considerado como um factor importante no controlo de infecções secundárias. Segundo estes investigadores, a utilização do Cyprex poderá anular totalmente ou quase, o potencial de infecção de *Venturia inequalis* em macieiras.

Mitchell & Moore (1962) relacionaram os níveis de resíduos de dodina com o desenvolvimento do pedrado da macieira. Verificaram que existia uma relação directa entre o número e a data das pulverizações, e o número de lesões e época do seu

aparecimento: com doze aplicações a intervalos regulares, não se observaram lesões, tanto no início como no fim da época de tratamentos; com cinco aplicações o número de lesões foi inicialmente reduzido, mas no fim da época, relativamente elevado; se com cinco aplicações, o primeiro tratamento fosse feito tardiamente, o número de lesões era já razoável no princípio da época; com três e duas aplicações, o número de lesões era muito elevado, sobretudo no fim da época de tratamentos. Se o Cyprex era aplicado a 0.75 lb 100 gal^{-1} (aproximadamente 3.1 mM dodina), a intervalos de sete a dez dias, o resíduo de dodina na superfície dos frutos nunca era inferior a 0.75 $\mu g\ cm^{-2}$ e a infecção não ocorria. Foi ainda estudada a actividade curativa da dodina. Se fossem feitas quatro aplicações entre 23 de Julho e 3 de Agosto, na concentração de 0.75 lb 100 gal^{-1}, não se formavam novas lesões nos frutos e nas folhas, as maçãs depois de armazenadas não se deterioravam apreciavelmente, sarando-se as feridas de infecções já existentes. Três aplicações de Cyprex (a 0.5 - 1 lb 100 gal^{-1}) reduziram a 0 % a taxa de germinação dos esporos (em plantas não tratadas a taxa de germinação era de 16 a 86 %).

Após esta fase em que se estabelecem quais os principais factores que influenciam o controlo, pela dodina, do pedrado das pomóideas e da mancha foliar da cerejeira, segue-se um período em que se pretende determinar quais as causas do aparecimento da resistência à dodina e o seu mecansimo em *Venturia inaequalis*. Esta mutação no tema dos estudos sobre o controlo de micoses pela dodina deveu-se ao aparecimento brusco, em 1969, no estado de Nova Iorque (Estados Unidos da América do Norte), de forte infecção por *Venturia inaequalis* em macieiras tratados pela dodina em que o controlo do pedrado era há anos satisfatório.

A história do aparecimento da resistência à dodina no estado de Nova Iorque encontra-se bem documentada em Szkolnik & Gilpatrick (1969, 1973). Após a introdução da dodina no circuito comercial, este fungicida foi prontamente utilizado pelos agricultores desta área como único fungicida a aplicar no controlo do pedrado da macieira. De 1959 a 1968, o esquema de tratamentos com a dodina em vigor resultou num controlo adequado da doença, mas em 1969, verificaram-se inúmeros casos de pomares severamente infectados por *Venturia inaequalis*. Szkolnik & Gilpatrick (1969) apresentaram uma descrição do evoluir da doença neste período, assim como resultados de experimentação por eles realizada, durante este mesmo período. Enquanto que de 1961 a 1968, a percentagem de folhas infectadas em plantas tratadas com dodina era muito reduzida (1 a 5 %; 33 a 99 % nos controlos), em 1969 era apreciável (52 a 64 % das folhas de plantas tratadas apresentavam-se

infectadas pelo agente patogénico; 93 % no controlo). A ausência de controlo da doença pela dodina foi interpretada como sendo consequência directa do uso intensivo deste fungicida por largo período de tempo, e poder-se-ia antever que idênticos resultados se obteriam noutras situações sempre que tal uso fosse praticado, o que, como se refere seguidamente não se verificou. A experimentação continuou até 1972, tendo os resultados sido publicados no ano seguinte (Szkolnik & Gilpatrick, 1973). Nesse trabalho são apresentados os resultados referentes à aplicação da dodina em dois pomares geograficamente bem separados. No pomar em que se tinha verificado forte infecção em 1969, nos anos subsequentes o Cyprex continuou a ser aplicado em duas modalidades distintas, por pulverização às plantas (aérea) e ao solo. Os resultados obtidos com estas duas modalidades, no período 1970 - 72, foram muito diferentes: enquanto que nos blocos em que foram pulverizadas as plantas, a dodina continuou a não evitar fortes níveis de pedrado, nas zonas pulverizadas no solo, os níveis de infecção nestes anos foram muito inferiores aos de 1969. Estes investigadores afirmaram desconhecer qual a explicação para este facto, e concluiram que na expansão da tolerância à dodina devem estar envolvidos factores delicados e desconhecidos. Como já foi referido, os peritécios de *Venturia inaequalis* formam-se na manta morta, durante o inverno, e os ascósporos são os principais agentes das infecções primárias. A redução nos níveis de pedrado por pulverização ao solo, observada por Szkolnik e Gilpatrick, pode ter sido devido à destruição ou inactivação dos ascocarpos ou ascósporos formados, reduzindo-se assim o potencial de inóculo primário. Foi realizada experimentação num outro pomar, de 1955 a 1972, nunca se tendo observado falta de controlo da doença pela dodina, mesmo no ano de 1972 em que as condições climáticas para o desenvolvimento da doença se revelaram muito favoráveis.

Num artigo publicado em 1981 sobre o problema da resistência à dodina em *Venturia inaequalis*, Jones concluiu que esta resistência só se tem desenvolvido em áreas em que o fungicida se aplicou exclusiva e ininterruptamente durante dez ou mais anos, e que se encontra restringida a certas áreas dos Estados Unidos da América do Norte e do Canadá. Segundo Schwabe (1977) na República da África do Sul, só num caso (uso ininterrupto de dodina durante oito anos) a dodina não se mostrou eficaz no controlo de *Venturia inaequalis* em macieiras.

Relacionado com o problema da resistência à dodina em *Venturia inaequalis*, é a observação de que existe uma relação entre a sensibilidade à dodina *in vitro*, e a intensidade da aplicação do fungicida nas áreas em que as estirpes foram isoladas.

Yoder & Klos (1976), utilizando conídios de diferentes estirpes de *Venturia inaequalis*, determinaram a zona de inibição causada por discos embebidos numa solução de dodina, tendo verificado que, enquanto que nos isolamentos provenientes de pomares tratadas pela dodina, o diâmetro da zona de inibição variava entre 0.83 e 3.03 cm, nos isolamentos provenientes de árvores não tratadas, o diâmetro variava entre 2.58 e 3.03 cm.

Mckay & Macneil (1979) compararam a inibição, pela dodina, da germinação de conídios de *Venturia inaequalis* de isolamentos provenientes de árvores não tratadas, de árvores pulverizadas com dodina, e de árvores tratadas com diversos fungicidas, incluindo a dodina. Nestes diferentes tipos de isolamentos obtiveram-se os seguintes limites de variação dos valores da ED_{50} (concentração que inibe a germinação de 50 % dos esporos): 0.50 - 1.3 µM, 2.5 - 4.6 µM, 0.59 - 2.1 µM, respectivamente. Foi concluido que o tratamento pela dodina induziu o aparecimento da resistência a este fungicida, mas que nas populações selvagens (isoladas de árvores nunca tratadas pela dodina) podiam existir estirpes com níveis consideráveis de tolerância a este fungicida.

Gilpatrick & Blowers (1974) determinaram a ED_{50} de ascósporos de isolamentos de *Venturia inaequalis* provenientes de árvores não tratadas quimicamente, de árvores tratadas pela dodina mas em que o controlo da doença não era satisfatório, e de árvores tratadas em que o controlo se tinha revelado adequado, tendo obtido os seguintes limites de variação: 2.1 - 2.1 µM, 2.6 - 4.3 µM, 1.0 - 2.3 µM, respectivamente. Gilpatrick & Blowers concluiram que o deficiente controlo da doença se devia à existência de estirpes tolerantes a este fungicida.

Polach (1973) também verificou que existe uma relação entre a inibição da germinação de conídios de isolamentos de *Venturia inaequalis* e o tratamento de campo: enquanto que em trinta e dois isolamentos de pomares em que era reduzido o controlo da doença, os conídios de vinte e oito isolamentos cresceram com 1.7 µM dodina, de quarenta isolamentos de pomares não tratados por este fungicida, só num isolamento os conídios cresceram com este concentração de fungicida.

Os trabalhos citados concordam assim em que as estirpes de *Venturia inaequalis* isoladas de pomares tratados com dodina geralmente apresentam *in vitro* uma menor sensibilidade a este fungicida, mas também indicam que estirpes isoladas da árvores nunca tratadas quimicamente podem apresentar níveis razoáveis de tolerância à dodina. A ausência de controlo, pela dodina, do pedrado da macieira pode portanto estar relacionada com o aparecimento, no campo, de estirpes resistentes a este fungicida.

A resistência à dodina em *Venturia inaequalis* e *Nectria haematococca* é geneticamente controlada, sendo conhecido o seu mecanismo (Kappas & Georgopoulos, 1970; Polach, 1973).

Na década de 80, o controlo pela dodina de micoses das plantas continuou a ser objecto de estudo.

Schwabe (1980a, 1980b, 1980c), utilizando plantas inoculadas experimentalmente com conídios ou ascósporos de *Venturia inaequalis* e tratadas com soluções de Cyprex, estudou em pormenor a acção preventiva e curativa da dodina no pedrado da macieira. Macieiras pulverizadas com dodina foram pós-inoculadas com conídios ou ascósporos; após dois dias a aproximadamente 20 °C com elevada humidade, as plantas foram colocadas numa estufa, e passadas duas a três semanas foi avaliada a percentagem de infecção pelo agente patogénico. Com ambos os tipos de inóculo, a dodina reduziu acentuadamente o desenvolvimento da doença; nas árvores pulverizadas com uma solução de 1.7 mM dodina, o desenvolvimento do pedrado era inferior a 3 % do controlo (Schwabe, 1980a). Macieiras inoculadas com conídios ou ascósporos foram expostas a humidade elevada por tempos variáveis e a diferentes temperaturas, após o que foram pulverizadas com soluções de Cyprex; após duas a três semanas de permanência numa estufa a aproximadamente 20 °C, foi feita a avaliação do desenvolvimento da doença e da produção de conídios pelo fungo. Foi observado que se a pulverização fosse feita com uma solução de 2.3 mM dodina não muito tempo após o inoculação do agente patogénico, obtinha-se um controlo efectivo da doença, e que quanto mais baixa fosse a temperatura durante a permanência em humidade elevada, mais prolongado era o período em que não se verificava infecção por este agente patogénico (Schwabe, 1980b). A acção curativa e protectora da dodina foi também estudada em frutos destacados. Maçãs inoculadas com suspensões de conídios, foram sujeitas a humidade elevada durante períodos variáveis a 16 °C, e pós-tratadas com dodina; após seis meses a 1 - 2 °C, procedeu-se à avaliação da infecção pelo agente patogénico. Verificou-se que quanto mais curto era o período de elevada humidade, maior era a acção curativa da dodina, e que a aplicação de dodina a 2.3 mM, após 72 h de elevada humidade, reduzia a 1/4 o desenvolvimento do pedrado nos frutos inoculados (em relação aos controlos). Maçãs pulverizadas com dodina foram pós-inoculadas com conídios, e expostas a humidade elevada durante 120 h a 14 °C; após seis meses a 1 - 2 °C, procedeu-se à avaliação do desenvolvimento da doença. Verificou-se que quanto mais curto fosse o período entre a pulverização com o fungicida e a aplicação dos esporos, menor era o desenvolvimento da doença, e que a

aplicação de dodina a 1.7 mM, sete dias antes do inoculação com conídios reduzia o desenvolvimento do pedrado a 7 % do controlo (Schwabe, 1980c).

Eisensmith & Jones (1981) observaram que a aplicação de Cyprex em cerejeiras reduzia acentuadamente a infecção primária e secundária por *Coccomyces hiemalis*.

No «mofo cinzento» da seringueira causado por *Ceratocystis fimbriata*, a dodina pode controlar aceitavelmente a doença e constituir uma alternativa aos benzimidazóis correntemente utilizados (Pereira & Santos, 1986).

São escassíssimos os trabalhos publicados sobre a utilização da dodina no controlo de bacterioses de plantas.

Diener & Carlton (1960) referiram que a aplicação da combinação dodina - captana reduzia significativamente a «mancha bacteriana» («bacterial spot») do pessegueiro causada por *Xanthomonas campestris* pv. *pruni*.

Segundo Ray & Addy (1976) a presença, à superfície das folhas de citrinos, de um resíduo de dodina superior a 0.94 $\mu g\ cm^{-2}$ evitava a infecção por *Xanthomonas campestris* pv. *citri*, agente causal do «cancro bacteriano» dos citrinos. Foi ainda observado que após pulverização com soluções de dodina, nas concentrações de 0.5 a 1 lb 100 gal^{-1} (aproximadamente 2.1 a 4.2 mM dodina), a concentração do fungicida à superfície das folhas diminuia com o tempo. Com a solução menos concentrada (0.5 lb 100 gal^{-1}), o resíduo de dodina à superfície das folhas só se mantinha acima de 0.94 $\mu g\ cm^{-2}$ durante um dia, mas com a aplicação da solução mais concentrada (1 lb 100 gal^{-1}) mantinha-se por quinze dias, caso não se verificasse intensa pluviosidade (experiências realizadas ao ar livre). É interessante constatar que este valor crítico do resíduo de dodina à superfície das folhas, efectivo na prevenção da infecção por esta espécie bacteriana, é semelhante ao já referido para o fungo *Venturia inaequalis*. A acentuada redução com o tempo do resíduo de dodina à superfície das folhas observada no trabalho de Ray & Addy (1976), pode ser responsável por falhas no controlo da infecção por bactérias e fungos. Seria muito importante conhecer qual a influência dos principais factores ambientais na permanência das moléculas de dodina à superfície das folhas das plantas.

ESTUDO DO MODO DA ACÇÃO ANTIBACTERIANA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE*

Introdução.

O estudo da acção de agentes químicos em células bacterianas é actualmente um dos temas fundamentais da investigação em Microbiologia. O conhecimento do mecanismo de acção de agentes antibacterianos tem proporcionado elementos fundamentais para a compreensão da estrutura e função da célula bacteriana, e para o controlo das doenças causadas por estes microrganismos. O estudo da actividade antibacteriana de agentes químicos em bactérias fitopatogénicas apresenta acrescida importância dado o impacto económico de muitas bacterioses das plantas.

No presente trabalho, estudou-se a acção do Cu^{2+} e da dodina, dois agentes químicos que têm sido utilizados no controlo de algumas doenças das plantas, em *Pseudomonas syringae*, espécie bacteriana que é responsável por um grande número de importantes doenças de plantas, nomeadamente o cancro bacteriano das prunóideas, doença de ocorrência frequente e disseminação generalizada no nosso país.

A acção dos iões cúpricos em células de microrganismos tem sido objecto de intensa investigação; no entanto, o seu mecanismo de actuação não se encontra totalmente elucidado. Ao contrário do Cu^{2+}, são escassíssimos os trabalhos publicados sobre a actuação da dodina em células bacterianas.

Os iões cúpricos e a dodina pertencem a dois tipos diferentes de agentes químicos, e, como será mostrado no presente trabalho, apresentam mecanismos de actuação diversos mas, ambos apresentam, *in vitro*, uma elevada actividade antibacteriana nas células de *Pseudomonas syringae*.

Com esta Dissertação pretende-se dar uma contribuição para o conhecimento dos mecanismos de acção destes dois agentes químicos na célula bacteriana. Estes conhecimentos podem contribuir para uma melhor compreensão da estrutura e função da célula bacteriana, e para um controlo mais eficaz das doenças causadas nas plantas pela espécie bacteriana *Pseudomonas syringae*.

1. O PAPEL FUNDAMENTAL DO K^+ NO METABOLISMO BACTERIANO.

Desde há longo tempo que se verificou que vários agentes químicos induzem uma saída de K^+ das células bacterianas, mas os mecanismos deste processo são ainda mal conhecidos. Dos agentes químicos que apresentam a capacidade de induzir uma saída significativa do K^+ das células, destacam-se certos catiões divalentes e os detergentes catiónicos, e em *P. syringae*, verifiquei que, de facto, representantes destes dois tipos de agentes químicos, o Cu^{2+} e Hg^{2+}, e a dodina, são fortes indutores de um efluxo de K^+ (Trabalhos I, II, III, IV, VII, Anexo B). Nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} ou dodina, observei ainda que a saída do K^+ intracelular é acompanhada da libertação de outros metabolitos do «pool», designadamente de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» (Trabalhos II, IV e VII).

Os trabalhos de vários grupos de investigadores, sobretudo os publicados nas últimas três décadas, levaram à conclusão de que os iões K^+ desempenham um papel crucial no metabolismo celular, nomeadamente, na fisiologia da célula bacteriana. Por esta razão, uma das formas dos iões Cu^{2+} e das moléculas de dodina agredirem as células de *P. syringae* é através da depleção destas em potássio. Para se compreender quais as consequências de uma saída acentuada do K^+ das células bacterianas, é necessário ter presente quais as principais funções que este catião monovalente desempenha nas células procarióticas.

Antes de se referirem alguns aspectos gerais sobre o efluxo de K^+ induzido por estes dois tipos de agentes químicos e suas relações com os resultados obtidos em *P. syringae*, torna-se assim necessário abordar o papel fundamental do K^+ no metabolismo bacteriano.

1.1. As células bacterianas apresentam elevadas concentrações internas de K^+, que são mantidas pela permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática.

Christian & Waltho (1961, 1962) foram dos primeiros investigadores a observar que as células bacterianas apresentam elevadas concentrações internas de K^+, e que estas concentrações dependem, nomeadamente, da actividade da água do ambiente em que crescem. Observaram que existia uma relação directa entre a tolerância das espécies bacterianas ao NaCl e a concentração interna de K^+: enquanto que as

espécies não-halofílicas ou moderadamente halofílicas apresentam concentrações internas de K^+ que variam entre 0.2 e 0.7 M, espécies de halófilos extremos exibem concentrações internas superiores a 2 M K^+. A tolerância ao NaCl é também acompanhada por um aumento substancial da concentração interna de Na^+.

Contemporâneo com estes trabalhos de Christian & Waltho, Schultz & Solomon (1961) estudaram, em *Escherichia coli*, a dependência das concentrações internas de K^+ e Na^+ relativamente à fase de crescimento e às concentrações destes catiões no meio de cultura. Observaram que na fase exponencial, a concentração intracelular de K^+ ($[K^+]_{in}$) era muito superior, e quase independente, da concentração extracelular deste catião ($[K^+]_{out}$): células cultivadas em meios de cultura em que a $[K^+]$ variava entre 0.050 e 120 mM K^+, apresentavam uma $[K^+]_{in}$ de 211 ± 3 mM K^+. As células apresentavam o mais elevado conteúdo em K^+ no início da fase exponencial; com o aumento do tempo de incubação e a passagem para a fase estacionária, a $[K^+]_{in}$ diminuía progressivamente com o tempo, sendo na fase estacionária, só ligeiramente superior à $[K^+]_{out}$. A concentração interna de Na^+ ($[Na^+]_{in}$) apresentava um padrão de variação completamente diferente do do K^+. Nas fases exponencial e estacionária, a $[Na^+]_{in}$ era directamente proporcional à concentração extracelular de sódio ($[Na^+]_{out}$); na fase exponencial, a $[Na^+]_{in}$ era inferior à $[Na^+]_{out}$, mas na fase estacionária, verificava-se o inverso. A $[Na^+]_{in}$ aumentava com a passagem da fase exponencial para a fase estacionária.

As células bacterianas acumulam K^+ contra um gradiente de concentrações que pode atingir 10^6:1. Estes elevadíssimos níveis internos de K^+ são obtidos pelo funcionamento de diversos sistemas de transporte, e pela impermeabilidade da membrana citoplasmática ao K^+ (Hughes & Poole, 1989).

1.2. O funcionamento de determinados sistemas enzimáticos e o crescimento das células bacterianas são directamente influenciados pelo K^+.

Tem sido observado que determinados iões monovalentes, em particular o K^+, estimulam a actividade de um número elevado de enzimas, e em alguns casos são mesmo indispensáveis ao funcionamento de alguns sistemas enzimáticos. Quando se comparam os resultados publicados sobre a estimulação, pelos catiões monovalentes, do funcionamento de sistemas enzimáticos *in vitro*, com os níveis destes catiões nas células bacterianas, algumas conclusões podem ser apresentadas:

(i) O K^+ é o catião inorgânico mais abundante nas células bacterianas, e é o

que mais estimula, *in vitro*, a actividade das enzimas dependentes de catiões monovalentes das células bacterianas.

(ii) A ordem de efectividade dos catiões monovalentes na estimulação de sistemas enzimáticos bacterianos *in vitro* é semelhante à observada em processos celulares globais.

(iii) As concentrações de catiões monovalentes óptimas para o funcionamento de sistemas enzimáticos *in vitro* correspondem aproximadamente às existentes nas células bacterianas. Nas bactérias halofílicas, que apresentam elevadíssimas concentrações internas de catiões monovalentes, a estabilidade de diversas moléculas e o funcionamento de sistemas enzimáticos dependem também de concentrações muito elevadas de determinados catiões monovalentes.

(iv) Enquanto que nas bactérias não-halofílicas, os sistemas enzimáticos dependentes de catiões monovalentes não são estimulados ou são-no muito fracamente pelo Na^+ e pelo Li^+, a actividade de muitas das enzimas das bactérias halofílicas é significativamente incrementada pelo Na^+, e em alguns casos pelo Li^+. O papel diferencial dos catiões monovalentes nas bactérias não-halofílicas e halofílicas tem correspondência com as concentrações internas dos catiões monovalentes nestes dois tipos de células. Enquanto que nas bactérias não-halofílicas, a concentração interna de Na^+ é geralmente muito baixa, na gama dos milimolares, nas halófilos, a concentração interna deste catião é, apesar de inferior à do K^+, muitíssimo mais elevada do que a das bactérias não-halofílicas, situando-se na gama das centenas ou milhares de milimolares.

Estas quatro conclusões baseiam-se nos resultados obtidos por vários investigadores sobre a influência dos catiões monovalentes na actividade enzimática e no metabolismo bacteriano, e a seguir discutidos.

Evans & Sorger (1966), num artigo de revisão sobre o papel dos catiões monovalentes em sistemas enzimáticos de células eucarióticas e procarióticas, referiram mais de duas dezenas de enzimas bacterianas que são activadas por catiões monovalentes. Das vinte e uma enzimas de bactérias não-halofílicas citadas neste trabalho, em doze, o catião mais efectivo na activação das enzimas é o K^+, e em nove, o NH^+_4; só em duas enzimas o Na^+ é mais efectivo que o K^+ ou o NH^+_4. Nas enzimas activadas pelo K^+, a concentração necessária para a actividade enzimática máxima varia entre 0.01 e 0.25 M. Nas enzimas activadas pelo K^+ ou pelo NH^+_4, o Na^+ e o Li^+ são geralmente inactivos ou inibitórios, e o Rb^+ fracamente estimulante da actividade enzimática. As enzimas das bactérias moderada ou extremamente halofílicas são geralmente estimuladas preferencialmente pelo K^+, variando a concentração

óptima entre 0.5 e 4.5 M K^+. Estas regras gerais observadas para as enzimas bacterianas são também geralmente observadas para as enzimas de células eucarióticas. Evans & Sorger propuseram que a activação das enzimas pelos catiões monovalentes é consequência de uma alteração conformacional induzida pelos catiões na estrutura das moléculas proteicas. Estas alterações são específicas para um determinado catião monovalente. Dado que a afinidade entre os catiões monovalentes (ao contrário dos divalentes) e as moléculas de proteínas é reduzida, são necessárias concentrações relativamente elevadas de catiões monovalentes para se obter uma ligação destes aos grupos ionizados das moléculas proteicas. De acordo com estes investigadores, existe uma relação directa entre a capacidade de activação da enzima e o raio atómico. Os iões K^+, NH^+_4 e Rb^+, têm raios atómicos muito semelhantes, marcadamente inferiores aos de Na^+ e Li^+. As grandes dimensões destes últimos iões podem ser responsáveis por alterações na conformação das enzimas que não são apropriadas para a catálise enzimática. Os iões K^+, NH^+_4 e Rb^+ apresentam dimensões semelhantes, mas diferentes efectividades na activação de enzimas, pelo que foi concluído que determinadas propriedades químicas, não identificadas, devem contribuir para a especificidade dos catiões. Foi proposto que o K^+ é o catião predominante nas células porque é o que activa a grande maioria das enzimas que dependem de catiões monovalentes.

Já em 1959, num artigo de revisão sobre a activação de enzimas por iões metálicos, Malmström & Rosenberg, após exame de numerosos exemplos contidos na bibliografia, haviam concluído que os iões K^+, Rb^+ e NH^+_4, geralmente activam as enzimas, mas os restantes monovalentes não. A especificidade dos iões metálicos na activação de enzimas foi comparada com diversas propriedades destes, tendo sido concluído que os iões que activam as enzimas apresentam raios iónicos semelhantes, não se verificando correlação directa entre as restantes propriedades químicas (número de coordenação, configuração dos complexos, electronegatividade e potencial de ionização) e a capacidade de activar as enzimas.

Lanyi (1974) num trabalho de revisão sobre as propriedades das proteínas das bactérias halofílicas, apresentou uma compilação dos dados publicados sobre a activação pelo Na^+ e K^+ de proteínas de halófilos. Das vinte e oito enzimas referidas, em dezassete a selectividade K^+/Na^+ é baixa (inferior a dois), em seis é média (aproximadamente igual a dois), e só em cinco é elevada (superior a cinco). Pelo contrário, nas bactérias não-halofílicas, como já foi referido, o sódio inibe ou estimula muito fracamente a actividade das enzimas dependentes de catiões monovalentes (que o K^+ estimula fortemente). Enquanto que nas enzimas das bactérias não-

halofílicas, os catiões monovalentes estimulam a actividade na gama das centenas de milimolar, as enzimas dos halófilos são estimuladas geralmente por concentrações de K^+ ou Na^+ superiores a um molar.

Trabalhos posteriores de vários investigadores sobre sistemas enzimáticos bacterianos confirmaram as conclusões apresentadas por Evans & Sorger (1966), nomeadamente a de que, quanto à capacidade em activar sistemas enzimáticos, os catiões monovalentes podem ser divididos em dois grupos: nas bactérias não-halofílicas, o sódio e o lítio não activam ou inibem as enzimas; o amónio, potássio, césio e rubídio estimulam a actividade enzimática, sendo os dois primeiros os mais efectivos no desempenho desta função.

Strickland & Miller (1968) estudaram a influência de catiões monovalentes na enzima glicerol:NAD^+ oxireductase (EC 1.1.1.6) de *Aerobacter aerogenes*. A actividade máxima foi observada na presença de K^+; se ao K^+ se adicionava Na^+ ou Li^+ a actividade decrescia, sendo o lítio mais inibitório do que o sódio; a um aumento da concentração de Na^+ ou Li^+ correspondeu um aumento da inibição da actividade enzimática. Na presença de Na^+, a actividade enzimática era inferior à observada com K^+; se ao Na^+ se adicionava K^+, aumentava a actividade.

A influência dos catiões monovalentes na actividade da DNA polimerase de *Escherichia coli* foi estudada nomeadamente por Klenow & Henningsen (1969) e Bishop & Gill (1971).

Klenow & Henningsen (1969) observaram que, na actividade de polimerização da DNA polimerase, os catiões monovalentes podiam ser divididos em dois grupos: (i) O Na^+ e o Li^+, na concentração de 0.1 M, incrementavam muito ligeiramente a actividade enzimática, mas concentrações superiores eram inibitórias. (ii) O K^+, Rb^+, Cs^+ e NH^+_4, estimulavam fortemente a actividade enzimática, sendo a relação entre a concentração do catião e a actividade uma função em forma de sino; a concentração que mais estimulava a actividade variava com o catião, mas situava-se entre aproximadamente 75 e 150 mM; a ordem de efectividade na actividade da polimerização era $K^+ \approx NH^+_4 > Rb^+ > Cs^+$; a estimulação máxima (três a quinze vezes) obtinha-se com aproximadamente 150 mM K^+. O K^+ e o Li^+ também influenciavam de forma oposta a actividade degradativa da enzima: enquanto que a um aumento da concentração de Li^+ (até 200 mM) correspondia uma diminuição da actividade degradativa, a relação entre a concentração de K^+ e a actividade degradativa era uma função em forma de sino, com um máximo a aproximadamente 100 mM K^+.

Posteriormente, Bishop & Gill (1971) também observaram que, enquanto que o Na^+ e o Li^+ inibiam a actividade de polimerização da DNA polimerase, o K^+, Rb^+ e

Cs^+, estimulavam esta actividade. Enquanto que Klenow & Henningsen (1969) observaram uma ligeira inibição da actividade de polimerização por concentrações de Na^+ e Li^+ superiores a aproximadamente 100 mM, Bishop & Gill (1971) referem uma forte inibição desta actividade enzimática com concentrações destes catiões inferiores a 100 mM. Enquanto que os primeiros investigadores relataram um acentuado aumento da actividade de polimerização na presença de K^+, Rb^+ ou Cs^+, os segundos autores observaram uma incrementação ligeira desta actividade nestas condições. Bishop & Gill (1971) verificaram que a actividade degradativa era ligeiramente estimulada por concentrações reduzidas (aproximadamente 50 mM) de Cs^+ e Rb^+, mas inibida por concentrações superiores destes catiões e por qualquer concentração (entre 0 e 200 mM) de K^+, Na^+ ou Li^+.

O potássio, o catião intracelular livre predominante nas células bacterianas, influencia directamente a taxa de crescimento e a síntese de proteínas e RNA nas células bacterianas como mostraram os trabalhos clássicos de Lubin & Ennis (1964) e Ennis & Lubin (1965).

Lubin & Ennis (1964) estudaram a influência dos catiões monovalentes na síntese de proteínas e de RNA, em células de um mutante (B207) de *Escherichia coli* B. Quando o meio de cultura continha níveis reduzidos de K^+, as células deste mutante não apresentavam a capacidade de acumularem intracelularmente este catião monovalente.

O excepcional interesse da utilização deste mutante de *Escherichia coli* residia no facto de ser possível controlar fácil e exactamente a concentração interna de K^+ ou Na^+, variando a concentração destes catiões no meio de cultura. Quando as células eram cultivadas em meios de cultura com diferentes proporções K^+ : Na^+ ($[Na^+ + K^+]$ = 200 mM), Lubin & Ennis verificaram que a um aumento de $[K^+]_{out}$ entre 0.5 e 100 mM, correspondia um aumento de $[K^+]_{in}$ de 25 a 175 mM e uma concomitante diminuição de $[Na^+]_{in}$ de 75 a 0 mM (nas estirpes selvagens, a $[K^+]_{in}$ é quase independente da $[K^+]_{out}$; *cf.* o trabalho de Schultz & Solomon, 1961, referido nas páginas anteriores).

A concentração de K^+ no meio de cultura determinava não só a sua concentração intracelular, como a taxa de crescimento das culturas: a um aumento da $[K^+]_{out}$ entre 0.5 e 100 mM correspondeu um aumento da taxa de crescimento entre 0.25 e 1.25 gerações $hora^{-1}$. Dado que a $[K^+]_{out}$ determinava a $[K^+]_{in}$, era possível conhecer qual a relação entre a concentração interna de potássio e a taxa de crescimento: quando $[K^+]_{in}$ diminuía de 200 para 100 mM, a taxa de crescimento dimi-

nuía em 60 %; quando a $[K^+]_{in}$ era de 25 mM, a taxa de crescimento era 1/4 da taxa observada com uma $[K^+]_{in}$ de 200 mM.

Pela manipulação da concentração de K^+ no meio de cultura, era assim possível controlar com exactidão a concentração interna deste catião nas células do mutante B207. Podia-se portanto estudar como decorria a síntese de proteínas e de RNA com diferentes concentrações intracelulares de potássio. A síntese proteica foi quantificada pela incorporação da ^{14}C-leucina ou ^{14}C-fenilalanina em polipeptídeos, e a síntese de RNA pela incorporação da ^{14}C-uridina em RNA. Quando a concentração de K^+ no meio de cultura variava entre 0.5 e 100 mM, existia uma relação de proporcionalidade directa entre a concentração interna de K^+ (entre 20 e 175 mM) e a taxa de síntese proteica, e uma relação aproximadamente sigmóide entre o primeiro parâmetro e a taxa de síntese do RNA. Quando a concentração interna de K^+ era de 20 mM, a síntese proteica era muito reduzida (menos de 10 % da observada com uma $[K^+]_{in}$ de 175 mM), mas a síntese de RNA era só metade da máxima observada com uma $[K^+]_{in}$ de 150 a 175 mM. Os resultados indicam assim que estes dois processos são afectados de forma diferente por níveis baixos de K^+: reduzindo acentuadamente a concentração interna de K^+, quase se anula a síntese proteica, mas a síntese de RNA continua a níveis muito significativos.

Em extractos acelulares («cell-free system»), a substituição do K^+ pelo Na^+ também resultou numa diminuição da extensão da síntese proteica. Quando os extractos continham K^+ (mas não Na^+), a extensão de síntese proteica (ao fim de 60 minutos) e a $[K^+]$ (entre 25 e 200 mM) era uma função em forma de sino, com um máximo a aproximadamente 100 mM K^+. Se o extracto continha, além do K^+, Na^+ ($[K^+ + Na^+]$ = 200 mM), a relação entre o $[K^+]$ e a extensão de síntese proteica era linear. Com uma $[K^+]$ de 100 mM, a presença adicional de 100 mM Na^+ traduziu-se numa redução a 1/4 da incorporação da fenilalanina em polipeptídeos.

Em extractos acelulares, foi estudado o efeito da substituição do K^+ pelo NH^+_4, na incorporação da fenilalanina em polipeptídeos. Enquanto que a relação entre a extensão da síntese proteica (ao fim de 60 minutos) e a $[K^+]$ era uma função em forma de sino, a extensão da incorporação do amino-ácido em polipeptídeos aumentava com um aumento da concentração de NH^+_4 entre 25 e 100 mM, para depois se manter aproximadamente constante com um aumento da concentração do catião até 200 mM. Com 100 mM NH^+_4, a síntese proteica era mais extensa do que com idêntica concentração de K^+.

O NH^+_4 era estimulante da síntese proteica em extractos acelulares, mas não tinha efeitos benéficos marcados no crescimento celular. Quando as células eram

cultivadas em meios com reduzida concentração de K^+, a adição de sais de amónio não estimulou o crescimento, apresentando as células uma concentração interna de NH^+_4 de aproximadamente 10 mM (*cf.* o trabalho de Buurman *et al.*, 1989, referido nas páginas seguintes).

No trabalho publicado no ano seguinte (Ennis & Lubin, 1965) foram apresentados mais estudos utilizando as células do mutante B207 de *Escherichia coli*. Como já tinha sido verificado no trabalho anterior, observou-se que quando a concentração interna de K^+ diminuía acentuadamente (por incubação das células num meio em que o K^+ tinha sido substituído por 0.1 M Na^+), a síntese de RNA prosseguia a uma taxa considerável, mas a síntese proteica diminuía drasticamente. Nestas condições formavam-se ribossomas deficientes em proteínas («KD-RNA», «potassium deficient-RNA»). O RNA ribossomal (rRNA) de células cultivadas na presença de K^+ foi comparado com o de células cultivadas com Na^+. Além dos 4S, 16S e 23S RNA, o KD-RNA continha dois novos tipos de RNA, com coeficientes de sedimentação de 14S e 18S, e o conteúdo em 4S RNA era inferior ao observado em células cultivadas na presença de K^+. Enquanto que as sub-unidades 30S e 50S normais (*i. e.* de células cultivadas com K^+) apresentavam 65 % de RNA, as partículas KD-RNA apresentavam 78 % de RNA. Se as células cultivadas no meio com sódio eram transferidas para um meio com K^+, o rRNA apresentava, ao fim de algum tempo de incubação, características de sedimentação muito semelhantes às do rRNA de células sempre cultivadas na presença de potássio.

É interessante constatar que a ordem de efectividade dos catiões monovalentes na activação de sistemas enzimáticos tem paralelo com o que se observa em fenómenos celulares globais.

Rhoads *et al.* (1977) estudaram a influência do K^+ e Rb^+ no crescimento de várias estirpes de *Escherichia coli*. Numa estirpe selvagem, o crescimento final das culturas (avaliada por turbidimetria, ao fim de 24 h de incubação) era directamente proporcional à concentração inicial de KCl ou RbCl no meio de cultura (0 - 10 mM), e para uma determinada concentração de catião monovalente, o K^+ proporcionou maior crescimento do que o Rb^+. As células cultivadas num meio com 10 mM RbCl (sem K^+ adicionado) apresentavam uma concentração interna de 50 µmol K^+ (g de células)$^{-1}$, enquanto que as células cultivadas no meio sem K^+ ou Rb^+ adicionado, apresentavam 260 µmol K^+ (g de células)$^{-1}$. Este K^+ intracelular tinha sido acumulado provavelmente à custa do K^+ existinte como contaminante dos ingredientes utilizados na confecção do meio de cultura. Quando o meio de cultura continha uma concentração

relativamente elevada de Rb^+, o conteúdo em K^+ nunca era inferior a 50 μmol (g de células)$^{-1}$.

Culturas num meio contendo 50 - 100 μM K^+ apresentavam uma fase exponencial longa, com aproximadamente 4 horas de duração, mas nas culturas em meio contendo 10 mM Rb^+ esta fase de crescimento tinha muito menor duração, a taxa de crescimento era inferior à observada na presença de concentrações muito reduzidas de K^+ (30 μM), e diminuía progressivamente a partir da segunda hora de incubação.

Rhoads e colaboradores também estudaram a capacidade do Rb^+ em interferir no crescimento de diversos mutantes de *Escherichia coli*, cujas células apresentavam só um dos quatro sistemas de transporte de K^+ funcional. Na estirpe TK1001, que apresentava o sistema de transporte TrkA funcional, na presença de 0.20 mM K^+, o tempo de duplicação era de 152 minutos; na presença adicional de 20 mM RbCl, este tempo aumentava aproximadamente 2.5 vezes; se as células eram cultivadas com 20 mM K^+, a presença adicional de Rb^+ não alterava a taxa de crescimento. Também na estirpe TK405m, que apresentava o sistema TrkF funcional, com 20 mM K^+ no meio de cultura, a presença adicional de 30 mM Rb^+ resultou num aumento significativo do tempo de duplicação. Pelo contrário, na estirpe TAD109, que apresentava unicamente o sistema Kdp funcional, com 0.1 mM K^+ no meio de cultura, a presença suplementar de 10 mM Rb^+, não resultou numa alteração significativa da taxa de crescimento.

Foi estudada a afinidade do sistema de transporte do potássio, Kdp, para o K^+ e para o Rb^+. As células da estirpe selvagem foram previamente esvaziadas do potássio intracelular e cultivadas na presença de reduzidas concentrações de $^{42}K^+$ e $^{86}Rb^+$, de forma a que o sistema de transporte predominantemente fosse o Kdp. Na presença de ambos os catiões monovalentes, as células transportaram, ao fim de quatro minutos, mais de 99 % do K^+ inicial presente no meio de cultura, e passados vinte e cinco minutos, menos de 3 % do Rb^+ tinha sido transportado para o interior das células. Ao fim deste tempo de incubação, as células tinham concentrado o K^+ 6 × 10^6 vezes, mas o Rb^+ só 5 × 10^3 vezes, *i. e.*, a descriminação do K^+ em relação ao Rb^+ era de aproximadamente mil vezes. O Rb^+ apresentou assim uma baixa afinidade para o sistema de transporte Kdp. Foi também estudada a afinidade deste catião monovalente para os restantes sistemas de transporte de K^+. A descriminação do K^+ em relação ao Rb^+ variou com o sistema de transporte: 10 vezes para o TrkA e 25 vezes para o TrkD; o sistema TrkF transportou Rb^+ preferencialmente em relação ao K^+.

Estes resultados de Rhoads e colaboradores indicam assim que, no metabolismo das células de *Escherichia coli*, o Rb^+, apesar de ser «muito menos eficaz» do que o

K^+, pode substituí-lo parcialmente.

Recentemente foi publicado um trabalho em que se compara a influência do K^+ e do NH^+_4 no crescimento, em quimiostato, de diversas espécies bacterianas (Buurman *et al.*, 1989). Quando cultivadas num meio limitado em K^+, a concentração interna deste catião nas células de *Bacillus stearothermophilus* e *Klebsiella pneumoniae* dependia da fonte de azoto no meio: quando esta era nitrato ou glutamato, a $[K^+]_{in}$ era superior à observada em células cultivadas na presença de NH^+_4; assim, por exemplo, em *Klebsiella pneumoniae*, com NH^+_4 como fonte de azoto, as células apresentavam 1.58 % de K^+, com glutamato, 1.68 % K^+, e com nitrato, 1.76 % K^+; em *Bacillus stearothermophilus*, na presença de NH^+_4, as células apresentavam 1.46 % de K^+, mas com glutamato, 1.82 %. A dependência da $[K^+]_{in}$ em relação à concentração de NH^+_4 no meio de cultura foi estudada mais pormenorizadamente em *Bacillus stearothermophilus*; em culturas limitadas em K^+ (0.5 mM), com 30 mM glutamato, a um aumento da concentração de NH^+_4 no meio de 0 a 100 mM, correspondeu uma diminuição concomitante da $[K^+]_{in}$ de 1.40 para 0.60 %; se as células eram cultivadas na ausência de K^+, com 100 mM NH^+_4, a $[K^+]_{in}$ era ainda inferior, 0.05 - 0.08 %. Estes resultados revelaram assim uma diminuição progressiva da concentração interna de K^+, à medida que aumentava a concentração de NH^+_4 no meio de cultura, sugerindo que os iões amónio podem substituir, pelo menos parcialmente, os iões potássio (*cf.* o trabalho de Lubin & Ennis, 1964, citado nas páginas anteriores).

É interessante comparar estes resultados com os recentemente publicados por Wisse & MacLeod (1989) sobre o papel do Na^+ no metabolismo de uma bactéria marinha, *Pseudomonas doudorofii*. A necessidade de Na^+ para o crescimento foi testada cultivando as células num meio mínimo constituído por TRIS, $MgSO_4$, NH_4Cl, KCl, KH_2PO_4, citrato férrico amoniacal, e concentrações variáveis de cloreto de sódio e de uma fonte de carbono. Quando a fonte de carbono e energia era o acetato, a taxa de crescimento não variva com a concentração de sódio no meio de cultura (entre 10 e 500 mM), mas com glutamato ou succinato, a taxa de crescimento aumentava apreciavelmente com um aumento da concentração de sódio de 10 para 200 mM. Com qualquer destes substratos, quando a concentração de sódio no meio de cultura era nula ou baixa (0 - 10 mM), a taxa de crescimento era nula ou muito reduzida. Na ausência de Na^+ adicionado ao meio mínimo, a presença de 300 mM LiCl ou KCl não permitia o crescimento das células na presença de qualquer destes fontes de carbono e energia. Na presença de 1 mM NaCl e 299 mM LiCl adicionados ao meio mínimo com acetato ou arginina, observou-se um crescimento reduzido, e ao fim de um longo período de retardamento.

Uma adição de sacarose (não utilizada pelas células como fonte de carbono e energia) de forma a que a pressão osmótica do meio fosse semelhante à obtida com a adição de 300 mM NaCl, não diminuia a necessidade das células em Na^+: na presença de 1 mM NaCl e 470 mM sacarose, não se verificou qualquer aumento da densidade óptica das culturas, mesmo após 200 horas de incubação.

Num meio de cultura sem Na^+ adicionado, as células não transportavam o acetato, glutamato ou succinato para o interior. A um aumento da concentração de Na^+ no meio de cultura correspondia um aumento da quantidade de substrato transportado, sendo a concentração óptima de aproximadamente 200 mM Na^+. Concentrações superiores resultaram numa diminuição da quantidade de substrato transportado. Quando o Na^+ era substituído pelo K^+ (200 mM), a taxa de transporte do acetato diminuía 40 vezes, a do glutamato 61 vezes, sendo nulo o transporte de succinato. Se o Na^+ fosse substituído pelo Li^+, a taxa de transporte destes substratos era menos reduzida do que quando se utilizava o K^+: 3.3, 6.8 e 254 vezes, respectivamente.

Estes resultados de Wisse & MacLeod indicam assim que as células de *Pseudomonas doudorofii* apresentam uma necessidade absoluta em Na^+ para o crescimento. Apesar do K^+ e do Li^+ serem fracos substitutos do Na^+ no metabolismo celular, o lítio é mais eficaz do que o potássio no transporte de substratos para o interior das células.

1.3. O K^+ é o principal responsável pela elevada pressão osmótica interna das células bacterianas.

Trabalhos publicados por vários investigadores indicam que o K^+ desempenha um papel crucial na manutenção da elevada pressão osmótica interna das células bacterianas. Esta conclusão baseia-se fundamentalmente no estudo dos fluxos de K^+ que ocorrem nas células sujeitas a choques osmóticos.

Foi Epstein & Schultz (1965) quem descreveu, pela primeira vez, a influência da osmolaridade do meio de cultura no conteúdo em K^+ das células bacterianas (*Escherichia coli*). Verificaram que existia uma relação próxima da proporcionalidade directa entre a osmolaridade do meio de cultura (obtido pela adição de NaCl, glucose ou sacarose) e a concentração intracelular de K^+: num meio com 148 mOsm, as células apresentavam uma $[K^+]_{in}$ de 150 mM, mas com 988 mOsm, a $[K^+]_{in}$ era de 495 mM. Pelo contrário, a concentração intracelular de sódio não variava signifi-

cativamente com a osmolaridade do meio de cultura ou com a concentração extracelular de Na^+. Se as células bacterianas eram transferidas para um meio de osmolaridade inferior em mais de 25 - 75 mOsm em relação ao meio em que se encontravam («downshock»), as células libertavam K^+. Quanto maior era a diferença de osmolaridade entre os dois meios de suspensão, maior o efluxo de K^+. Pelo contrário, se as células eram transferidas para um meio com osmolaridade superior («upshock»), as células acumulavam K^+ a uma taxa que dependia da $[K^+]_{out}$.

Meury *et al.* (1985) observaram que se as células de *Escherichia coli* fossem cultivadas num meio de elevada osmolaridade e lavadas com água destilada libertavam rapidamente a grande maioria do K^+ intracelular. Se estas células esvaziadas do K^+ intracelular fossem colocadas em tampão fosfato de sódio (0.050 M) com 1 mM KCl e 0.225 M NaCl (600 mOsm), acumulavam K^+ até a concentração interna atingir aproximadamente 120 mM. Se então se diminuisse a osmolaridade do meio de suspensão para 300 mOsm, a $[K^+]_{in}$ decrescia até aproximadamente 80 mM. Se às células esvaziadas de K^+ se adicionasse 1 mM KCl, na ausência de cloreto de sódio (150 mOsm), a acumulação de K^+ prosseguia até a $[K^+]_{in}$ atingir aproximadamente 25 mM. Se a osmolaridade fosse então incrementada para 300 mOsm pela adição de 0.075 M de cloreto de sódio, a $[K^+]_{in}$ aumentava de 25 para aproximadamente 75 mM. Existia assim uma relação de proporcionalidade directa entre a osmolaridade do meio de suspensão (entre aproximadamente 150 e 600 mOsm, ajustada pelo NaCl) e a concentração intracelular de K^+. A resposta ao choque osmótico consistia exclusivamente numa entrada ou saída de K^+ das células, consoante se verificava um aumento ou diminuição da osmolaridade do meio de suspensão. O influxo ou efluxo de K^+ foi detectado imediatamente após o distúrbio osmótico. Quando o KCl era substituído por RbCl, também se restabelecia a osmolaridade interna das células (o papel do Rb^+ no metabolismo bacteriano é referido na sub-secção 1.2.).

Os fluxos de K^+ após choque hiperosmótico foram estudados em *Pseudomonas aeruginosa* por Kroll & Anagnostopoulos (1981b). Foi também observado que um choque osmótico induzia o transporte de K^+ para o interior das células, e que este era o principal meio das células contrabalançarem o aumento da pressão osmótica externa.

Nas células de *Escherichia coli*, Roth *et al.* (1985a, 1985b) observaram que um choque osmótico com 0.8 M NaCl ou sacarose, resultava numa cessação do transporte de diversos carbohidratos e num decréscimo imediato do volume celular. Este decréscimo do volume celular era seguido por um ligeiro aumento, mas as células nunca readquiriam o volume celular inicial. Se as células eram submetidas a um choque osmótico com 0.2 M xilitol, o volume celular também diminuía. No entanto, se este

choque osmótico era realizado na presença de K^+, após 15 min de tratamento, o volume celular era semelhante ao de células não tratadas, e o transporte de α-metilglucósido era muito menos inibido do que na ausência de K^+. Concluiu-se que o K^+ tinha contribuído para o restabelecimento da elevada pressão osmótica interna das células sujeitas a choque osmótico.

Os trabalhos já referidos indicam assim que uma das formas das células bacterianas contrabalançarem o aumento da pressão osmótica externa consiste numa acumulação de K^+. Este catião monovalente desempenha portanto um papel importante na osmoregulação da célula bacteriana.

Este fenómeno tem, no entanto, várias implicações muito importantes:

(i) Nas células bacterianas, muitos processos metabólicos dependem directa ou exclusivamente da presença de determinadas concentrações de K^+. No entanto, concentrações muito elevadas de potássio podem ser inibitórias (*cf.* sub-secção 1.2.), pelo que não é de esperar que os choques osmóticos se traduzam num aumento *ad infinitum* da concentração intracelular de K^+.

(ii) Dada a carga dos iões K^+, uma acumulação exclusiva de quantidades consideráveis destes catiões, traduzir-se-ia no estabelecimento de uma elevada carga líquida interna positiva, pelo que o influxo de K^+ deve ser acompanhado de outras trocas iónicas, nomeadamente, influxo de aniões e/ou efluxo de outros catiões.

De facto verificou-se que nas células bacterianas, após choque osmótico, além de um influxo de K^+, ocorrem geralmente fluxos de outros metabolitos osmoticamente activos, nomeadamente, uma acumulação de moléculas não-iónicas, como as betaínas e a trealose (*cf.* artigos de revisão de Imhoff, 1986 e Strøm *et al.*, 1986), ou aniónicas como o ácido glutâmico, e/ou um efluxo de moléculas catiónicas como a putrescina. Citam-se seguidamente alguns trabalhos em que se estudaram alguns destes fluxos moleculares.

As poliaminas existentes em concentrações mais elevadas nas células de *Escherichia coli* são a putrescina e a espermidina, sendo a concentração da primeira muito superior à da segunda. *In vivo*, estas poliaminas parecem desempenhar funções na síntese do RNA e das proteínas, não sendo sujeitas a reciclagem, ou sendo-o muito lentamente (Munro *et al.*, 1972). Estes investigadores verificaram que a concentração interna de putrescina variava inversamente com a osmolaridade do meio de cultura. Um aumento da osmolaridade do meio resultava num efluxo rápido da putrescina intracelular (mas não da espermidina ou de amino-ácidos) e numa concomitante entrada de K^+ (mas não de Na^+, NH^+_4, Rb^+ ou Mg^{2+}) para o interior das

células. O efluxo da putrescina dependia directamente do influxo de K^+: uma ausência de K^+ no meio de cultura resultava numa diminuição acentuada na taxa de efluxo de putrescina; se então se adicionasse K^+, verifica-se, passados alguns minutos, um efluxo rápido de putrescina intracelular. O aumento de osmolaridade do meio de cultura também induzia um aumento da concentração interna de glutamato, ornitina e arginina. Dado que estes amino-ácidos são precursores da síntese da putrescina, foi proposto que o aumento da concentração interna destes amino-ácidos era resultante de uma redução na síntese de putrescina. Munro e colaboradores concluíram que o aumento brusco da osmolaridade externa obrigou a um aumento da osmolaridade interna das células bacterianas, e que este foi obtido à custa da acumulação de K^+ e de amino-ácidos, principalmente, glutamato. Concluíram ainda que o efluxo de putrescina^{2+} e a acumulação de amino-ácidos aniónicos como o glutamato, era provavelmente a forma das células compensarem o ganho de cargas positivas pela entrada dos iões K^+.

Em *Pseudomonas aeruginosa* e *Vibrio parahaemolyticus*, Measures (1975) observou que após choque osmótico com NaCl, o único agente osmoticamente activo acumulado, além do K^+, era o ácido glutâmico. Por cada mole de NaCl presente no meio de cultura, o aumento da concentração intracelular deste amino-ácido era de aproximadamente 0.9 mole. A enzima involvida na síntese do glutamato, na maioria das espécies bacterianas, é a glutamato desidrogenase, sendo a síntese do ácido glutâmico por esta enzima fortemente estimulada pelos iões K^+. Measures propôs que a acumulação do glutamato é um processo cíclico: o choque osmótico induz uma acumulação de K^+; para compensar a carga positiva, as células co-acumulam glutamato; concentrações crescentes de K^+ favorecem a síntese de glutamato.

Larsen *et al.* (1987) observaram que as células de *Escherichia coli* cultivadas em meio mínimo contendo betaínas e uma elevada concentração de cloreto de sódio, transportavam as moléculas de betaínas para o seu interior. Na presença de 0.20, 0.40 e 0.65 M NaCl, as concentrações internas molares de prolina-betaína e glicina-betaína correspondiam a 29, 38 e 58 %, respectivamente, da osmolaridade do meio de cultura. Se o meio de cultura não continha betaínas ou seus precursores, como a colina ou a glicina-betaína-aldeído, as células não acumulavam, após choque osmótico, betaínas, mas trealose, ácido glutâmico, e provavelmente K^+. Na presença de 0.40 M NaCl, as concentrações internas de trealose e ácido glutâmico eram então de 0.19 e 0.08 M, respectivamente; a força osmótica destas duas moléculas correspondia a 27 % da osmolaridade externa do meio de cultura. Se a trealose e o ácido glutâmico eram adicionados ao meio de cultura, estas moléculas não protegiam as

células contra o choque osmótico. Na ausência de choque osmótico, as células não acumulavam trealose nem de ácido glutâmico. Estes resultados indicam assim que as células de *Escherichia coli* não apresentam a capacidade de sintetizar *de novo* as betaínas, e que a acumulação de trealose e ácido glutâmico é de facto uma resposta ao choque osmótico, mas estas moléculas só são efectivas se sintetizadas pelas células. Larsen e colaboradores salientaram que o glutamato acumulado após choque osmótico só parcialmente neutralizava as cargas positivas dos iões K^+, e que era intrigante como não se detectava, por ressonância nuclear magnética, outro ou outros contra-iões orgânicos que compensassem a carga positiva dos iões K^+.

Dinnbier *et al.* (1988) observaram que após o choque osmótico com cloreto de sódio, as células de *Escherichia coli* K-12 acumulavam concentrações elevadas de K^+ e glutamato (K^+: 0.4 → 1.05 M; glutamato: 0.05 → 0.35 M). Após esta acumulação inicial, a concentração interna de K^+ e glutamato diminuía, mas o valor final era significativamente superior ao inicial (K^+: 0.4 → 0.7 M). À diminuição das concentrações internas de K^+ e glutamato, correspondia um aumento da concentração interna de trealose. Durante a adaptação a concentrações elevadas de NaCl, a acumulação de betaínas tinha prioridade em relação à de K^+: a presença de prolina ou betaína evitava a acumulação de K^+ e induzia um efluxo dos iões já acumulados. A adição de prolina a células que tinham acumulado trealose como resposta a um choque osmótico resultava numa degradação do carbohidrato acumulado. Foi salientado que a concentração do K^+ acumulado por choque osmótico era muito superior à do glutamato, pelo que devia ter-se verificado uma concomitante saída de putrescina ou Na^+ das células, ou ainda a síntese de outros ácidos além do glutamato.

Os trabalhos atrás citados indicam assim que nas células bacterianas um choque osmótico induz frequentemente uma co-acumulação de K^+ e glutamato, mas a quantidade do amino-ácido acumulado é geralmente muito inferior à do potássio. Epstein (1986) calculou que o glutamato acumulado por choque osmótico corresponde só a 20 % das cargas aniónicas necessárias para contrabalançar o K^+ transportado para o interior das células.

2. O EFLUXO DE K^+ E DE METABOLITOS DE BAIXO PESO MOLECULAR, INDUZIDO PELO Cu^{2+} E PELA DODINA EM *P. SYRINGAE*.

2.1. Os métodos utilizados no estudo do efluxo de K^+ induzido por agentes químicos.

2.1.1. Quantificação do K^+ libertado.

Para estudar o efluxo de K^+ induzido por agentes químicos em células bacterianas, pode seguir-se o decréscimo da concentração interna de K^+ nas células tratadas, ou acompanhar o aumento da concentração de K^+ no sobrenadante das suspensões, após a adição do agente químico.

O K^+ é geralmente quantificado por espectrometria de chama ou espectrometria de absorção atómica, ou pela utilização de um eléctrodo específico. Estas duas técnicas apresentam vantagens e incovenientes, sendo cada uma especialmente adequada a um tipo particular de estudos.

Quando se utiliza a espectrometria de chama (ou a de absorção atómica), o K^+ é doseado nas células ou no sobrenadante, pelo que é sempre necessário separar estes dois componentes um do outro. Esta separação pode ser feita por centrifugação ou por filtragem. Com uma centrifugação corrente (velocidade e duração não muito elevadas), é difícil obter uma amostra do sobrenadante totalmente isenta de células. Dada a elevada concentração intracelular de K^+, uma contaminação da fracção do sobrenadante com células bacterianas, mesmo que reduzida, teria como consequência uma avaliação por excesso da concentração exterior deste catião monovalente, pelo que este método não é geralmente utilizado. A separação das células do sobrenadante é geralmente feita por filtragem por filtro de poro inferior a 0.45 μm. Quando se estuda o efluxo de K^+ por espectrometria de chama, a principal limitação consiste assim no tempo necessário para levar a cabo a filtragem das amostras, não sendo exequível para um único operador processar amostras com menos de alguns minutos de intervalo entre elas, pelo que esta técnica não é adequada para um estudo pormenorizado de processos de efluxo rápidos. Apresenta a vantagem de ser muito reduzido o número de iões ou moléculas que interferem com o doseamento do K^+. Utilizei esta técnica no estudo do efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} e pela dodina em *P. syringae* (Trabalhos II, III e IV).

Pela utilização de um eléctrodo específico ou sensível ao K^+, é possível determinar continuamente, numa suspensão de células, a concentração extracelular de

K^+. Este método é assim particularmente adequado para o estudo pormenorizado de processos de efluxo rápidos. Apresenta a desvantagem do doseamento do K^+ poder ser afectado pela presença de determinados iões ou moléculas. Nomeadamente o eléctrodo de membrana líquida que utilizei no estudo do efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} (Trabalho I) não pode ser utilizado no estudo deste processo induzido pela dodina, dado que a dodina interfere com este eléctrodo, provavelmente pela destruição do potencial (*cf.* Trabalho VII). Para estudar o efluxo de K^+ induzido pela dodina (Trabalho VII) utilizei um eléctrodo de vidro, cujo funcionamento não era significativamente afectado pela presença de moléculas deste detergente, mas no entanto, era sensível à presença de Na^+, pelo que não foi possível utilizar o tampão Na^+-DMGA para suspender as células. Quando o eléctrodo apresenta uma deriva apreciável, não podem ser estudados convenientemente processos de efluxo relativamente longos. Dado que cada eléctrodo só permite estudar um processo de efluxo de cada vez, a utilização deste método para o estudo de processos de efluxo de duração superior a 30 - 45 minutos torna o trabalho muito moroso. As vantagens da utilização de um eléctrodo no estudo do efluxo de K^+ induzido por agentes químicos foram referidas, nomeadamente, por Lambert & Hammond (1973), Gale (1974), Hammond *et al.* (1974), Lambert (1974) e Kroll & Anagnostopoulos (1981).

2.1.2. Determinação dos parâmetros do efluxo de K^+.

É elevado o número de trabalhos publicados sobre o efluxo de K^+ induzido por agentes químicos em células procarióticas e eucarióticas, mas na quase totalidade dos trabalhos, este fenómeno é avaliado quantitativamente de uma forma muito sumária. Em alguns trabalhos, nomeadamente os de Vincent & Blackburn (1958) e De Filippis (1979), é quantificada unicamente a quantidade de K^+ libertado ao fim de um determinado tempo de tratamento. Na grande maioria dos trabalhos em que é estudada a cinética do efluxo, só são utilizados como parâmetros, ou a quantidade máxima de K^+ libertado, ou a quantidade libertada ao fim de um determinado tempo de tratamento pelo agente químico.

Kroll & Anagnostopoulos (1981a), num estudo sobre o efluxo de K^+ induzido pelo fenol em *Serratia marcescens*, definiram o t_{max} como o tempo necessário para se atingir a quantidade máxima de K^+ libertado, tendo observado que o valor deste parâmetro diminuía com um aumento da concentração de agente químico. Utilizaram ainda o que designaram de «taxa inicial de efluxo de K^+» («initial rate of K^+

release»), expressa em μg/ml/min, que, no entanto, não definiram.

Gale (1974), num estudo sobre o efluxo de K^+ induzido por antibióticos de polieno na levedura *Candida albicans*, utilizou os seguintes parâmetros: «taxa de efluxo» expressa em nmol K^+/min/mg, não definida no texto; «tempo para um efluxo padrão» («standard release time»), expresso em minutos, definido como o tempo necessário para se atingir uma taxa de efluxo 1 nmol/min/mg superior à de suspensões não tratadas; «concentração para um efluxo padrão» («standard release concentration»), expressa em μg/ml, definida como a concentração de agente químico necessária para se atingir uma taxa de efluxo 1 nmol/min/mg superior à de suspensões não tratadas, num dado tempo. Gale verificou que a um aumento da concentração de anfotericina-metil-éster correspondia uma diminuição do tempo para um efluxo padrão e do tempo para se atingir taxas de efluxo de 0.3, 1.0 e 3.0 nmol K^+/min/mg.

Considerei que os parâmetros definidos nos trabalhos publicados eram insuficientes para um estudo pormenorizado do efluxo de K^+, e em alguns casos, nomeadamente os parâmetros definidos por Gale (1974), eram de difícil interpretação. Considerei útil a utilização dos seguintes parâmetros: «Taxa de efluxo», «Taxa máxima de efluxo», «Tempo para taxa máxima» e «K^+ libertado após *x* minutos de tratamento» (Trabalhos I, II, III, IV e VII). Destes parâmetros, os três primeiros só foram determinados quando o efluxo de K^+ foi seguido pela utilização de um eléctrodo (Trabalhos I e VII). Com esta técnica, dado que as concentrações extracelulares de K^+ foram determinadas cada 5 segundos, foi também possível calcular, a intervalos de 5 segundos após a adição do agente químico, a «taxa de efluxo de K^+». A mais elevada taxa de efluxo foi considerada como sendo a designada «taxa máxima de efluxo». O cálculo destes novos parâmetros do efluxo de K^+ foi particularmente vantajoso no estudo deste processo induzido pela dodina (Trabalho VII), dado que foi possível relacionar a taxa máxima de efluxo com a formação de micelas deste detergente: quando a concentração de dodina atingia a concentração micelar crítica (CMC), verificava-se um aumento acentuado da quantidade de K^+ libertado e da velocidade com que se processava a sua saída das células.

2.2. O efluxo de K^+ e de metabolitos de baixo peso molecular induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae*.

2.2.1. Os iões Cu^{2+} e Hg^{2+} induzem um efluxo de K^+ em células eucarióticas e procarióticas.

Vincent & Blackburn (1958) foram dos primeiros investigadores a observar que alguns catiões metálicos induzem uma saída acentuada de K^+ de células eucarióticas. Dos catiões estudados, o Pb^{2+} foi o mais efectivo na indução do efluxo de K^+; um tratamento dos eritrócitos humanos com concentrações de Au^{3+}, Hg^{2+} ou Cu^{2+} superiores a 0.1 mM resultava numa saída significativa de K^+ das células, mas o Cd^{2+} e o Zn^{2+}, mesmo a concentrações superiores a 5 mM, só causavam um ligeiro efluxo de K^+.

Puckett (1976) observou que um tratamento do talo do líquene *Umbilicaria muhlenbergii* com concentrações de Cu^{2+}, Ag^+ ou Hg^{2+} superiores a 0.1 mM resultava numa saída acentuada de K^+, mas o Cd^{2+}, Co^{2+} e Ni^{2+} só eram efectivos a concentrações mil vezes superiores. No talo do líquene *Cladina rangiferina*, Burton *et al.* (1981) também referiram que o Cu^{2+} induzia um efluxo de K^+ a concentrações muito inferiores às concentrações efectivas de Ni^{2+}.

McBrien & Hassall (1965) observaram que um tratamento das células da alga verde unicelular *Chlorella vulgaris* com concentrações iguais ou superiores a 0.048 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$ resultava na libertação da maioria do K^+ livre intracelular. Pelo contrário, De Filippis (1979) referiu que um tratamento das células de *Chlorella* com 0.1 mM $CuCl_2$ durante 1 h só resultava na libertação de aproximadamente 20 % do K^+ intracelular total. No entanto, um tratamento com Hg^{2+} resultava na libertação de mais de 50 % do K^+ celular.

O efluxo de K^+ induzido por catiões metálicos nas células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* foi estudado por vários investigadores que observaram que os iões Cu^{2+} e Hg^{2+} são dos mais efectivos na indução deste processo. Passow & Rothstein (1960) observaram que o Zn^{2+} e o Pb^{2+} não causavam uma saída significativa do K^+ intracelular, mas o Cu^{2+} e o Hg^{2+} tinham este efeito, que era máximo com os iões de mercúrio. Kuypers & Roomans (1979) observaram que o Cu^{2+} era quase tão efectivo como o Hg^{2+} na indução do efluxo de K^+: após 4 h de incubação com 60 µM $CuCl_2$, a quantidade de K^+ libertado era 90 % da obtida com idêntica concentração de Hg^{2+}. Theuvenet *et al.* (1987) também observaram que estes dois metais causavam níveis de efluxo de K^+ semelhantes, obtendo-se com um tratamento com 0.5 mM

durante alguns minutos, a libertação de aproximadamente 30 % do K^+ total. O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} foi estudado em pormenor por Rome & Gadd (1987) e Oshumi *et al.* (1988). Rome & Gadd (1987) concluiram que o efluxo de K^+ observado com concentrações muito reduzidas de Cu^{2+} estava directamente relacionado (correspondia a uma troca de cargas idênticas) com o processo de transporte activo de Cu^{2+} para o interior das células (*cf.* sub-secção 2.2.3.). Ohsumi *et al.* (1988) concluiram que o tratamento com $CuCl_2$ resultava na libertação da maioria do K^+ citoplasmático, mas não do K^+ vacuolar.

Concentrações de Cu^{2+} iguais ou superiores a 0.8 μM causam uma saída de K^+ das células da cianobactéria *Lyngbia nigra*, mas a níveis reduzidos; após um tratamento com 80 μM, durante 192 h, só aproximadamente 12 % do K^+ tinha sido libertado (Gupta & Arora, 1978).

A maioria dos trabalhos referidos indica assim que os iões Cu^{2+} e Hg^{2+} são potentes indutores de efluxo de K^+, mas em alguns casos, nomeadamente nos trabalhos de De Filippis (1979) e Gupta & Arora (1978), tal resultado não foi obtido. A variabilidade destes resultados pode ser devida a diferentes comportamentos do material biológico, ou ser causada pela utilização de diferentes condições experimentais, nomeadamente, suspensões com diferentes concentrações celulares. A toxicidade do Cu^{2+} e do Hg^{2+} não depende directamente da concentração absoluta destes metais, mas antes da sua concentração relativa à massa celular (*cf.* Anexo C). Este aspecto foi demonstrado por Vincent & Blackburn (1958), em eritrócitos humanos tratados com Hg^{2+}. Estes investigadores verificaram que a quantidade de K^+ libertado dependia da concentração de Hg^{2+} relativa à massa celular, e não da concentração absoluta deste metal; obtinham-se assim resultados idênticos, por exemplo, aumentando em cinco vezes a concentração absoluta de Hg^{2+} e mantendo a concentração celular constante, ou mantendo a concentração absoluta de metal constante e reduzindo em cinco vezes a concentração celular.

Os resultados referidos na bibliografia sugeriram o estudo da indução do efluxo de K^+ por catiões divalentes em células de *P. syringae*. À semelhança do observado em várias espécies de eucariontes, e referido nesta secção, verifiquei que um tratamento das células de *P. syringae* com concentrações micromolares de Cu^{2+} ou Hg^{2+} resultava na libertação da maioria do K^+ intracelular (Trabalhos I, II, III e Anexo B). No Anexo B são comparadas as características dos processos de efluxo induzidos pelo Cu^{2+} e pelo Hg^{2+} nas células de *P. syringae*.

2.2.2. O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* é um processo muito rápido.

Com a utilização de um eléctrodo específico foi-me possível estudar em pormenor a cinética da libertação do K^+ das células de *P. syringae* tratadas com $CuSO_4$ (Trabalho I). Após a adição de 15 a 40 μM Cu^{2+} (0.0535 a 0.143 μmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$), o processo desenrola-se essencialmente em menos de 15 min. McBrien & Hassall (1965) estudaram a cinética do efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} na alga *Chlorella vulgaris*, tendo observado que após um tratamento com concentrações de Cu^{2+} compreendidas entre 0.048 e 1.6 μmol (mg peso seco)$^{-1}$, este processo só se completava ao fim de aproximadamente 4 h. O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* é assim muito mais rápido do que em *Chlorella vulgaris*.

2.2.3. Nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}, o número de iões K^+ libertados é superior ao dobro do número de iões Cu^{2+} absorvidos.

McBrien & Hassall (1965) compararam a cinética do efluxo de K^+ com a da absorção de Cu^{2+} nas células de *Chlorella vulgaris*, tendo observado que, em todas as concentraçõs de Cu^{2+} estudadas (0.048 a 1.6 μmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$), o número de cargas positivas libertadas (K^+) era superior ao número de cargas positivas absorvidas (Cu^{2+}).

Com o objectivo de verificar se idêntico fenómeno ocorria em *P. syringae*, representei graficamente na Fig. 1. a relação entre a quantidade de K^+ libertado ou Cu^{2+} absorvido, e a concentração inicial de Cu^{2+}, em células suspensas em tampão na ausência de uma fonte exterior de energia. O gráfico obtido permite concluir que: (i) Para concentrações iniciais compreendidas entre 10 e 100 μM Cu^{2+}, estes dois fenómenos dependem de forma diferente da concentração inicial de iões cúpricos ($[Cu^{2+}]_{inicial}$): enquanto que o número de iões Cu^{2+} absorvidos é aproximadamente directamente proporcional ao número de iões Cu^{2+} disponíveis, o número de iões K^+ libertados é uma função sigmóide da $[Cu^{2+}]_{inicial}$, atingindo-se a saturação com aproximadamente 50 μM Cu^{2+}. (ii) Na gama de concentrações em que se desenrola o efluxo de K^+ (iguais ou inferiores a 50 μM Cu^{2+}), o número de iões K^+ libertados é superior ao dobro do número de iões Cu^{2+} absorvidos. (iii) A razão entre o número de iões K^+ libertados e o número de iões Cu^{2+} absorvidos não é constante.

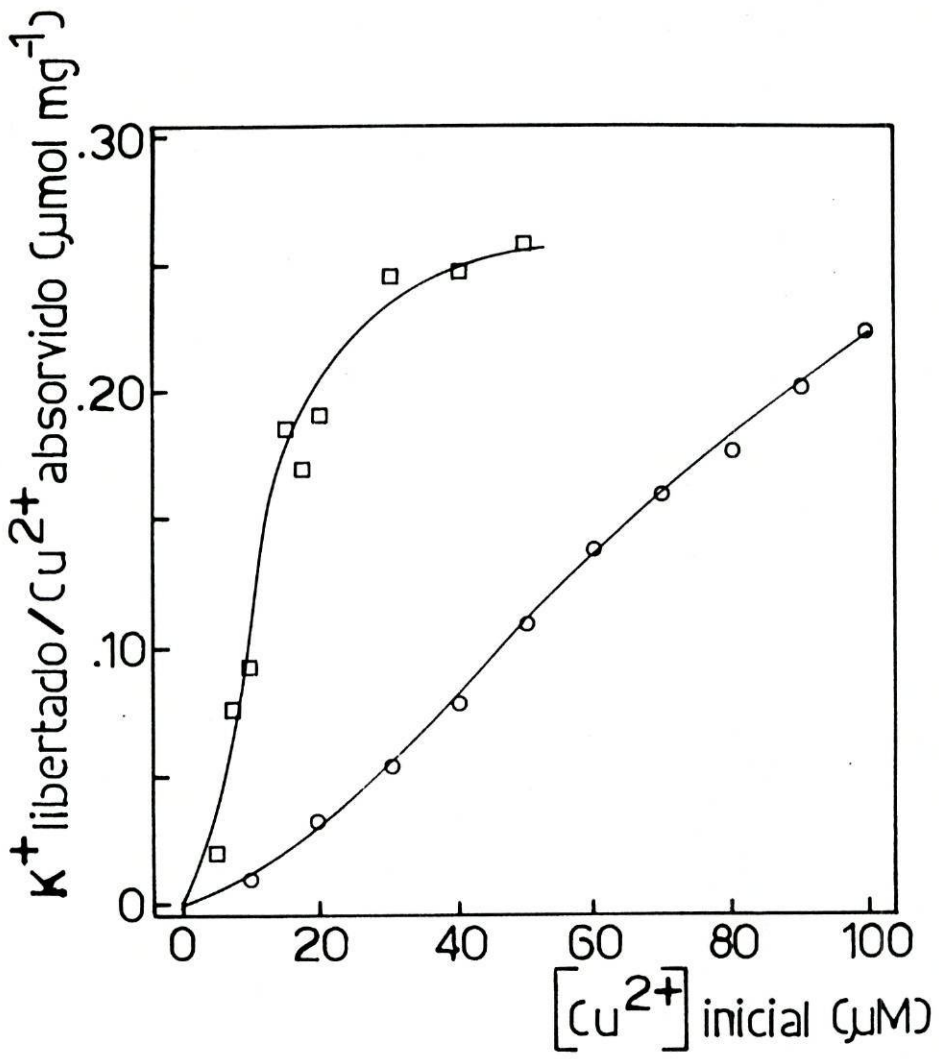


FIGURA 1. Relação entre a quantidade de K^+ libertado (□) ou Cu^{2+} absorvido (○), e a concentração inicial de Cu^{2+}, em células de *P. syringae* suspensas em 10 mM Na^+-PIPES e tratadas com $CuSO_4$ durante 15 min.

A quantidade de K^+ libertado pela acção dos iões Cu^{2+} foi calculada, para cada concentração de Cu^{2+}, substraindo à quantidade total de K^+ libertado, o valor do controlo (resultados extraídos do Trabalho I). Os resultados da absorção de Cu^{2+} foram extraídos do Trabalho II. O K^+ foi doseado por espectrometria de chama e o cobre por espectrometria de absorção atómica.

Rome & Gadd (1987) compararam a absorção do Cu^{2+} com o efluxo de K^+, em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. Observaram que a absorção de Cu^{2+} decorria em duas etapas, uma ligação inicial, não-energética, à superfície das células, seguida de transporte activo. Concomitante com o influxo de Cu^{2+} ocorria um efluxo de K^+. Os factores que diminuíam o transporte de Cu^{2+}, nomeadamente, a ausência de glucose e a presença de inibidores ou desacopladores («uncouplers»), também reduziam o efluxo de K^+, sugerindo que, nas condições experimentais utilizadas, a libertação do K^+ estava relacionada com o transporte activo de Cu^{2+}. O efluxo de K^+ e o influxo de Cu^{2+} eram electricamente equivalentes, tendo sido concluído que a saída dos iões K^+ tinha restabelecido o balanço iónico das células.

Os resultados referidos por Rome & Gadd não podem ser directamente comparados com os que obtive em *P. syringae*. Rome & Gadd estudaram a interacção entre o Cu^{2+} e as células de levedura a concentrações relativas de Cu^{2+} extremamente reduzidas (0.010 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$), concentrações que, na ausência de fonte de energia, não causavam uma saída significativa de K^+, e que não afectavam a viabilidade celular. Em *P. syringae*, a relação entre as quantidades de K^+ libertado e de Cu^{2+} absorvido foi estudada para concentrações superiores a 0.036 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$, concentrações que, na ausência de glucose, já causavam uma saída detectável de K^+ das células. Enquanto que Rome & Gadd estudaram a relação entre o efluxo de K^+ e o transporte activo de Cu^{2+}, em *P. syringae* estudei a relação entre o efluxo de K^+ e a ligação passiva dos iões Cu^{2+} às células.

2.2.4. A relação entre o efluxo de K^+ e a saída de metabolitos de baixo peso molecular, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}.

Referi na sub-secção anterior que após tratamento das células de *P. syringae* com Cu^{2+} o número de cargas positivas (K^+) que deixam a célula é superior ao número de cargas positivas (Cu^{2+}) que se ligam, o que sugere que outras trocas iónicas devem ter lugar nas células.

Em condições normais de crescimento, as células bacterianas apresentam elevadas concentrações internas de K^+, cuja carga global positiva deve ser contrabalançada pela presença de uma quantidade razoável de aniões. Apesar de terem sido publicados vários trabalhos (alguns dos quais mencionados na sub-secção 1.3.) sobre a composição iónica das células bacterianas sujeitas a choques osmóticos, este assunto não tem sido estudado em células cultivadas em meios correntes. O conteúdo

das células bacterianas apresenta diversos constituintes aniónicos, nomeadamente o fosfato inorgânico, moléculas de pequenas dimensões como os nucleótidos, e macromoléculas como os ácidos nucleicos. O conteúdo das células bacterianas em ácidos nucleicos é significativo, situando-se em média entre 12 e 24 % do seu peso seco (Mandelstam & McQuillen, 1973; Schlegel, 1986). É de admitir que os iões K^+ sejam um dos (talvez o principal, dada a sua elevada concentração intracelular) contra-iões dos grupos fosfato destas moléculas poli-aniónicas que entram na composição das células bacterianas. Esta interpretação é apoiada pelos resultados que obtive em *P. syringae* (Trabalho II). O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} é acompanhado da saída de metabolitos de baixo peso molecular, alguns dos quais aniónicos, como o fosfato inorgânico, os nucleótidos e as moléculas de RNA de pequenas dimensões. Os resultados que obtive sugerem que o efluxo destes metabolitos aniónicos deve ter participado no restabelecimento da carga eléctrica das células esvaziadas do seu K^+ intracelular. A saída do K^+ das células tratadas com Cu^{2+}, pode também ter sido contrabalançada por uma entrada nas células de catiões monovalentes (Trabalho III).

Os resultados que obtive sugerem assim que, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}, a depleção do citoplasma em cargas positivas causada pela saída da maior parte do K^+ intracelular, é provavelmente compensada, por um efluxo de moléculas aniónicas (fosfato inorgânico, nucleótidos e RNAs de pequenas dimensões), pela ligação de iões Cu^{2+} e, se presentes no meio de suspensão, por um influxo de catiões monovalentes como o Na^+.

2.2.5. A plasmólise como consequência directa da saída da maior parte do K^+ intracelular, nas células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}.

Como foi desenvolvido na sub-secção 1.3., nas bactérias não-halofílicas cultivadas em condições normais, o K^+ é geralmente o principal responsável pela elevada pressão osmótica interna. É assim de esperar que um esvaziamento das células em K^+ tenha como consequência directa uma contracção do citoplasma. Tal foi observado por Thompson *et al.* (1970) numa pseudomonas marinha suspensa numa solução diluída de cloreto de magnésio, e por mim nas células de *P. syringae* após tratamento com Cu^{2+} (Trabalho III).

No trabalho de Thompson *et al.* (1970) foi estudada a relação entre o tratamento das células de uma pseudomonas marinha com diversos catiões, e o seu conteúdo em K^+. Quando as células eram suspensas numa solução contendo 0.3 M NaCl, 0.05

M $MgCl_2$ e 0.01 M KCl (meio de sais completo), exibiam uma morfologia normal quando observadas por microscopia óptica e electrónica, mas se ao meio completo se retirava o KCl, as células plasmolizavam. A adição de K^+ a estas células plasmolizadas resultava numa diminuição da densidade óptica e concomitante desaparecimento das baías de plasmólise, processo que se completava vinte a trinta minutos após a adição de K^+. As células desplasmolizadas apresentavam uma morfologia semelhante à das células não tratadas. Para testar se outros catiões monovalentes também tinham a capacidade de desplasmolizar as células da pseudomonas marinha, estas foram suspensas em 0.3 M NaCl e 0.05 M $MgCl_2$, após o que se adicionou 0.01 M de K^+, Li^+, Rb^+, Cs^+ ou NH^+_4. Destes catiões monovalentes, só o K^+ diminuia a densidade óptica da suspensão, indicando que só este catião monovalente tinha a capacidade de desplasmolizar as células. Foi determinada qual a concentração interna de K^+, nas células sujeitas a estes diferentes tratamentos. As células suspensas no meio de sais completo, apresentavam uma concentração interna de 0.290 M K^+, mas nas células suspensas em 0.05 M $MgCl_2$, esta concentração era muitíssimo inferior, 0.004 M K^+. Se estas células plasmolizadas eram transferidas para um meio de sais completo, as células desplasmolizavam-se, e a concentração intracelular de K^+ aumentava para um valor semelhante ao de células inicialmente suspensas neste meio de sais completo. Thompson e colaboradores concluíram que a plasmólise era consequência do esvaziamento das células em K^+, e que a desplasmólise tinha sido resultado do restabelecimento de uma concentração interna de K^+ elevada. Os iões K^+ intracelulares eram assim osmoticamente activos. Se as células perdiam a grande maioria do K^+ intracelular, a pressão osmótica interna diminuia com concomitante contracção da membrana citoplasmática e formação de baías de plasmólise.

Em *P. syringae*, também constatei que a saída da maior parte do K^+ intracelular é acompanhada de uma plasmólise acentuada (Trabalho III). Ao contrário do observado numa pseudomonas marinha por Thompson *et al.* (1970), em *P. syringae*, o Na^+, o K^+ e o Li^+ antagonizam a plasmólise induzida pelo Cu^{2+}, provavelmente pela entrada nas células de quantidades apreciáveis daqueles iões. Para confirmar esta hipótese seria necessário estudar os fluxos destes catiões monovalentes após tratamento com os iões Cu^{2+}. Os resultados apresentados no Trabalho III estão assim de acordo com a noção fundamental desenvolvida na sub-secção 1.3. de que o K^+ desempenha um papel crucial na osmoregulação das células bacterianas.

Estudei a plasmólise induzida pelo Cu^{2+} em *P. syringae*, pela observação, por microscopia electrónica de transmissão, de cortes ultra-finos das células tratadas; adicionalmente, a plasmólise foi seguida pelo aumento da densidade óptica a um dado

comprimento de onda (Trabalho III). A contracção celular como consequência de um esvaziamento das células em K^+ só tem sido estudada indirectamente, pela determinação da densidade óptica de suspensões após o tratamento químico, e ocasionalmente confirmado pela observação ao microscópio óptico. Creio que o Trabalho III constitui a primeira publicação que confirma a nível ultrastrutural, que o esvaziamento das células bacterianas em K^+ por tratamento com agentes químicos pode ser acompanhada de plasmólise.

Pode-se obter uma quantificação aproximada da plasmólise celular pela análise de cortes ultra-finos observados por microscopia electrónica de transmissão, tendo sido este o método que utilizei (Trabalho III). Na gama de concentrações que causam efluxo de K^+ em *P. syringae*, a um aumento da concentração de Cu^{2+} corresponde um aumento da percentagem de células plasmolizadas, mas não um aumento da intensidade da plasmólise nas células afectadas. A distribuição do índice de plasmólise na população de células afectadas é semelhante nas diferentes concentrações de Cu^{2+}. Assim como a quantidade de K^+ libertado, também a percentagem de células plasmolizadas é uma função sigmóide simétrica do logaritmo da concentração de Cu^{2+} (*cf.* Tabela 1 do Trabalho III). Interpretei estes resultados como indicando que a plasmólise induzida pelo Cu^{2+} é essencialmente um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada» (*cf.* sub-secção 2.2.6.).

Em organismos eucarióticos também tem sido descrito que uma saída do K^+ intracelular pode resultar numa contracção celular.

Sutherland *et al.* (1967) estudaram a actuação de um reagente de grupos sulfidrilo, o paracloromercuribenzeno-sulfonato, em eritrócitos humanos. A adição de paracloromercuribenzeno-sulfonato, a concentrações iguais ou superiores a 10 µM, resultou numa saída lenta, mas significativa, de K^+ das células. Se as células eram suspensas em NaCl a saída de K^+ era acompanhada de um concomitante ligeiro aumento do volume celular, mas se o meio de suspensão continha cloreto de colina, o volume celular decrescia apreciavelmente. Considerando que estas células são permeáveis ao sódio mas não à colina, os resultados obtidos foram interpretados como significando que na presença de Na^+, a saída de K^+ era osmoticamente contrabalançada pela entrada de iões Na^+, mas na presença de colina (e ausência de Na^+), as células sofriam uma perda do seu conteúdo em solutos osmoticamente activos.

Em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, agentes químicos muito diversos (incluíndo o Cu^{2+}) que causam um efluxo de K^+, também induzem uma concomitante contracção («shrinkage») das células (Borst-Pauwels *et al.*, 1983; Borst-Pauwels & Theuvenet, 1985; Ohsumi *et al.*, 1988). A distribuição do volume

celular na população após tratamento com o agente químico foi mesmo utilizada por Borst-Pauwels e colaboradores para estudar se o efluxo de K^+ era reacção gradual ou do tipo «tudo-ou-nada» (*cf.* sub-secção 2.2.6.). Estes investigadores verificaram que um tratamento com os antagonistas da calmodulina, trifluoperazina e calmidazólio, resultava num efluxo de K^+, e concomitante diminuição do número de células de dimensões normais e aumento do número de células fortemente contraídas. Nas populações tratadas com estes agentes químicos só se observavam dois tipos de células, normais ou fortemente contraídas. Foi concluído que o efluxo de K^+ era um processo essencialmente do tipo «tudo-ou-nada». Oshumi *et al.* (1988) observaram que o Cu^{2+} induz um efluxo de K^+ e uma contracção das células desta levedura. Um tratamento com 30 μM $CuCl_2$ resultou numa redução do volume celular para 77 % do de células não tratadas. Esta contracção das células foi seguida por turbidometria, tendo sido observado que a velocidade a que se verificava o aumento da densidade óptica e o incremento final neste parâmetro dependiam ambos da concentração de Cu^{2+}. A presença de K^+ no meio de suspensão evitava o aumento da densidade óptica induzido pelo Cu^{2+}. Os iões cúpricos também causavam uma saída significativa de «materiais-absorvando-a-260 nm» e amino-ácidos das células. A contracção das células por tratamento com Cu^{2+} foi associada à saída dos iões e metabolitos das células.

2.2.6. O efluxo de K^+ como um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada» («all-or-nothing»).

Já referi que certos catiões divalentes são potentes indutores do efluxo de K^+ em células eucarióticas. A. Rothstein e colaboradores estudaram detalhadamente este fenómeno, tendo proposto que se trata de um processo do tipo «tudo-ou-nada», *i. e.*, uma célula ou não liberta quantidades significativas de K^+ ou o liberta na totalidade. Os principais resultados foram obtidos por estes investigadores em eritrócitos humanos tratados com Pb^{2+} e em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com Hg^{2+}, encontram-se descritos em Rothstein (1959a, 1959b), Passow & Rothstein (1960) e Passow *et al.* (1961), e são os seguintes:

(i) A adição de reduzidas concentrações de Pb^{2+} a eritrócitos humanos tem como consequência um esvaziamento das células em K^+. Este fenómeno é acompanhado de uma entrada reduzida de Na^+ para as células, pelo que o volume e o conteúdo osmótico dos eritrócitos diminuem.

(ii) Os eritrócitos que libertam o K^+ intracelular são assim capazes de sobreviver em meios hipotónicos, ao contrário dos eritrócitos não afectados que, nestes meios, se desintegram devido a uma hemólise osmótica. O número de eritrócitos resistentes ao choque osmótico é aproximadamente proporcional à quantidade de K^+ libertado. Após separação física das células contraídas («shrinked») das células normais, as primeiras células apresentam reduzido conteúdo em K^+, enquanto que as segundas o apresentam normal.

(iii) A adição de Hg^{2+} a células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tem como consequência um esvaziamento das células em K^+, processo que se completa 90 a 100 min após a adição do agente químico. A quantidade máxima de K^+ libertado é uma função sigmóide simétrica do logaritmo da concentração de Hg^{2+}.

(iv) As células de levedura não tratadas não são coráveis pelos corantes básicos, nomeadamente, o azul de metileno e o azul de Nilo, mas após um tratamento com Hg^{2+}, uma fracção das células torna-se permeável a estes corantes. Um aumento da concentração de Hg^{2+} corresponde um aumento concomitante e paralelo do número de células coradas e da quantidade de K^+ libertado, e assim quando se representa graficamente a percentagem de células coradas em função da percentagem de K^+ libertado os valores distribuem-se segundo a bissectriz.

O fenómeno «tudo-ou-nada» foi explicado por estes investigadores da seguinte forma:

(i) O efluxo de K^+ induzido pelos iões Hg^{2+} nas células de levedura é provavelmente consequência de uma interacção destes iões com grupos sulfidrilo da membrana citoplasmática. Quando um determinado número destes grupos funcionais é afectado pelos iões Hg^{2+}, a permeabilidade selectiva da membrana é totalmente destruída, ocorrendo um esvaziamento das células em K^+, compostos fosfatados, amino-ácidos e nucleótidos. Existe portanto em cada célula um limiar de concentração de agente químico («threshold concentration»), acima do qual se verifica uma quebra da permeabilidade da membrana. Um aumento da concentração de Hg^{2+} corresponde um aumento do número de células em que o limiar de concentração foi excedido, e assim um concomitante aumento da quantidade de metabolitos libertados.

(ii) O facto da quantidade de K^+ libertado ser uma função sigmóide simétrica do logaritmo da concentração de Hg^{2+} significa que a susceptibilidade, *i. e.*, o valor limiar da concentração do agente químico, apresenta uma distribuição normal na população. Esta distribuição não deve corresponder à variação da quantidade de metal absorvido por célula, mas antes a diferenças no número de locais sensíveis por célula.

A interpretação apresentada por Rothstein e colaboradores de que o efluxo de K^+ induzido pelo Pb^{2+} e Hg^{2+} é um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada» baseava-se em evidência indirecta, já que não era estudado como variava o conteúdo em K^+ da cada célula, e tal aliás não era tecnicamente possível na altura. Posteriormente, várias técnicas foram postas à disposição dos investigadores que permitem determinar o conteúdo iónico de células individuais.

Kuypers & Roomans (1979) estudaram precisamente como variava individualmente o conteúdo iónico de células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com $HgCl_2$, utilizando a microanálise de raios-X («electron probe X-ray microanalysis»). A abundância de potássio nas células foi estimada pela razão entre as intensidades dos sinais referentes ao potássio e ao fósforo. Na população não-tratada, a distribuição desta razão era aproximadamente normal centrada no valor 1.5. Após tratamento com 0.11 mM $HgCl_2$ durante 5 h, aproximadamente 10 % das células apareciam desprovidas de K^+, e as restantes apresentavam uma distribuição normal, mas centrada não em 1.5 como na população controlo, mas num valor inferior (1.2). Um aumento da concentração de Hg^{2+} para 0.13 e 0.165 mM resultou num aumento progressivo da percentagem de células isentas de K^+, e numa deslocação adicional do centro da distribuição sucessivamente para 1.0 e 0.5. Estes resultados foram interpretados como significando que o efluxo de K^+ induzido pelo Hg^{2+} é um fenómeno «tudo-ou-nada», mas também ocorre uma libertação gradual de K^+ das células. Se o efluxo de K^+ ocorresse unicamente por um mecanismo «tudo-ou-nada», a distribuição da razão K/P não deveria sofrer alterações significativas após tratamento com os iões Hg^{2+}; um aumento da concentração de Hg^{2+} corresponderia a um aumento da percentagem de células desprovidas de K^+ (o que foi observado), e uma diminuição da percentagem, mas não do conteúdo, das células normais (com elevado conteúdo em K^+). O que se observou foi uma diminuição progressiva do conteúdo em K^+ da maioria das células da população.

Outros agentes químicos também induzem um efluxo de K^+ em células de *Saccharomyces cerevisiae* simultâneamente por um mecanismo do tipo «tudo-ou-nada» e por uma resposta gradual. Estes agentes químicos incluem alguns inibidores da ATPase da membrana citoplasmática e antagonistas da calmodulina (Borst-Pauwels *et al.*, 1983; Borst-Pauwels & Theuvenet, 1985). As conclusões apresentadas por estes investigadores basearam-se na análise de resultados obtidos por vários métodos, nomeadamente por microanálise de raios-X, e pela quantificação do número de células coráveis pelo azul de bromofenol. Borst-Pauwels e colaboradores observaram que o efluxo de K^+ era acompanhado de uma contracção das células («shrinkage»). O volume

celular na população não tratada apresentava uma distribuição normal centrada em 36 μm^3. O tratamento com 25 μg miconazole ml^{-1} durante 7.5 min, resultava na libertação de 50 % do K^+ total, e na substituição do máximo a 36 μm^3 por um a 33 μm^3, e um novo pico a 19 μm^3. Um prolongamento deste tratamento por 17 min, resultava na libertação de mais de 75 % do K^+ total, e numa nova diminuição do centro da distribuição do volume (para 29 μm^3), e num aumento do máximo a 19 μm^3. Os resultados indicavam assim que o efluxo de K^+ induzido pelo miconazole era acompanhado do aparecimento de células muito contraídas, cujo número aumentava com o tempo de tratamento, mas também numa ligeira, mas significativa diminuição do volume celular da maioria das células. O efluxo de K^+ induzido pelo miconazole ocorria essencialmente por um processo do tipo «tudo-ou-nada», mas também se verificava uma saída gradual do K^+ celular. Foi ainda observado que a percentagem de células permeáveis ao azul de bromofenol aumentava com o tempo de exposição ao miconazole; no entanto, a percentagem de células coráveis era inferior ao da percentagem de células fortemente contraídas e ao da percentagem de K^+ libertado. Este facto indicava que uma parte das células fortemente contraídas (células totalmente desprovidas de K^+) não era permeável ao azul de bromofenol, e portanto não tinham perdido totalmente a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática.

Como já referi, McBrien & Hassall (1965) estudaram o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} na alga verde *Chlorella vulgaris*. Numa tentativa de saber se se tratava de um processo do tipo «tudo-ou-nada», foi determinado como variava o número de células permeáveis ao azul de metileno com a concentração de Cu^{2+}. Observaram que a um aumento da concentração de metal correspondia um aumento da percentagem de células permeáveis ao corante, mas esta era inferior à percentagem de K^+ libertado, tendo concluído que o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} nestas células não deveria ser do tipo «tudo-ou-nada», mas antes uma resposta gradual. O azul de metileno é uma molécula de dimensões relativamente grandes, pelo que a sua passagem através da membrana citoplasmática só se fará se existirem lesões apreciáveis. Uma saída acentuada do K^+ intracelular não significa necessariamente que a membrana se torne permeável a qualquer molécula. Em *P. syringae*, observei precisamente que o Cu^{2+} induz um efluxo muito acentuado de K^+, mas uma saída restrita de moléculas de baixo peso molecular, indicando que não deve haver lesões grosseiras da membrana (Trabalho II). Borst-Pauwels *et al.* (1983) observaram que após um tratamento com miconazole, a percentagem de células de *Saccharomyces cerevisiae* coráveis pelo azul de bromofenol era menos de metade da percentagem de células que tinham libertado a

totalidade do K^+. Novamente, um esvaziamento das células em K^+ não implica uma permeabilidade total da membrana citoplasmática a moléculas estranhas.

Os resultados apresentados na bibliografia sugeriram que estudasse se o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* era um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada». Se a plasmólise induzida pelo Cu^{2+} em *P. syringae*, é uma consequência directa do esvaziamento das células em K^+, e é provavelmente um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada» (cf. sub-secção 2.2.5.), é de admitir que o efluxo de K^+ também seja um fenómeno desta natureza. Esta interpretação é apoiada pela análise do próprio processo de efluxo de K^+ induzido pelos iões cúpricos (Trabalho III). Num processo do tipo «tudo-ou-nada», quando a susceptibilidade dos membros da população tem uma distribuição normal, a percentagem de resposta é uma função sigmóide da dose ou do tempo. Esta curva pode ser linearizada pela transformação «Probit» (Finney, 1952; Hewlett & Plackett, 1979). De facto verifiquei que: (i) Os valores da concentração extracelular de K^+, após a adição do Cu^{2+}, são uma função sigmóide do tempo (Trabalho I). (ii) Quando as quantidades de K^+ libertado após a adição de uma determinada concentração de Cu^{2+} são convertidas em percentagem do máximo observado com esta concentração de Cu^{2+}, e estes valores transformados em «probits», e representados em função do logarítmo do tempo, os valores distribuem-se segundo uma linha recta (Trabalho III). (iii) Quando as quantidades finais de K^+ libertado pelo tratamento com determinadas concentrações de Cu^{2+} são convertidas em percentagem do máximo observado após tratamento com iões cúpricos, e estes valores transformados em «probits» e representados em função do logaritmo da concentração de Cu^{2+}, os valores também se distribuem segundo uma linha recta (Trabalho III). A confirmação desta hipótese aguarda uma quantificação directa do conteúdo de K^+ em células individuais. Existe actualmente uma técnica que permite determinar o conteúdo iónico de partículas com aproximadamente 1 μm de diâmetro. Trata-se da análise de espectrometria de massa com sonda de laser («laser microprobe mass analysis»), LAMMA®, Leybold-Heraeus, Köln, Alemanha, que consiste numa combinação de um microscópio de laser com um espectrómetro de massa (Lindner & Seydel, 1983).

2.3. O efluxo de K^+ e de metabolitos de baixo peso molecular induzido pela dodina em *P. syringae*.

Muitos detergentes catiónicos alteram drasticamente a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células procarióticas e eucarióticas, e em *P. syringae* verifiquei que, de facto, a dodina induz um efluxo muito acentuado de metabolitos do «pool» (Trabalhos IV, VII). Para a compreensão dos mecanismos da interacção entre os detergentes e as membranas celulares têm sido fundamentais os estudos realizados com membranas fosfolipídicas artificiais.

Antes de referir e discutir as alterações da permeabilidade induzidas pela dodina em células eucarióticas e em *P. syringae*, mencionarei alguns estudos publicados sobre as alterações da permeabilidade de membranas fosfolipídicas artificiais induzidas por anfífilos.

2.3.1. Os anfífilos alteram a permeabilidade de membranas fosfolipídicas artificiais.

Em condições normais de integridade estrutural, a bicamada fosfolipídica é quase totalmente impermeável a moléculas e iões. Tem sido observado que a adição de anfífilos a membranas fosfolipídicas causa um aumento acentuado da permeabilidade a moléculas e iões, que esta alteração é selectiva, e que depende da concentração do anfífilo na membrana e na solução.

A adição de taurocolato de sódio ou desoxicolato de sódio a vesículas de fosfatidilcolina (PC) causa uma permeabilização destas vesículas aos iões Eu^{3+} e Mn^{2+} (Castellino & Violand, 1979; Lichtenberg *et al.*, 1979).

Em lipossomas de PC, Ruiz *et al.* (1988) observaram que a permeabilização induzida por anfífilos era selectiva e dependia da razão entre a concentração de anfífilo e a concentração de fosfolípido. Definindo R_{so} como a razão entre as concentrações molares de lípido e de detergente necessária para induzir o efluxo de 50 % das moléculas ou iões contidos nas vesículas, estes investigadores verificaram que o valor deste parâmetro variava: (i) Com o tipo de molécula ou ião, e que para o Triton X-100, o seu valor geralmente decrescia com um aumento da dimensão do agente em estudo: enquanto que para o Na^+, fosfato inorgânico e Cl^-, o valor de R_{so} era de 3.7, 3.8, e 2.4, respectivamente, para a 6-carboxifluoresceína, glucose e dextrano, o valor era de (limites de variação) 2.6-2.9, 1.7-3.2 e 1.2. (ii) Com o tipo

de detergente adicionado para causar um efluxo de 6-carboxifluoresceína; o valor de R_{50} para lisofosfatidilcolina, octilglucósido, colato de sódio, dodecilsulfato de sódio e Triton X-100, era inferior a 0.1, e igual a 0.09, 0.32, 0.83 e 2.9, respectivamente.

A adição de lisofosfatidilcolinas a membranas constituídas por PC pode causar alterações da permeabilidade. Mandersloot *et al.* (1975) observaram que a adição de lisofosfatidilcolinas, numa concentração molar inferior a 22.5 %, não causava alterações significativas da permeabilidade dos lipossomas, mas concentrações superiores induziam um aumento acentuado da permeabilidade ao K^+. Lee & Chan (1977) referiram que a um aumento da concentração de lisofosfatidilcolina correspondia um aumento da permeabilidade aos iões Eu^{3+}, e que com uma concentração molar de 26.8 %, a taxa do efluxo destes catiões era demasiado rápido para poder ser quantificada.

As polimixinas e peptídeos cíclicos policatiónicos análogos, são anfífilos com elevada actividade biocida em bactérias, leveduras e protozoários (Storm *et al.*, 1977). Em membranas constituídas por fosfolípidos sintéticos ou extraídos de membranas celulares, estes anfífilos policatiónicos podem alterar drasticamente a permeabilidade, causando, nomeadamente, um efluxo rápido e pronunciado das moléculas de glucose retidas em lipossomas (HsuChen & Feingold, 1973; Storm *et al.*, 1977).

Os antibióticos de polieno são anfífilos que causam alterações profundas da permeabilidade de membranas. Ao contrário das polimixinas, a interacção destes antibióticos com as membranas exige a presença de esteróis (Norman *et al.*, 1972; Hamilton-Miller, 1973). Van Hoogevest & De Kruijff (1978) observaram que a adição de anfotericina B a vesículas fosfolipídicas podia resultar num esvaziamento destas em K^+.

Os resultados citados nesta sub-secção sobre a interacção entre os anfífilos e as membranas fosfolipídicas artificiais mostram assim que: (i) A adição à bicamada fosfolipídica de moléculas de anfífilos pode resultar numa permeabilização da membrana a iões e moléculas. (ii) A um aumento da concentração do anfífilo na membrana corresponde geralmente um aumento da permeabilidade a um determinado ião ou molécula, e uma permeabilização a moléculas e iões de dimensões crescentes. (iii) A estrutura da molécula de anfífilo, nomeadamente a forma e carga do grupo polar e dimensões da cadeia hidrocarbonada, influencia a capacidade destes agentes em tornar as membranas permeáveis.

2.3.2. A influência da concentração micelar crítica nas alterações da permeabilidade induzida por anfífilos.

A influência da concentração micelar crítica (CMC) na alteração da permeabilidade de membranas fosfolipídicas artificais tem sido objecto de estudo e controvérsia. Alguns investigadores observaram uma alteração profunda da permeabilidade, a concentrações de detergente no sobrenadante inferiores à CMC. Pelo contrário, outros autores referem que esta alteração coincide aproximadamente com a CMC do anfífilo. Saliente-se no entanto, que as alterações da permeabilidade das membranas artificais induzidas por anfífilos são geralmente graduais. Nos trabalhos em que se observou uma alteração drástica da permeabilidade ao atingir-se a CMC do anfífilo, também se constatou que a concentrações inferiores a esta, as membranas tornavam-se progressivamente permeáveis a iões e moléculas de dimensões crescentes.

A interacção entre o detergente octilglucósido (OG) e vesículas de PC foi estudada em detalhe por Ollivon *et al.* (1988), que referiram os seguintes resultados e conclusões principais: (i) A adição de 1 mM OG a vesículas de PC causou um efluxo de 17 % da carboxifluoresceína em 8 min; com 10 mM detergente, 90 % destas moléculas foram libertadas em 30 segundos. (ii) Na presença de determinadas concentrações de OG (inferior a 5 % molar), as vesículas eram permeáveis a solutos de dimensões moderadas como a carboxifluoresceína, mas permaneciam impermeáveis a moléculas de grandes dimensões como a inulina. (iii) Quando a concentração de OG nas membranas atingia aproximadamente 50 % molar, dava-se a ruptura das vesículas com concomitante saída da inulina e formação de lâminas abertas; nestas lâminas, os fosfolípidos e as moléculas de detergente mantinham a estrutura de bicamada. (iv) Quando a razão molar OG/PC atingia 2.1, as lâminas saturadas de detergente transformavam-se em micelas de detergente saturadas de lípidos; estas micelas eram provavelmente achatadas, com as cadeias hidrocarbonadas das moléculas de lípidos e de detergente interdigitadas. (v) Com um aumento da concentração de OG, estas micelas de grandes dimensões podiam originar micelas pequenas de formato esférico. Enquanto que em solução pura, as moléculas de OG formavam micelas quando a concentração atingia aproximadamente 20.5 mM, a formação das micelas mistas OG + PC ocorria a uma concentração inferior, 15.2 - 15.7 mM OG. De acordo com estes investigadores, a CMC *do conjunto* OG + PC (calculado pela lei de Raoult) era de 15.5 mM, muito próximo do valor da concentração de octilglucósido em que ocorria a formação de micelas mistas e desagregação da bicamada fosfolipídica.

Inoue & Kitagawa (1976) observaram que, em lipossomas multilamelares consti-

tuídos por PC, dicetil fosfato e colesterol, a adição de Triton X-100 a concentrações inferiores à CMC causava um efluxo da glucose retida nas vesículas. Ao fim de 30 minutos de tratamento, a relação entre a percentagem de glucose libertada e a concentração de detergente era aproximadamente sigmóide, com a primeira inflexão a 100 μg detergente ml^{-1} e o máximo atingido com concentrações de Triton X-100 superiores a aproximadamente 120 μg ml^{-1} (a CMC deste detergente é de aproximadamente 200 μg ml^{-1}).

2.3.3. Os anfífilos alteram a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática.

Foi referido na sub-secção anterior que os anfífilos podem alterar drasticamente a permeabilidade selectiva de membranas fosfolipídicas artificiais. Este fenómeno pode também ocorrer em membranas celulares, nomeadamente a membrana citoplasmática de bactérias e de leveduras. Salvo raras excepções (nomeadamente certos antibióticos de polieno em células eucarióticas, *cf.* secção 11.), as alterações da permeabilidade induzidas pelos anfífilos catiónicos não são selectivas, pelo que a sua acção se traduz por um efluxo indiscriminado dos iões e pequenas moléculas que existam em elevada concentração no citoplasma das células. Dado que as células bacterianas apresentam elevadas concentrações internas de K^+, e um considerável conteúdo em compostos de baixo peso molecular («pool metabolites», Herbert *et al.*, 1971), a acção dos anfífilos catiónicos nestas células traduz-se geralmente por um efluxo rápido de K^+ e de pequenas moléculas.

Os métodos geralmente utilizados no estudo do efluxo de K^+ foram referidos na sub-secção 1.2.. Para se estudar o efluxo dos metabolitos do «pool», as determinações mais frequentemente utilizadas são as do fosfato inorgânico, pentoses, e compostos absorvendo na região dos ultra-violetas (*cf.* Trabalhos II, IV e VII). Dada a composição das células bacterianas, em que a ribose é a pentose largamente predominante, a determinação das pentoses nos sobrenadantes das células tratadas reflectirá muito directamente o conteúdo em fragmentos de RNAs, ribonucleósidos e ribonucleótidos. As bases púricas e pirimídicas dos ácidos nucleicos absorvem fortemente na região dos ultra-violetas. Salton (1951) foi dos primeiros investigadores a observar que um tratamento de células bacterianas com um detergente catiónico (CTAB) resultava numa saída de substâncias que absorviam fortemente na região dos 260 nm. Os sobrenadantes foram analizados por cromatografia em papel

tendo sido detectadas a guanina, a adenina e o uracilo. A determinação da absorvência na região ultra-violeta dos sobrenadantes das suspensões tratadas reflectirá assim fundamentalmente a concentração de ácidos nucleicos, bases púricas e pirimídicas, nucleósidos e nucleótidos.

Dos anfífilos catiónicos que alteram a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células bacterianas podem-se citar os seguintes: brometo de cetiltrimetilamónio (Salton, 1951; Newton, 1953), clorohexidina (Hugo & Longworth, 1964a), polimixinas (Few & Schulman, 1953; Newton, 1953, 1956; Storm *et al.*, 1977), dodecildietanolamina (Lambert, 1974), anestésicos locais, como a cloropromazina, nupercaína e a tetracaína (Silva *et al.*, 1979), e a dodina, no presente trabalho.

2.3.4. A dodina altera a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células de fungos e de plantas.

A dodina, em reduzidas concentrações, altera drasticamente a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células de fungos e de plantas. Além dos trabalhos incluídos nesta Dissertação, não conheço qualquer outro artigo publicado sobre a alteração, pela dodina, da permeabilidade da membrana citoplasmática de células bacterianas, pelo que serão referidos os trabalhos em que se utilizaram células eucarióticas.

O tratamento pela dodina de conídios de *Monilinia fructicola* e de células de *Saccharomyces pastorianus* pode resultar num efluxo de ^{32}P e de amino-ácidos (Brown & Sisler, 1960). Em todas as concentrações de dodina testadas, a quantidade de ^{32}P libertado aumentou com o tempo de tratamento (máximo 60 minutos). Para um dado tempo de exposição, a quantidade de ^{32}P libertado aumentou com a concentração de dodina, mas não proporcionalmente. Após 1 hora de tratamento, enquanto que em *Saccharomyces pastorianus*, a quantidade de ^{32}P libertado com 35, 110 e 196 µM dodina era de 1130, 1710 e 1750 % do controlo, respectivamente, em *Monilinia fructicola*, com 20, 35 e 62 µM dodina, era de 111, 241 e 312 %, respectivamente. Para uma dada concentração de dodina, o efluxo de ^{32}P era assim mais acentuado em *Saccharomyces pastorianus* do que em *Monilinia fructicola*. Saliente-se que em *Monilinia fructicola*, enquanto que na presença de 20 µM dodina, o efluxo era ligeiramente superior ao controlo, com 35 µM era superior ao dobro do controlo. Os compostos fosfatados libertados das células de levedura pela acção da dodina foram separados por cromatografia em papel, descendente, e identificados como sendo

fosfato inorgânico, açúcares fosfatados e compostos com absorvência máxima a 260 nm, provavelmente moléculas contendo bases púricas e pirimídicas. Em ambas as espécies, a dodina também induziu um efluxo de amino-ácidos, cuja intensidade aumentou com o incremento da concentração de fungicida. Apesar das diferenças observadas entre as duas espécies, os resultados de Brown & Sisler indicam assim que concentrações micromolares de dodina causam um efluxo de ^{32}P e amino-ácidos das células de duas espécies de fungos, e que estes processos são já pronunciados com 35 μM dodina.

Solel & Siegel (1984) também utilizaram a quantificação do efluxo de ^{32}P, na avaliação da danificação, pela dodina, da membrana citoplasmática de *Ustilago maydis*. Após 1 h de tratamento com 18 e 36 μM dodina, o efluxo de ^{32}P era ligeiramente superior ao do controlo, mas com 72 μM observava-se uma acentuada saída de compostos fosfatados das células.

Somers (1963) referiu que em conídios de *Neurospora crassa* a dodina induzia uma libertação de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e amino-ácidos. Após 30 min de tratamento, concentrações de dodina inferiores a 70 μM, não causavam uma saída significativa de materiais-absorvendo-a-260 nm, mas para concentrações superiores (até 350 μM), a quantidade de materiais libertados era aproximadamente directamente proporcional à concentração de detergente. Para concentrações de dodina compreendidas entre 20 e 350 μM, a quantidade de amino-ácidos libertados era também aproximadamente proporcional à concentração de detergente.

Em macroconídios de *Fusarium sulphureum*, Miller & Barran (1977) avaliaram a alteração da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática induzida pela dodina, pela determinação da penetração nas células do Ni^{2+}. A permeabilidade a estes iões não era significativa após tratamento com 40 μM dodina, mas concentrações superiores causavam uma progressiva permeabilização a este catião divalente, sendo total com 100 μM dodina.

A dodina também pode induzir alterações drásticas da permeabilidade das membranas de células vegetais. Srivastava & Smith (1982b) quantificaram o efluxo de betacianina e iões totais induzido, por várias alquilguanidinas, em células de beterraba, couve-nabo (*Brassica napobrassica*), espinafre e macieira. Em células de beterraba e de macieira, os efluxos de iões totais e de betacianina estavam relacionados, de forma semelhante, com o comprimento da cadeia hidrocarbonada: os efluxos máximos verificaram-se com os homólogos C_{10} - C_{12}, decrescendo com um aumento (até C_{18}) ou diminuição (até C_8) do comprimento da cadeia hidrocarbonada (para a relação entre o comprimento da cadeia hidrocarbonada das alquilguanidinas e

a actividade biocida *cf.* sub-secção 4.2.1.). O tratamento com 0.5 mM dodina induziu (em percentagem em relação ao controlo), em células de macieira, um efluxo de iões totais de aproximadamente 250 %, em células de beterraba um efluxo de iões totais de 634 %, e de betacianina de 1263 %. O tratamento de células de couve-nabo com 0.3 mM dodina induziu um efluxo de iões totais de 1168 %, e em células de espinafre de 163 % (em relação ao controlo).

2.3.5. A destruição pela dodina da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*. A influência da concentração micelar crítica nas alterações da permeabilidade.

Os anfífilos podem alterar drasticamente a permeabilidade selectiva das membranas fosfolipídicas artificiais e celulares. Nos sistemas artificais, em que as condições experimentais, nomeadamente o tipo e concentração de fosfolípido nas membranas, podem ser rigorosamente controladas, a um aumento da concentração do anfífilo corresponde geralmente uma permeabilização a metabolitos de dimensões crescentes (*cf.* sub-secção 2.3.1.). Em sistemas celulares este fenómeno não tem sido observado, mas as causas para tal podem ser várias, nomeadamente pode ser uma consequência da grande diversidade molecular e complexidade das membranas celulares, em que várias espécies de fosfolípidos coexistem com diferentes proteínas.

Estudei a influência da dodina na permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*, tendo observado que a um aumento da concentração de detergente corresponde um aumento concomitante da quantidade de K^+, fosfato inorgânico, «moléculas-contendo-ribose» e «materiais-absorvendo-a-260 nm», libertados das células (Trabalhos IV e VII). A mais baixa concentração estudada foi de 5 μM dodina, que causou uma pequena, mas detectável saída destes metabolitos das células. Em células suspensas em tampão 0.01 M Na^+-DMGA, após 15 min de tratamento com 5 μM dodina (para análise), a quantidade de K^+, moléculas-contendo-ribose e materiais-absorvendo-a-260 nm libertadas das células era 119, 112, e 121 %, respectivamente, do observado em células não tratadas (resultados obtidos com a metodologia descrita no Trabalho IV, mas não incluídos neste trabalho). Os resultados que obtive sobre a actuação deste detergente na respiração das células de *P. syringae* mostraram que esta concentração de dodina causava um aumento do consumo de O_2 usando glicerol ou succinato como substratos, sugerindo que se tinha verificado um desacoplamento («uncoupling») da oxidação fosforilativa causado por

uma permeabilização da membrana citoplasmática aos protões (Trabalho VII). O tratamento com 5 μM dodina parece assim causar uma permeabilização da membrana citoplasmática das células de *P. syringae* simultâneamente a iões (H^+, K^+) e a pequenas moléculas (fosfato inorgânico, nucleósidos, nucleótidos, RNAs de pequenas dimensões). Saliente-se no entanto que os resultados obtidos não excluem a possibilidade de este anfífilo catiónico poder causar uma permeabilização gradual da membrana a metabolitos de dimensões crescentes, mas indicam que tal fenómeno, a verificar-se, será com concentrações extremamente reduzidas de dodina (inferiores a 5 μM) ou num processo faseado no tempo. Para verificar tal possibilidade seria necessário estudar em pormenor a cinética do efluxo destes metabolitos numa gama de concentrações muito baixas de dodina.

Como foi referido na sub-secção 2.3.4., a dodina altera a permeabilidade da membrana citoplasmática de células de fungos e de plantas. Os resultados por mim obtidos mostram pela primeira vez que este anfífilo catiónico também altera a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células bacterianas (Trabalhos IV e VII).

É interessante constatar que a dodina apresenta a capacidade de alterar pronunciadamente a permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de bactérias e de células eucarióticas a concentrações muito reduzidas, na gama dos micromolar. Foi referido que, em membranas artificiais, quando a concentração do anfífilo atinge a concentração micelar crítica (CMC), pode observar-se uma diminuição drástica da permeabilidade selectiva. A CMC da dodina não era conhecida (*cf.* American Cyanamid Company, 1982, 1985), pelo que foi por mim determinada (Trabalho VI realizado em colaboração com A. R. W. Smith). Conhecida a CMC deste detergente, foi então possível estudar qual a influência da formação de micelas de dodina nas alterações da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*. Observei que, de facto, quando a concentração de dodina atingia a CMC ocorria um aumento acentuado do efluxo de K^+, fosfato inorgânico, «moléculas-contendo-ribose» e «materiais-absorvendo-a-260 nm» (Trabalhos IV e VII). A utilização de um eléctrodo sensível ao K^+ permitiu-me estudar com pormenor a cinética do efluxo de K^+ induzido pela dodina (Trabalho VII). Observei que tanto a quantidade de K^+ libertado como a velocidade a que decorria a sua saída das células aumentavam acentuadamente quando a concentração de dodina atingia a CMC. Os resultados que obtive sugerem portanto que são as micelas de dodina os principais agentes danificadores da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*. A escassez dos dados

publicados sobre a acção deste detergente em células eucarióticas, sobretudo a falta de estudos detalhados sobre as alterações da permeabilidade para concentrações de dodina inferiores a 50 μM, não permite verificar se esta interpretação também se aplica a sistemas eucarióticos. No entanto, alguns resultados publicados sobre a alteração da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células de fungos, e referidos na sub-secção 2.3.4., sugerem um aumento da actividade danificadora da membrana citoplasmática para concentrações de dodina superiores a aproximadamente 40 μM. Seria interessante estudar a interacção entre as moléculas de dodina e vesículas fosfolipídicas artificiais, nomeadamente, as alterações da permeabilidade causadas por este anfífilo, e suas relações com a CMC.

3. A INIBIÇÃO, PELO Cu^{2+} E PELA DODINA, DE ALGUMAS ACTIVIDADES METABÓLICAS DAS CÉLULAS BACTERIANAS.

Foram já referidas e discutidas algumas das alterações causadas pelo Cu^{2+} e pela dodina na permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células procarióticas e eucarióticas. Na presente secção serão referidas outras alterações causadas por estes agentes químicos no metabolismo da célula bacteriana.

3.1. Inibição de sistemas enzimáticos pelo Cu^{2+}.

Lowe *et al.* (1987) referiram que concentrações reduzidas de Cu^{2+} inibem a síntese do pigmento prodigiosina nas células de *Serratia marcescens*.

Trabalhos publicados por vários investigadores concordam que as hidrogenases bacterianas (hidrogénio:(aceitador) oxireductase, E.C. 1.12.-.-) são fortemente inibidas pelo Cu^{2+}. A actividade da hidrogenase da bactéria fotossintética *Chromatium vinosum* é totalmente inibida na presença de 1 mM Cu^{2+}. O cádmio, zinco e cobalto causam 37 a 87 % de inibição. Pelo contrário, os iões Mn^{2+} e vários reagentes de grupos sulfidrilo não inibem a actividade desta enzima (Van Herikhuizen *et al.*, 1981). Na presença de 1 mM Cu^{2+} a actividade da hidrogenase II de *Clostridium pasteurianum* é totalmente inibida (Adams & Mortensen, 1984). A actividade das isoenzimas 1 e 2 da hidrogenase de *Escherichia coli* é inibida em 95 a 100 % pelo tratamento com 10 mM $CuSO_4$. Pelo contrário, o Ni^{2+} e Zn^{2+} não causam qualquer inibição da actividade (Sawers & Boxer, 1986). O tratamento da hidrogenase de *Acetomicrobium flavidum* com 1 mM $CuSO_4$ ou $HgSO_4$ resulta em 100 % de inibição. O Ni^{2+}, Cd^{2+}, Mn^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} e Sr^{2+} causam 33 a 62 % de inibição (Schindler & Winter, 1987).

A metano monoxigenase cataliza a oxidação do metano a metanol. Green *et al.* (1985) observaram que, em *Methylococcus capsulatus*, esta enzima é constituída por três proteínas (A, B e C) e que a sua actividade é fortemente inibida pelo Cu^{2+}. Os resultados obtidos permitiram concluir que o cobre tinha provavelmente causado a destruição do centro Fe-S da proteína C impedindo assim a transferência de electrões entre esta proteína e o centro Fe da proteína A. A concentrações elevadas de Cu^{2+}, o centro FAD da proteína C tornava-se inactivo, sendo libertado da molécula, causando desta forma uma inibição da aceitação de electrões por esta proteína a partir do NADH.

3.2. Alterações no metabolismo de compostos carbonados induzidas pelo Cu^{2+}.

Foi referido na sub-secção anterior que os iões cúpricos podem inibir diversos sistemas enzimáticos das células bacterianas. Podem também inibir determinadas vias metabólicas, como as conectadas com o metabolismo dos compostos carbonados, nomeadamente a assimilação e a respiração de diversos substratos.

Jonas (1989) estudou a influência dos iões cúpricos numa comunidade microbiana de um estuário. As comunidades nativas continham 1.0 - 8.8 x 10^4 unidades formadoras de colónias (CFU) ml^{-1}, e a taxa de incorporação de amino-ácidos (estimada pela assimilação de uma mistura de quinze amino-ácidos marcados radioactivamente) era de 1 a 2 % h^{-1}. Um aumento da concentração de Cu^{2+} (superior a 0.16 µM) resultou numa redução da taxa de assimilação de amino-ácidos, sendo total com 16 µM Cu^{2+}.

A influência do Cu^{2+} na assimilação e degradação da ^{14}C-glucose por uma estirpe de *Klebsiella sp.* foi estudada por Brynhildsen *et al.* (1988). Em meios contendo 0.01 - 1 mg C l^{-1}, estes processos eram inibidos com concentrações iguais ou superiores a 100 µM Cu^{2+}, mas na presença de concentrações de carbono superiores, a inibição já era acentuada com 10 µM Cu^{2+}.

Schreiber *et al.* (1985) estudaram a inibição pelo Cu^{2+} da respiração da glucose pelas células de *Vibrio alginolyticus*. Em culturas num meio constituído por glucose e sais, com 4 x 10^8 células ml^{-1}, após 30 min de tratamento com concentrações superiores a 2 µM Cu^{2+}, a taxa respiratória era inferior à do controlo, e com 45 µM Cu^{2+} era nula.

Domek *et al.* (1987) estudaram alguns aspectos da fisiologia das células de *Escherichia coli* «lesionadas» («injured») pelo Cu^{2+}. Verificaram que a determinação da viabilidade das células tratadas com Cu^{2+} dependia directamente da composição do meio utilizado para a determinação do número de células viáveis. Após tratamento de suspensões com 10^9 CFU ml^{-1} com 30 µM Cu^{2+}, se as células fossem plaqueadas num meio rico não-selectivo, a mortalidade era inferior a 5 % do controlo, mas se ao meio de cultura se adicionava desoxicolato de sódio, a viabilidade diminuía drasticamente. As células que dão origem a colónias num meio nutritivo rico, mas não num meio selectivo, designam-se de células «lesionadas» («injured»). Um tratamento com 30 µM Cu^{2+} resultava assim na lesão de um fracção significativa da população. Domek e colaboradores observaram que as células lesionadas pelo Cu^{2+} apresentavam uma redução significativa da respiração endógena e do consumo de O_2 com a glucose ou lactose como substratos. Nas células lesionadas pelo Cu^{2+}, em

anaerobiose, a taxa de utilização da glucose era 64 % da observada em células não-lesionadas, e a acumulação de lactato, etanol, acetato CO_2 e H_2, era de 88, 50, 24, 88 e 89 %, respectivamente, da observada em células controlo. Em aerobiose, a taxa de utilização da glucose e do succinato era de 87 e 21 %, respectivamente, da observada em células não-lesionadas, e a acumulação do acetato, CO_2 e glutamina, era de 42, 67 e 20 %, respectivamente, das células controlo. Foi concluído que a glicólise e o ciclo dos ácidos tricarboxílicos tinham sido afectados pelos iões cúpricos.

Nas células de *P. syringae*, observei que o Cu^{2+} inibe a níveis semelhantes o consumo de O_2 com o glicerol, glucose e succinato como substratos, ocorrendo uma cessação completa da respiração após o tratamento com 20 a 25 μM Cu^{2+} (Trabalho VIII). Apesar de Domek *et al.* (1987) e Schreiber *et al.* (1985) terem utilizado condições experimentais ligeiramente diferentes das que utilizei em *P. syringae*, é interessante constatar que a inibição da respiração ocorreu a concentrações não muito díspares, o que poderá significar que não existem diferenças muito acentuadas na susceptibilidade da respiração de diferentes espécies bacterianas à inibição pelo Cu^{2+}, e que concentrações micromolares de Cu^{2+} são potentes inibidores da actividade respiratória bacteriana.

Os resultados que obtive levaram à conclusão que a inibição da respiração nas células de *P. syringae* expostas ao Cu^{2+} é provavelmente resultado de uma inibição de componentes da cadeia respiratória e/ou da H^+-ATP sintase (Trabalho VIII). Os resultados obtidos por vários investigadores com mitocôndrias de células animais são compatíveis com esta hipótese, dado terem concluído que os iões cúpricos podem inibir segmentos da cadeia respiratória destes organelos.

Cederbaum & Wainio (1972b) estudaram o efeito do Cu^{2+} no metabolismo de mitocôndrias de células do coração de bovino, tendo concluído que a succinato desidrogenase (Complexo II) e o segmento NADH-ubiquinona (Complexo I) eram inibidos por concentrações micromolares de Cu^{2+}, mas a H^+-ATP sintase só era inibida por concentrações muito superiores.

Wakatsuki *et al.* (1986) estudaram a inibição, pelo Cu^{2+}, da respiração no protozoário *Tetrahymena pyriformis*. Em mitocôndrias isoladas, um tratamento com 50 μM Cu^{2+} não resultou numa diminuição apreciável do consumo de O_2 com vários substratos, mas na presença de 100 μM Cu^{2+}, a respiração do succinato já era significativamente reduzida. Com 500 μM Cu^{2+}, o consumo de O_2 com isocitrato, cetoglutarato, fumarato ou malato era também fortemente reduzido. A mais baixa concentração de Cu^{2+} que reduzia a respiração do succinato (100 μM) não afectava

no entanto a síntese de ATP, mas com 500 μM Cu^{2+}, esta era seriamente reduzida. Foi ainda estudada a acção do Cu^{2+} em enzimas isoladas das mitocôndrias. Na presença de 100 μM Cu^{2+}, as actividades da malato desidrogenase, citocromo c reductase e citocromo oxidase não eram significativamente afectadas, mas a da succinato desidrogenase era reduzida a 70 % do controlo. No entanto, com 500 μM Cu^{2+}, todas as enzimas testadas eram fortemente inibidas. Foi concluído que os iões cúpricos são potentes inibidores da actividade respiratória das mitocôndrias deste organismo, sendo a succinato desidrogenase a enzima mais susceptível.

3.3. Inibição de sistemas enzimáticos pela dodina.

A dodina causa uma inibição da respiração e da fermentação da glucose, e do transporte de ^{32}P, em conídios de *Monilinia fructicola* e em células de *Saccharomyces pastorianus*. Em *Saccharomyces pastorianus*, um tratamento com 35 μM dodina resulta numa inibição total do consumo de O_2 a partir da glucose, mas em *Monilinia fructicola*, um tratamento com 62 μM dodina só reduz a 67 % a taxa respiratória, e 11 μM dodina causam um aumento desta taxa em 14.8 %. Em ambas as espécies, o transporte de ^{32}P é severamente diminuído por concentrações de dodina superiores a 35 μM (Brown & Sisler, 1960).

Em macroconídios de *Fusarium sulphureum*, o tratamento com 50 μM dodina resulta em 90 % de inibição do transporte activo de ^{14}C-L-fenilalanina, mas a respiração só é inibida com concentrações de dodina superiores a 100 μM (Miller & Barran, 1977).

O tratamento das células de *Ustilago maydis* por reduzidas concentrações de dodina resulta numa redução acentuada da respiração da glucose e acetato, e do transporte de ^{32}P, ^{14}C-glucose e ^{14}C-acetato. O tratamento com 18 μM dodina reduz o consumo de O_2 a partir da glucose e do acetato em 52 e 80 %, respectivamente, e o transporte de ^{32}P, ^{14}C-glucose e ^{14}C-acetato em aproximadamente 100 % (Solel & Siegel, 1984)..

Observei que a dodina também inibe a respiração de células bacterianas (*P. syringae*). Um tratamento com concentrações de dodina superiores a 10 - 15 μM, resulta numa redução do consumo de O_2 utilizando a glucose ou o succinato como substratos, sendo total com 35 a 40 μM dodina (Trabalho VII).

4. A ACTIVIDADE BACTERIOSTÁTICA E BACTERICIDA DOS IÕES CÚPRICOS E DA DODINA.

4.1. A actividade bacteriostática e bactericida dos iões cúpricos.

4.1.1. A influência da composição do meio de cultura na toxicidade do Cu^{2+}.

Os trabalhos publicados sobre a toxicidade dos iões cúpricos têm referido que estes iões são geralmente altamente tóxicos para as células de microrganismos, mas que esta toxicidade depende da composição do meio de cultura.

Baldry *et al.* (1977) estudaram a actividade inibitória do Cu^{2+} em *Klebsiella aerogenes*. Quando as células eram cultivadas num meio contendo glucose, sais, TRIS e glicerofosfato de sódio, na presença de 0.22 mM Cu^{2+}, o crescimento só se iniciava 50 h depois do observado num meio não contendo Cu^{2+}. Se o TRIS e o glicerofosfato eram substituídos por fosfato de potássio e fosfato de sódio, obtinha-se um efeito semelhante a este com uma concentração de Cu^{2+} muitíssimo inferior, 10 μM. Foi sugerido que uma fracção do Cu^{2+} se tinha ligado às moléculas de TRIS e assim não se encontrava disponível para ligação às células.

Schreiber *et al.* (1985) estudaram a actividade inibitória do Cu^{2+} em *Vibrio alginolyticus*. Foi estudada qual a influência, na viabilidade das células tratadas com Cu^{2+}, da presença no meio de cultura (contendo glucose e sais) das moléculas queladoras de metais, ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e ácido nitrilo-triacético (NTA). Verificaram que estas moléculas quelantes reduziam a actividade bactericida do Cu^{2+}, e que se a viabilidade era representada em função da concentração de cobre disponível no meio de cultura ($[Cu^{2+}]_{livre}$), os resultados obtidos, na ausência ou presença das moléculas quelantes, eram sobreponíveis, *i. e.*, a actividade bactericida do cobre era uma função, não da sua concentração total no meio de cultura ($[Cu^{2+}]_{total}$), mas da concentração de iões Cu^{2+} livres.

Alguns anos antes da publicação deste trabalho, Zevenhuizen *et al.* (1979) tinham estudado em pormenor qual a influência da composição do meio de cultura e de suspensão, na concentração de iões cúpricos livres, e sua actividade bactericida. Em tampão fosfato de potássio, pH 7.0, verificaram que uma variação da $[Cu^{2+}]_{total}$ entre 10^{-6} e 2×10^{-5} M, correspondia a uma variação da $[Cu^{2+}]_{livre}$ entre 10^{-9} e 2×10^{-7} M, o que indicava que neste tampão, só aproximadamente 1 % dos iões cúpricos adicionados se encontravam livres, estando portanto a grande maioria

ligado aos aniões fosfato. Em soluções a 0.1 % de bacto-peptona, bacto-casitona, triptona e extracto de levedura, verificaram que a uma variação da $[Cu^{2+}]_{total}$ entre 10^{-4} e 10^{-3} M, correspondia uma variação da $[Cu^{2+}]_{livre}$ entre aproximadamente $8 \times 10^{-9} - 5 \times 10^{-8}$ e $2 \times 10^{-7} - 2 \times 10^{-6}$ M. Nestes meios, a concentração de iões cúpricos livres era assim diminuta em relação à concentração total de iões Cu^{2+}. Na presença de 1 mM NTA, a adição de $10^{-4} - 10^{-3}$ M Cu^{2+}, resultou numa concentração de iões livres de aproximadamente 10^{-10} M; na presença de 1 mM EDTA, a concentração de iões cúpricos livres era ainda inferior. Num meio de cultura constituído por casitona, extracto de levedura e glicerol, a adição de 0.6 mM Cu^{2+} (correspondente a 1 µM Cu^{2+} livre) resultava numa inibição completa do crescimento de *Klebsiella aerogenes*, *Escherichia coli* e *Alcaligenes sp.*. Em tampão fosfato, a taxa de morte de células de *Klebsiella aerogenes* tratadas com Cu^{2+} aumentava concomitantemente com a concentração de fosfato. Foi concluído que a actividade bactericida do Cu^{2+} dependia, não da concentração total de iões cúpricos, mas da concentração de iões livres.

A diminuição da actividade inibitória do Cu^{2+} pela presença, no meio de cultura, de moléculas com elevada afinidade para os iões cúpricos, também foi observada em cianobactérias, leveduras e algas verdes.

Imahara *et al.* (1978) estudaram a actividade inibitória do Cu^{2+} em várias espécies de leveduras, e em pormenor, as condições culturais que afectam a actividade fungicida destes iões na espécie *Debaryomyces hansenii*. Em várias dezenas de espécies de leveduras, a concentração de Cu^{2+} que causava uma redução em 50 % do crescimento (que pode ser designada de ED_{50}), num meio contendo glucose, sais e extracto de levedura (pH 6.0), variou entre 0.4 e 4.3 mM. Em muitas das espécies testadas, se ao meio de cultura se adicionava ácido aspártico, o valor da ED_{50} era superior ao observado na ausência deste amino-ácido, o que indicava que o ácido aspártico podia diminuir a actividade inibitória do Cu^{2+}. Em *Debaryomyces hansenii*, a ED_{50} era de 1.2 mM, mas na presença de amino-ácidos, a ED_{50} (mM Cu^{2+}) aumentava para: 6.2 (cisteína), 3.0 (metionina), 2.4 (glicina), 2.3 (asparagina), 2.2 (ácido aspártico), 1.9 (serina), 1.8 (alanina, ácido glutâmico e lisina). A formação de um complexo cobre-aspartato foi estudada por electroforese, tendo sido concluído que quando a razão molar ácido aspártico/cobre excedia o valor 3, a maioria do cobre presente no meio de cultura encontrava-se ligado ao aspartato. Foi também estudada a influência da razão molar aspartato/cobre na inibição do crescimento de *Debaryomyces hansenii*, tendo sido observado que para uma determinada concentração de Cu^{2+}, a um aumento da concentração de aspartato

correspondia uma diminuição da inibição do crescimento desta espécie de levedura. Os resultados obtidos por estes investigadores sugerem assim que a diminuição da actividade inibitória dos iões cúpricos pela presença de amino-ácidos era uma consequência directa da formação de complexos Cu^{2+}-amino-ácidos, que tinha como resultado uma diminuição da concentração dos iões Cu^{2+} livres. O efeito marcado da presença de cisteína está muito provavelmente relacionado com a elevadíssima afinidade deste amino-ácido para os iões Cu^{2+} (*cf.* Anexo C e Trabalho IX).

Fitzgerald & Faust (1963) estudaram a toxicidade do Cu^{2+} para a cianobactéria *Microcystis aeruginosa* e para a alga verde unicelular *Chlorella pyrenoidosa*, cultivadas em diferentes meios de cultura, tendo observado que a presença de EDTA no meio de cultura reduzia substancialmente a toxicidade do sulfato de cobre para ambas as espécies.

Os trabalhos atrás citados ilustram a influência da composição do meio de cultura na actividade inibitória do Cu^{2+} em microrganismos, e em particular, a redução da toxicidade pela presença, no meio de cultura, de moléculas com elevada afinidade para estes catiões divalentes. Em *P. syringae*, observei que a actividade inibitória do Cu^{2+} é muito mais acentuada nos meios de suspensão tampão PIPES ou água destilada, do que nos meios de cultura «YGS» e «Nutrient Broth» (NB) (Anexo A). Considerando a composição destes meios e os resultados citados da bibliografia, a explicação mais provável para este facto é a de que nos meios de cultura que utilizei, muitos dos iões Cu^{2+} adicionados se encontravam fortemente ligados a moléculas orgânicas (nomeadamente amino-ácidos e peptona) e assim não disponíveis para ligação às células de *P. syringae* (*cf.* Anexo A). O Ca^{2+} e o Mg^{2+} diminuem a actividade bactericida do Cu^{2+} em *P. syringae* (Trabalho I). Apesar de não ser conhecida a composição exacta dos meios YGS e NB (*cf.* Anexo A), é muito provável que estes contenham concentrações apreciáveis de Ca^{2+} e Mg^{2+}, pelo que é de admitir que nestes meios, além de uma parte dos iões cúpricos se encontrar ligada a moléculas orgânicas, estes iões também devem ter sofrido a competição do Ca^{2+} e do Mg^{2+} para ligação às células de *P. syringae*.

4.1.2. A actividade bacteriostática e bactericida do Cu^{2+} em diversas espécies bacterianas.

Actividade bacteriostática em meio de cultura.

Babich & Stotzky (1983) estudaram a actividade bacteriostática do Cu^{2+} em diversas espécies de bactérias e fungos. As células foram cultivadas em «Nutrient Broth» (suplementado com 1 % de glucose, pH 7) na presença de diversas concentrações de $CuCl_2$, sendo o crescimento avaliado por turbidimetria. Não foi referida qual a concentração celular inicial, mas pelas indicações dadas pelos autores, é possível estimar a densidade óptica (a 420 nm) inicial das culturas em aproximadamente 0.006, o que indica uma concentração inicial muito reduzida. Em *Bacillus subtilis*, *Enterobacter aerogenes* e *Nocardia corallina*, a um aumento da concentração de Cu^{2+}, correspondeu uma diminuição da densidade óptica das culturas, ao fim de 22 h de incubação. Os gráficos apresentados na Figura 1 deste trabalho, permitem estimar a «Concentração Inibitória Mínima» («MIC») para estas espécies em aproximadamente 0.8, 1.6 e 0.4 mM Cu^{2+}, respectivamente.

Casella *et al.* (1988) determinaram o valor da MIC de várias estirpes de *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*, cultivadas num meio mínimo líquido constituído por glucose, sais, vitaminas e cofactores (pH 7). Não foi referida qual a concentração inicial das culturas. O valor obtido numa estirpe selvagem foi de 1.6 mM Cu^{2+}.

A susceptibilidade aos metais de 68 estirpes de Halobactérias foi estudada por Nieto *et al.* (1987). O meio utilizado continha uma elevada concentração de sais (indispensável para o crescimento destas estirpes) e extracto de levedura (pH 7.2). Ao meio sólido contendo diversas concentrações dos metais estudados, adicionaram-se gotas das suspensões das estirpes em estudo (10^4 a 10^5 células por inóculo de cada estirpe). As estirpes estudadas apresentaram uma MIC que variou entre 0.5 e 5 mM Cu^{2+}. Na grande maioria das estirpes, a MIC foi de 1 ou 2.5 mM Cu^{2+}.

Observei que em *P. syringae*, cultivada em «Nutrient Broth», com uma concentração inicial de 2.5×10^7 células ml^{-1}, o valor da MIC é de 0.8 mM Cu^{2+} (Tabela A.1.).

Actividade bactericida em meio de cultura.

Baldry *et al.* (1977) estudaram a actividade bactericida do Cu^{2+} em *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes* num meio constituído por glucose, sais, glicerofosfato de sódio, TRIS e agar (pH 7.0). Observaram 100 % de mortalidade com concentrações de Cu^{2+} superiores a 0.4 mM, podendo-se assim considerar esta concentração como a «Concentração Bactericida Mínima» («MBC»). Não foi referida qual a concentração celular nos meios inoculados.

Observei que em *P. syringae*, cultivada em «Nutrient Broth», com uma concentração inicial de 2.5×10^7 células ml^{-1}, o valor da MBC é de 1 mM (Tabela A.1.).

Nos trabalhos citados, para a avaliação da actividade bacteriostática e bactericida do Cu^{2+}, foram utilizados meios de cultura diversos, e como já foi referido, a composição do meio de cultura influencia directamente a actividade antibacteriana dos iões cúpricos. No entanto, na variedade das espécies estudadas, os valores obtidos para a MIC e MBC não constituem uma gama muito larga de concentrações de Cu^{2+}. Dado que todos os meios utilizados contêm moléculas com elevada afinidade para os catiões metálicos, as concentrações de Cu^{2+} que apresentaram actividade antibacteriana provavelmente não correspondem a concentrações em iões Cu^{2+} livres muito díspares, o que poderá indicar que não existem grandes variações na susceptibilidade de muitas espécies bacterianas aos iões cúpricos.

4.2. A actividade biostática e biocida da dodina.

4.2.1. A inibição pela dodina do crescimento de células de fungos e de plantas.

A dodina inibe fortemente o crescimento, *in vitro*, de células de fungos e de plantas. A inibição do crescimento é geralmente quantificada pela determinação da ED_{50}, a concentração de agente químico que inibe o crescimento em, ou de, 50 % das células, ou a germinação de 50 % dos esporos. O valor deste parâmetro depende directamente das condições experimentais, nomeadamente da concentração celular e da composição do meio de cultura.

Os conídios e os ascósporos de estirpes de *Venturia inaequalis* isoladas de plantas não tratadas pela dodina, são geralmente muito susceptíveis a este fungicida. Mckay & Macneill (1979) referiram que a ED_{50} (germinação de conídios) se situava entre 0.5 e 1.3 µM dodina. Gilpatrick & Blowers (1974) apresentaram o valor de 2.1 µM para a ED_{50} da germinação de ascósporos. Yoder & Klos (1976) referiram que o crescimento em meio líquido era geralmente inibido por 3.5 µM dodina, e a germinação de conídios em água era totalmente inibida na presença de 14 µM dodina.

Num estudo comparativo sobre a toxicidade da dodina para quatro espécies de fungos fitopatogénicos (*Venturia inaequalis*, *Blumeriella jaapii*, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli* e *Colletotrichum orbiculare*), Bartz & Mitchell (1970) observaram que os conídios de *Venturia inaequalis* eram os mais sensíveis à actividade inibitória deste fungicida. Neste trabalho, as concentrações de dodina nas suspensões são expressas em unidades relativas à massa de esporos, não sendo possível determinar a concentração absoluta deste detergente. Miller (1960) referiu que os conídios de *Venturia inaequalis*, *Glomerella cingulata* e *Neurospora sitophila* eram mais sensíveis à inibição pela dodina, do que os conídios de *Aspergillus niger* e *Alternaria oleracea*. Os valores da ED_{50} (germinação de conídios) também foram referidos em relação à massa celular. De Waard & Nistelrooy (1983) observaram que em quatro estirpes de *Aspergillus nidulans*, a ED_{50} (do crescimento) se situava entre 33 e 52 µM dodina, e em três estirpes de *Cladosporium cucumerinum*, os valores variavam entre 18 e 181 µM dodina. Em conídios de *Monilia fructicola*, Brown & Sisler (1960) obtiveram uma ED_{50} de aproximadamente 6 µM, e em células de *Saccharomyces pastorianus* de aproximadamente 4 µM dodina. Solel & Siegel (1984) observaram que o crescimento de *Ustilago maydis* em meio líquido era inibido por reduzidas concentrações de dodina: ao fim de 12 horas de incubação, o crescimento de culturas tratadas com 9 µM dodina era 58 % do controlo, com 18 µM era de 21 %, e com 36 µM era nulo. Miller & Barran (1977) referiram que a germinação dos macroconídios de *Fusarium sulphureum* em meio nutritivo era totalmente inibida na presença de 170 µM dodina.

A toxicidade da dodina foi comparada com a de outros acetatos de n-alquilguanidina.

Em conídios de *Monilia fructicola* e células de *Saccharomyces pastorianus*, Brown & Sisler (1960) referiram que a toxicidade aumentava com o aumento da cadeia hidrocarbonada entre C_{10} e C_{13} - C_{14}, para diminuir de seguida com o aumento da cadeia até C_{18}. Concluíram que a relação entre a ED_{50} e o número de átomos da

cadeia hidrocarbonada é uma função em forma de sino invertido. Observaram ainda que, enquanto que a ED_{50} do acetato de dodecilguanidina para células de *Saccharomyces pastorians* era inferior a 5 µM, o acetato de guanidina não era tóxico para estas células mesmo na concentração de 17 mM, concluindo que o grupo hidrofóbico das alquilguanidinas é determinante na actividade biológica destas moléculas.

Byrde *et al.* (1962), num estudo sobre a inibição da germinação de conídios de *Venturia inaequalis* e *Nectria galligena* por acetatos de n-alquilguanidina e hidrocloretos de n-alquilamina, obtiveram os seguintes resultados: (i) Na presença de 10 µM de alquilguanidina, a percentagem de germinação dos conídios de *Venturia inaequalis* aumentou pela seguinte ordem: C_{13} (0 %) < C_{14} = C_{15} (0.8 %) < C_{16} (1.1 %) < C_{11} (3.0 %) < C_{12} (12.7 %) < C_{10} (30.8 %) < C_9 (34.2 %) < C_{17} (69.7 %) < C_8 (70.1 %) < C_7 = C_{18} (76.2 %) < controlo (75.3 %). (ii) A ED_{50} para os homólogos C_{11} a C_{16} de alquilguanidinas era de 9.76, 5.50, 5.12, 5.35, 5.74 e 6.78 µM, respectivamente. (iii) Em conídios de *Venturia inaequalis*, as alquilaminas eram menos tóxicas que as alquilguanidinas (para idêntica cadeia hidrocarbonada); na presença de 50 µM de hidrocloreto de dodecilamina, 44.9 % dos esporos germinaram (no controlo 58.5 %). (iv) Na presença de 50 µM de alquilguanidina, a percentagem de germinação dos conídios de *Nectria galligena* aumentou pela seguinte ordem: C_{12} = C_{15} (1.5 %) < C_9 (57.5 %) < controlo (88.7 %) < C_8 (96.9 %) < C_{18} (97.2 %). (v) Na presença de 10 µM de alquilguanidina, a percentagem de germinação dos conídios desta espécie aumentou pela ordem: C_{12} (64.6) < C_{15} (79.8) < controlo (88.7) < C_9 (92.6) < C_{18} (93.2) < C_8 (93.5). Os resultados obtidos neste estudo sobre a relação entre a dimensão da cadeia hidrocarbonada das alquilguanidinas e a sua actividade inibitória em células de fungos, concordam assim com os de Brown & Sisler (1960) e mostram, como referem os seus autores, que a utilização, contra o pedrado da macieira, de outros acetatos de alquilguanidina que não a dodina, não deve apresentar vantagens significativas sobre a utilização deste homólogo. Os resultados mostraram ainda que os conídios de *Venturia inaequalis* eram mais susceptíveis à dodina que os de *Nectria galligena*, e que a actividade inibitória dos hidrocloretos de alquilamina era inferior à exibida pelos acetatos de alquilguanidina, provavelmente devido à mais fraca basicidade dos primeiros.

As alquilguanidinas também inibem fortemente o crescimento de várias espécies de plantas. Srivastava & Smith (1982a) estudaram a inibição do crescimento de plântulas de agrião, cevada e aveia, por várias alquilguanidinas. A actividade inibitória máxima (com 1 mM de agente químico) foi observada com os homólogos C_8 -

C_9. A um aumento da cadeia hidrocarbonada entre C_6 e C_8 ou entre C_9 e C_{18}, correspondeu uma concomitante diminuição da actividade inibitória das alquilguanidinas. A inibição total do crescimento de células de macieira em cultura ocorria com 10 µM dos homólogos C_{10} - C_{14}, ou com 100 µM dos restantes homólogos. Um tratamento com 1 mM dodina reduziu em 50 % o crescimento das plântulas testadas. Em culturas de células de macieira, um tratamento com 10 µM dodina reduziu o crescimento a 12 % do controlo.

Brown & Sisler (1960) estudaram o efeito do pH na toxicidade da dodina em células de *Saccharomyces pastorianus*, tendo observado que a uma variação do pH de 5.1 a 7.8 correspondia um aumento da ED_{50} de 0.7 para 15 µM dodina. Dado que nesta gama de pH, a percentagem de moléculas de dodina ionizadas não varia significativamente e é quase de 100 %, o aumento da susceptibilidade das células à dodina com o aumento do pH de 5.1 para 7.8 deve ser resultado de um aumento do número de grupos fosfato e carboxilato ionizados à superfície das células, o que sugere que a interacção electrostática entre a molécula de dodina e estes grupos aniónicos desempenha um papel importante na acção tóxica deste fungicida.

De acordo com Beilharz *et al.* (1982), a dodina pode ser usada como agente selectivo para o isolamento de determinadas espécies de fungos do solo. A incorporação num meio de cultura de 2.3 mM dodina favoreceu o isolamento de espécies dos géneros *Metarhizium* e *Beauveria*, de difícil isolamento quando se utilizam os meios convencionais. A utilização do meio com dodina também possibilitou o isolamento de *Phialocephala sp.*, *Codinaea simplex*, *Pestalotia sp.* e *Anixiopsis fulvescens* var. *stercoraria*, espécies raramente isoladas do solo quando se usam os meios correntes.

Os resultados aqui citados mostram assim que a sensibilidade dos fungos à dodina é variável: a espécie *Venturia inaequalis* apresenta uma susceptibilidade bastante superior à exibida por várias outras espécies de fungos, e talvez por esta razão a dodina seja especialmente eficaz no controlo do pedrado da macieira (*cf.* Introdução). Como regra geral, pode-se afirmar que concentrações de dodina inferiores a 100 µM inibem fortemente o crescimento de células de fungos, mas determinadas espécies (por exemplo, algumas espécies de fungos do solo) podem ser tolerantes a concentrações relativamente elevadas deste fungicida.

4.2.2. A actividade bacterióstatica e bactericida da dodina.

São escassíssimos os trabalhos publicados sobre a acção da dodina em células bacterianas. Zeher (1968) estudou a actividade bactericida da dodina na espécie fitopatogénica *Erwinia amylovora*. A culturas em meio nutritivo com 4 × 10^5 células ml^{-1} adicionou dodina, numa concentração final que variava entre 1 e 100 ppm (3.48 e 348 µM). Ao fim de 24 h de incubação à temperatura ambiente (22 - 23 °C), as culturas foram diluídas (1:10 a 1:10^5), e destas colocaram-se amostras (1 ml) em meio nutritivo sólido. Nas culturas tratadas com 3.5 µM dodina, as placas inoculadas apresentavam colónias, mas após um tratamento com 17 µM dodina, não se observou qualquer colónia no meio inoculado, mesmo na diluição de 1:10. Se admitirmos que após o tratamento com 17 µM dodina não existiam células viáveis nas culturas tratadas (não se avaliou a viabilidade não usando diluição), os resultados obtidos neste trabalho indicam uma MBC da dodina em *Erwinia amylovora* de aproximadamente 17 µM. Os resultados apresentados não permitem calcular a MIC, já que não foi determinada a concentração celular nas culturas tratadas com 1 ppm dodina, limitando-se o autor a indicar que se formavam colónias nas placas inoculadas com amostras das diluições.

Determinei a MIC e a MBC da dodina em *P. syringae* (Anexo A). O meio de cultura utilizado foi o NB da Difco, e a concentração celular inicial era de 2.5 × 10^7 partículas ml^{-1}. Os valores que obtive para estes parâmetros foram de 25 e 30 µM dodina, respectivamente.

Tu (1980) avaliou a actividade inibitória da dodina e doze outros fungicidas, em três estirpes de *Rhizobium japonicum*, pela quantificação das zonas de inibição causadas por discos de papel embebidos em soluções dos fungicidas. O meio de cultura (contendo extracto de levedura e manitol) foi inoculado com as bactérias em estudo, numa concentração final de aproximadamente de 5 × 10^7 células ml^{-1}, após o que foram colocados os discos de papel de filtro. Após sete dias de incubação, determinaram-se os diâmetros dos halos de inibição. Nas três estirpes de *Rhizobium japonicum*, os discos embebidos numa solução com 5 µg dodina ml^{-1} (17.4 µM) não causaram qualquer halo de inibição; com os discos embebidos em 174 µM dodina, o diâmetro do halo variou entre 0 e 0.8 mm; com 1.74 mM, o halo de inibição tinha um diâmetro que variava entre 2.0 e 3.2 mm. Dos treze fungicidas estudados, a dodina foi um dos cinco a sete mais potentes inibidores do crescimento das estirpes bacterianas estudadas.

Fisher (1976) estudou a inibição, pela dodina, do crescimento de *Rhizobium trifolii* em meio sólido ou líquido, constituído por K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$, NaCl, $CaCO_3$, manitol e extracto de levedura. Após incorporação da dodina no meio sólido, este foi inoculado por picada com a cultura bacteriana. Ao fim de 30 dias a 25 °C, comparou-se o diâmetro das colónias em meio não contendo fungicida, com o observado na presença de 10 a 200 ppm dodina (35 a 700 μM). Na presença de 35 μM dodina, o crescimento das colónias era 39 % do controlo, mas com 174 μM, era nulo. Em meio líquido, a adição de 35 μM dodina resultou numa redução do crescimento (avaliado pelo peso seco) a 17 % do controlo (após sete dias de incubação), mas um tratamento com 174 μM reduziu o crescimento a 4 % do controlo; uma cessação completa do crescimento ocorria com uma dose de dodina cinco vezes superior.

Estudei a actividade inibitória da dodina em culturas de *P. syringae* (Anexo A). A dodina foi adicionada a culturas no meio da fase exponencial, e o crescimento foi avaliado pela determinação da concentração celular, em número de partículas por ml. A adição de 10 μM dodina não resultou numa alteração significativa da curva de crescimento, mas o tratamento com 48 μM teve como consequência uma cessação completa da multiplicação das células.

Os resultados referidos na bibliografia sobre a actividade inibitória da dodina em várias espécies bacterianas não são directamente comparáveis com os que obtive em *P. syringae*, dado que as condições experimentais e as técnicas utilizadas, nomeadamente a concentração celular e a composição do meio, diferiram substancialmente. No entanto, é interessante constatar que a dodina apresenta geralmente uma elevada actividade inibitória a concentrações na gama dos micromolar. Também nesta gama de concentrações, como foi referido na sub-secção 4.2.1., a dodina apresenta uma elevada actividade inibitória do crescimento de células de fungos e de plantas. Esta elevada actividade biocida de concentrações micromolares de dodina pode estar relacionada com o facto deste detergente apresentar uma reduzidíssima concentração micelar crítica, e serem as micelas os principais agentes da actividade anticelular (*cf.* Trabalhos IV, V e VII).

5. A ABSORÇÃO DE DODINA PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* E SUA RELAÇÃO COM A ACTIVIDADE ANTIBACTERIANA.

Para a compreensão do modo da acção antibacteriana de um agente químico, é muito importante o conhecimento do tipo e níveis de absorção deste agente pelas células, e dos factores que a influenciam. A absorção dos iões cúpricos pelas células de *P. syringae* é descrita e discutida no Anexo C. Na presente secção é relacionada a absorção da dodina pelas células de *P. syringae* com outros aspectos da actividade antibacteriana deste detergente. Os resultados obtidos em *P. syringae* são comparados com os referidos na bibliografia para células eucarióticas, e para outros anfífilos catiónicos em células de diversas espécies bacterianas.

5.1. A isotérmica da absorção de dodina por células de fungos e de *P. syringae*. Níveis de saturação das células. Comparação com a absorção de outros anfífilos catiónicos em células bacterianas.

O primeiro estudo sobre a absorção passiva da dodina por células de fungos foi o de Brown & Sisler (1960). Neste trabalho, foi comparada a absorção da dodina pelas células da levedura *Saccharomyces pastorianus* com a do fungo filamentoso *Monilinia fructicola*. Em cada uma destas espécies, só foram estudadas três concentrações de dodina, pelo que os resultados obtidos não permitem caracterizar a isotérmica de absorção. Os resultados permitiram no entanto concluir que a absorção passiva da dodina era um processo muito rápido, com duração de alguns minutos.

A absorção passiva da dodina foi posteriormente estudada em pormenor no trabalho de Somers & Pring (1966). Foi observado que a absorção passiva da dodina por conídios do ascomicete *Neurospora crassa* era também um fenómeno muito rápido, completando-se em alguns minutos. A isotérmica da absorção de dodina pelos conídios de *Neurospora crassa* e de *Alternaria tenuis* era do tipo «L» (absorção «Langmuiriana») do sistema de classificação de Giles *et al.* (1960). Na saturação, os esporos de *Neurospora crassa* continham aproximadamente 1 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$, e os de *Alternaria tenuis*, 0.6 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$. Estes níveis de absorção de dodina pelos esporos de *Neurospora crassa* correspondiam a aproximadamente 30 % do seu peso seco. Foi ainda observado que, entre 4 e 35 °C, este processo de absorção não era influenciado pela temperatura, confirmando que se tratava de uma absorção passiva.

Estudei a absorção passiva de dodina pelas células de *P. syringae* (Trabalho V). Assim como nas células de fungos, este processo completa-se nos minutos seguintes ao contacto entre as células bacterianas e as moléculas de detergente. A isotérmica de absorção é do tipo «S» do sistema de classificação de Giles *et al.* (1960), indicando que a uma primeira fase de absorção cooperativa, segue-se uma do tipo «Langmuiriano». A absorção cooperativa foi interpretada como sendo provavelmente devida à absorção de micelas de dodina pelas células, à desnaturação de proteínas citoplasmáticas e à formação dos sistemas mielínicos intracelulares. Apesar de Somers & Pring (1966) terem concluído que a isotérmica da absorção de dodina pelos conídios de duas espécies de fungos era do tipo «Langmuiriano», a primeira parte da isotérmica não foi estudada em pormenor, e os resultados apresentados não excluem a possibilidade da existência de uma primeira fase de absorção cooperativa. É interessante constatar que as células de *P. syringae* apresentam, na saturação, um conteúdo em dodina (0.87 μmol (mg peso seco)$^{-1}$) comparável ao referido por Somers & Pring (1966) para os conídios de duas espécies de fungos.

A absorção passiva de anfífilos catiónicos por células bacterianas foi estudada nomeadamente por Salton (1951), Few & Schulman (1953) e Hugo & Longworth (1964a), que concluiram que, tanto em Gram-negativos como em Gram-positivos, a absorção da polimixina E, brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) e clorohexidina, era do tipo «Langmuiriano».

Em quatro espécies bacterianas sensíveis à polimixina E, o valor médio da saturação das células com este anfífilo foi de 314 μg (mg peso seco)$^{-1}$ (Few & Schulman, 1953). Este nível de absorção corresponde aproximadamente a 0.251 μmol polimixina E (mg peso seco)$^{-1}$, considerando um peso molecular de 1250 (*cf.* Newton, 1953). Em seis espécies bacterianas, o valor médio da saturação das células com CTAB foi de 410 μg (mg peso seco)$^{-1}$, o que corresponde aproximadamente a 1.16 μmol (mg peso seco)$^{-1}$ (Salton, 1951). Em duas espécies bacterianas, a saturação das células com clorohexidina ocorreu com a absorção de 200 a 300 μg clorohexidina (mg peso seco)$^{-1}$.

5.2. A absorção de anfífilos catiónicos pelas células bacterianas e a formação de uma camada monomolecular à superfície das células.

Foi referido na sub-secção anterior que a absorção de alguns anfífilos catiónicos pelas células bacterianas é do tipo «Langmuiriano». Este tipo de absorção

indica que à medida que as moléculas vão sendo absorvidas pelas células, o número de moléculas que podem ser absorvidas adicionalmente é cada vez menor (Giles *et al.*, 1960). Esta isotérmica de absorção pode corresponder à formação de uma monocamada molecular à superfície das células, representando o patamar da isotérmica o revestimento completo das células por moléculas de anfífilo. Para testar esta hipótese, os investigadores têm comparado o número de moléculas absorvidas pelas células na saturação, com o teoricamente necessário para a formação de uma monocamada superficial. Interessantemente, na maioria dos casos, foi concluído que, na saturação, o número de moléculas absorvidas é muito superior ao número de moléculas necessárias para a formação da camada monomolecular à superfície das células.

Salton (1951) concluíu que, em duas espécies bacterianas, a saturação das células com CTAB correspondia a um número de moléculas absorvidas 15 a 18 vezes superior ao necessário para a formação de uma monocamada superficial. Few & Schulman (1953) concluíram que, nas várias espécies bacterianas estudadas, a saturação das células com polimixina E correspondia a 4 - 12 vezes a quantidade necessária para a formação de uma camada monomolecular superficial. Os valores apresentados por Hugo & Longworth (1964a) indicam que a saturação das células de *Escherichia coli* com moléculas de clorohexidina correspondia a 2.5 - 3.5 vezes o necessário para a formação de uma monocamada à superfície das células.

Com o objectivo de saber se idêntico fenómeno ocorre nas células de *P. syringae*, calculei quantas moléculas de dodina seriam necessárias para a formação de uma monocamada superficial e comparei estes valores com os níveis de saturação das células (Trabalho V). Os resultados que obtive indicam que, à semelhança do observado com o CTAB, a polimixina E e a clorohexidina, o número de moléculas de dodina absorvidas na saturação corresponde a várias vezes (aproximadamente 5) a quantidade necessária para a formação de uma camada monomolecular superficial.

O facto da saturação das células bacterianas com as moléculas de anfífilo ocorrer com quantidades muito superiores às necessárias para a formação de uma monocamada superficial, levou Salton (1951) e Few & Schulman (1953) a concluírem que as moléculas de CTAB e polimixina E se deveriam ligar a constituíntes citoplasmáticos, e Hugo & Longworth (1964a) a admitirem a formação de multi-camadas de clorohexidina à superfície das células. A isotérmica «Langmuiriana» pode teoricamente corresponder a uma saturação da toda a célula em moléculas de anfífilo, sem se formar qualquer camada monomolecular superficial. Para o esclarecimento desta questão, era muito importante a comparação dos dados bioquímicos com estudos

de ultrastrutura, o que fiz nas células de *P. syringae* (Trabalho V).

Estudei as alterações induzidas pela dodina na ultrastrutura das células de *P. syringae* (Trabalho V). Em nenhuma concentração de dodina observei qualquer indício da formação de uma monocamada de dodina à superfície das células, mas antes, estas apresentaram uma grande diversidade de estruturas membranares superficiais e intracelulares formadas *de novo*, como «blebs», expansões da membrana exterior, e figuras mielínicas. As concentrações de dodina que saturavam as células induziam uma coagulação extensa do citoplasma. Os resultados que obtive sugerem que a absorção «Langmuiriana» da dodina pelas células de *P. syringae* corresponde, não à formação de uma monocamada superficial, mas à saturação de toda a célula com moléculas de dodina, e que os elevados níveis de absorção deste anfífilo se devem à formação das diferentes estruturas membranares e à coagulação do citoplasma.

Uma análise das imagens obtidas por microscopia electrónica de transmissão apresentadas nos trabalhos de Hugo & Longworth (1965) e Davies *et al.* (1968) sugere a possibilidade de, nas células tratadas com clorohexidina, também existirem expansões da membrana exterior e figuras mielínicas intracelulares, apesar destas estruturas não terem sido identificadas pelos autores. Estes referiram exclusivamente a existência de protuberâncias e de um citoplasma «granuloso». É de admitir que os elevados níveis de absorção de clorohexidina também estejam relacionados com a formação de diversas novas estruturas membranares e com a coagulação do citoplasma. São necessários mais estudos para esclarecer esta questão.

5.3. A relação entre a absorção da dodina e as alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática e da viabilidade em *P. syringae*. Comparação com outros anfífilos catiónicos.

Já foi referido que as células de *P. syringae* absorvem, na saturação, elevadíssimas quantidades de dodina. A saturação das células ocorre com concentrações iniciais de dodina (aproximadamente 400 µM), muito superiores às necessárias para induzir alterações significativas na permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática, na respiração e na viabilidade (Trabalhos IV, V, VII), o que indica que a actividade antibacteriana deste detergente não está associada a elevados níveis de absorção.

Um tratamento das suspensões de *P. syringae* durante 15 min com 70 µM dodina resulta na morte de aproximadamente 99 % das células, na libertação de 100 % do

K^+, 76 % das «moléculas-contendo-ribose» e 65 % dos «materiais-absorvendo-a-260 nm» presentes no «pool» das células (*cf.* secção 10.), e na absorção de 0.22 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$ (Travalho V). Para se ter uma ideia do que representa este nível de absorção de dodina, refira-se que a quantidade necessária para a formação de uma hipotética monocamada à superfície das células é de 0.17 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$, e a saturação das células ocorre com a absorção de 0.87 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$ (Trabalho V). Os resultados que obtive sugerem que esta camada monomolecular não se formou (*cf.* sub-secção 5.2.), mas esta comparação mostra que a morte das células e a danificação extensa da membrana citoplasmática estão associadas à absorção de quantidades apreciáveis de dodina pelas células de *P. syringae*.

Few & Schulman (1953) também observaram que, em várias espécies bacterianas tratadas pela polimixina E, o efluxo de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e a morte ocorriam com a absorção de quantidades significativas de polimixina, mas que estas eram inferiores às necessárias para saturar as células: o efluxo de mais de 75 % do máximo de materiais-absorvendo-a-260 nm libertados das células ocorria com a absorção de 1/3 da quantidade de polimixina necessária para saturar as células; a morte da grande maioria das células ocorria com a absorção de níveis de polimixina semelhantes aos necessários para a formação de uma hipotética monocamada superficial.

Pela análise dos resultados apresentados por Hugo & Longworth (1964a) e Longworth (1971) sobre o modo de acção da clorohexidina, é possível comparar a acção da dodina e da polimixina E com a deste anfífilo catiónico. Em células de *Escherichia coli*, o efluxo máximo de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e pentoses ocorreu com 90 µg clorohexidina ml^{-1}, correspondente a uma absorção de 72 µg clorohexidina (mg peso seco)$^{-1}$. A saturação das células só se verificava com elevadas concentrações iniciais de clorohexidina (500 µg ml^{-1}), que correspondiam a uma absorção de aproximadamente 293 µg clorohexidina ml^{-1}. A quantidade de clorohexidina necessária para a formação de uma hipotética monocamada à superfície das células correspondia à absorção de aproximadamente 85 µg clorohexidina ml^{-1}. Estes resultados indicam assim que, à semelhança do observado com a dodina e a polimixina E, a danificação da membrana citoplasmática pela clorohexidina corresponde à absorção de quantidades apreciáveis de anfífilo, comparáveis às que seriam necessárias para a formação de uma monocamada superficial, e que estes níveis de absorção são muito inferiores aos da saturação das células. No entanto, ao contrário do observado com a dodina e a polimixina, as mais baixas concentrações de

clorohexidina que danificavam acentuadamente a membrana citoplasmática, não causavam a morte das células; esta só ocorria com concentrações de clorohexidina perto da saturação.

6. AS ALTERAÇÕES SECUNDÁRIAS INDUZIDAS PELA DODINA NAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE*. COMPARAÇÃO COM OS RESULTADOS OBTIDOS COM OUTROS ANFÍFILOS CATIÓNICOS.

Salton (1951) foi dos primeiros investigadores a observar que o efluxo de «materiais-absorvendo-a-260 nm», pentoses e fosfato inorgânico, induzido pelo detergente catiónico CTAB em células de várias espécies bacterianas era um processo bifásico: após uma fase inicial em que se verificava uma libertação rápida de quantidade apreciáveis de materiais-absorvendo-a-260 nm, fosfato inorgânico e pentoses, existia uma segunda fase, em que a libertação destes metabolitos era lenta, mas ocorria a uma taxa aproximadamente constante e se prolongava por várias horas.

Posteriormente, Few & Schulman (1953) e Newton (1953) observaram que, em várias espécies bacterianas tratadas com polimixina E, a libertação de materiais-absorvendo-a-260 nm, pentoses e fosfato, eram também processos bifásicos, com uma segunda fase que se prolongava por várias horas após a adição do anfífilo.

Newton (1953) observou ainda que nas células de *Pseudomonas aeruginosa* tratadas com polimixina E ou CTAB, a quantidade de materiais-absorvendo-a-260 nm libertados das células era uma função em forma de sino em relação à concentração de anfífilo. Existia assim uma concentração óptima de polimixina e CTAB que induzia um acentuado efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm, acima da qual a libertação destes materiais era menor. A taxa de efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm induzida pela polimixina ou pelo CATB era, a 2 °C, muito inferior à observada a 30 °C. Newton concluiu que as moléculas de anfífilo tinham causado provavelmente uma desorganização da «barreira osmótica» das células provocando um efluxo rápido de «moléculas contendo purinas ou pirimidinas», e que este era seguido de uma degradação enzimática de «componentes celulares não-difusíveis», processo que era inibido por concentração elevadas de anfífilo ou por temperaturas baixas.

Os trabalhos de Hugo & Longworth (1964a, 1964b, 1965 e 1966), Davies *et al.* (1968) e Longworth (1971) mostraram que a clorohexidina induz, em várias espécies bacterianas, um processo com características semelhantes às referidas para a

polimixina E e para o CTAB. Estes investigadores observaram que: (i) Um tratamento com clorohexidina induz um efluxo bifásico de materiais-absorvendo-a-260 nm e pentoses: após uma fase inicial que dura alguns minutos, em que se libertam quantidades apreciáveis destes metabolitos, segue-se uma libertação secundária a uma taxa aproximadamente constante, que se prolonga por pelo menos 24 h. (ii) Nesta segunda fase, a quantidade de materiais libertados não é uma função linear da concentração de anfífilo, mas antes corresponde a uma curva em forma de sino; a taxa máxima de libertação de materiais-absorvendo-a-260 nm e de pentoses não ocorre com uma concentração elevada de clorohexidina, mas com uma concentração relativamente baixa. (iii) As concentrações de clorohexidina que induzem uma elevada taxa de efluxo dos metabolitos são as que causam um maior decréscimo na densidade óptica das suspensões. (iv) Observações realizadas por microscopia eléctronica de transmissão mostraram que as concentrações de clorohexidina que induzem uma elevada taxa de efluxo de metabolitos causam uma lise das células, e que as concentrações elevadas de clorohexidina, que induzem um menor efluxo de metabolitos, causam uma coagulação do citoplasma. (v) As concentrações elevadas de clorohexidina que induzem uma reduzida taxa de efluxo de metabolitos e que coagulam o citoplasma, causam, *in vitro*, uma precipitação do ^{32}P presente no citoplasma isolado das células.

Os resultados referidos sobre a acção da clorohexidina, CTAB e polimixina E, nas células bacterianas podem ser interpretados da seguinte forma: (i) Um tratamento com o anfífilo induz uma degradação enzimática de componentes celulares, nomeadamente do RNA, e a lise das células. (ii) Estes processos ocorrem numa gama restrita de concentrações de anfífilo. (iii) A inibição da lise celular e da degradação do RNA com concentrações elevadas de anfífilo deve-se provavelmente a uma inibição das enzimas autolíticas, nomeadamente das RNases, por coagulação das proteínas citoplasmáticas.

Solel & Siegel (1984) observaram que um tratamento das células de *Ustilago maydis* com 18 - 72 µM dodina resultava numa libertação, a taxa constante (que aumentava com um aumento da concentração de dodina), de ^{32}P das células. Estes resultados não foram interpretados pelos autores, mas sugerem a existência, nas células deste fungo tratadas com dodina, de um processo de degradação enzimática de macromoléculas fosfatadas.

Estudei as alterações causadas por uma exposição prolongada das células de *P. syringae* à dodina (Trabalhos IV e V). Pelo menos até 8 h de tratamento com dodina,

as células libertavam «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» a uma taxa aproximadamente constante. Após 3 - 4 h de exposição a concentrações de dodina superiores a 40 μM, a quantidade de metabolitos libertados já excedia a quantidade total presente no «pool» das células, e estas moléculas continuavam a ser libertadas a uma taxa constante por mais algumas horas. Este efluxo não podia assim corresponder a uma libertação de materiais presentes no «pool», mas devia ser consequência de uma degradação progressiva de estruturas celulares. Estas características, e o facto deste fenómeno não ocorrer a 6 °C, sugerem que a dodina induz uma degradação enzimática do RNA presente nas células de *P. syringae*. As observações ultrastruturais apoiam esta interpretação (Trabalho V).

Quando a taxa de efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm e de moléculas-contendo-ribose é representada em função da concentração de dodina, obtém-se uma curva em forma de sino com um máximo a aproximadamente 50 μM dodina (Trabalho V). À semelhança do observado com a clorohexidina, CATB e polimixina E, concentrações elevadas de dodina parecem inibir a degradação do RNA. As observações ultrastruturais que realizei mostraram que um tratamento com concentrações elevadas de dodina tem como consequência uma coagulação extensiva do citoplasma (Trabalho V). Estes resultados sugerem assim que a inibição da degradação do RNA por concentrações elevadas de dodina é resultado de uma inibição das RNases, por coagulação destas moléculas.

Num estudo espectrofotométrico e ultrastrutural da acção de detergentes em duas espécies de Gram-negativos, Delgado (1984) observou que um tratamento das células de *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens* com 2 mM CTAB durante 10 min, resultava numa significativa coagulação do citoplasma. No entanto, não foi estudado o efeito de concentrações inferiores de detergente, nem de tempos prolongados de exposição.

7. A INTERACÇÃO ENTRE OS GRUPOS SULFIDRILO E OS IÕES CÚPRICOS.

Na sub-secção 3.1. foram referidos alguns mecanismos de inibição de enzimas pelos iões cúpricos. Além destas formas de interacção entre os iões Cu^{2+} e as proteínas, constatou-se que estes catiões divalentes podem interactuar com os grupos sulfidrilo, com a formação de dissulfuretos.

A fibronectina é uma glicoproteína de elevado peso molecular constituída por duas cadeias polipeptídicas semelhantes (mas não idênticas), unidas entre si perto da terminação carboxilo por numerosas ligações dissulfureto. Além destas ligações dissulfureto, as subunidades parecem conter, também perto da região terminal carboxilo, dois grupos sulfidrilo livres. Vartio (1986) observou que o tratamento da fibronectina com 2.5 mM de diversos sais de cobre ou de ferro resultava numa elevada polimerização da molécula, mas um tratamento com $CoSO_4$, $NiCl_2$, $ZnSO_4$ ou $MgCl_2$ resultava numa polimerização ligeira ou nula. A polimerização induzida pelos iões cúpricos e férricos ocorria a pH 7, 8 e 9, mas não a pH 5, 6 ou 10. O EDTA inibia esta polimerização, mas o ditioeritritol incrementava-a. Vartio propôs que a polimerização da fibronectina induzida pelos iões metálicos era resultado da formação de ligações dissulfureto entre os grupos sulfidrilo livres das duas subunidades da molécula de fibronectina. A confirmar esta hipótese observou que o bloqueamento dos grupos sulfidrilo evitava a polimerização, e que só os fragmentos de cadeias polipeptídicas com grupos carboxilos terminais livres (os grupos sulfidrilo encontravam-se exclusivamente perto do grupo terminal carboxilo) polimerizavam na presença de sulfato de cobre. A desnaturação da fibronectina não afectava a polimerização induzida pelos iões metálicos. O aumento da polimerização induzido pelo ditioeritritol deveu-se provavelmente a uma redução das ligações dissulfureto formadas, constituíndo-se assim novos grupos sulfidrilo susceptíveis de serem oxidados pelos iões metálicos com a formação, novamente, de grupos dissulfureto.

O «Factor B» é uma glicoproteína do plasma. A incubação desta molécula com $CuCl_2$ pode resultar na formação de um polímero, numa extensão dependente da concentração de cobre. A polimerização foi interpretada como sendo muito provavelmente resultante da formação de ligações dissulfureto entre várias moléculas de Factor B (Matsushita *et al.*, 1989).

Nas enzimas que contêm grupos sulfidrilo essencias para a actividade enzimática, a formação de ligações dissulfureto induzida pelos iões cúpricos pode resultar numa diminuição drástica da actividade enzimática.

Uma das funções das moléculas de glutationa consiste em remover os agentes oxidantes produzidos nas células. Nesta função, as moléculas de glutationa são oxidadas a glutationa-dissulfureto. A redução das moléculas de glutationa-dissulfureto a glutationa é catalizada pela enzima glutationa reductase, sendo esta actividade indispensável para a manutenção, a níveis aproximadamente constantes (e elevados), da razão entre a concentração de glutationa e a de glutationa-dissulfureto. A glutationa reductase contém grupos sulfidrilo que são essenciais para a actividade enzimática. O tratamento da glutationa reductase de levedura por reduzidíssimas concentrações de cobre (1 μM Cu^{2+}) resultou em 50 % de inibição da actividade enzimática. A inibição era reversível: um pós-tratamento com D-penicilamina, L-cisteína, homocisteína ou DDC resultou numa reversão da inibição causada pelos iões Cu^{2+}. Foi proposto que a inibição da glutationa reductase era consequência da formação, pelos iões Cu^{2+}, de ligações entre grupos sulfidrilo vizinhos (Rafter, 1982).

8. QUAIS OS LOCAIS DE LIGAÇÃO DOS IÕES Cu^{2+}?

Após ter verificado que as células de *P. syringae* apresentam uma capacidade de absorver quantidades relativamente elevadas de Cu^{2+}, podendo atingir, com reduzidas concentrações iniciais (200 μM), mais de 2 % do peso seco das células (Anexo C), uma questão que se pode colocar é a de saber a que locais se ligam os iões cúpricos.

Na secção anterior referiram-se vários trabalhos que concluíram que os iões cúpricos podem interactuar com grupos sulfidrilo de moléculas protéicas. Em *P. syringae*, verifiquei que um pré-tratamento das células com reagentes com elevada afinidade para os grupos sulfidrilo (Hg^{2+} e N-etilmaleimida) resulta numa diminuição significativa da quantidade de cobre absorvido, sugerindo que os grupos sulfidrilo são um dos locais de ligação dos iões cúpricos (Anexo C). Idêntica conclusão foi apresentada por Cederbaum & Wainio (1972a, 1972b, 1972c) num estudo sobre a interacção entre os iões cúpricos e cuprosos, e a mitocôndria de células animais. Na presença de moléculas contendo grupos sulfidrilo, como a cisteína e a glutationa, a quantidade de cobre absorvido era drasticamente reduzida, provavelmente porque estas moléculas competiam com os locais de ligação nas mitocôndrias, pela ligação dos iões cúpricos. Na presença de *p*-cloromercúriobenzoato, uma molécula com elevada afinidade para os grupos sulfidrilo, a quantidade de cobre

absorvido era reduzida em 13 a 30 % do controlo. Na presença de Hg^{2+}, a quantidade de cobre absorvido era reduzida em mais de 50 %. Cederbaum & Wainio concluíram que os grupos sulfidrilo constituem uma fracção significativa dos locais de ligação dos iões cúpricos às mitocôndrias.

Além dos grupos sulfidrilo, outros grupos funcionais devem participar na ligação dos iões cúpricos às células bacterianas (*cf.* Trabalho IX). Esta questão é complexa, dado que as células bacterianas são constituídas por uma grande diversidade de estruturas moleculares, e os iões metálicos podem interactuar de várias formas com as moléculas orgânicas, e apresentam diferentes afinidades para os diversos grupos funcionais.

Existem duas formas principais de ligação dos iões metálicos a moléculas orgânicas (Gurd & Wilcox, 1956; Brill, 1977; Hughes & Poole, 1989; *cf.* Trabalho IX): a ligação de um ião a um grupo funcional de uma molécula (ligação simples ou unidentada) e a ligação de um ião simultâneamente a vários grupos funcionais de uma molécula (formação de um quelato). A afinidade dos iões metálicos para a formação de quelatos é muitíssimo superior à das ligações simples (Gurd & Wilcox, 1956).

Nas ligações unidentadas, a extensão da ligação dos catiões metálicos depende directamente da fracção de grupos ionizados, e esta é função do pH do meio, e do pK destes grupos. Os grupos carboxilato laterais dos amino-ácidos aspártico e glutâmico apresentam um pK de 3.9 e 4.3, respectivamente (West *et al.*, 1966). A um pH perto da neutralidade, a grande maioria destes grupos encontrar-se-á ionizada e assim susceptível de ligar catiões metálicos. O grupo amina lateral (ε-amina) da lisina, e o grupo guanidino da arginina, apresentam um pK de 10.5 e 12.5, respectivamente (West *et al.*, 1966). A um pH perto da neutralidade, a grande maioria destes grupos não deverá ligar catiões metálicos. O grupo imidazole da histidina apresenta um pK de 6.1 (West *et al.*, 1966), e assim, perto da neutralidade será um local provável de ligação simples de iões metálicos. O grupo sulfidrilo da cisteína tem um pK de 8.3 (West *et al.*, 1966) e assim, a pH 7, uma fracção destes grupos encontrar-se-á ionizada.

Ao contrário das ligações unidentadas, a formação de quelatos pode ocorrer a um pH que pode diferir em algumas unidades logarítmicas dos pKs dos grupos funcionais que nele participam (Brill, 1977). Alguns catiões metálicos, nomeadamente o Cu^{2+}, apresentam, a um pH perto da neutralidade, uma elevada afinidade para a formação de quelatos involvendo grupos amina, apesar de a este pH não se verificar uma significativa capacidade de ligação simples a estes grupos (Brill, 1977; Sigel &

Martin, 1982).

Saliente-se no entanto, que apesar da afinidade para a formação de quelatos ser muito superior à da formação de ligações simples, em termos de macro-estruturas, como a célula bacteriana, o número de locais para a formação de quelatos deve ser muito inferior ao número de locais existentes para ligações simples (*cf.* Gurd & Wilcox, 1956). Numa primeira aproximação ao estudo da interacção dos iões metálicos com sistemas celulares ou sub-celulares, podem-se assim considerar unicamente as ligações simples entre os iões e os grupos funcionais. Apesar da grande diversidade na composição molecular das células bacterianas, existe um número restrito de possíveis locais de ligação simples (unidentada) dos iões metálicos às células, e estes são, a um pH perto da neutralidade, fundamentalmente os seguintes grupos funcionais: carboxilato, fosfato, sulfidrilo e imidazole (Gurd & Wilcox, 1956; Passow *et al.*, 1961; Brill, 1977; Tobin *et al.*, 1984; Cabral, 1986; Hughes & Poole, 1989; *cf.* Trabalho IX). Os grupos amida das cadeias polipeptídicas, e os grupos amina, só ligam significativamente catiões metálicos através da formação de quelatos (Kroneck *et al.*, 1980; Sigel & Martin, 1982). A ligação de iões Cu^{2+} aos grupos sulfidrilo já foi referida. Alguns estudos realizados sobre a interacção entre os iões cúpricos e moléculas orgânicas, sistemas celulares ou sub-celulares, confirmaram que estas moléculas e sistemas apresentam uma capacidade de ligar quantidades apreciáveis de iões cúpricos e apresentaram evidência experimental para o envolvimento dos grupos mencionados na ligação dos iões cúpricos.

I. M. Klotz e colaboradores estudaram em pormenor a interacção entre a molécula de albumina e os iões cúpricos. Os resultados foram resumidos e discutidos por Gurd & Wilcox (1956). A pH 4.8, na presença de 10 mM Cu^{2+}, a molécula de albumina pode ligar dez a onze átomos de cobre, sem ser saturada com este metal. A este pH, a grande maioria do cobre encontra-se ligado aos grupos carboxilato. A pH 6.5, o cobre deve ligar-se aos grupos imidazole, e provavelmente formar quelatos involvendo grupos ε-amina. Quando o pH atinge 9.6, o cobre liga-se aos próprios grupos laterais amina.

T. J. Beveridge e colaboradores publicaram uma série de artigos sobre a interacção entre os metais e os invólucros bacterianos. No trabalho publicado em 1981 (Beveridge & Koval, 1981) foram quantificados os níveis de absorção de trinta e dois metais pelo invólucro isolado de células de *Escherichia coli* K-12. Com uma concentração inicial de 2 μmol de metal (mg peso seco)$^{-1}$, os invólucros absorveram 0.090 μmol cobre (mg peso seco)$^{-1}$. Estes níveis de absorção são assim muito

inferiores aos que observei nas células de *P. syringae* (Anexo C). Os resultados obtidos neste trabalho mostram, no entanto, que o invólucro das células de *Escherichia coli* (e provavelmente dos Gram-negativos em geral) apresentam a capacidade de absorver quantidades significativas de iões cúpricos. No trabalho publicado no ano anterior (Beveridge & Murray, 1980) foi estudada qual a influência da modificação dos grupos amina e carboxilato, e da extracção dos ácidos teicóicos, na absorção de diversos metais pela parede celular do Gram-positivo *Bacillus subtilis*. Com uma concentração inicial de 10 μmol metal (mg peso seco)$^{-1}$, a parede celular absorvia aproximadamente 3 μmol cobre (mg peso seco)$^{-1}$, um nível de absorção muito superior ao observado no invólucro de *Escherichia coli* (mas também a concentração inicial tinha sido cinco vezes superior). Se os grupos amina eram modificados quimicamente de forma a serem convertidos em grupos carboxilato, a quantidade de cobre absorvida decrescia para 0.8 - 0.9 μmol cobre (mg peso seco)$^{-1}$. Se os grupos carboxilato eram modificados quimicamente de forma a serem convertidos em grupos sem carga ou em grupos amina, a quantidade de cobre absorvida também decrescia significativamente (1.0 e 0.3 μmol cobre (mg peso seco)$^{-1}$, respectivamente). Se às paredes celulares eram extraídos os ácidos teicóicos, a quantidade de cobre absorvido decrescia em 0.5 μmol (mg peso seco)$^{-1}$. Dado que com este tratamento se tinha extraído aproximadamente 1 μmol P_i (mg peso seco)$^{-1}$, Beveridge & Murray proposeram que, nas paredes nativas tratadas com cloreto de cobre, cada ião Cu^{2+} se deveria encontrar ligado a dois grupos fosfato dos ácidos teicóicos. Estes investigadores sugeriram que o principal local de ligação dos catiões metálicos à parede celular de *Bacillus subtilis* eram os grupos carboxilato, principalmente dos resíduos de glutamato do peptidoglicano.

9. A RELAÇÃO ENTRE AS ALTERAÇÕES NO METABOLISMO E A VIABILIDADE, NAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* TRATADAS COM Cu^{2+}.

Um tratamento das suspensões de *P. syringae* com concentrações micromolares de Cu^{2+} resulta num efluxo de metabolitos do «pool» (muito acentuado de K^+, mas restrito de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose») (Trabalhos I, II, III), numa plasmólise (Trabalho III), e numa inibição do consumo de O_2 utilizando diferentes substratos (Trabalho VIII). Após 15 min de tratamento com concentrações iguais ou superiores a 30 - 40 µM Cu^{2+} a totalidade do K^+ livre intracelular é libertado; o consumo de O_2 utilizando o glicerol, succinato ou glucose como substratos é totalmente inibido com concentrações iguais ou superiores a 25 µM Cu^{2+}. Avaliei a viabilidade das células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} diluindo as amostras em água destilada e inoculando-as em «Agar Nutritivo» (Difco) (Trabalhos I e VIII). A actividade bactericida foi quantificada pela determinação das «Doses Letais» e dos «Tempos Letais» (Trabalho VIII e Anexo A). Após 15 min de tratamento 40 µM Cu^{2+}, 50 % das células são viáveis. Concentrações superiores resultam num aumento da mortalidade.

Os resultados obtidos indicam assim que a depleção das células em K^+ e a inibição da respiração estão provavelmente envolvidos na morte das células de *P. syringae* expostas ao Cu^{2+}, mas que existe uma gama de concentrações de Cu^{2+} que induzem a saída da *totalidade* do K^+ intracelular e inibem *completamente* a respiração de *todas* as células, mas só causam a morte de uma fracção da população. As células de *P. syringae* podem assim apresentar-se totalmente esvaziadas do seu K^+ intracelular e apresentar a respiração totalmente inibida, mas quando colocadas à superfície do agar nutritivo podem dar origem a colónias. Saliente-se que este fenómeno só ocorre numa determinada gama de concentrações de Cu^{2+}, já que concentrações superiores causam uma progressiva diminuição da percentagem de células viáveis; um tratamento das suspensões com 70 µM Cu^{2+} durante 15 min resulta na morte de aproximadamente 90 % das células (Trabalho VIII).

Pelo exposto na sub-secção 1.2. se conclui que uma célula bacteriana totalmente privada do seu K^+ intracelular, apresenta o metabolismo seriamente afectado. Se adicionalmente apresentar a respiração totalmente inibida, não é provável que, *nestas condições*, a célula seja capaz de se multiplicar. *Mas numa fracção da população este fenómeno ocorreu*, dado que algumas destas células deram origem a colónias. A explicação mais plausível para este facto é a de que nestas células, os iões cúpricos foram removidos dos locais inibitórios, restabelecendo-se então a

respiração e a acumulação de K^+.

Em células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}, experiências que realizei indicam que, em determinadas condições, a inibição da actividade respiratória é um fenómeno reversível: um tratamento das células com 20 μM Cu^{2+} resulta numa inibição severa do consumo de O_2 utilizando o glicerol como substrato; se após este tratamento se adicionar os agentes quelantes EDTA ou dietilditiocarbamato de sódio (DDC), a respiração do glicerol é restabelecida a níveis normais ou quase (Trabalho VIII). Observei ainda que, em determinadas condições, o efluxo de K^+ não é um fenómeno «imparável»: um tratamento das células com 20 μM Cu^{2+} resulta na libertação, ao fim de alguns minutos, da maioria do K^+ intracelular livre; se após o início da libertação do K^+ se adicionar EDTA ou DDC, o efluxo pára totalmente, alguns segundos depois (Trabalho VIII). A explicação mais provável para estes resultados é a de que as moléculas de EDTA ou DDC «sequestraram» os iões de cobre dos locais implicados na inibição da respiração e na indução do efluxo de K^+. Esta interpretação é apoiada pelos resultados obtidos por vários investigadores que mostraram que as moléculas de DDC são capazes de remover totalmente os iões de cobre fortemente ligados às moléculas da proteína Cu-Zn superóxido dismutase (*cf.* Trabalho VIII).

O meio de cultura utilizado para a avaliação da viabilidade das células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} não contem DDC ou EDTA, mas apresenta na sua constituição moléculas com elevada afinidade para os metais (*cf.* Anexo C e Trabalho IX). Sou assim levado a admitir que provavelmente as moléculas constituíntes do agar nutritivo removeram uma parte dos iões cúpricos ligados às células de *P. syringae*. É provável que a eficácia neste processo não seja igual nas células da população, já que o número de iões Cu^{2+} por célula e a acessibilidade destes às moléculas constituintes do meio de cultura utilizado para a determinação da viabilidade, não devem ser idênticas em todas as células. É ainda provável que exista um valor limiar para o número de iões Cu^{2+} ligados aos locais inibitórios, só acima do qual se verifica um efluxo de K^+ e uma inibição da respiração, apreciáveis (*cf.* subsecção 2.2.6.). Nas células em que os iões Cu^{2+} ligados aos locais inibitórios não foram removidos a valores inferiores a este valor limiar, o metabolismo não foi restabelecido, acarretando a morte celular.

A inviabilização de 90 % das células de *P. syringae*, após 15 min de tratamento, ocorre com aproximadamente 70 μM Cu^{2+} (Trabalho VIII). Esta concentração deve corresponder, na maioria das células, a uma ligação irreversível (*i. e.*, não susceptível de ser revertida pelas moléculas constituintes do meio utilizado na determinação da viabilidade das células) dos iões cúpricos aos locais inibitórios

relacionados com o efluxo de K^+ e a inibição da respiração.

Uma hipótese alternativa consiste em considerar que a morte das células de *P. syringae* expostas ao Cu^{2+} não foi causada directamente pelo esvaziamento das células em K^+ e pela inibição da respiração. Já referi que um tratamento com 40 µM Cu^{2+} durante 15 min resulta na morte da aproximadamente 50 % das células. É possível que o Cu^{2+} ligado aos locais inibitórios envolvidos no efluxo de K^+ e na inibição da respiração tenha sido removido a níveis tais, que a totalidade das células colocadas à superfície do meio de cultura utilizado na determinação da viabilidade celular, podesse re-acumular o K^+ e respirar normalmente. Metade da população não sobreviveu, no entanto, porque outras funções vitais tinham sido irreversivelmente inibidas.

McBrien & Hassall (1965) compararam o efluxo de K^+ induzido pelos iões cúpricos na alga verde *Chlorella vulgaris*, com a morte celular, tendo observado que um tratamento por 3 h com 0.25 ou 2.5 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$ resultava na libertação de 86 % do K^+ total, mas 39 - 41 % das células davam origem a colónias quando inoculadas em meio nutritivo. Estes investigadores não indicaram qual a composição do meio de cultura utilizado.

10. OS DANOS CAUSADOS PELA DODINA NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA DAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* SÃO A CAUSA PRIMEIRA DA MORTE.

As causas da morte das células de fungos expostas à dodina foram discutidas por Brown & Sisler (1960) e Somers (1963).

Brown & Sisler (1960) concluíram que as causas de morte, pela dodina, das células da levedura *Saccharomyces pastorianus* e do fungo filamentoso *Monilinia fructicola* eram diferentes: nas células de levedura, a morte parecia estar associada a alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática; pelo contrário, no fungo filamentoso, as concentrações de dodina que causavam a morte da quase totalidade das células, não induziam uma saída significativa de moléculas fosfatadas ou de amino-ácidos das células.

Somers (1963) comparou a germinação dos conídios de *Neurospora crassa* tratados com dodina, com a libertação de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e amino-ácidos, induzidos por este fungicida. A inibição da germinação ocorria com concentrações de dodina inferiores às que causavam uma saída significativa de materiais-absorvendo-a-260 nm e amino-ácidos das células. Na presença de 30 µg dodina ml^{-1}

(104 μM), a inibição da germinação era quase total, mas a libertação de aminoácidos e materiais-absorvendo-a-260 nm era semelhante ou ligeiramente superior à de células controlo. Somers concluíu que a actividade inibitória da dodina não deveria ser consequência directa de uma alteração da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática, mas antes deveria resultar de uma inibição de sistemas enzimáticos presentes nesta membrana.

Estudei quais as possíveis causas da morte das células de *P. syringae* expostas à dodina.

Após um breve tratamento com dodina, um aumento da concentração de detergente resulta num aumento concomitante da quantidade de K^+, fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose», libertados das células, e da percentagem de células não-viáveis (Trabalhos IV e VII). Nas condições experimentais utilizadas, os «materiais-absorvendo-a-260 nm» devem representar fundamentalmente as bases púricas e pirimídicas, nucleósidos, nucleótidos e RNAs de pequenas dimensões, libertados das células, e as «moléculas-contendo-ribose», os ribonucleósidos, ribonucleótidos e RNAs de pequenas dimensões (metabolitos do «pool»). Um incremento da concentração de dodina resulta assim num aumento dos danos causados na membrana citoplasmática e num aumento da mortalidade.

Em suspensões de *P. syringae* em água destilada, tratadas com dodina durante 15 min, as «Doses Letais» para a morte de 90, 99 e 99.9 % da população são de 49, 70 e 91 μM dodina, respectivamente (resultados que obtive pelo método descrito no Trabalho V, mas não incluídos na Tabela 1 deste trabalho). Uma avaliação dos danos causados na membrana citoplasmática das células expostas à dodina durante 15 min mostrou que a quantidade de K^+, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» libertadas das células é uma função sigmóide da concentração de dodina (entre 10 e 150 μM), e que com concentrações de dodina superiores a 70 μM, a quantidade de metabolitos libertados é mais de 95 % do máximo observado nesta gama de concentrações de detergente (Trabalho IV e resultados que obtive pelos métodos descritos neste trabalho, mas não incluídos na Fig. 2). Para avaliar a extensão da libertação dos metabolitos do «pool» das células tratadas com dodina, determinei a concentração destes metabolitos em suspensões controlo (não-tratadas), tendo obtido os seguintes valores: 80 μM K^+, 0.17 A_{260} e 16 μg RNA ml^{-1} (Trabalho II). Os resultados que apresento no Trabalho IV indicam portanto que um tratamento das células de *P. syringae* suspensas em água destilada com 70 μM dodina durante 15 min resulta na morte de aproximadamente 99 % da população, na libertação de 100 %

do K^+, 76 % das «moléculas-contendo-ribose» e 65 % dos «materiais-absorvendo-a-260 nm», presentes no «pool» das células. As concentrações de dodina que inviabilizam a grande maioria da população de *P. syringae* correspondem assim às que causam um efluxo da maioria dos metabolitos do «pool», indicando que a morte das células expostas à dodina é concomitante com uma alteração profunda e inespecífica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática.

Estudos de viabilidade indicaram que a morte causada pela dodina é um fenómeno rápido, e assim as alterações secundárias induzidas por este anfífilo (degradação dos ribossomas, lise celular e coagulação do citoplasma) não estão envolvidas na morte das células (Trabalho V). O aumento da mortalidade também é acompanhado por uma inibição crescente do consumo de O_2 utilizando o succinato como substrato, sugerindo que concentrações reduzidas deste detergente provavelmente também inibem sistemas enzimáticos da membrana citoplasmática (componentes da cadeia respiratória e/ou a H^+-ATP sintase) (Trabalho VII). Os resultados que obtive num estudo comparativo da inibição da respiração utilizando o glicerol ou o succinato como substratos, sugerem que ao aumentar a concentração de dodina, se verifica primeiro uma inibição da respiração devido a uma drenagem de cofactores, e posteriormente uma interacção directa com os componentes membranares do processo respiratório (Trabalho VII).

No seu conjunto, os resultados que obtive sugerem portanto que a morte das células de *P. syringae* pela dodina é uma consequência directa de alterações na estrutura e função da membrana citoplasmática.

Um tratamento das suspensões de *P. syringae* durante 15 min com 70 µM dodina resulta na absorção de 0.22 µmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$, uma quantidade de detergente superior à necessária para a formação de uma hipotética monocamada à superfície das células (*cf.* sub-secção 5.3.). Os resultados que obtive sugerem que esta camada monomolecular não se formou (*cf.* sub-secção 5.2.), mas esta comparação mostra que a morte das células e a danificação extensa da membrana citoplasmática ocorrem com a absorção de quantidades apreciáveis de dodina. É assim de admitir que a morte das células de *P. syringae* expostas à dodina ocorre quando os danos causados pelas moléculas deste detergente, na estrutura e função da membrana citoplasmática, são extensos e não podem ser reparados quando as células são colocadas à superfície do meio de cultura utilizado para a determinação do número de células viáveis.

A relação entre a danificação da membrana citoplasmática e a morte, em células bacterianas tratadas com detergentes catiónicos, é desde há muito objecto de discussão.

Few & Schulman (1953), num trabalho sobre o modo de acção da polimixina E em várias espécies bacterianas, observaram que um tratamento das células com este anfífilo catiónico resultava num rápido efluxo de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e numa concomitante morte das células. Após 20 min de tratamento, um aumento da concentração de polimixina, entre 5 e 30 $\mu g\ ml^{-1}$, resultava numa diminuição do número de células viáveis e num aumento da quantidade de materiais-absorvendo-a-260 nm libertados das células; para concentrações de anfífilo inferiores às necessárias para causar 99 % de morte, a quantidade de materiais-absorvendo-a-260 nm libertados das células era directamente proporcional à percentagem de células mortas. A morte de mais de 99 % das células correspondia ao efluxo de 62 a 68 % do máximo de materiais-absorvendo-a-260 nm libertados das células pela acção deste anfífilo. Estes resultados sugerem assim que a danificação da membrana citoplasmática é a causa primeira da morte das células tratadas por polimixina E. Esta interpretação é apoiada pela observação de que nas estirpes resistentes a este agente químico, a libertação de materiais-absorvendo-a-260 nm é reduzida. Em *Fseudomonas aeruginosa*, Newton (1956) também observou que, enquanto que nas estirpes sensíveis, a polimixina induzia uma libertação acentuada de materiais-absorvendo-a-260 nm, nas estirpes resistentes, o efluxo destes materiais era reduzido. Storm *et al.* (1977), num artigo de revisão sobre as polimixinas e antibióticos relacionados, concluíram que as alterações na permeabilidade causadas por estes anfífilos catiónicos são suficientes para explicar todos os efeitos bioquímicos.

Salton (1951), num trabalho sobre o modo de acção do brometo de cetiltrimetilamónio (CTAB) em células bacterianas, também observou que após 5 min de tratamento com concentrações de CTAB inferiores às necessárias para causar 99.99 % de mortalidade, a quantidade de «materiais-absorvendo-a-260 nm» libertados das células era proporcional à percentagem de células mortas. Os resultados obtidos levaram Salton a propôr que a causa primária da morte das células pela CTAB não devia consistir numa inibição específica de determinadas enzimas, mas antes na drenagem de metabolitos para o exterior das células e numa inibição generalizada de sistemas enzimáticos.

Os resultados referidos por Hugo & Longworth (1964a) sobre a acção da clorohexidina em *Escherichia coli* e *Staphyloccocus aureus* indicam que, ao contrário

do observado com a dodina, CTAB e polimixina, a morte das células destas espécies bacterianas só ocorre com concentrações de clorohexidina muito superiores às necessárias para induzirem um acentuado efluxo de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e pentoses.

11. A RELAÇÃO ENTRE OS DANOS CAUSADOS NA MEMBRANA CITOPLASMÁTICA E A VIABILIDADE, EM CÉLULAS EUCARIÓTICAS TRATADAS COM ANTIBIÓTICOS DE POLIENO. AS CONDIÇÕES QUE INFLUENCIAM A DETERMINAÇÃO DA VIABILIDADE DAS CÉLULAS EXPOSTAS AOS ANTIBIÓTICOS DE POLIENO.

Um dos trabalhos pioneiros neste campo foi o de Borowski & Cybulska (1967), em que se estudou a influência da presença de K^+ no meio de diluição e de determinação da concentração celular, na viabilidade de células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com N-succinil perimicina. Este antibiótico de polieno causa uma alteração muito específica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células eucarióticas, dado que induz, ao contrário de muitos outros antibióticos de polieno, um efluxo de K^+, mas não de pequenas moléculas. Células desta levedura, suspensas em tampão com 0.1 M KCl, foram tratadas com este antibiótico. Após 2 h, a viabilidade foi determinada utilizando dois métodos distintos: diluição das amostras em água destilada e inoculação em meio nutritivo sem K^+; ou diluição em 0.1 M KCl e inoculação num meio ao qual se tinha adicionado 0.1 M KCl. A diferença entre os resultados obtidos com estes dois métodos foi notória: se as suspensões tratadas fossem diluídas e inoculadas num meio com K^+, a concentração celular só era ligeiramente inferior à observada em suspensões não tratadas; pelo contrário, a ausência de K^+ do meio de suspensão e de determinação da viabilidade, tinha como consequência uma redução superior a mil vezes no número de células viáveis. A morte das células por depleção do K^+ intracelular foi designada por estes investigadores de «potassiumless death».

A primeira alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática das células de *Saccharomyces cerevisiae* após a adição do antibiótico de polieno, candicidina, consiste num efluxo de K^+ e de Mg^{2+}. As concentrações de candicidina que induzem um esvaziamento das células em K^+ e Mg^{2+} não causam uma saída significativa de fosfato inorgânico, amino-ácidos, uridina e «materiais-absorvendo-a-260 nm», indicando que este antibiótico causa uma alteração específica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática (Liras & Lampen, 1974a, 1974b). No trabalho de

Liras & Lampen (1974b) foi estudada a influência da presença de K^+ ou Mg^{2+} no meio de cultura, no metabolismo de células desta levedura tratadas com candicidina. Se as células eram tratadas com 0.06 µg candicidina ml^{-1}, a síntese proteica e o consumo de glucose, ao fim de 1 h de tratamento, eram 12 e 60 %, respectivamente, do observado em células não tratadas. Se o meio em que decorria o tratamento continha uma mistura de cofactores (K^+, NH_4, Mg^{2+}, ATP, TPP, NAD e piruvato), os valores eram de 30 e 106 % do controlo, respectivamente, mas se a esta mistura se retiravam os iões inorgânicos, os valores eram só ligeiramente superiores aos observados na ausência de qualquer cofactor (15 e 68 %, respectivamente). Se a mistura continha 85 mM KCl e 45 mM $MgCl_2$, o tratamento com candicidina só resultava numa redução de 10 % na taxa de síntese proteica (em relação a células não tratadas), não se observando qualquer redução na taxa de crescimento. A presença de K^+ e Mg^{2+} no meio de cultura também evitava a inibição do transporte de aminoácidos causada pela candicidina, e a inibição da síntese proteica induzida pelos antibióticos de polieno, anfotericina B e N-succinilfungimicina.

Hammond & Kliger (1976) estudaram o efeito da presença de catiões monovalentes e divalentes, na actividade inibitória da candicidina nas células da levedura *Candida albicans*. Um tratamento com 20 µg candicidina ml^{-1} resultou na morte de 99.9 % das células em 30 min, mas se ao meio se adicionava 0.1 M KCl este tempo era de 90 min, e com 0.1 M $CaCl_2$, 120 min; os iões Mg^{2+} não eram efectivos. Um tratamento com 50 µg candicidina ml^{-1} resultou numa redução significativa do consumo de oxigénio utilizando a glucose como substrato, mas na presença de 0.1 M KCl ou NH_4Cl, a inibição era reduzida (o Ca^{2+} e o Mg^{2+} não eram efectivos). Apesar de o K^+ reduzir a actividade fungicida deste antibiótico, este catião não diminuía a quantidade de candicidina absorvida pelas células. Os iões K^+ e NH^+_4 são indispensáveis em várias vias metabólicas, pelo que a sua drenagem das células deve resultar em importantes alterações fisiológicas, nomeadamente, da glicólise, como foi observado. A presença de K^+ ou NH^+_4 no sobrenadante das células tratadas com candicidina antagonizava o efeito deste antibiótico, não porque evitava uma alteração da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática, mas porque estes iões entravam nas células e substituíam os iões drenados para o exterior.

Malewicz *et al.* (1981) estudaram em pormenor as condições necessárias para se repararem as alterações causadas pelo éster trimetilamónio metilo do polieno aureofacina, na permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática de células eucarióticas. Se as células eram tratadas com concentrações sub-letais deste polieno (0.2 µg ml^{-1}) e transferidas para um meio contendo 37 mM K^+, estas re-

acumulavam o K^+ intracelular a níveis normais, 2 h mais cedo do que células colocadas num meio contendo 2.5 mM K^+. Se as células eram tratadas com concentrações letais do polieno (0.5 $\mu g\ ml^{-1}$) e transferidas para um meio contendo 2.5 mM K^+, estas rapidamente perdiam a viabilidade, mas se o meio continha 37 mM K^+, as células eram capazes de crescer e multiplicar-se. Se as células eram tratadas com doses hiper-letais do polieno (superiores a 0.5 $\mu g\ ml^{-1}$), a reversão, pela presença de K^+, dos efeitos tóxicos do derivado da aureofacina, dependia do tempo de actuação e da concentração do polieno: com um tratamento com 1 $\mu g\ ml^{-1}$, se após 30 min de tratamento, as células fossem transferidas para um meio isento de antibiótico, mas com 37 mM K^+, as células mantinham-se viáveis. Para o restabelecimento da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática era indispensável a presença de energia: a falta de uma fonte energética exterior facilmente utilizável, ou a presença de condições que inibiam a produção de energia (temperaturas baixas), retardavam ou anulavam o processo de reparação. A presença de cicloheximida (inibidor da síntese proteica) não evitava uma recuperação total das células tratadas, sugerindo que neste processo não deviam participar enzimas sintetizadas *de novo*. Foi ainda estudada a influência, na viabilidade celular, da presença de uma concentração elevada de K^+ no meio de incubação, após tratamento com treze antibióticos de polieno diferentes. Nas células pré-tratadas com anfotericina B ou aureofacina (e seus derivados N-glicosilo e éster metilo trimetilamónio, entre outros antibióticos), a presença de K^+ no meio de cultura diminuía significativamente os efeitos tóxicos destes antibióticos; pelo contrário, a presença de uma concentração elevada de K^+ no meio de incubação das células pré-tratadas com filipina (entre outros antibióticos) não resultava em qualquer aumento da percentagem de células viáveis.

Os resultados citados indicam assim que o K^+ pode antagonizar significativamente os efeitos biocidas de antibióticos de polieno como a perimicina, candicidina, anfotericina B e aureofacina. Estes antibióticos de polieno causam uma alteração específica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células eucarióticas, induzindo um esvaziamento das células em pequenos iões (K^+, Mg^{2+}), mas não causando uma saída significativa de outros metabolitos do pool (Liras & Lampen, 1974a). A dodina, pelo contrário, causa uma alteração inespecífica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática. Após um tratamento com antibióticos de polieno como a filipina, que causam uma danificação extensa da membrana citoplasmática, com um acentuado efluxo de K^+, Mg^{2+}, fosfato inorgânico e

amino-ácidos (Liras & Lampen, 1974a), a presença de K^+ no meio de cultura ou de determinação da viabilidade *per se*, não antagoniza significativamente os efeitos biocidas destes antibióticos (Liras & Lampen, 1974b; Malewicz *et al.*, 1981). Mas nestes antibióticos de polieno (e na dodina), o que seria interessante verificar é se a presença, no meio de cultura, suspensão ou determinação da viabilidade, de moléculas que tenham sido drenadas para o exterior das células (fosfato inorgânico, amino-ácidos e cofactores, nomeadamente) antagoniza os efeitos biocidas destes agentes químicos, causando uma redução da mortalidade.

Kotler-Brajtburg *et al.* (1977) realizaram um estudo comparativo sobre o efluxo de K^+ e a viabilidade de células «L» e «HeLa» tratadas com anfotericina B ou filipina. A um aumento da concentração de anfotericina B correspondeu um aumento muito mais acentuado da percentagem de K^+ libertado, do que da percentagem de células mortas: um tratamento das células L com concentrações superiores a 40 μg anfotericina B ml^{-1} resultou na libertação da grande maioria do K^+ celular, no entanto mais de 30 % das células eram viáveis. A um aumento da concentração de filipina, pelo contrário, correspondeu um aumento concomitante da percentagem de K^+ libertado e de células mortas. A libertação da grande maioria do K^+ intracelular e a morte da maioria da população, ocorriam com concentrações semelhantes de filipina. Foi ainda estudado se as células tratadas com anfotericina B ou filipina, e pós-incubadas num meio desprovido de antibiótico, eram capazes de re-acumular o potássio. Os efeitos destes dois antibióticos foi novamente marcadamente diferente. Se após tratamento com anfotericina B durante 0.5 h, as células eram pós-incubadas num meio isento de antibiótico, estas apresentavam, ao fim de 1 h, um conteúdo de K^+ quase normal. Nas células tratadas com filipina, pelo contrário, o conteúdo em K^+ após a incubação num meio isento de antibiótico era significativamente inferior ao normal. Estes resultados indicavam assim, que as células tratadas com anfotericina B tinham re-acumulado o K^+ a níveis semelhantes aos de células controlo, mas que só uma fracção das células tratadas com filipina tinha mantido esta capacidade.

Num trabalho publicado posteriormente, Kotler-Brajtburg *et al.* (1979) estudaram a relação entre o efluxo de K^+, e a viabilidade de células de levedura, ou a hemólise de eritrócitos de rato, tratados com diferentes antibióticos de polieno. Quanto à relação entre o efluxo de K^+ e a viabilidade/hemólise, os vinte antibióticos testados formavam dois grupos bem distintos: nuns antibióticos, a percentagem do K^+ intracelular libertado era muito superior à percentagem de células mortas ou hemolisadas; noutros, a um aumento da concentração de antibiótico

correspondia um aumento concomitante da quantidade de K^+ libertado e do número de células inviáveis ou da quantidade de hemoglobina libertada. A relação entre a capacidade de induzir um efluxo de K^+, e inviabilizar ou hemolisar as células, foi quantificada pela determinação da razão entre a concentração necessária para inviabilizar 50 % da população ou libertar 50 % da hemoglobina, e a necessária para libertar 50 % do K^+ intracelular. Enquanto que no primeiro grupo de antibióticos, o valor desta razão era superior a 3.5 - 5, no segundo grupo era igual ou inferior a 2. No primeiro grupo incluiam-se nomeadamente a anfotericina B e a candicidina, e no segundo, a filipina.

Os resultados obtidos nos trabalhos de B. Malewicz e J. Kotler-Brajtburg e seus colaboradores, indicam assim que os antibióticos de polieno podem ser classificados em dois grandes grupos principais. Nas células tratadas com anfotericina B, aureofacina ou candicidina (entre outros), a percentagem do K^+ intracelular libertado é muito superior à percentagem das células inviáveis; se as células tratadas forem incubadas na ausência de antibiótico, são capazes de re-acumular o potássio intracelular a níveis normais ou quase; a presença de K^+ no meio de pós-incubação diminui significativamente a mortalidade. Pelo contrário, nas células tratadas com filipina (entre outros), a percentagem do K^+ intracelular libertado é semelhante à percentagem de células mortas; quando colocadas num meio isento de antibiótico, as células tratadas só parcialmente re-acumulam o K^+ intracelular; a presença de concentrações elevadas de K^+ após o tratamento com o antibiótico não antagoniza os seus efeitos letais.

É interessante constatar que esta classificação dos antibióticos de polieno também tem correspondência com o tipo e dimensões da molécula do antibiótico, com o tipo de alterações da permeabilidade da membrana citoplasmática, e com o tipo e dimensões dos poros formados em membranas celulares. Assim, enquanto que as moléculas de anfotericina B e candicidina são heptaenos (massa molecular superior a 900), com um anel de grandes dimensões, a filipina é um pentaeno (massa molecular inferior a 700), com um anel central muito menor (Hamilton-Miller, 1973; Malewicz *et al.*, 1981). Enquanto que a anfotericina B e a candicidina causam uma lesão específica da membrana citoplasmática com um efluxo quase exclusivo de pequenos iões, a filipina induz uma perda generalizada da permeabilidade selectiva desta membrana (Liras & Lampen, 1974a). Segundo Van Hoogevest & De Kruijff (1978) e Kasumov *et al.* (1979), as moléculas de anfotericina B, quando inseridas em membranas fosfolipídicas artificiais, formam poros de diâmetro muito reduzido. Pelo contrário, Kinsky *et al.* (1967) observaram que em membranas isoladas de eritrócitos,

as moléculas de filipina podiam induzir a formação de orifícios com um diâmetro interno de 80 - 250 Å. Neste trabalho não se realizou um estudo comparativo entre as alterações ultrastruturais e de permeabilidade. No entanto, o facto de a filipina poder induzir a formação, em bicamadas celulares, de orifícios de grande dimensões, indica que este antibiótico pode causar lesões «grosseiras» da membrana citoplasmática, que podem ser a causa do esvaziamento das células em pequenas moléculas, como foi observado por vários investigadores.

Nas células eucarióticas tratadas com filipina (como nas células de *P. syringae* tratadas com dodina), a quantidade de K^+ libertado indica assim a extensão dos danos causados na estrutura da membrana citoplasmática, e quando estes atingem um determinado nível, a alteração da permeabilidade torna-se irreversível, acarretando a morte da célula. Um aumento da concentração de filipina (ou de dodina) traduz-se assim por um aumento concomitante do número de células inviáveis (*cf.* secção 10.).

Os resultados obtidos em *P. syringae* permitem calcular, para o Cu^{2+} e para a dodina, os valores do parâmetro utilizado no trabalho de Kotler-Brajtburg *et al.* (1979): a razão entre a concentração de Cu^{2+} ou dodina que causa nas células de *P. syringae* uma redução da viabilidade em 50 %, e a concentração que induz a libertação de 50 % do máximo de K^+ libertável. Os valores são de 3.8 para o Cu^{2+} e 1.8 para a dodina (valores para um tratamento durante 15 min; o valor do Cu^{2+} refere-se a células suspensas em tampão PIPES e foi calculado utilizando resultados contidos nos Trabalhos II e VIII; o valor da dodina refere-se a células suspensas em água destilada e foi calculado utilizando resultados contidos no Trabalho IV). É interessante constatar que para a dodina, que induz uma alteração inespecífica da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática com um efluxo muito acentuado de metabolitos do pool, o valor desta razão é, assim como para a filipina, inferior a 2. Pelo contrário, para o Cu^{2+}, que induz um efluxo da maioria do K^+ intracelular, mas uma libertação muito restrita de pequenas moléculas, o valor desta razão é, assim como para a anfotericina B, aureofacina e candicidina, superior a 3.5.

RESULTADOS E CONCLUSÕES PRINCIPAIS

1.- Estudaram-se alguns aspectos do modo da acção antibacteriana do Cu^{2+} e do detergente catiónico monoacetato de dodecilguanidina (dodina) nas células da bactéria fitopatogénica *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. Foram estudadas as alterações da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática e do consumo de oxigénio utilizando diversos substratos, a absorção passiva daqueles agentes pelas células, e as alterações ultrastruturais e de viabilidade.

Utilizou-se em todas as experiências uma mesma suspensão-padrão de *P. syringae*. As células foram cultivadas num meio semi-sintético contendo sais, extracto de levedura e glicerol; no fim da fase exponencial, as células foram separadas por centrifugação e suspensas em água destilada, tampão Pipes ou tampão dimetilglutarato, de forma que a suspensão apresentasse uma densidade óptica de 1.06 a 568 nm. Antes de ser utilizada, esta suspensão foi diluída 9:10, apresentando a suspensão-padrão 10^{9} unidades formadoras de colónias ml^{-1}, correspondendo a 0.28 mg peso seco ml^{-1}.

2.- A cinética do efluxo de K^{+} foi estudada utilizando dois métodos distintos: separação das células do sobrenadante por filtragem, e doseamento, por espectrometria de chama, do K^{+} no sobrenadante; doseamento *in situ* do K^{+} extracelular utilizando um eléctrodo sensível ou específico para o K^{+}. Usando esta segunda técnica foi possível estudar em pormenor a cinética do efluxo de K^{+} induzido pelo Cu^{2+} e pela dodina nas células de *P. syringae*. Uma análise dos trabalhos publicados sobre o efluxo de K^{+} induzido por agentes químicos revelou que os parâmetros até agora utilizados para a caracterização deste fenómeno são insuficientes, e em alguns casos de difícil interpretação. Foi assim necessário definir novos parâmetros para o efluxo de K^{+}, tendo considerado útil a utilização dos seguintes: «Taxa de efluxo», «Taxa máxima de efluxo» e «Tempo para taxa máxima». O cálculo destes novos parâmetros foi particularmente vantajoso no estudo do efluxo de K^{+} induzido pela dodina, dado que foi possível relacionar a intensidade e velocidade da libertação do K^{+} intracelular com a formação de micelas deste detergente.

3.- Os catiões metálicos diferem na sua capacidade em induzir o efluxo do K^{+} livre intracelular das células de *P. syringae*. O tratamento das células com Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} ou Zn^{2+} (a concentrações até 0.1 mM), não

resulta num efluxo significativo, mas o Cu^{2+} e o Hg^{2+} induzem uma saída muito acentuada de K^+.

4.- Um tratamento das suspensões de *P. syringae* com concentrações iguais ou superiores a 15 μM Cu^{2+} resulta numa libertação significativa do K^+ intracelular. A cinética do efluxo de K^+ segue um padrão sigmóide: após a adição do Cu^{2+}, a taxa de efluxo aumenta com o tempo; após se ter atingido uma taxa máxima, esta diminui progressivamente até ao valor zero. Quando a taxa de efluxo é representada em função do tempo, obtem-se assim uma curva em forma de sino. O processo da libertação do K^+ completa-se essencialmente em, no máximo, 15 min.

A um aumento da concentração de Cu^{2+}, entre 15 e 40 μM, corresponde um aumento da taxa máxima de efluxo e da quantidade de K^+ libertado, e uma diminuição do tempo necesário para se atingir a taxa máxima. A quantidade de K^+ libertado ao fim de 15 min de tratamento é uma função sigmóide da concentração de Cu^{2+}. Um tratamento das células com 30 - 40 μM Cu^{2+} durante 15 min resulta na libertação da grande maioria ou totalidade do K^+ livre intracelular.

5.- Num processo do tipo «tudo-ou-nada», quando a susceptibilidade dos membros da população apresenta uma distribuição normal, a percentagem de resposta é uma função sigmóide da dose do agente químico ou do tempo de tratamento. Estas curvas podem ser convertidas em rectas pela transformação «probit». Quando as quantidades de K^+ libertado após a adição de uma determinada concentração de Cu^{2+} são convertidas em percentagem do máximo observado com esta concentração de Cu^{2+}, e estes valores transformados em probits, e representados em função do logaritmo do tempo, os valores distribuem-se segundo uma linha recta. Quando as quantidades finais de K^+ libertado pelo tratamento com determinadas concentrações de Cu^{2+} são convertidas em percentagem do máximo observado após tratamento com iões cúpricos, e estes valores transformados em probits e representados em função do logaritmo da concentração de Cu^{2+}, os valores também se distribuem segundo uma linha recta. O efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} em *P. syringae* é assim provavelmente um processo do tipo «tudo-ou-nada», mas a confirmação desta hipótese aguarda uma quantificação directa do conteúdo de K^+ em células individuais.

6.- Concentrações micromolares de Hg^{2+} também induzem a libertação da grande maioria do K^+ livre intracelular das células de *P. syringae*. A fase inicial do processo de efluxo induzido pelo Hg^{2+} é mais lenta do que a induzida pelo Cu^{2+}. Se

as células são pré-tratadas com Hg^{2+}, uma adição de Cu^{2+} não altera a cinética do efluxo de K^+ induzido pelos iões de mercúrio, sugerindo que estes têm maior afinidade que os iões cúpricos para os locais envolvidos no processo de efluxo de K^+. A N-etilmaleimida também causa uma saída significativa de K^+, mas a concentrações muito superiores às de Cu^{2+} ou Hg^{2+}, e a uma velocidade muito inferior à observada após tratamento com estes catiões divalentes.

7.- Os iões cúpricos também causam um efluxo de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» (quantificados pela absorvência a 260 nm) e «moléculas-contendo-ribose» (quantificadas pela reacção do orcinol) das células de *P. syringae*. Após 15 min de tratamento com 10 - 50 μM Cu^{2+}, a quantidade destes metabolitos libertados das células é uma função sigmóide da concentração de Cu^{2+}. Nas condições experimentais utilizadas, os «materiais-absorvendo-a-260 nm» devem representar essencialmente, bases púricas e pirimídicas, nucleósidos, nucleótidos, e RNAs de pequenas dimensões, libertados das células. As «moléculas-contendo-ribose» devem representar fundamentalmente, ribonucleósidos, ribonucleótidos e RNAs de pequenas dimensões, libertados das células. A saída de K^+ das células expostas ao Cu^{2+} é portanto acompanhada da libertação de outros metabolitos do «pool», alguns dos quais são moléculas aniónicas, como o fosfato inorgânico, os nucleótidos e o RNA. No sobrenadante das células tratadas com Cu^{2+}, não se detectou a presença dos ácidos glutâmico ou aspártico.

Para se avaliar a extensão da libertação dos metabolitos do «pool» nas células tratadas com Cu^{2+}, determinou-se a concentração destes metabolitos em células controlo (por extracção, a frio, com ácido perclórico). Os resultados obtidos permitem concluir que o Cu^{2+} causa o efluxo da totalidade do K^+ intracelular, mas só uma pequena fracção dos restantes metabolitos é libertada das células, indicando que os iões cúpricos causam uma alteração específica e restrita da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*.

8.- Se o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} tivesse como finalidade restabelecer a carga eléctrica das células, o número de iões K^+ libertados deveria ser igual ao dobro do número de iões Cu^{2+} absorvidos. Pelo contrário, no balanço K^+ libertado - Cu^{2+} absorvido, as células de *P. syringae* apresentam um grande défice de cargas positivas, sugerindo a existência de outras trocas iónicas. O facto de a um aumento da concentração de Cu^{2+} corresponder um aumento concomitante da quantidade de K^+, fosfato inorgânico, materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose,

libertados das células, e de não terem sido detectados no sobrenadante das células tratadas amino-ácidos aniónicos, sugere que a saída de moléculas aniónicas do «pool», apesar de restrita, participa no restabelecimento da carga eléctrica das células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+}.

9.- Concentrações micromolares de Cu^{2+} também causam uma acentuada plasmólise das células de *P. syringae*. Após a adição de 50 μM Cu^{2+}, a densidade óptica aumenta durante 20 min, e depois estabiliza-se. Para um determinado tempo de tratamento, a um aumento da concentração de Cu^{2+} corresponde um aumento da densidade óptica. Por microscopia óptica e por microscopia electrónica de transmissão confirmou-se que o incremento da densidade óptica corresponde de facto a uma contracção do citoplasma das células.

A plasmólise ocorre em células suspensas em água destilada ou tampão Ca^{2+}-Pipes ou Mg^{2+}-Pipes, mas não em células suspensas em tampão Na^{+}-Pipes. Se às células suspensas nos três primeiros meios se adiciona Na^{+}, as células não plasmolizam, mas a adição de Ca^{2+} ou Mg^{2+} a células suspensas em água destilada não impede a plasmólise. O K^{+} e o Li^{+} também evitam a plasmólise induzida pelo Cu^{2+} em células suspensas em água destilada, Ca^{2+}-Pipes ou Mg^{2+}-Pipes.

A plasmólise induzida pelo Cu^{2+} é provavelmente uma consequência directa do esvaziamento das células em K^{+}, e esta não ocorre na presença de catiões monovalentes no sobrenadante, dado que estes são transportados para o interior das células restabelecendo, pelo menos parcialmente, a pressão osmótica interna. Os resultados obtidos estão assim de acordo com a noção fundamental apresentada por vários investigadores, segundo a qual o K^{+} é o principal responsável pela elevada pressão osmótica interna das células bacterianas.

A plasmólise induzida pelo Cu^{2+} foi quantificada pela análise de cortes ultra-finos observados por microscopia eléctronica de transmissão. A um aumento da concentração de Cu^{2+} corresponde um aumento da percentagem de células plasmolizadas, mas não da intensidade da plasmólise nas células afectadas. Assim como a quantidade de K^{+} libertado, também a percentagem de células plasmolizadas é uma função sigmóide da concentração de Cu^{2+}. A distribuição do índice de plasmólise na população de células afectadas é semelhante nas diferentes concentrações de Cu^{2+}. A plasmólise induzida pelo Cu^{2+} em *P. syringae* é assim provavelmente um fenómeno do tipo «tudo-ou-nada». Se a plasmólise fosse uma resposta gradual, um aumento da concentração de Cu^{2+} deveria resultar num aumento da intensidade da plasmólise nas

células afectadas e um deslocamento da distribuição do índice de plasmólise para valores mais elevados.

10.- Um tratamento das células de *P. syringae* com Cu^{2+} resulta também numa inibição do consumo de O_2 utilizando o glicerol, glucose ou succinato como substratos. O padrão da inibição da respiração destas substâncias é semelhante: a adição de 5 - 10 μM Cu^{2+} causa um aumento da taxa respiratória, mas concentrações superiores são inibitórias. A adição de 20 - 25 μM Cu^{2+} resulta numa cessação total do consumo de O_2, ao fim de alguns minutos. A inibição do consumo de O_2 deve-se provavelmente a uma inibição de componentes da cadeia respiratória e/ou da H^+-ATP sintase.

11.- A absorção passiva do Cu^{2+} pelas células de *P. syringae* é um processo rápido. A um aumento da concentração inicial de Cu^{2+} (entre 10 e 200 μM) corresponde um aumento da quantidade de Cu^{2+} absorvido. Na presença de 200 μM Cu^{2+}, as células absorvem quantidades elevadas deste metal (0.381 μmol (mg peso seco)$^{-1}$), aproximadamente 2.4 % do seu peso seco (corresponde a uma concentração intracelular de 60 mM e um factor de concentração de 300 vezes, assumindo uma distribuição uniforme dos iões cúpricos nas células), e estes níveis de absorção são ainda inferiores aos da saturação das células.

Os níveis de absorção passiva do Cu^{2+} e do Hg^{2+} pelas células de *P. syringae* são semelhantes, muito superiores aos do Cd^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}. Um tratamento das células com Ca^{2+} ou Mg^{2+}, pelo contrário, não resulta numa absorção significativa destes metais. Existe uma correlação entre os níveis de absorção dos metais pelas células de *P. syringae*, e a afinidade destes para a formação de ligações simples com os grupos funcionais mais abundantes nas células e para a formação de quelatos, sugerindo que a absorção passiva destes catiões divalentes pelas células é determinada essencialmente pela afinidade destes para os mencionados locais de ligação.

Um pré-tratamento das células com Hg^{2+} ou N-etilmaleimida, agentes com uma elevadíssima afinidade para os grupos sulfidrilo, resulta numa redução significativa da quantidade de Cu^{2+} absorvido pelas células de *P. syringae*. Uma fracção (aprox. 10 %) do Cu^{2+} absorvido deve encontrar-se ligado a grupos sulfidrilo. O Ca^{2+} e o Mg^{2+} só reduzem significativamente os níveis de absorção do Cu^{2+}, se presentes em concentrações muitíssimo mais elevadas que os iões cúpricos.

Considerando os elevados níveis de absorção do Cu^{2+} e do Hg^{2+} pelas células

de *P. syringae*, a relativa facilidade em obter quantidades apreciáveis desta biomassa, e a toxicidade destes metais, é de admitir que estas células (e provavelmente as de outras espécies) possam ser utilizadas como bio-absorventes destes metais em sistemas naturais poluídos.

12.- Um tratamento das células de *P. syringae* durante 15 min com concentrações iguais ou superiores a 25 - 40 μM Cu^{2+} resulta portanto na libertação da grande maioria do K^+ intracelular e na inibição total do consumo de O_2. A viabilidade das células foi determinada diluindo as amostras em água destilada e inoculando-as em agar nutritivo (Difco). Após 15 min de tratamento com 40 μM Cu^{2+}, aproximadamente 50 % das células são viáveis. Concentrações superiores causam um progressivo aumento da mortalidade.

A depleção das células em K^+ e a inibição da respiração estão assim provavelmente envolvidas na morte das células de *P. syringae* expostas ao Cu^{2+}, mas existe uma gama de concentrações de Cu^{2+} que induzem a saída da *totalidade* do K^+ intracelular e inibem *completamente* a respiração de *todas* as células, mas só causam a morte de uma fracção da população. Uma célula bacteriana que se encontra privada do seu K^+ intracelular e apresenta a respiração inibida, tem o seu metabolismo seriamente afectado, e não é provável que, *nestas condições*, seja capaz de se multiplicar. *Mas numa fracção da população este fenómeno ocorreu*, dado que algumas destas células deram origem a colónias.

A adição às células de *P. syringae* expostas ao Cu^{2+} dos agentes quelantes dietilditiocarbamato de sódio e ácido etilenodiaminotetracético pode resultar numa paragem da saída do K^+ intracelular e no restabelecimento da respiração. Foi mostrado por vários investigadores que o dietilditiocarbamato pode remover os iões cúpricos firmemente ligados a moléculas orgânicas complexas. É assim de admitir que estes agentes quelantes tenham «sequestrado» os iões de cobre dos locais implicados na inibição da respiração e na indução do efluxo de K^+.

O meio de cultura utilizado para a avaliação da viabilidade das células tratadas com Cu^{2+} não contem estes agentes quelantes, mas apresenta na sua composição extracto de carne e peptona, e estes ingredientes contêm moléculas com elevada afinidade para os catiões metálicos. A explicação mais plausível para os resultados obtidos é a de que as moléculas constituintes do agar nutritivo removeram uma parte dos iões cúpricos ligados às células de *P. syringae*. Restabeleceu-se então a respiração e as células poderam re-acumular o K^+ a níveis suficientes para se retomar o metabolismo normal. É de admitir que a eficácia neste processo

não seja idêntica em todas as células da população, e que exista um valor limiar para o número de iões Cu^{2+} ligados aos locais inibitórios, só acima do qual os efeitos são sensíveis. Nas células em que os iões Cu^{2+} ligados aos locais inibitórios não foram removidos em número suficiente, o metabolismo não foi restabelecido, acarretando a morte celular. A inviabilização de 90 % da população, após 15 min de tratamento, ocorre com aproximadamente 70 μM Cu^{2+}. Esta concentração deve corresponder, na maioria das células, a uma ligação irreversível (*i. e.* não susceptível de ser revertida pelas moléculas constituintes do meio de plaqueamento) dos iões cúpricos aos locais inibitórios relacionados com o efluxo de K^+ e a inibição da respiração.

Uma hipótese alternativa consiste em considerar que a morte não foi directamente causada pelo esvaziamento das células em K^+ e pela inibição da respiração. O Cu^{2+} ligado aos locais inibitórios do efluxo de K^+ e da inibição da respiração pode ter sido removido das células a níveis tais que estas poderam re-acumular o K^+ e voltar a respirar normalmente. A morte de metade das células tratadas com 40 μM Cu^{2+} durante 15 min resultaria de terem sido afectadas irreversivelmente outras funções vitais.

13.- A actividade antibacteriana do Cu^{2+} foi também estudada em células de *P. syringae* em crescimento activo em meio de cultura. Em «Nutrient Broth» (Difco) com 2.5 x 10^7 células ml^{-1}, a «Concentração Inibitória Mínima» é de 0.8 mM e a «Concentração Bactericida Mínima» é de 1 mM. A actividade bactericida do Cu^{2+} é muito mais intensa em células suspensas em água destilada ou tampão Pipes, do que em células em crescimento em meio de cultura, provavelmente devido ao facto dos contituintes dos meios de cultura terem ligado uma parte significativa dos iões cúpricos, reduzindo assim substancialmente a concentração de iões disponíveis para interacção com as células.

14.- Um tratamento das suspensões de *P. syringae* com concentrações de dodina iguais ou superiores a 15 μM resulta numa libertação do K^+ livre intracelular, processo que se completa essencialmente em, no máximo, 15 min de tratamento.

Um tratamento com 15 ou 20 μM dodina resulta numa reduzida libertação de K^+, mas concentrações superiores causam uma acentuada libertação deste metabolito. A quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento e a taxa máxima de efluxo aumentam pronunciadamente quando a concentração de dodina atinge a concentração micelar crítica, sugerindo que são as micelas os principais agentes danificadores da

membrana citoplasmática. Um tratamento durante 15 min com concentrações de dodina superiores a 40 μM resulta na libertação da grande maioria do K^+ livre intracelular.

15.- A dodina também causa uma saída pronunciada de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose», das células de *P. syringae*. Um tratamento durante 15 min com concentrações iguais ou superiores a 40 μM dodina resulta na libertação da maioria dos materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose contidos no «pool» das células, indicando que, ao contrário dos iões cúpricos, a dodina induz uma alteração inespecífica e extensa da permeabilidade selectiva da membrana citoplasmática das células de *P. syringae*.

16.- Um tratamento das células de *P. syringae* com dodina resulta também numa inibição do consumo de O_2 utilizando o glicerol ou o succinato. Com ambos os substratos, a adição de 5 μM dodina causa um aumento da taxa respiratória, mas concentrações superiores são inibitórias. O consumo de O_2 cessa completamente na presença de 30 - 40 μM dodina. Ao contrário dos iões cúpricos, a inibição da oxidação do succinato pela dodina ocorre a concentrações superiores às necessárias para inibir a respiração do glicerol. A dodina induz uma saída pronunciada de metabolitos do «pool», sendo provável que estes incluam coenzimas, moléculas que são indispensáveis para a oxidação do glicerol. O facto de um aumento da concentração de dodina resultar numa inibição crescente da respiração do glicerol e num aumento da quantidade de materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose libertados das células, sugere que a inibição da respiração do glicerol é devida, pelo menos parcialmente, a uma drenagem de coenzimas das células tratadas. O facto da dodina também inibir a respiração do succinato sugere que componentes da cadeia respiratória e/ou a H^+-ATP sintase também são inibidos por este detergente. O facto da respiração do glicerol ser inibida por concentrações de dodina inferiores às necessárias para inibir a respiração do succinato sugere que a dodina inibe o consumo de O_2 pelas células de *P. syringae* primeiro de uma forma indirecta, como resultado de uma drenagem de coenzimas, seguida por uma interacção directa com componentes da cadeia respiratória e/ou a H^+-ATP sintase.

17.- Enquanto que o processo de libertação do K^+ intracelular induzido pela dodina se completa essencialmente em 15 min de exposição a este detergente, a libertação de «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» prolonga-se por

pelo menos 8 h, a uma taxa aproximadamente constante. Ao fim de 3 - 4 h de tratamento com concentrações de dodina superiores a 40 μM, a quantidade de materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose libertados das células é já superior à quantidade destes materiais existentes no «pool» das células, e a libertação continua por pelo menos mais 4 a 5 h. Quando as células são tratadas com dodina a uma temperatura baixa (6 °C), a taxa de efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm não é significativamente diferente da observada em células controlo. Estes resultados sugerem que a dodina induz, nas células de *P. syringae*, uma degradação enzimática do RNA.

Entre 10 e 150 - 200 μM dodina, a taxa de efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose, representada em função da concentração de detergente, é uma curva em forma de sino, com um máximo a aproximadamente 50 μM dodina.

Com um aumento do tempo de exposição das células de *P. syringae* a 50 μM dodina, observa-se uma diminuição do número de ribossomas por célula e um aumento do número de células lisadas. Pelo contrário, com 100 μM dodina, a lise celular é reduzida, e as células apresentam um citoplasma extensivamente coagulado.

A concentração de dodina que induz a mais elevada taxa de efluxo de materiais-absorvendo-a-260 nm e moléculas-contendo-ribose é assim a que causa uma rápida degradação dos ribossomas e lise das células. Concentrações mais elevadas causam uma progressiva diminuição da taxa de efluxo destes metabolitos e da lise celular, e induzem a coagulação do citoplasma. A diminuição da degradação do RNA e da desintegração das células deve-se assim provavelmente a uma desnaturação das enzimas autolíticas, nomeadamente das RNases.

18.- A dodina também induz a formação de variadas estruturas membranares, «blebs», expansões da membrana exterior e figuras mielínicas intracelulares. O facto destas estruturas serem observáveis em amostras fixadas após 1 min da adição de detergente, indica que estas estruturas não são formadas por moléculas de fosfolípidos sintetizadas *de novo*, mas devem ser constituídas, parcial ou totalmente, por moléculas de dodina, e que estas são capazes de atravessar rapidamente as membranas citoplasmática e exterior. As moléculas de dodina são portanto particularmente adequadas para a formação de bicamadas artificiais mas também apresentam a capacidade de atravessar facilmente membranas celulares, o que sugere que a molécula de dodina não é excessivamente hidrofóbica nem hidrofílica. O moderado

coeficiente de partição octanol-água ($\log_{10}$ P = 1.5) da molécula de dodina apoia esta interpretação.

19.- A absorção de dodina pelas células de *P. syringae* é um processo rápido que se completa essencialmente em alguns minutos. Para concentrações iniciais de dodina compreendidas entre 20 e 380 μM, a isotérmica da absorção é do tipo «S», indicando que a uma primeira fase de absorção cooperativa se segue uma do tipo «Langmuiriano». A absorção cooperativa deve-se provavelmente à absorção de micelas de dodina, à coagulação do citoplasma e à formação dos sistemas mielínicos intracelulares, e a absorção Langmuiriana, à saturação das células com moléculas de detergente.

A saturação das células só ocorre com elevadas (superiores a 300 μM) concentrações iniciais de dodina, muito superiores às necessárias para danificar a membrana citoplasmática e causar a morte das células, indicando que a actividade antibacteriana deste detergente não está associada a elevados níveis de absorção. Na saturação, as células de *P. syringae* absorvem elevadas quantidades de detergente (0.87 μmol (mg peso seco)$^{-1}$), correspondentes a aproximadamente 25 % do seu peso seco, e a mais de cinco vezes a quantidade necessária para a formação de uma hipotética monocamada de dodina à superfície das células (0.17 μmol (mg peso seco)$^{-1}$). Os resultados obtidos em estudos de ultrastrutura sugerem, no entanto, que esta monocamada de facto não se formou, e que os elevados níveis de absorção de dodina pelas células de *P. syringae* se devem à formação das diferentes estruturas membranares observadas e à coagulação do citoplasma.

20.- O método utilizado para avaliar a viabilidade das células de *P. syringae* expostas à dodina foi idêntico ao usado para quantificar a viabilidade das células tratadas com Cu^{2+}.

Após um tratamento breve com dodina, um aumento da concentração de detergente resulta num aumento concomitante da quantidade de metabolitos libertados do «pool» das células e da mortalidade.

Um tratamento das suspensões de *P. syringae* durante 15 min com 70 μM dodina resulta na morte de aproximadamente 99 % das células, na libertação de 100 % do K^+, 76 % das «moléculas-contendo-ribose» e 65 % dos «materiais-absorvendo-a-260 nm» presentes no «pool» das células, e na absorção de 0.22 μmol dodina (mg peso seco)$^{-1}$. A morte da grande maioria da população de *P. syringae* está assim associada ao efluxo da maioria dos metabolitos do «pool» e à absorção de quantidades apreci-

áveis de dodina (superiores às necessárias para a formação de uma monocamada superficial).

Os danos causados pela dodina na membrana citoplasmática das células de *P. syringae* são assim provavelmente a causa primeira da morte e esta deve ocorrer quando as lesões são de tal forma extensas que não podem ser reparadas quando as células são colocadas à superfície do meio de cultura.

21.- A actividade antibacteriana da dodina foi também estudada em células de *P. syringae* em crescimento activo num meio de cultura. Em «Nutrient Broth» com 2.5 × 10^7 células ml^{-1}, a «Concentração Inibitória Mínima» é de 25 μM e a «Concentração Bactericida Mínima», 30 μM. A actividade bactericida da dodina, ao contrário do Cu^{2+}, não é muito influenciada pela composição do meio de suspensão ou cultura, aumentando acentuadamente quando se atinge a concentração micelar crítica.

22.- Existe uma concentração limiar (aprox. 25 μM) acima da qual a dodina causa significativas alterações estruturais, lesões da membrana citoplasmática, degradação do RNA, lise e morte celular. Esta concentração corresponde à concentração micelar crítica, o que sugere que são as micelas de dodina os principais agentes da actividade antibacteriana deste detergente. A dodina difere assim de outros detergentes catiónicos que apresentam uma actividade antibacteriana máxima a concentrações inferiores à concentração micelar crítica.

SUMMARY

1.- Studies were carried out on the mode-of-action of cupric ions and of the cationic surfactant dodecylguanidine monoacetate (dodine) on the cells of the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. The alterations on the selective permeability of the cytoplasmic membrane and on oxygen consumption, the passive uptake of these agents by the cells, and the alterations on the ultrastructure and viability of the cells were investigated.

2.- The time course of K^+ efflux was followed using flame photometry and a selective electrode. This latter technique allowed a careful study of the kinetics of K^+ release, and the definition of three new parameters: «the rate of efflux», «the maximum rate of efflux» and «the time needed to reach the maximum rate».

3.- Treatment of the cells with Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} or Zn^{2+}, results in no significant K^+ loss, but Cu^{2+} and Hg^{2+} induce a massive leakage of K^+ from the cells. N-ethylmaleimide also causes a significant release of K^+, but at much higher concentrations than Cu^{2+} and Hg^{2+}, and at a much lower rate than the one observed after treatment with these divalent metal ions.

4.- The time course of K^+ efflux induced by Cu^{2+} follows a sigmoid pattern. After the addition of Cu^{2+}, the rate of K^+ efflux progressively increases with time until a maximum is reached. Increasing Cu^{2+} concentration results in increasing the maximum rate and decreases the time needed to achieve this rate. After reaching a maximum, the rate of K^+ efflux progressively decreases to zero. The rate of K^+ efflux plotted against time yields a bell-shaped curve. The amount of K^+ released after 15 min is a sigmoid function of Cu^{2+} concentration.

5.- In a «quantal» («all-or-nothing») phenomenon, when the susceptibility of the members of the population is normally distributed, the percentage of response is a sigmoid function of dose of the chemical agent or time of exposure. This curve can be converted into a straight line by the «probit» transformation.

When the amounts of K^+ released after the addition of a given Cu^{2+} concentration are converted into percentages of the maximum observed with this Cu^{2+} concentration, and these transformed into probits and plotted against the logarithm of time, a linear relationship is found. Additionally, when the maximum amounts of

K^+ released with given Cu^{2+} concentrations are converted into percentages of the maximum observed with a treatment with cupric ions, and these transformed into probits and plotted against the logarithm of Cu^{2+} concentration, a linear relationship is also found. It would appear therefore that K^+ efflux induced by Cu^{2+} is a «all-or-nothing» phenomenon, but to confirm this hypothesis it will be necessary to carry out a direct assay of the K^+ contents of individual cells.

6.- Cu^{2+} also cause the release of inorganic phosphate, «260 nm-absorbing materials» (assayed by measuring the absorbance at 260 nm) amd «ribose-containing molecules» (assayed by the orcinol reaction) from the cells. In the experimental conditions used, the absorbance at 260 nm should reflect mainly the amount of purines, pyrimidines, nucleosides, nucleotides and small RNAs released from the cells, and the orcinol reaction, the ribonucleosides, ribonucleotides and small RNAs leaked from the cells («pool» metabolites).

To evaluate the significance of the amount of the leaked metabolites, the concentrations of pool metabolites in untreated cell suspensions were determined (by extraction with cold perchloric acid). The results indicate that Cu^{2+} induce the leakage of all the intracellular unbound K^+, but only a small fraction of the pool 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules is released by Cu^{2+} treatment, suggesting that Cu^{2+} induce a specific and restricted alteration of the permeability of the cytoplasmic membrane.

7.- The fact that the number of leaked K^+ ions is more than twice the number of bound Cu^{2+} ions, that the patterns of release of K^+, inorganic phosphate, 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules as functions of Cu^{2+} concentration are similar, and that some of the leaked pool metabolites are anionic molecules such as inorganic phosphate, nucleotides and RNA, suggests that the release of these metabolites plays a role in the maintenance of the electric charge balance of the cytoplasm of K^+-depleted cells.

8.- Cu^{2+} also induce an acute plasmolysis of the cells, probably as a direct consequence of the massive release of intracellular K^+. Externally added Na^+, Li^+ and K^+ effectively antagonize plasmolysis induced by Cu^{2+} probably by entering the cells soon after the release of the resident K^+ ions, thus re-estabilishing, at least partially, the internal osmotic pressure and electric charge.

Plasmolysis induced by Cu^{2+} was quantified by the analysis of ultra-thin

sections observed by transmission electron microscopy. Increasing Cu^{2+} concentration results in an increase in the number of plasmolized cells, but not in the intensity of plasmolysis in plasmolized cells. The percentage of plasmolized cells is a sigmoid function of Cu^{2+} concentration. The distribution of the plasmolysis index in the population of plasmolyzed cells is similar at all Cu^{2+} concentrations. It would appear therefore that plasmolysis induced by Cu^{2+} is, like K^+ efflux, an «all-or-nothing» phenomenon.

9.- Cu^{2+} inhibit the respiration of glycerol, glucose and succinate, at similar levels, probably as a consequence of an inhibition of components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase.

10.- Passive binding of Cu^{2+} to the cells is fast. Increasing Cu^{2+} concentration results in an increase in the amount of bound Cu^{2+}. Cells can bind more than 2 % of their dry weight in Cu^{2+}, without being saturated with this metal.

Cells bind similar levels of Cu^{2+} and Hg^{2+}, much higher than those of Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}. In contrast, treatment of the cells with Ca^{2+} or Mg^{2+} results in no significant binding of these metals. There is a correlation between the levels of binding of tested metals and the affinity of these to unidentate binding to most of the groups available for cation binding in the cells, and for chelate formation. Sulphydryl groups are probably involved in the binding of Cu^{2+} to the cells.

11.- Viability of Cu^{2+}-treated cells was evaluated by diluting the samples with distilled water and plating on nutrient agar (Difco). K^+ efflux and the inhibition of the respiration are probably involved in the death of Cu^{2+}-treated cells, but there is a range of Cu^{2+} concentrations that induce the release of all the intracellular K^+ and inhibit completely the respiration in *all* cells, but kill only a fraction of the population. It is unlikely that a bacterial cell totally depleted of K^+ and with the respiration blocked is able to grow, but some of these cells *did survive*, since they gave rise to colonies.

The addition of the chelating agents ethylenediaminetetraacetic acid and sodium diethyldithiocarbamate to Cu^{2+}-treated cells can result in the complete cessation of the release of K^+ and the restoration of the respiration. It was shown by several workers that diethyldithiocarbamate is able to remove tightly bound copper ions from complex organic molecules such as the superoxide dismutase. It would appear therefore that these chelating agents were able to remove the cupric

ions bound to the sites involved in the inhibition of the respiration and the induction of K^+ efflux.

The medium used to evaluate the viability of Cu^{2+}-treated cells does not have these chelating agents, but is composed of beaf extract and peptone, and these have molecules with high affinity for metal cations. It would appear therefore that the constituents of the plating medium were able to remove at least part of the Cu^{2+} bound to the sites involved in the release of K^+ and the inhibition of the respiration. It is likely that the efficacy in this process is not identical in all cells, and that there is a threshold concentration for the number of cupric ions that must be exceeded before they can cause significant release of K^+ and inhibition of the respiration. If the amount of Cu^{2+} removed from the cells was not enough to allow the restoration of the respiration and the re-accumulation of K^+, the cells died. It should be stressed that these phenomena ocurred in a restricted range of Cu^{2+} concentrations, since higher concentrations cause a progressive decrease in the number of viable cells.

An alternative interpretation is to consider that cell death was not directly caused by the massive release of K^+ and the inhibition of the respiration. Cu^{2+} bound to the inhibitory sites could have been removed to such levels that *all* cells did re-accumulate K^+ and resume normal respiration. Some of these cells did not survive, however, because other vital functions were irreversibly inhibited.

12.- The bactericidal activity of Cu^{2+} is much higher in cells suspended in distilled water or Pipes-buffer than in cells grown in the culture media, «Nutrient Broth» and «YGS», probably due to the fact that the constituents of the culture media bound a significant fraction of the cupric ions initially present in solution, thus decreasing the number of ions available for binding to the cells.

13.- Treatment of the cells with dodine results in a massive leakage of K^+, inorganic phosphate, «260 nm-absorbing materials» and «ribose-containing molecules», indicating that this surfactant, unlike Cu^{2+}, causes an extensive damage to the cytoplasmic membrane. The amount of K^+ released after 4 min and the rate of K^+ efflux increase pronouncedly at the critical micelle concentration, suggesting that the micelles of dodine are the main damaging agent of the cytoplasmic membrane.

14.- Unlike Cu^{2+}, dodine inhibits the respiration of succinate at higher concentrations than those that cause the cessation of the oxidation of glycerol. Dodine

probably inhibits the respiration firstly by causing drainage of coenzymes from the cells, and then by a direct interaction with the components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase.

15.- Whereas the process of K^+ leakage is essentially completed in few minutes of exposure to dodine, the release of «260 nm-absorbing materials» and «ribose-containing molecules» continue for several hours, at a constant rate. Dodine concentrations that induce a high rate of release of these metabolites also cause a time-dependent decrease in the number of ribosomes and an increase in the number of lysed cells. Higher concentrations cause a decrease in the intensity of these alterations and the appearance of zones of coagulated cytoplasm. It would appear therefore that dodine induces an enzymic degradation of RNA and cell lysis, and that these are inhibited by high dodine concentrations as a result of the denaturation of autolytic enzymes, namely RNases.

16.- Dodine induces the formation of several membranous structures, «blebs», expansions of the outer membrane and intracellular «myelin-like» structures, which are already evident in samples fixed only 1 min after the addition of dodine. These structures are not, therefore, formed by newly synthesized molecules of phospholipids, but are probably composed, partially or totally, of dodine. The results suggest that the hydrophobic-hydrophilic balance of dodine is particularly suitable both to the formation of artificial bilayers and for easy migration through natural ones. The moderate octanol-water partition coefficient of dodine indicates that this molecule is indeed moderately hydrophobic, and supports the above interpretation of the affinity of dodine for membranes.

17.- The binding of dodine to the cells is a fast phenomenon. The uptake isotherm is of the S type, indicating that a first phase of cooperative binding is followed by one of the «Langmuirian» type. Cooperative binding is probably due to the binding of micelles, the coagulation of the cytoplasm and the formation of intracellular myelin-like structures, and the «Langmuirian» phase to the saturation of the cells with molecules of detergent.

Saturation levels of dodine (approx. 25 % of the cell dry weight) correspond to more than five times the amount needed to form an hypothetical close-packed monolayer of dodine on the cell surface. Ultrastructural observations suggest that this structure was not actually formed in the cells, and indicate that, on the

contrary, the high levels of dodine uptake are probably due to the formation of the different abnormal membranous structures and cytoplasm coagulation.

18.- Viability of dodine-treated cells was evaluated by the method used for Cu^{2+}-treated cells. Increasing dodine concentration results in a concomitant increase in the amount of leaked pool metabolites and percentage of dead cells. The death of the great majority of the population is associated with the release of most of the metabolites present in the pool and the uptake of considerable amounts of dodine (higher than those necessary for the formation of a monolayer on cell surface).

It would appear therefore that membrane damage is the main cause of death of dodine-treated cells, and this occurs when the lesions of the cytoplasmic membrane are so extensive that can not be repaired when the cells are placed on the surface of the plating medium.

19.- The bactericidal activity of dodine is not very dependent on the composition of the suspending or culture medium, and shows a marked increase at the critical micelle concentration.

20.- The antibacterial activity of dodine exhibits a clear-cut threshold concentration, approximately 25 μM, that must be exceeded before the drug can cause significant ultrastructural alterations, membrane damage, RNA degradation, cell lysis and death. This concentration corresponds to the critical micelle concentration of dodine, which suggests that, in contrast to other cationic surfactants, the micelles are the main agent of the antibacterial activity of dodine.

BIBLIOGRAFIA

ADAMS, M. W. W. & MORTENSEN, L. E. 1984. The physical and catalytic properties of hydrogenase II of *Clostridium pasteurianum*. A comparison with hydrogenase I. *Journal of Biological Chemistry* **259**, 7045-7055.

ADASKAVEG, J. E. & HINE, R. B. 1985. Copper tolerance and sensitivity of Mexican strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, causal agent of bacterial spot of pepper. *Plant Disease* **69**, 993-996.

ALBERT, J. J. & LEWIS, F. H. 1962. Effect of repeated applications of dodine and of captan on apple scab foliage lesions. *Plant Disease Reporter* **46**, 163-167.

ALMEIDA, E. S. 1940. Doenças das plantas e seus tratamentos. Edição do autor, Santarém, 596 pg.

AMERICAN CYANAMID COMPANY 1982. Technical information. Cyprex® 65-W. Fruit fungicide. American Cyanamid Company, New Jersey.

AMERICAN CYANAMID COMPANY 1985. Material safety data sheet. Cyprex® Technical fungicide. Sheet no. 2195-01. American Cyanamid Company, New Jersey.

BABICH, H. & STOTZKY, G. 1983. Synergism between nickel and copper in their toxicity to microbes: mediation by pH. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **7**, 576-587.

BALDRY, M. G. C., HOGARTH, D. S. & DEAN, A. C. R. 1977. Chromium and copper sensitivity and tolerance in *Klebsiella* (*Aerobacter*) *aerogenes*. *Microbios Letters* **4**, 7-16.

BARTZ, J. A. & MITCHELL, J. E. 1970. Comparative interaction of n-dodecylguanidine acetate with four plant pathogenic fungi. *Phytopathology* **60**, 345-349.

BAZZI, C. & CALZOLARI, A. 1986. Lotta chimica al marciume batterico della lattuga (*Pseudomonas cichorii*): valutazione preliminare de alcuni trattamenti. *Informatore Fitopatologico* **36**, 30-32.

BEILHARZ, V., PARBERY, D. G. & SWART, H. J. 1982. Dodine: a selective agent for certain soil fungi. *Transactions of the British Mycological Society* **79**, 507-511.

BEVERIDGE, T. J. & KOVAL, S. F. 1981. Binding of metals to cell envelopes of *Escherichia coli* K-12. *Applied and Environmental Microbiology* **42**, 325-335.

BEVERIDGE, T. J. & MURRAY, R. G. E. 1980. Sites of metal deposition in the cell wall of *Bacillus subtilis*. *Journal of Bacteriology* **141**, 876-887.

BISHOP, C. C. & GILL, J. E. 1971. Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase by monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* **227**, 97-105.

BOROWSKI, E. & CYBULSKA, B. 1967. Potassiumless death of *Saccharomyces cerevisiae* cells treated with N-succinyl perimycin and the reversal of fungicidal action of the antibiotic by potassium ions. *Nature* **211**, 1034-1035.

BORST-PAUWELS, G. W. F. H. & THEUVENET, A. P. R. 1985. All-or-none K^+ efflux from yeast cells induced by calmodulin antagonists. *FEMS Microbiology Letters* **29**, 221-224.

BORST-PAUWELS, G. W. F. H., THEUVENET, A. P. R. & STOLS, A. L. H. 1983. All-or-none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **732**, 186-192.

BOUÉ, H. & CHAFFURIN, C. 1978. Le "Réseau d'Informations Tavelures" de Lot-et-Garonne. *Phytoma - Défense des cultures* Maio, 27-31.

BOUREAU, M. & OLIVIER, J.-M. 1984. Bilan d'activité des réseaux d'avertissements «Tavelure» en France. *Phytoma - Défense des cultures* Julho-Agosto, 31-33.

BRILL, A. S. 1977. Transition metals in biochemistry. Springer-Verlag, Heidelberg. 186 pg.

BROWN, I. F. & SISLER, H. D. 1960. Mechanisms of fungitoxic action of N-dodecyl-guanidine acetate. *Phytopathology* **50**, 830-839.

BRYNHILDSEN, L., LUNDGREN, B. V., ALLARD, B. & ROSSWALL, T. 1988. Effects of glucose concentrations on cadmium, copper, mercury, and zinc toxicity to a *Klebsiella* sp.. *Applied and Environmental Microbiology* **54**, 1689-1693.

BURTON, M. A. S., LESUEUR, P. & PUCKETT, K. J. 1981. Copper, nickel, and thallium uptake by the lichen *Cladina rangiferina*. *Canadian Journal of Botany* **59**, 91-100.

BUTLER, E. J. & JONES, S. G. 1949. Plant pathology. Macmillan, London, 979 pg.

BUURMAN, E. T., PENNOCK, J., TEMPEST, D. W., DE MATOS, M. J. T. & NEIJSSEL, O. M. 1989. Replacement of potassium ions by ammonium ions in different micro-organisms grown in potassium-limited chemostat culture. *Archives of Microbiology* **152**, 58-63.

BYRDE, R. J. W., CLIFFORD, D. R. & WOODCOCK, D. 1962. Fungicidal and chemical constitution. XI. The activity of n-alkyl guanidine acetates. *Annals of Applied Biology* **50**, 291-298.

CABRAL, J. P. S. 1986. Alguns aspectos da interacção entre os catiões metálicos e os invólucros bacterianos. Provas de Aptidão Pedagógica e Capacidade Científica. Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 52 pg.

CASELLA, S., FRASSINETTI, S., LUPI, F. & SQUARTINI, A. 1988. Effect of cadmium, chromium and copper on symbiotic and free-living *Rhizobium leguminosarum* biovar *trifolii*. *FEMS Microbiology Letters* **49**, 343-347.

CASTELLINO, F. J. & VIOLAND, B. N. 1979. ^{31}P-Nuclear magnetic resonance and ^{31}P{^{1}H} Nuclear overhauser effect analysis of mixed egg phosphatidylcholine-sodium taurocholate vesicles and micelles. *Archives of Biochemistry and Biophysics* **193**, 543-550.

CATION, D. 1957. Two years' results of testing Cyprex for control of cherry leaf spot in Michigan. *Plant Disease Reporter* **41**, 1029-1031.

CEDERBAUM, A. I. & WAINIO, W. W. 1972a. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. I. Quantitative aspects and stability. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 4593-4603.

CEDERBAUM, A. I. & WAINIO, W. W. 1972b. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. II. Effect on mitochondrial metabolism. *Journal of Biological Chemistry* 247, 4604-4614.

CEDERBAUM, A. I. & WAINIO, W. W. 1972c. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. III. Role of mitochondrial phospholipids and thiols. *Journal of Biological Chemistry* 247, 4615-4620.

CHRISTIAN, J. H. B. & WALTHO, J. A. 1961. The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *Journal of General Microbiology* 25, 97-102.

CHRISTIAN, J. H. B. & WALTHO, J. A. 1962. Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* 65, 506-508.

COLIN, J. E. & CHAFIK, Z. 1986. Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. *Plant Disease* 70, 1048-1050.

COLIN, K. C. & MCCARTER, S. M. 1983. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato in vitro* and in controlling bacterial speck. *Plant Disease* 67, 639-644.

COOKSEY, D. A. 1988. Reduction of infection by *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* using a nonpathogenic, copper-resistant strain combined with copper bactericide. *Phytophatology* 78, 601-603.

CRUZ, R. X. 1973. Algumas observações sobre a biologia do pedrado das pomóideas. *Gazeta das Aldeias* nº 2731, 1-6.

CRUZ, R. X. 1980. Avisos e tratamentos fitossanitários em Portugal. Comunicação apresentada ao I Congresso Português de Fitiatria e Fitofarmacologia, Lisboa.

DARPOUX, H., ANDRÉ, C., BOURON, H., CABANE, E., JEANDET, C., JOURNET, P & LE NAIL, FR. 1961. Les tavelures du pommier et du poirier. Association de Coordination Technique Agricole, Éditions SEDA, Paris, 42 pg.

DAVIES, A., BENTLEY, M. & FIELD, B. S. 1968. Comparison of the action of vantocil, cetrimide and chlorhexidine on *Escherichia coli* and its spheroplasts and the protoplasts of Gram positive bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* 31, 448-461.

DE FILIPPIS, L. F. 1979. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* 92, 39-49.

DELGADO, A. M. P. S. 1984. Lise de bactérias de Gram-negativo. Estudo espectrofotométrico e ultrastrutural em *Escherichia coli* e *Pseudomonas fluorescens*. Dissertação de candidatura ao grau de Doutor apresentada à Faculdade de Ciências da Universidade do Porto. 207 pg.

DE WAARD, M. A. & NISTELROOY, J. G. M. V. 1983. Negatively correlated cross-resistance to dodine in fenarimol-resistant isolates of various fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 89, 67-73.

DIENER, U. L. & CARLTON, C. C. 1960. Dodine-captan combination controls bacterial spot of peach. *Plant Disease Reporter* 44, 136-138.

DINNBIER, U., LIMPINSEL, E., SCHMID, R. & BAKKER, E. P. 1988. Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaption of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of Microbiology* **150**, 348-357.

DOMEK, M. J., ROBBINS, J. E., ANDERSON, M. E. & MCFETERS, G. A. 1987. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 57-62.

EASTON, G. D. & NAGLE, M. E. 1985. Copper-8-quinolinolate for control of *Corynebacterium michiganense* pv. *sepedonicum* of potato seed pieces and handling equipment. *Plant Disease* **69**, 422-425.

EISENSMITH, S. P. & JONES, A. L. 1981. Infection model for timing fungicide applications to control cherry leaf spot. *Plant Disease* **65**, 955-958.

ENNIS, H. L. & LUBIN, M. 1965. Pre-ribosomal particles formed in potassium-depleted cells. Studies on degradation and stabilization. *Biochimica et Biophysica Acta* **95**, 605-623.

EPSTEIN, W. 1986. Osmoregulation by potassium transport in *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 73-78.

EPSTEIN, W. & SCHULTZ, S. G. 1965. Cation transport in *Escherichia coli*. V. Regulation of cation content. *Journal of General Physiology* **49**, 221-234.

EVANS, E. 1973. Enfermedades de las plantas y su control químico. Editorial Labor, Barcelona, 307 pg.

EVANS, H. J. & SORGER, G. J. 1966. Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual Review of Plant Physiology* **17**, 47-76.

FEW, A. V. & SCHULMAN, J. H. 1953. The absorption of polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action. *Journal of General Microbiology* **9**, 454-466.

FINNEY, D. J. 1952. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge, 318 pg.

FISHER, D. J. 1976. Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Pesticide Science* **7**, 10-18.

FITZGERALD, G. P. & FAUST, S. L. 1963. Factors affecting the algicidal and algistatic properties of copper. *Applied Microbiology* **11**, 345-351.

GALE, E. F. 1974. The release of potassium ions from *Candida albicans* in the presence of polyene antibiotics. *Journal of General Microbiology* **80**, 451-465.

GEOFFRION, R. 1969. La prévision des attaques de Tavelures à la Station d'Avertissements Agricoles du Val de Loire. *Phytoma* Janeiro, 9-19.

GILES, C. H., MACEWAN, T. H., NAKHAWA, S. N. & SMITH, D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society* 1960, 3973-3993.

GILPATRICK, J. D. & BLOWERS, D. R. 1974. Ascospore tolerance to dodine in relation to orchard control of apple scab. *Phytopathology* **64**, 649-652.

GITAITIS, R. D., BELL, D. K. & SMITTLE, D. A. 1986. Epidemiology and control of bacterial blight and canker of cowpea. *Plant Disease* **70**, 187-190.

GOOD, N. E., WINGET, D., WINTER, W., CONNOLLY, T., IZAWA, S. & SINGH, R. M. M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* **5**, 467-477.

GREEN, J., PRIOR, S. D. & DALTON, H. 1985. Copper ions as inhibitors of protein C of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *European Journal of Biochemistry* **153**, 137-144.

GRIMM, R. 1987. Control of crown gall in Swiss apple nurseries. *EPPO Bulletin* **17**, 269-272.

GUPTA, A. B. & ARORA, A. 1978. Morphology and physiology of *Lyngbya nigra* with reference to copper toxicity. *Physiologia Plantarum* **44**, 215-20.

GURD, F. R. N. & WILCOX, P. E. 1956. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides, and amino acids. Advances in Protein Chemistry, vol. 11, pg. 311-427. Academic Press.

HAMILTON-MILLER, J. M. T. 1973. Chemistry and biology of the polyene macrolide antibiotics. *Bacteriological Reviews* **37**, 166-196.

HAMMOND, S. M. & KLIGER, B. N. 1976. Differential effects of monovalent and divalent ions upon the mode of action of the polyene antibiotic candicidin. *Journal of Applied Bacteriology* **41**, 59-68.

HAMMOND, S. M., LAMBERT, P. A. & KLIGER, B. N. 1974. The mode of action of polyene antibiotics; induced potassium leakage in *Candida albicans*. *Journal of General Microbiology* **81**, 325-330.

HEALD, F. D. 1933. Manual of plant diseases. McGraw-Hill Book Company, New York, 953 pg.

HERBERT, D., PHIPPS, P. J. & STRANGE, R. E. 1971. Chemical analysis of microbial cells. *in* NORRIS, J. R. & RIBBONS, D. W. (ed.) Methods in Microbiology. Volume 5 B, pg. 209-344. Academic Press, London.

HEWLETT, P. S. & PLACKETT, R. L. 1979. The interpretation of quantal responses in biology. Edward Arnold, London. 82 pg.

HORSFALL, J. G. 1956. Principles of fungicidal action. Chronica Botanica Company, Waltham. 279 pg.

HSUCHEN, C.-C. & FEINGOLD, D. S. 1973. The mechanism of polymyxin B action and selectivity toward biologic membranes. *Biochemistry* **12**, 2105-2111.

HUGHES, M. N. & POOLE, R. K. 1989. Metals and micro-organisms. Chapman and Hall, London. 412 pg.

HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. 1964a. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 655-662.

HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. 1964b. Effect of chlorhexidine diacetate on "protoplasts" and spheroplasts of *Escherichia coli*, protoplasts of *Bacillus megaterium* and the Gram staining reaction of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 751-758.

HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. 1965. Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **17**, 28-32.

HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. 1966. The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **18**, 569-578.

IMAHARA, H., WAKATSUKI, T., KITAMURA, T. & TANAKA, H. 1978. Effect of copper on growth of yeast. *Agricultural and Biological Chemistry* **42**, 1173-1179.

IMHOFF, J. F. 1986. Osmoregulation and compatible solutes in eubacteria. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 57-66.

INMAN, R. E. & WEIHING, J. L. 1959. Cyprex: a superior control for shothole disease of chokecherry. *Plant Disease Reporter* **43**, 536-539.

INOUE, K. & KITAGAWA, T. 1976. Effect of lipid composition on sensitivity of lipid membranes to Triton X-100. *Biochimica et Biophysica Acta* **426**, 1-16.

JARDINE, D. J. & STEPHENS, C. T. 1987. Influence of timing of application and chemical on control of bacterial speck of tomato. *Plant Disease* 71, 405-408.

JEPSON, W. F. 1961. Melprex dodine: a new organic fungicide. *Mededelingen Landbouwhogeschool Opzoekingsstation Staat Gent* **26**, 1365-1369.

JONAS, R. B. 1989. Acute copper and cupric ion toxicity in an estuarine microbial community. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 43-49.

JONES, A. L. 1981. Fungicide resistance: past experience with benomyl and dodine and future concerns with sterol inhibitors. *Plant Disease* **65**, 990-992.

KAPPAS, A. & GEORGOPOULOS, S. G. 1970. Genetic analysis of dodine resistance in *Nectria haematococca* (syn. *Hypomyces solani*). *Genetics* **66**, 617-622.

KASUMOV, K. M., BORISOVA, M. P., ERMISHKIN, L. N., POTSELUYEV, V. M., SILBERSTEIN, A. Y. & VAINSHTEIN, V. A. 1979. How do ionic channel properties depend on the structure of polyene antibiotic molecules ? *Biochimica et Biophysica Acta* **551**, 229-237.

KINSKY, S. C., LUSE, S. A., ZOPE, D., VAN DEENEN, L. L. M. & HAXBY, J. 1967. Interaction of filipin and derivatives with erythrocyte membranes and lipid dispersions: electron microscopic observations. *Biochimica et Biophysica Acta* **135**, 844-861.

KLENOW, H. & HENNINGSEN, I. 1969. Effect of monovalent cations on the activity of the DNA polymerase of *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **9**, 133-141.

KOTLER-BRAJTBURG, J., MEDOFF, G., KOBAYASHI, G. S., BOGGS, S., SCHLESSINGER, D., PANDEY, C. & RINEHART, K. L. 1979. Classification of polyene antibiotics according to chemical structure and biological effects. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **15**, 716-722.

KOTLER-BRAJTBURG, J., MEDOFF, G., SCHLESSINGER, D. & KOBAYASHI, G. S. 1977. Amphotericin B and filipin effects on L and HeLa cells: dose response. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **1**, 803-808.

KROLL, R. G. & ANAGNOSTOPOULOS, G. D. 1981a. Potassium leakage as a lethality index of phenol and the effect of solute and water activity. *Journal of Applied Bacteriology* **50**, 139-147.

KROLL, R. G. & ANAGNOSTOPOULOS, G. D. 1981b. Potassium fluxes on hyperosmotic shock and the effect of phenol and bronopol (2-bromo-2-nitropropan-1,3-diol) on the deplasmolysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Applied Bacteriology* **51**, 313-323.

KRONECK, P. M. H., VORTISCH, V. & HEMMERICH, P. 1980. Model studies on the coordination of copper in biological systems. The deprotonated peptide nitrogen as a potential binding site for copper(II). *European Journal of Biochemistry* **109**, 603-612.

KUYPERS, G. A. J. & ROOMANS, G. M. 1979. Mercury-induced loss of K^+ from yeast cells investigated by electron probe X-ray microanalysis. *Journal of General Microbiology* **115**, 13-18.

LAMBERT, P. A. 1974. Studies on the mode of action of n-dodecyldiethanolamine. Thesis presented for the degree of Doctor of Phylosophy. School of Biological Sciences, Thames Polytechnic, London. 225 pg.

LAMBERT, P. A. & HAMMOND, S. M. 1973. Potassium fluxes, first indications of membrane damage in micro-organisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **54**, 796-799.

LANYI, J. K. 1974. Salt-dependent properties of proteins from extremely halophilic bacteria. *Bacteriological Reviews* **38**, 272-290.

LARSEN, P. I., SYDNES, L. K., LANDFALD, B. & STRØM, A. R. 1987. Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaines, glutamic acid, and trehalose. *Archives of Microbiology* **147**, 1-7.

LEE, Y. & CHAN, S. I. 1977. Effect of lysolecithin on the structure and permeability of lecithin bilayer vesicles. *Biochemistry* **16**, 1303-1309.

LEITE, R. P., MOHAN, S. K., PEREIRA, A. L. G. & CAMPACCI, C. A. 1987. Controle integrado de cancro citrico - efeito da resistência genética e da aplicação de bactericidas. *Fitopatologia Brasileira* **12**, 257-263.

LICHTENBERG, D., ZILBERMAN, Y., GREENZAID, P. & ZAMIR, S. 1979. Structural and kinetic studies on the solubilization of lecithin by sodium deoxycholate. *Biochemistry* **18**, 3517-3525.

LINDNER, B. & SEYDEL, U. 1983. Mass spectrometric analysis of drug-induced changes in Na^+ and K^+ contents of single bacterial cells. *Journal of General Microbiology* **129**, 51-55.

LIRAS, P. & LAMPEN, J. O. 1974a. Sequence of candicidin action on yeast cells. *Biochimica et Biophysica Acta* **372**, 141-153.

LIRAS, P. & LAMPEN, J. O. 1974b. Protection by K^+ and Mg^{2+} of growth and macromolecule synthesis in candicidin-treated yeast. *Biochimica et Biophysica Acta* **374**, 159-163.

LONGWORTH, A. R. 1971. Chlorhexidine. *in* Hugo, W. B. (ed.) Inhibition and destruction of the microbial cell, pg. 95-106. Academic Press, London.

LOWE, J. A., CHAN, Y. M. & TSANG, J. C. 1987. Investigation of biosynthesis of prodigiosin and its condensing enzyme in *Serratia marcescens*. 2. Effects of various transition metal ions. *Microbios* **51**, 71-80.

LUBIN, M. & ENNIS, H. L. 1964. On the role of intracellular potassium in protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **80**, 614-631.

MALEWICZ, B., JENKIN, H. M. & BOROWSKI, E. 1981. Repair of membrane alterations induced in baby hamster kidney cells by polyene macrolide antibiotics. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **19**, 238-247.

MALMSTRÖM, B. & ROSENBERG, A. 1959. Mechanism of metal ion activation of enzymes. Advances in Enzymology, vol. 21. Academic Press.

MANDELSTAM, J. & MCQUILLEN, K. 1973. Biochemistry of bacterial growth. Blackwell Scientific Publications, London. 582 pg.

MANDERSLOOT, J. G., REMAN, F. C., VAN DEENEN, L. L. M. & DE GIER, J. 1975. Barrier properties of lecithin/lysolecithin mixtures. *Biochimica et Biophysica Acta* **382**, 22-26.

MARCO, G. M. & STALL, R. E. 1983. Control of bacterial spot of pepper initiated by strains of *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* that differ in sensitivity to copper. *Plant Disease* **67**, 779-781.

MATSUSHITA, M., IWASAKI, A. & OKADA, H. 1989. Polymeration of factor B of the alternative complement pathway via disulfide bond(s) in the presence of Cu^{2+} and stimulation by C3b, the major fragment of C3. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **165**, 101-105.

MCBRIEN, D. C. H. & HASSALL, K. A. 1965. Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. *Physiologia Plantarum* **18**, 1059-1065.

MCKAY, M. C. R. & MACNEIL, B. H. 1979. Spectrum of sensitivity to dodine in field populations of *Venturia inaequalis*. *Canadian Journal of Plant Pathology* **1**, 76-78.

MEASURES, J. C. 1975. Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature* **257**, 398-400.

MEURY, J., ROBIN, A. & MONNIER-CHAMPEIX, P. 1985. Turgor-controlled K^+ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **151**, 613-619.

MILLER, L. P. 1960. Uptake and innate toxicity of dodine (n-dodecylguanidine acetate) to fungus conidia. *Phytopathology* **50**, 646.

MILLER, R. W. & BARRAN, L. R. 1977. The effect of ionic surface-active agents on the macroconidial plasma membrane of *Fusarium sulphureum*. *Canadian Journal of Microbiology* 23, 1373-1383.

MITCHELL, J. E. & MOORE, J. D. 1962. Relation of dodine residue levels and scab development on apple fruit and leaves. *Phytophatology* 52, 572-580.

MUNRO, G. F., HERCULES, K., MORGAN, J. & SAUERBIER, W. 1972. Dependence of the putrescine content of *Escherichia coli* on the osmotic strenght of the medium. *Journal of Biological Chemistry* 247, 1272-1280.

NEWTON, B. A. 1953. The release of soluble constituents from washed cells of *Pseudomonas aeruginosa* by the action of polymyxin. *Journal of General Microbiology* 9, 54-64.

NEWTON, B. A. 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. *Bacteriological Reviews* 20, 14-27.

NIETO, J. J., VENTOSA, A. & RUIZ-BERRAQUERO, F. 1987. Susceptibility of Halobacteria to heavy metals. *Applied and Environmental Microbiology* 53, 1199-1202.

NORMAN, A. W., DEMEL, R. A., DE KRUYFF, B & VAN DEENEN, L. L. M. 1972. Studies on the biological properties of polyene antibiotics. Evidence for the direct interaction of filipin with cholesterol. *Journal of Biological Chemistry* 247, 1918-1929.

OLLIVON, M., EIDELMAN, O., BLUMENTHAL, R. & WALTER, A. 1988. Micelle-vesicle transition of egg phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry* 27, 1695-1703.

OSHUMI, Y., KITAMOTO, K. & ANRAKU, Y. 1988. Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *Journal of Bacteriology* 170, 2676-2682.

PASSOW, H. & ROTHSTEIN, A. 1960. The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. *Journal of General Physiology* 43, 621-633.

PASSOW, H., ROTHSTEIN, A. & CLARKSON, T. W. 1961. The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacological Reviews* 13, 185-224.

PEREIRA, J. C. R. & SANTOS, A. F. 1986. Avaliação de fungicidas e técnicas de aplicação no controle de *Ceratocystis fimbriata*, em seringueira. *Fitopatologia Brasileira* 11, 811-816.

POLACH, F. J. 1973. Genetic control of dodine tolerance in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* 63, 1189-1190.

POWELL, D., KHETTRY, A., SASAKI, P. J. & BRUSSELL, G. E. 1958. The fungicidal efficacy of Cyprex against apple scab. *Plant Disease Reporter* 42, 493-498.

PUCKETT, K. J. 1976. The effect of heavy metals on some aspects of lichen physiology. *Canadian Journal of Botany* 54, 2695-2703.

RAFTER, G. W. 1982. Copper inhibition of glutathione reductase and its reversal with gold thiolates, thiol, and disulfide compounds. *Biochemical Medecine* 27, 381-391.

RAY, S. & ADDY, S. K. 1976. Residue levels of dodine in relation to canker development in citrus trees. *Indian Phytopathology* **29**, 246-250.

RHOADS, D. B., WOOD, A. & EPSTEIN, W. 1977. Discrimination between Rb^+ and K^+ by *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **469**, 45-51.

ROME, L. & GADD, G. M. 1987. Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu^{2+}-selective electrode. *FEMS Microbiology Letters* **43**, 283-287.

ROTH, W. G., LECKIE, M. P. & DIETZLER, D. N. 1985a. Osmotic stress drastically inhibits active transport of carbohydrates by *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **126**, 434-441.

ROTH, W. G., PORTER, S. E., LECKIE, M. P., PORTER, B. E. & DIETZLER, D. N. 1985b. Restoration of cell volume and the reversal of carbohydrate transport and growth of osmotically upshocked *Escherichia coli*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **126**, 442-449.

ROTHSTEIN, A. 1959a. Cell membrane as site of action of heavy metals. *Federation Proceedings* **18**, 1026-1035.

ROTHSTEIN, A. 1959b. Role of the cell membrane in the metabolism of inorganic electrolytes by microorganisms. *Bacteriological Reviews* **23**, 175-201.

RUIZ, J., GOÑI, M. & ALONSO, A. 1988. Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochimica et Biophysica Acta* **937**, 127-134.

SALTON, M. R. J. 1951. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology* **5**, 391-404.

SAWERS, R. G. & BOXER, D. H. 1986. Purification and properties of membrane-bound hydrogenase isoenzyme I from anaerobically grown *Escherichia coli* K 12. *European Journal of Biochemistry* **156**, 265-275.

SCHINDLER, F. & WINTER, J. 1987. Purification and properties of a soluble, thermophilic hydrogenase of *Acetomicrobium flavidum*. *Biochimica et Biophysica Acta* **913**, 81-88.

SCHLEGEL, H. G. 1986. General microbiology. Cambridge University Press, Cambridge. 587 pg.

SCHREIBER, D. R., GORDON, A. S. & MILLERO, F. J. 1985. The toxicity of copper to the marine bacterium *Vibrio alginolyticus*. *Canadian Journal of Microbiology* **31**, 83-87.

SCHULTZ, S. G. & SOLOMON, A. K. 1961. Cation transport in *Escherichia coli*. I. Intracellular Na^+ and K^+ concentrations and net cation movement. *Journal of General Physiology* **45**, 355-369.

SCHWABE, W. F. S. 1977. Tolerance of *Venturia inaequalis* to benzimidazole fungicides and dodine in South Africa. *Phytophylactica* **9**, 47-54.

SCHWABE, W. F. S. 1980a. Greenhouse evaluation of fungicides for apple scab control. *Phytophylactica* **12**, 195-197.

SCHWABE, W. F. S. 1980b. Curative activity of fungicides against apple leaf infection by *Venturia inaequalis*. *Phytophylactica* **12**, 199-207.

SCHWABE, W. F. S. 1980c. Prevention of storage scab of apples. *Phytophylactica* **12**, 209-211.

SIGEL, H. & MARTIN, R. B. 1982. Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chemical Reviews* **82**, 385-426.

SILVA, M. T., SOUSA, J. C. F., POLÓNIA, J. J. & MACEDO, P. M. 1979. Effects of local anesthethics in bacterial cells. *Journal of Bacteriology* **137**, 461-468.

SOLEL, Z. & SIEGEL, M. R. 1984. Effect of the fungicides guazatine and dodine on growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz* **91**, 273-285.

SOMERS, E. 1963. The uptake of dodine acetate by *Neurospora crassa*. *Mededelingen Landbouwhogeschool Opzoekingsstation Staat Gent* **28**, 580-589.

SOMERS, E. & PRING, R. J. 1966. Uptake and binding of dodine acetate by fungal spores. *Annals of Applied Biology* **58**, 457-466.

SRIVASTAVA, S. K. & SMITH, T. A. 1982a. The inhibition of growth in higher plants by a homologous series of guanidines and its reversal by spermidine. *Annals of Botany* **50**, 265-275.

SRIVASTAVA, S. K. & SMITH, T. A. 1982b. The effect of some oligo-amines and -guanidines on membrane permeability in higher plants. *Phytochemistry* **21**, 997-1008.

STORM, D. R., ROSENTHAL, K. S. & SWANSON, P. E. 1977. Polymyxin and related antibiotics. *Annual Review of Biochemistry* **46**, 723-763.

STRICKLAND, J. E. & MILLER, O. N. 1968. Inhibition of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by dihydroxyacetone, high ionic strength, and monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* **159**, 221-226.

STRØM, A. R., FALKENBERG, P. & LANDFALD, B. 1986. Genetics of osmoregulation in *Escherichia coli*: uptake and biosynthesis of organic osmolytes. *FEMS Microbiology Reviews* **39**, 79-86.

SUTHERLAND, R. M., ROTHSTEIN, A. & WEED, R. I. 1967. Erythrocyte membrane sulphydryl groups and cation permeability. *Journal of Cell Physiology* **69**, 185-198.

SZKOLNIK, M. & GILPATRICK. J. D. 1969. Apparent resistance of *Venturia inaequalis* to dodine in New York apple orchards. *Plant Disease Reporter* **53**, 861-864.

SZKOLNIK, M. & GILPATRICK, J. D. 1973. Tolerance of *Venturia inaequalis* to dodine in relation to the history of dodine usage in apple orchards. *Plant Disease Reporter* **57**, 817-821.

TAMIETTI, G. & GARIBALDI, A. 1984. Eradication of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in bean seeds in Italy. *in* Phytobacteriology and plant bacterial diseases of quarantine significance, pg. 69-76. Italian - U. S. Workshop / Seminar «Plant pathology and quarantine». Rome.

THEUVENET, A. P. R., KESSELS, B. G. F., BLANKENSTEIJN, W. M. & BORST-PAUWELS, G. W. F. H. 1987. A comparative study of K^+-loss from a cadmium-sensitive and a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **43**, 147-153.

THOMPSON, J., COSTERTON, J. W. & MACLEOD, R. A. 1970. K^+-dependent deplasmolysis of a marine pseudomonad plasmolyzed in a hypotonic solution. *Journal of Bacteriology* **102**, 843-854.

TOBIN, J. M., COOPER, D. G. & NEUFELD, R. J. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 821-824.

TU, C. M. 1980. Effect of fungicides on growth of *Rhizobium japonicum in vitro*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **25**, 364-368.

TUNIS, W. D. & SUDDS, R. H. 1959. Field trials with certain *n*-dodecylguanidine fungicides for the control of apple scab. *Plant Disease Reporter* **43**, 483-486.

VAN HEERIKHUIZEN, H., ALBRACHT, S. P. J., SLATER, E. C. & VAN RHEENEN, P. S. 1981. Purification and some properties of the soluble hydrogenase from *Chromatium vinosum*. *Biochimica et Biophysyca Acta* **657**, 26-39.

VAN HOOGEVEST, P. & DE KRUIJFF, B. 1978. Effect of amphotericin B on cholesterol-containing liposomes of egg phosphatidylcholine and didocosenoyl phosphatidylcholine. A refinement of the model for the formation of pores by amphotericin B in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* **511**, 397-407.

VARTIO, T. 1986. Disulfide-bounded polymerization of plasma fibronectin in the presence of metal ions. *Journal of Biological Chemistry* **261**, 9433-9437.

VINCENT, P. C. & BLACKBURN, C. R. B. 1958. The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. I. Comparisons of the action of several heavy metals. *Australian Journal of Experimental Biology* **36**, 471-475.

WAKATSUKI, T., TAZAKI, Y. & IMAHARA, H. 1986. Respiratory inhibition by copper in *Tetrahymena pyriformis* GL. *Journal of Fermentation Technology* **64**, 119-127.

WALKER, J. C. 1965. Patología vegetal. Ediciones Omega, Barcelona, 818 pg.

WEST, E. S., TODD, W. R., MASON, H. S. & VAN BRUGGEN, J. T. 1966. Textbook of biochemistry. The Macmillan Company, New York. 1595 pg.

WESTCOTT, C. 1950. Plant disease handbook. D. Van Nostrand Company, New York, 746 pg.

WISSE, G. A. & MACLEOD, R. A. 1989. Role of Na^+ in growth, respiration and membrane transport in the marine bacterium *Pseudomonas doudoroffii* 70. *Archives of Microbiology* **153**, 64-71.

YODER, K. S. & KLOS, E. J. 1976. Tolerance to dodine in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **66**, 918-923.

ZEHR, E. I. 1968. Selected organic fungicides and dimethyl sulfoxide as supplements to streptomycin for fire blight control on Bartlett pear. *Phytopathology* **58**, 1624-1629.

ZEVENHUIZEN, L. P. T. M., DOLFING, J., ESHUIS, E. J. & SCHOLTEN-KOERSELMAN, I. J. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microbial Ecology* 5, 139-146.

ANEXO A

ANEXO A

DADOS ADICIONAIS SOBRE A ACTIVIDADE BACTERIOSTÁTICA E BACTERICIDA DO Cu^{2+} E DA DODINA EM *PSEUDOMONAS SYRINGAE* ATCC 12271 *).

Nos Trabalhos I, IV, V e VIII, foram apresentados e discutidos os principais resultados sobre a actividade bactericida do Cu^{2+} e da dodina em *P. syringae*. Neste Anexo apresentam-se resultados complementares a estes.

Será referida a acção dos iões cúpricos e da dodina no crescimento de culturas de *P. syringae* em meio YGS, e a «Concentração Inibitória Mínima» (MIC) e a «Concentração Bactericida Mínima» (MBC) destes agentes químicos em «Nutrient Broth» (NB). Serão ainda apresentados valores das «Doses Letais» e «Tempos Letais» para a morte das células de *P. syringae* tratadas com Cu^{2+} ou dodina, não incluídos nos Trabalhos IV, V e VIII.

A.1. A ACTIVIDADE BACTERIOSTÁTICA DO Cu^{2+} E DA DODINA EM CÉLULAS EM CRESCIMENTO EXPONENCIAL.

Como trabalho preliminar ao estudo da actividade inibitória do Cu^{2+} e da dodina em células de *P. syringae*, determinei a cinética do crescimento de culturas em meio YGS tratadas com estes agentes químicos, comparando-se com a de culturas não tratadas.

A.1.a. Material e Métodos.

Para a determinação das «Doses Letais» e «Tempos Letais» (Trabalhos IV, V e VIII), utilizei células de culturas no fim da fase exponencial. Dado que no estudo da actividade bacteriostática se pretendia caracterizar a cinética do crescimento, era indispensável utilizar culturas mais jovens, tendo optado pelo uso de culturas no meio da fase exponencial.

---

*) Resultados não publicados.

Meio de cultura YGS (100 ml) (a composição deste meio encontra-se nos Trabalhos anexos) em frascos de 250 ml foram inoculados com um pequeno volume de uma cultura jovem em YGS. Os frascos foram mantidos com agitação a 27 °C. O crescimento das culturas foi seguido pela determinação, a tempos regulares, da concentração celular, em número de partículas por ml. Quando as culturas se encontravam a meio da fase exponencial ($3.5 - 4.7 \times 10^8$ partículas ml^{-1}), adicionei, a cada cultura, um determinado volume de uma solução concentrada estéril de sulfato de cobre ou dodina (extraída do fungicida comercial «Melprex»; para a caracterização desta amostra *cf.* Trabalho VI), de forma à concentração final de cobre variar entre 0.202 e 4.81 mM Cu^{2+} e a de dodina entre 10 µM e 0.92 mM. A uma das culturas não adicionei agente químico, considerando o crescimento desta como o controlo. Após a adição do agente químico, determinei, em cada cultura, a tempos regulares, a concentração celular, em número de partículas por ml. Para a determinação da concentração celular, utilizei uma câmara de contagem «Neubauer» (Improved double Neubauer ruling, Fortuna W. G. Co. - Opticolor, Germany), tendo seguido, na contagem, o procedimento descrito por Meynell & Meynell (1970).

A.1.b. Resultados.

Os resultados obtidos encontram-se representados nas Figuras A.1. e A.2. .

A adição de 0.202 mM Cu^{2+} resultou numa diminuição da concentração celular, 0.5 h após a adição do cobre, mas entre 0.5 e 2.5 h de tratamento, a taxa de crescimento da cultura tratada foi semelhante à da cultura controlo. A adição de 1 mM Cu^{2+}, causou uma cessação total do aumento da concentração celular com o tempo, ao fim de aproximadamente 1.5 h de tratamento. Na presença de 4.81 mM Cu^{2+}, observei uma paragem quase total do aumento da concentração celular, 0.5 h após a adição de cobre.

Uma hora após a adição de 10 µM dodina, a concentração celular era ligeiramente inferior à da cultura não tratada, mas entre 1 e 4 h, a taxa de crescimento foi semelhante à da cultura controlo. Concentrações iguais ou superiores a 48 µM dodina, resultaram numa cessação total do aumento da concentração celular, 1 hora após a adição do detergente. Um tratamento com 100 µM dodina resultou numa diminuição progressiva com o tempo (1 a 4 h) do número de partículas por unidade de volume.

A.1.c. Discussão.

Neste trabalho preliminar, a concentração celular foi quantificada pela determinação do número de partículas por unidade de volume. Não foi determinada qual a fracção de células viáveis no total de partículas existentes nas culturas. Uma constância do número de partículas pode corresponder, simultâneamente, a uma ausência de multiplicação celular e de lise, ou a uma presença simultânea destes dois fenómenos. Na gama de concentrações de Cu^{2+} utilizada, não se observaram células em lise, e só numa gama muito restrita de concentrações de dodina se observou um número significativo de células lisadas (Trabalho V).

Um tratamento com 0.202 mM Cu^{2+} ou 10 µM dodina resultou numa ligeira diminuição da concentração celular, 0.5 - 1 h após a adição do agente químico, seguida de um crescimento a uma taxa semelhante à do controlo. Provavelmente o tratamento com estas concentrações de Cu^{2+} ou dodina resultou na morte de uma pequena fracção da população. As células que sobreviveram a este tratamento multiplicaram-se a uma taxa semelhante à das células controlo.

Um tratamento com 4.81 mM Cu^{2+} ou 48, 480 ou 920 µM dodina resultou numa cessação rápida, total ou quase, da multiplicação celular. Esta paragem do crescimento pode ter correspondido a uma morte das células ou a uma inibição reversível do crescimento celular.

A diminuição progressiva com o tempo da concentração celular na cultura tratada com 100 µM dodina deve ter correspondido à lise de uma fracção da população tratada e à morte ou inibição do crescimento das restantes células.

A.2. DETERMINAÇÃO DA «CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA» (MIC) E DA «CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA» (MBC) DO Cu^{2+} E DA DODINA EM CÉLULAS CULTIVADAS EM «NUTRIENT BROTH».

A.2.a. Material e Métodos.

Células na fase exponencial foram separadas do sobrenadante por filtragem e suspensas em água destilada estéril. A concentração celular (número de partículas por ml) desta suspensão foi ajustada a 5×10^8 partículas ml^{-1}. O meio de cultura «Nutrient Broth» (NB, Difco) foi preparado de forma a numa diluição de 9:10

corresponder à concentração indicada pelo fabricante. Em cada tubo coloquei 9 ml de NB, sendo o meio esterilizado por autoclavagem. A cada tubo de meio estéril, adicionei 0.5 ml de uma solução aquosa estéril de sulfato de cobre ou de dodina (Melprex) de concentração variável, e 0.5 ml da suspensão bacteriana. A concentração celular final era assim de 2.5×10^7 partículas ml^{-1}. Esta concentração celular foi escolhida de forma a obter-se uma suspensão inicial de turvação quase imperceptível à vista desarmada, sendo assim fácil a detecção visual de crescimento após incubação dos meios. A concentração final de dodina variou entre 10 µM e 0.5 mM e a de Cu^{2+} entre 40 µM e 2 mM. Entre 10 e 50 µM dodina, as concentrações utilizadas foram de 10, 20, 25, 30 e 50 µM. Entre 0.6 e 2 mM Cu^{2+}, as concentrações utilizadas foram 0.6, 0.8, 1 e 2 mM. Ao fim de três dias de incubação a 27 °C, em cada cultura, observei a turvação à vista desarmada, e determinei a concentração celular. De cada tubo inoculei «em riscado» meio de cultura «Nutrient Agar» (NA, Difco) em caixa de Petri. Estas foram incubadas a 27 °C, tendo sido observadas após três dias de incubação. A «Concentração Inibitória Mínima» (MIC) foi considerada como a mais baixa concentração do agente químico que inibiu o crescimento das células do inóculo, *i. e.*, a mais baixa concentração do agente químico em que após incubação do meio de cultura a concentração celular era semelhante à concentração inicial. A «Concentração Bactericida Mínima» (MBC) foi considerada como a mais baixa concentração do agente químico que causou a morte de todas as células, *i. e.*, a mais baixa concentração do agente químico em que após incubação dos «riscados» não se formou qualquer colónia do organismo em estudo.

A.2.b. Resultados.

Os meios de cultura com uma concentração de Cu^{2+} igual ou superior a 0.8 mM não apresentavam uma turvação muito diferente da inicial, mas os com uma concentração igual ou inferior a 0.6 mM Cu^{2+} apresentavam uma turvação detectável à vista desarmada. Com 0.8, 1 e 2 mM Cu^{2+}, a concentração celular dos meios era semelhante à inicial, variando entre 2.7 e 3.1×10^7 partículas ml^{-1}. Com 0.6 mM Cu^{2+}, a concentração era muito superior à inicial. A MIC do Cu^{2+} é assim de 0.8 mM. Nos riscados das culturas com uma concentração de Cu^{2+} igual ou superior 1 mM não se formou qualquer colónia. Com 0.8 mM Cu^{2+}, detectaram-se cinco colónias, e com uma concentração de Cu^{2+} igual ou inferior a 0.6 mM, um número incontável de colónias. A MBC do Cu^{2+} é assim de 1 mM.

Enquanto que os meios de cultura com uma concentração de dodina igual ou superior a 25 µM não apresentavam uma turvação significativa, os meios com 20 e 10 µM dodina apresentavam uma ligeira turvação observável à vista desarmada. Com 25, 30 e 50 µM dodina, a concentração celular dos meios era semelhante à inicial (variava entre 2.1 e 2.6 x 10^7 partículas ml^{-1}). Com 20 e 10 µM dodina a concentração era de 6.1 x 10^7 e 1.5 x 10^8 partículas ml^{-1}, respectivamente. A MIC da dodina é assim de 25 µM. Nos «riscados» das culturas tratadas com uma concentração de dodina igual ou superior a 30 µM, não se observaram quaisquer colónias. Com 25 µM dodina, formaram-se três colónias. Com 20 e 10 µM dodina, observou-se nos riscados um número incontável de colónias. A MBC da dodina é assim de 30 µM.

As Concentrações Inibitória e Bactericida Mínimas do Cu^{2+} e da dodina em *P. syringae* encontram-se na Tabela A.1. .

A.2.c. Discussão.

Enquanto que a determinação da MIC e MBC foi levada a cabo em NB com uma concentração inicial de 2.5 x 10^7 partículas ml^{-1}, o estudo inicial (A.1.) da inibição do crescimento foi realizado em meio YGS, tendo os agentes químicos sido adicionados a culturas com 3.5 - 4.7 x 10^8 partículas ml^{-1}.

A presença de 1 mM Cu^{2+} em NB resultou na morte de todas as células presentes no inóculo. A adição de idêntica concentração de cobre a culturas em YGS teve como consequência uma paragem do crescimento, 1.5 h após a adição do agente químico. O tratamento com 4.81 mM Cu^{2+} em YGS resultou numa rápida cessação do crescimento. A actividade antibacteriana dos iões cúpricos em NB é assim ligeiramente mais intensa do que em YGS. Este facto pode ser devido à diferente composição dos meios de cultura utilizados, ou ao facto de o número de iões disponíveis por célula ser no primeiro meio superior ao do segundo.

A presença de dodina em concentrações iguais ou superiores a 30 µM, em NB, resultou na morte de todas as células presentes no inóculo. A adição de dodina, em concentrações iguais ou superiores a 48 µM, em YGS, resultou numa inibição rápida e total do crescimento bacteriano. Em ambos os meios de cultura, o início da actividade antibacteriana da dodina ocorreu quando a concentração deste detergente atingiu a concentração micelar crítica (*cf.* a Discussão geral nas páginas seguintes).

A.3. DISCUSSÃO GERAL.

Neste Anexo apresentam-se os resultados referentes à actividade bacteriostática e bactericida do Cu^{2+} e da dodina nas células de *P. syringae* em crescimento activo num meio de cultura. Nos Trabalhos I, IV, V e VIII, e nas Tabelas A.2. a A.4. do presente Anexo, apresentam-se os resultados referentes à actividade bactericida destes agentes químicos em células «em repouso» suspensas em água destilada ou tampão PIPES. A comparação dos resultados entre si encontra-se limitada pelo facto de se terem utilizado suspensões ou culturas com diferentes concentrações celulares e em meios diversos, e células em dois estados fisiológicos distintos. No entanto algumas conclusões podem ser apresentadas.

(i) A actividade bactericida do Cu^{2+} em *P. syringae* é muito mais intensa nos meios de suspensão, água destilada e tampão PIPES, do que nos meios de cultura, NB e YGS.

Em NB, a morte de todas as células (2.5×10^7 ml^{-1}) ocorreu com 1 mM Cu^{2+}. Em YGS, para a cessação completa do crescimento de uma cultura com $3.5 - 4.7 \times 10^8$ células ml^{-1}, foi necessário adicionar uma concentração igual ou superior a 4 mM Cu^{2+}. Em água destilada e tampão PIPES, um tratamento com 100 µM Cu^{2+} resultou na morte da grande maioria das células presentes na suspensão (10^8 ml^{-1}) (Tabela A.2 e Trabalho VIII). Dado que as suspensões em água destilada e PIPES eram muito mais concentradas do que as culturas em NB ou YGS, a mais elevada actividade bactericida do Cu^{2+} em água destilada e PIPES não pode ser explicada por uma maior concentração relativa de iões cúpricos nestes meios, mas antes é provavelmente devida ao diferente estado fisiológico das células e à diferente composição dos meios de suspensão e de cultura. Tanto o NB como o YGS apresentam na sua composição moléculas com elevada afinidade para os catiões metálicos (amino-ácidos no YGS e peptona no NB). O número de iões Cu^{2+} *disponíveis* para actuação nas células bacterianas nos meios YGS e NB é assim provavelmente muito inferior ao número de iões *adicionados* a estes meios de cultura. Pelo contrário, as moléculas de PIPES não parecem apresentar uma significativa capacidade de ligar iões cúpricos (Good *et al.*, 1966). A diminuição da toxicidade dos iões cúpricos, pela presença de determinadas moléculas orgânicas no meio de cultura é objecto de discussão na sub-secção 4.1.1. . A este facto acresce a circunstância de em água destilada e tampão PIPES se terem utilizado células «em repouso», mas em NB e YGS, células em crescimento activo.

(ii) A actividade bactericida da dodina em *P. syringae* ocorre a níveis comparáveis nos meios de cultura e nas suspensões em água destilada.

Em NB, a morte de todas as células ocorreu com 30 μM dodina. Em YGS, concentrações de dodina iguais ou superiores a 48 μM causaram uma rápida e completa cessação do crescimento. Em água destilada, um tratamento com concentrações de dodina superiores a 50 μM resultou na morte da grande maioria das células (Tabela A.4. e Trabalhos IV e V). É interessante constatar que a mais baixa concentração de dodina que tem uma notória actividade bactericida coincide aproximadamente com a concentração micelar crítica deste detergente (*cf.* sub-secção 4.2.2. e Trabalhos V, VI e VII). Dada a grande variação na composição e na concentração celular das suspensões e culturas utilizadas, estes resultados parecem indicar que, na actividade bactericida da dodina, a concentração absoluta (em particular se inferior ou superior à concentração micelar crítica) é mais determinante do que a sua concentração relativa, e que a actividade bactericida deste detergente não é muito influenciada pela composição do meio de suspensão ou cultura.

A.4. BIBLIOGRAFIA.

GOOD, N. E., WINGET, D., WINTER, W., CONNOLLY, T., IZAWA, S. & SINGH, R. M. M. 1966. Hydrogen ion buffers for biological research. *Biochemistry* 5, 467-477.

MEYNELL, G. G. & MEYNELL, E. 1970. Theory and practice in experimental bacteriology. Cambridge University Press, Cambridge. 347 pg. .

TABELA A.1.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (MIC) E CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (MBC) DO Cu^{2+} E DA DODINA EM *P. SYRINGAE* *).

	Cu^{2+} (mM)	dodina (μM)
MIC	0.8	25
MBC	1	30

---

*) Os agentes químicos ($CuSO_4$ ou dodina [Melprex]) foram adicionados a culturas em «Nutrient Broth» com 2.5×10^7 células ml^{-1}.

TABELA A.2.

DOSES LETAIS PARA A MORTE DE 25, 50, 90 e 99 % (LD_{25}, LD_{50}, LD_{90}, LD_{99}) DAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* SUSPENSAS EM ÁGUA DESTILADA (pH 6.5) OU TAMPÃO Na^+-PIPES (pH 6.5) E TRATADAS COM Cu^{2+} *).

Meio de suspensão	Tempo de actuação (min)	LD_{25} (µM)	LD_{50} (µM)	LD_{90} (µM)	LD_{99} (µM)
Água destilada	1	-	48	90	-
	5	-	22	63	-
	10	-	22	63	-
	15	-	16	72	-
Na^+-PIPES	1	49	65	111	171
	10	34	47	87	143
	15	32	41	69	105

---

*) Suspensões com 10^8 CFU ml^{-1} foram tratadas com diversas concentrações de $CuSO_4$. Foram retiradas amostras a dados tempos, sendo a viabilidade determinada após plaqueamento em NA. Os parâmetros da equação Probit (% de células mortas) *vs.* $\log_{10}$ (concentração de Cu^{2+}, em µM) foram determinados por regressão linear ponderada iterativa pelo método de Finney conforme descrito nos Trabalhos V e VIII. Os LDs, para cada tempo de exposição ao Cu^{2+}, foram calculados utilizando os valores dos parâmetros da equação da recta. O número de determinações médio por concentração de Cu^{2+} variou entre 1 e 4. O número de concentrações de Cu^{2+} por tempo de exposição variou entre 3 e 8. Parte destes valores encontram-se no Trabalho VIII.

TABELA A.3.

TEMPOS LETAIS PARA A MORTE DE 50 e 90 % (LT_{50}, LT_{90}) DAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* SUSPENSAS EM TAMPÃO Na^+-PIPES (pH 6.5) E TRATADAS COM Cu^{2+} *).

Meio de suspensão	$[Cu^{2+}]$ (µM)	LT_{50} (min)	LT_{90} (min)
Na^+-PIPES	30	5823	-
	40	31	1626
	50	4,6	80

---

*) Suspensões com 10^9 CFU ml^{-1} foram tratadas com diversas concentrações de $CuSO_4$. Foram retiradas amostras a dados tempos, sendo a viabilidade determinada após plaqueamento em NA. Os parâmetros da equação Probit (% de células mortas) *vs.* $\log_{10}$ (tempo de exposição em min) foram determinados por regressão linear ponderada iterativa pelo método de Finney conforme no Trabalho IV. Os LTs, para cada concentração de Cu^{2+}, foram calculados utilizando os valores dos parâmetros da equação da recta. Número médio de determinações por tempo de exposição: 2. O número de tempos de exposição por concentração de Cu^{2+} variou entre 2 e 4. Resultados não publicados.

TABELA A.4.

DOSES LETAIS PARA A MORTE DE 25, 50, 90 e 99 % (LD_{25}, LD_{50}, LD_{90}, LD_{99}) DAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* SUSPENSAS EM ÁGUA DESTILADA (pH 6.5) E TRATADAS COM DODINA *).

Meio de suspensão	Tempo de actuação (min)	LD_{25} (µM)	LD_{50} (µM)	LD_{90} (µM)	LD_{99} (µM)
Água destilada	5	21	29	56	94
	30	21	29	49	77
	60	20	26	46	71
	90	17	24	49	85
	120	24	29	44	62
	300	24	29	42	56

---

*) Suspensões com 10^8 CFU ml^{-1} foram tratadas com diversas concentrações de dodina (amostra de elevada pureza; *cf.* Trabalho VI). Foram retiradas amostras a dados tempos, sendo a viabilidade determinada após plaqueamento em NA. Os parâmetros da equação Probit (% de células mortas) *vs.* $\log_{10}$ (concentração de dodina, em µM) foram determinados por regressão linear ponderada iterativa pelo método de Finney conforme descrito nos Trabalhos V e VIII. Os LDs, para cada tempo de exposição à dodina, foram calculados utilizando os valores dos parâmetros da equação da recta. O número médio de determinações por concentração de dodina variou entre 1 e 1.8. O número de concentrações de dodina por tempo de exposição variou entre 4 e 5. Parte destes valores encontram-se no Trabalho V.

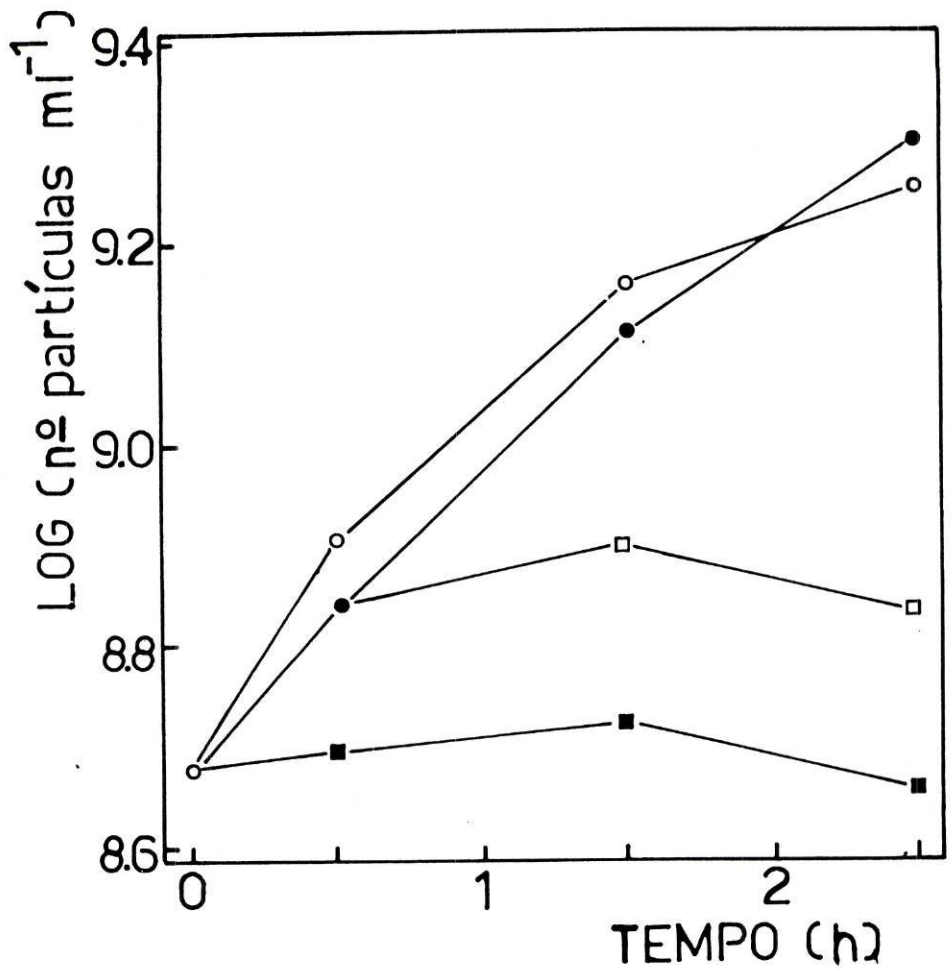


FIGURA A.1. Evolução da concentração celular (nº partículas ml^{-1}) de culturas em YGS na fase exponencial, tratadas com $CuSO_4$. Tratamento com ● 0.202 mM, □ 1 mM, ■ 4.81 mM Cu^{2+}; O controlo.

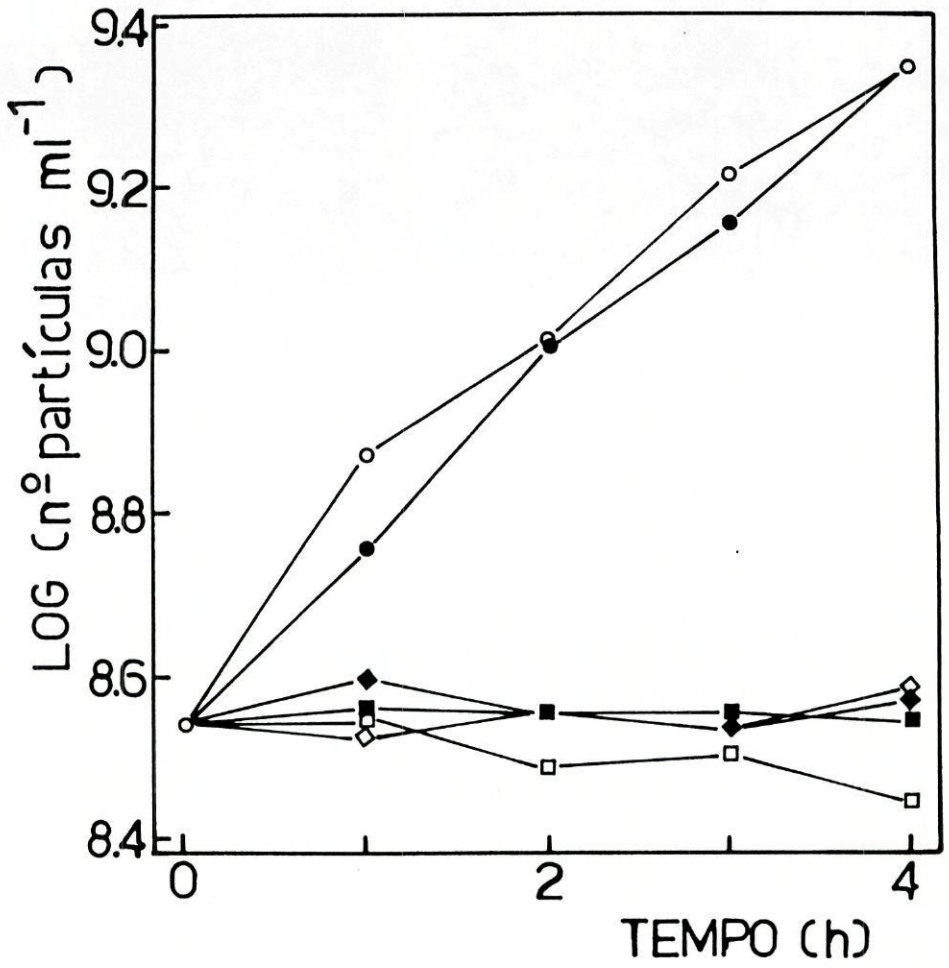


FIGURA A.2. Evolução da concentração celular (nº partículas ml^{-1}) de culturas em YGS na fase exponencial, tratadas com dodina (Melprex) Tratamento com, ● 10 µM, ■ 48 µM, □ 100 µM, ◇ 480 µM e ◆ 920 µM dodina; O controlo.

ANEXO B

ANEXO B

O EFLUXO DE K^+ INDUZIDO PELO Hg^{2+} E PELA N-ETILMALEIMIDA EM *P. SYRINGAE*. A INFLUÊNCIA DO Hg^{2+} NO EFLUXO DE K^+ INDUZIDO PELO Cu^{2+} *).

Nos trabalhos I, II, III e VIII, foram apresentados e discutidos os resultados principais sobre o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} nas células de *P. syringae*.

Desde há longa data que se verificou que o Hg^{2+}, e outros agentes com elevada afinidade para os grupos sulfidrilo como a N-etilmaleimida (NEM), podem induzir um acentuado efluxo de K^+ em células eucarióticas e procarióticas. O objectivo do presente trabalho é verificar se idêntico fenómeno ocorre em *P. syringae*, e comparar os resultados com os referidos na bibliografia, e os obtidos nas células desta espécie bacteriana tratada com Cu^{2+}.

B.a. Material e Métodos.

As células foram cultivadas em meio YGS e suspensas em tampão 10 mM Na^+-PIPES como descrito nos Trabalhos I, II, III e VIII.

O efluxo de K^+ induzido pelo $HgCl_2$ e pela N-etilmaleimida foi estudado utilizando um eléctrodo específico Metrohm, de acordo com a metodologia descrita no Trabalho I.

B.b. Resultados.

O efluxo de K^+ induzido pelos iões Hg^{2+}.

O tratamento das células de *P. syringae* com Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} ou Zn^{2+}, em concentrações até 0.1 mM, durante 1 h, não causa um efluxo detectável de K^+ (Trabalho I). Pelo contrário, um tratamento com concentrações micromolares de $CuSO_4$ ou $HgCl_2$ resulta numa saída muito acentuada do K^+ intracelular.

---

*) Resultados não publicados.

O efluxo de K^+ induzido pelo $HgCl_2$ nas células de *P. syringae* apresenta as seguintes características principais:

(i) O tratamento com concentrações superiores a 10 μM Hg^{2+} causa a saída da maioria do K^+ livre intracelular (Figura B.1.; *cf.* Tabela B.1.).

(ii) A quantidade de K^+ libertado em função do tempo de tratamento é uma curva sigmóide, muito assimétrica (Figura B.2.). A taxa do efluxo, representada em função do tempo, é uma curva em forma de sino, muito assimétrica, com a taxa máxima atingida alguns segundos após a adição do Hg^{2+} (Figura B.1.).

(iii) Nos primeiros 10 minutos de tratamento, o processo de efluxo mais rápido ocorre com 10 μM Hg^{2+} (Figuras B.1. e B.2.). Concentrações superiores resultam num retardamento da fase inicial do processo de efluxo, traduzida numa diminuição da taxa máxima de efluxo (Figura B.3.) e na quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento (Figura B.4.), apesar da quantidade final de potássio libertado aumentar com a concentração de Hg^{2+}. A taxa máxima do efluxo e a quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento, em função da concentração de Hg^{2+}, são curvas em forma de sino, assimétricas.

O efluxo de K^+ induzido pelo Hg^{2+} apresenta assim algumas características qualitativamente semelhantes ao induzido pelo Cu^{2+}. A taxa máxima de efluxo em função da concentração de Cu^{2+} é também uma curva assimétrica em forma de sino (Figura 2 do Trabalho I). No entanto, enquanto que a taxa máxima de efluxo induzido pelo Cu^{2+} é atingida com 40 μM (Figura 2 do Trabalho I), a induzida pelo Hg^{2+} ocorre com 10 μM (Figura B.3.). A quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento com Cu^{2+} é máxima com 40 μM Cu^{2+}; concentrações superiores induzem a libertação de uma menor quantidade de K^+ (Figura 3 do Trabalho I). A máxima quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento com Hg^{2+}, observa-se com 10 μM; concentrações superiores causam a libertação de quantidades ligeiramente inferiores de K^+ (Figura B.4.).

Nos primeiros 10 minutos de tratamento com Cu^{2+} ou Hg^{2+}, o processo de efluxo induzido por concentrações muito reduzidas (10 - 15 μM) de metal é mais acentuado nas células tratadas com Hg^{2+} do que nas células tratadas com Cu^{2+}. A quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento com 15 μM Cu^{2+} é de 17 μM K^+, e com 15 μM Hg^{2+}, de 33 μM K^+ (Figura 3 do Trabalho I; Figura B.4.). Com concentrações superiores de metal, o processo de efluxo é mais acentuado e mais rápido nas células tratadas com Cu^{2+} do que nas células tratadas com Hg^{2+}. Após tratamento com 50 μM Cu^{2+}, a taxa máxima é de 0.023 μmol K^+ mg^{-1} 5 s^{-1}, e com 50 μM Hg^{2+} de 0.0030 μmol K^+ mg^{-1} 5 s^{-1} (Figura 2 do Trabalho I; Figura B.3.). A quan-

tidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento com 50 μM Cu^{2+} é de 77 μM K^+, e com 50 μM Hg^{2+}, de 25 μM K^+ (Figura 3 do Trabalho I; Figura B.4.).

O efluxo de K^+ induzido pela N-etilmaleimida.

A molécula com elevada afinidade para os grupos sulfidrilo, N-etilmaleimida (NEM), também induz uma saída significativa do K^+ das células de *P. syringae*.

Ao contrário dos iões Cu^{2+} e Hg^{2+}, que são efectivos a concentrações muito inferiores a 100 μM, a NEM só causa uma saída significativa do K^+ intracelular em concentrações na gama das centenas de micromolar. Esta diferença é ilustrada pelo gráfico apresentado na Fig. B.2. que mostra que um tratamento com 20 μM Hg^{2+} ou 800 μM NEM resultam em níveis semelhantes de libertação do K^+ intracelular.

A um aumento da concentração de NEM, entre 100 e 800 μM, corresponde um aumento da quantidade de K^+ libertado após 4 min de tratamento e da taxa máxima de efluxo (Tabela B.1.). Assim, ao contrário dos iões Cu^{2+} e Hg^{2+}, em que estes parâmetros são uma função em forma de sino em relação à concentração de metal, na gama de concentrações de NEM testada, não se observa tal correlação.

A saída do K^+ das células tratadas com NEM ocorre a uma taxa muito inferior à observada nas células tratadas com Hg^{2+} ou Cu^{2+} (Tabela B.1.).

A influência de um tratamento com Hg^{2+} no efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+}.

Para concentrações superiores a 10 - 15 μM, o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} é muito mais rápido do que o causado pelo Hg^{2+}. Utilizei esta característica diferencial para estudar qual a influência de um pré-tratamento com Hg^{2+}, no efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+}. Os principais resultados encontram-se representados nas Figuras B.5. e B.6. . Quando as células são tratadas com Hg^{2+} (50 - 100 μM), estas libertam K^+ lentamente. Se após este tratamento, se adiciona Cu^{2+} (20 - 40 μM), a cinética do efluxo de K^+ não se altera, indicando que os iões cúpricos não alteram significativamente o processo de efluxo de K^+ induzido pelos iões de mercúrio.

B.c. Discussão.

Em células eucarióticas, desde há longa data que se constatou que os iões de mercúrio, a par dos iões cúpricos, são potentes indutores de efluxo de K^+.

Vincent & Blackburn (1958) referiram que um tratamento de eritrócitos humanos com concentrações de Pb^{2+}, Au^{3+}, Hg^{2+} ou Cu^{2+}, superiores a 10 - 100 μM, tinha como consequência uma saída apreciável do K^+ intracelular, apresentando os três últimos metais uma efectividade semelhante.

Em células da alga verde *Chlorella sp.*, De Filippis (1979) observou que os iões Hg^{2+} e várias moléculas orgânicos contendo mercúrio, eram fortes indutores de um efluxo de K^+.

Em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, Theuvenet *et al.* (1987) observaram que um tratamento com 0.5 mM de Hg^{2+} ou Cu^{2+} resultava numa rápida saída do K^+ intracelular, a níveis semelhantes. No entanto, em células desta espécie, Passow & Rothstein (1960) referiram que um tratamento com 2 mM Hg^{2+} causava um maior efluxo de K^+ do que o induzido por 4 mM Cu^{2+}.

Os iões de mercúrio são também fortes indutores de um efluxo de K^+ em células eucarióticas. Em células de *Escherichia coli*, Meury *et al.* (1980) observaram que após 40 min de tratamento com 1 mM $HgCl_2$, a grande maioria do K^+ intracelular tinha sido libertado.

Não conheço qualquer estudo comparativo sobre o efluxo de K^+ induzido pelo Cu^{2+} e pelo Hg^{2+} em células bacterianas, e os trabalhos publicados sobre o efluxo de K^+ causado pelos iões de mercúrio não são muito detalhados, pelo que a discussão dos resultados obtidos com *P. syringae* encontra-se limitada. No entanto, os resultados que obtive com esta espécie bacteriana e os referidos na bibliografia são geralmente concordantes na elevada capacidade destes dois catiões divalentes em causarem uma pronunciada saída do K^+ intracelular.

Em *P. syringae*, a quantidade final de K^+ libertado pela acção do Cu^{2+} ou Hg^{2+} aumenta com um incremento da concentração de metal. No entanto, na fase inicial do efluxo, a libertação mais rápida ocorre com concentrações muito reduzidas de metal (40 μM Cu^{2+} e 10 μM Hg^{2+}); concentrações superiores retardam o processo de efluxo. Desconheço qual a causa deste fenómeno. Em eritrócitos humanos, Weed *et al.* (1962) observaram que a quantidade de K^+ libertado e a inibição do transporte de glucose não eram proporcionais à quantidade de Hg^{2+} ligado às células: entre 0.5 e 50 - 100 x 10^7 átomos de mercúrio absorvidos por célula, um aumento da quantidade de metal ligado às células resultava num aumento da quantidade de K^+ libertado e da

inibição do transporte da glucose, mas quantidades superiores resultavam num decréscimo da quantidade de K^+ libertado. Para explicar este fenómeno foi admitido que elevadas concentrações de mercúrio reduziam a permeabilidade da membrana citoplasmática dos eritrócitos.

O mecanismo do efluxo de K^+ induzido pela NEM foi estudado, em *Escherichia coli*, por Meury *et al.* (1980), Bakker & Mangerich (1982) e Bakker *et al.* (1987). A gama de concentrações de NEM utilizadas por estes investigadores para causar uma acentuada saída do K^+ das células de *Escherichia coli*, é semelhante à observada como efectiva em *P. syringae*.

B.d. Bibliografia.

BAKKER, E. P., BOOTH, I. A., DINNBIER, U., EPSTEIN, W. & GAJEWSKA, W. 1987. Evidence for multiple K^+ export systems in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **169**, 3743-3749.

BAKKER, E. P. & MANGERICH, W. E. 1982. *N*-ethylmaleimide induced K^+-H^+ antiport activity in *Escherichia coli* K-12. *FEBS Letters* **140**, 177-180.

DE FILIPPIS, L. F. 1979. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie* **92**, 39-49.

MEURY, J., LEBAIL, S. & KEPES, A. 1980. Opening of potassium channels in *Escherichia coli* membranes by thiol reagents and recovery of potassium tightness. *European Journal of Biochemistry* **113**, 33-38.

PASSOW, H. & ROTHSTEIN, A. 1960. The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. *Journal of General Physiology* **43**, 621-633.

THEUVENET, A. P. R., KESSELS, B. G. F., BLANKENSTEIJN, W. M. & BORST-PAUWELS, G. W. F. H. 1987. A comparative study of K^+-loss from a cadmium-sensitive and a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* **43**, 147-153.

VINCENT, P. C. & BLACKBURN, C. R. B. 1958. The effects of heavy metal ions on the

human erythrocyte. I. Comparisons of the action of several heavy metals. *Australian Journal of Experimental Biology* **36**, 471-475.

WEED, R., EBER, J. & ROTHSTEIN, A. 1962. Interaction of mercury with human erythrocytes. *Journal of General Physiology* **45**, 395-410.

TABELA B.1.

ALGUNS PARÂMETROS DO EFLUXO DE K^+ INDUZIDO PELA N-ETILMALEIMIDA, Cu^{2+} E Hg^{2+} NAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Agente químico/ concentração	$[K^+]_{out}$ 4 min[2]	Taxa máxima de efluxo de K^+	Tempo para taxa máxima de efluxo
(µM)	(µM K^+)	(µmol K^+ mg^{-1} 5 s^{-1})	(min)
100 µM NEM	23	0,00091	2,5
200	28	0,00107	1,5
400	33	0,00133	1,0
800	38	0,00158	0,5
15 µM $CuSO_4$	17	0,0011	6,5
40	76	0,0249	0,8
100	73	0,0117	0,8
5 µM $HgCl_2$	23	0,00086	0,3
10	38	0,00550	0,3
100	26	0,00297	0,2

---

[1] Células suspensas em tampão 10 mM Na^+-PIPES (pH 6.5). A concentração extracelular de K^+ foi determinada cada 5 s, utilizando um eléctrodo específico. Os parâmetros do efluxo de K^+ foram calculados da forma descrita no Trabalho I. Os resultados referentes à acção do Cu^{2+} foram extraídos do Trabalho I ou obtidos utilizando a metodologia descrita neste trabalho. Os restantes valores não foram publicados.

[2] A libertação da totalidade do K^+ livre intracelular corresponde a uma $[K^+]_{out}$ de aproximadamente 80 µM K^+ (Trabalho II).

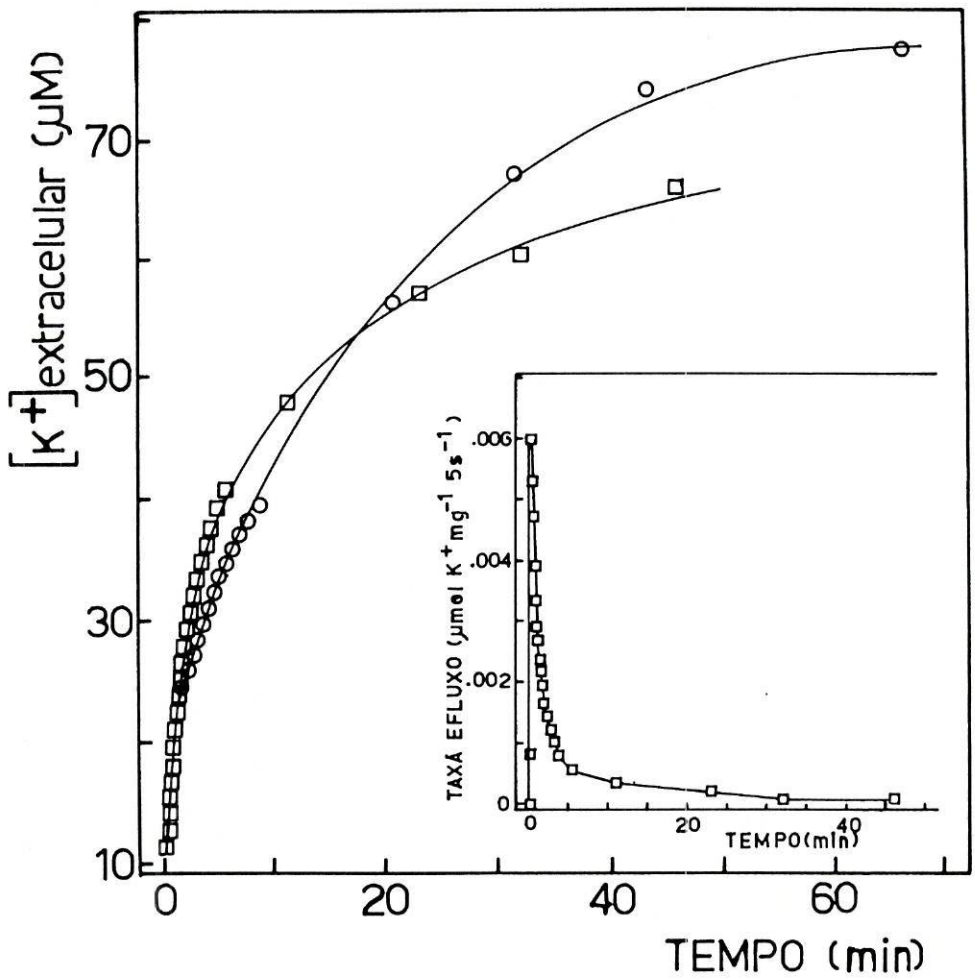


FIGURA B.1. Cinética da libertação de K^+ de células de *P. syringae* tratadas com 10 (□) ou 20 μM $HgCl_2$ (○). A concentração extracelular de K^+ foi determinada utilizando um eléctrodo específico. Células suspensas em tampão Na^+-PIPES. Resultados de uma experiência.
Gráfico inserido: Variação da taxa de efluxo de K^+ com o tempo de exposição a 10 μM Hg^{2+}. Resultados de uma experiência.

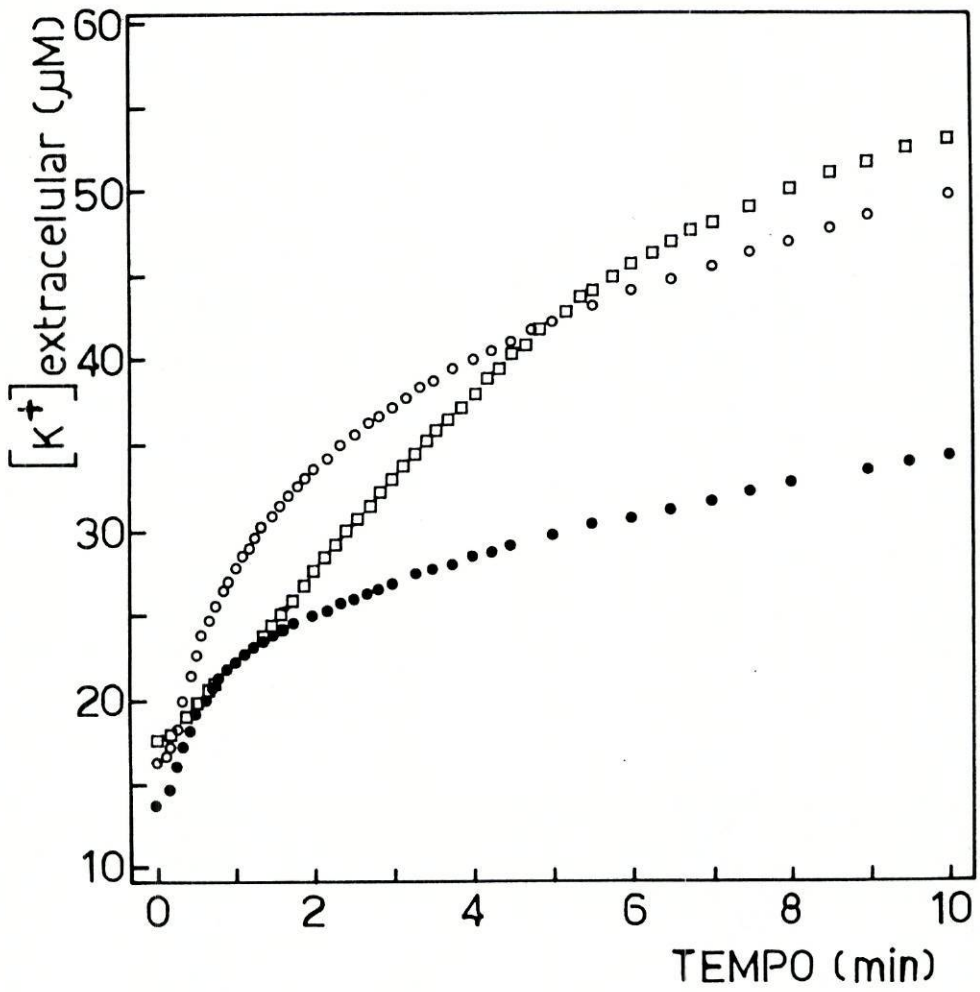


FIGURA B.2. Cinética da libertação de K^+ de células de *P. syringae* tratadas com 20 (○) ou 50 μM $HgCl_2$ (●), ou 800 μM N-etilmaleimida (□). Células suspensas em tampão Na^+-PIPES. A concentração extracelular de K^+ foi determinada utilizando um eléctrodo específico. Resultados de uma experiência.

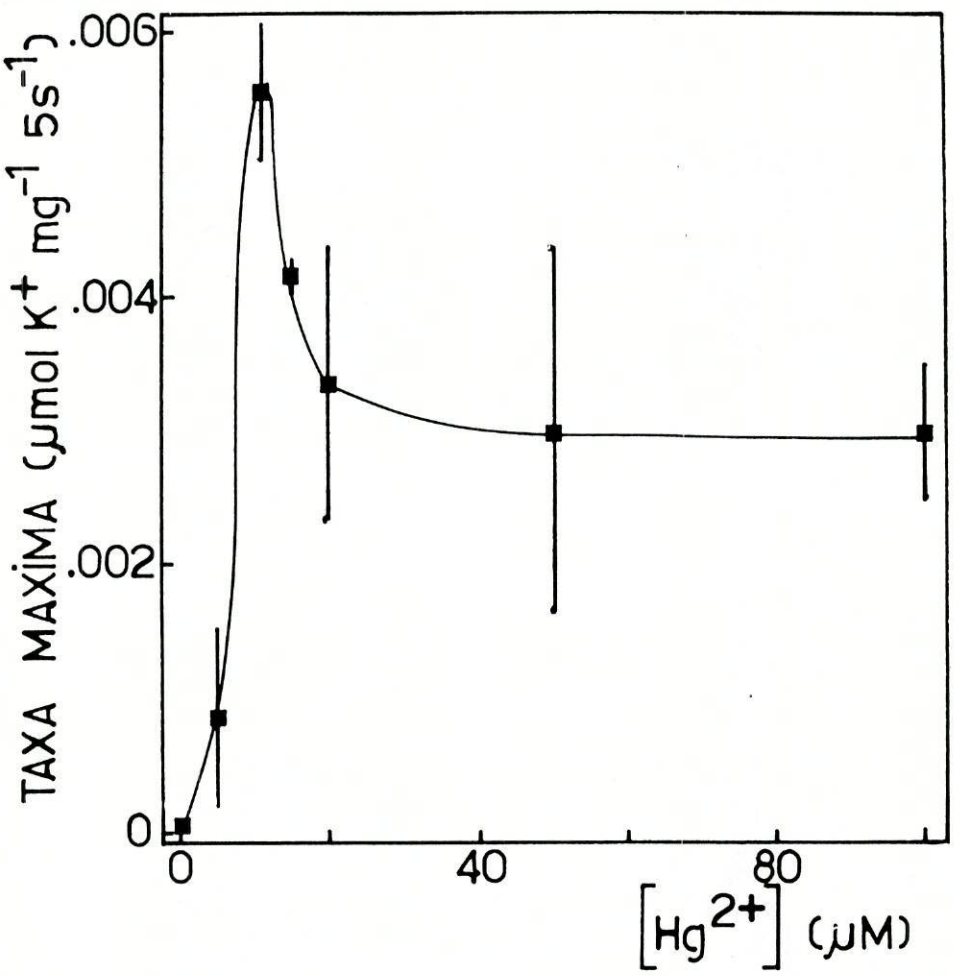


FIGURA B.3. Taxa máxima do efluxo de K^+ em função da concentração de Hg^{2+}. Células suspensas em tampão Na^+-PIPES. As concentrações extracelulares de K^+ (e a partir destas as taxas de efluxo) foram determinadas cada 5 s, utilizando um eléctrodo específico. Para cada concentração de Hg^{2+}, a taxa máxima do efluxo foi considerada como a mais elevada taxa de efluxo no decorrer do processo de libertação do K^+. Número médio de determinações por concentração de Hg^{2+}: 2.7. As barras representam os desvios padrões das médias.

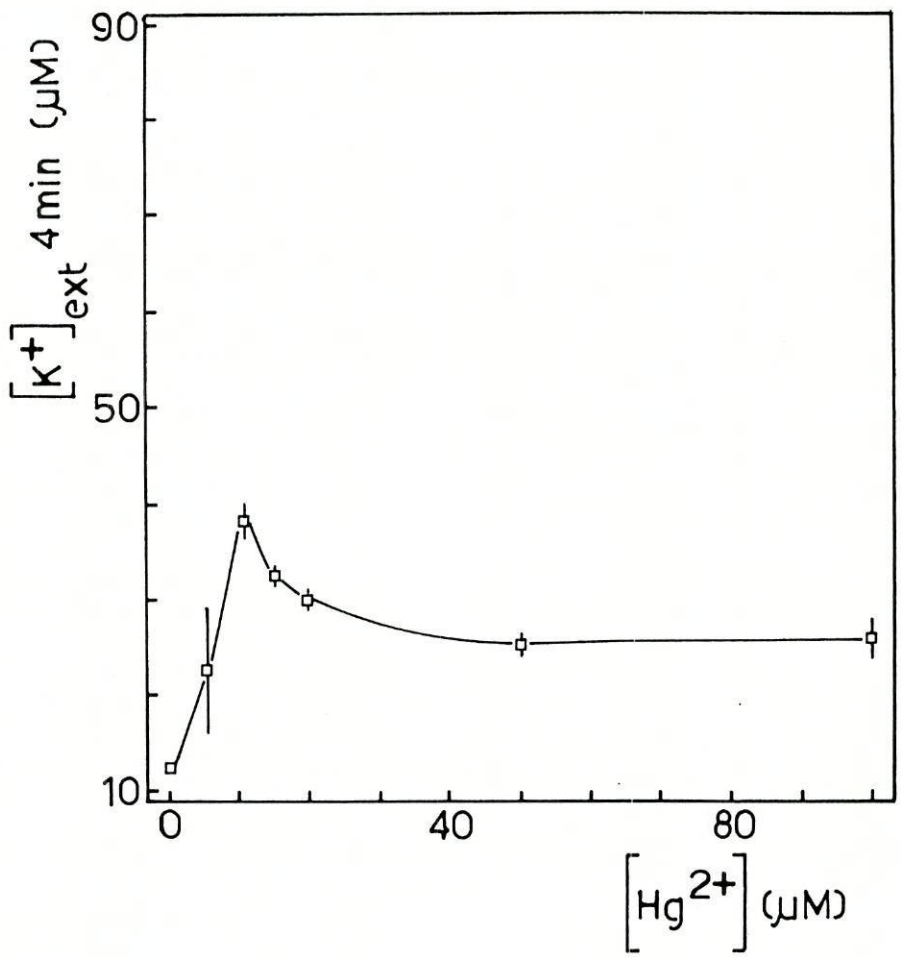


FIGURA B.4. Concentração extracelular de K^+ em suspensões de *P. syringae* em tampão Na^+-PIPES, tratadas com Hg^{2+} durante 4 minutos. O K^+ foi doseado utilizando um eléctrodo específico. Número médio de determinações por concentração de Hg^{2+}: 2.5. As barras representam os desvios padrões das médias.

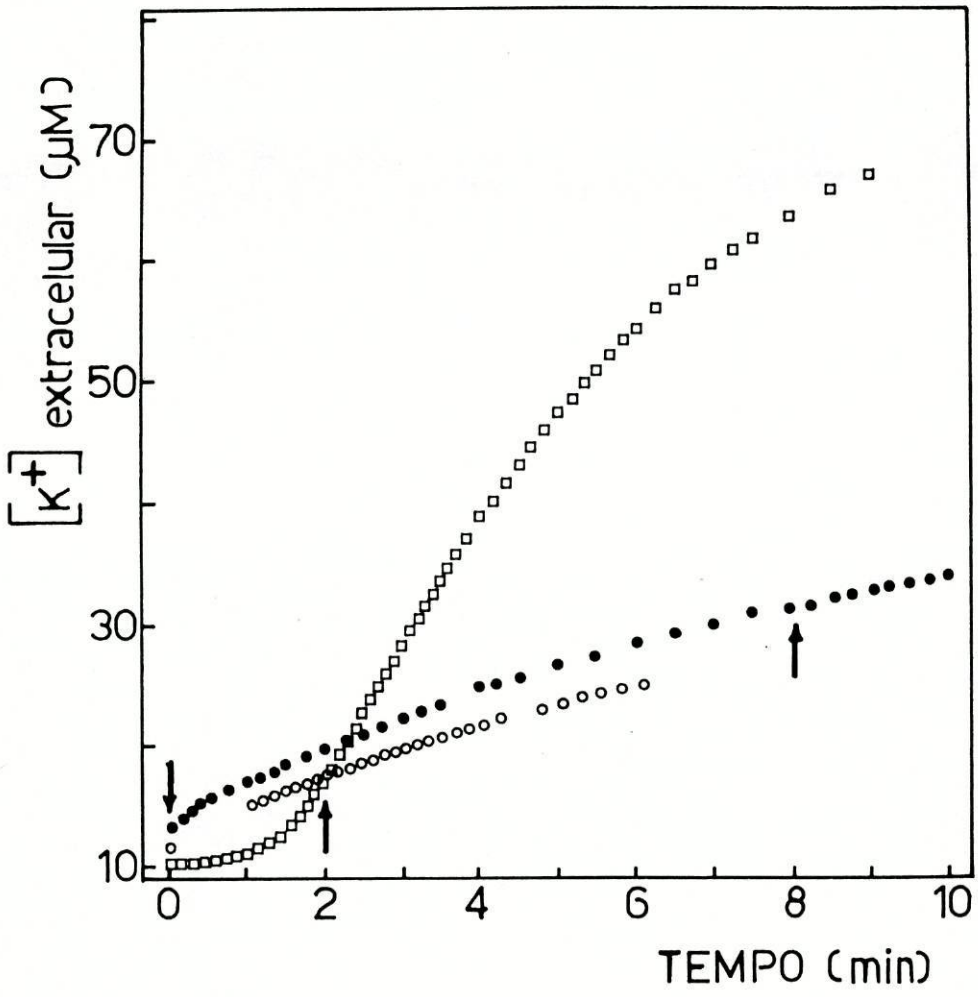


FIGURA B.5. Influência de um tratamento com $HgCl_2$ no efluxo de K^+ induzido por 20 µM $CuSO_4$. Células suspensas em tampão Na^+-PIPES. A concentração extracelular de K^+ foi determinada utilizando um eléctrodo específico. □, ausência de pré-tratamento; ○, adição de 100 µM Hg^{2+} ao tempo zero, e Cu^{2+} 2 min depois; ●, adição de 100 µM Hg^{2+} ao tempo zero, e Cu^{2+} 8 min depois. Resultados de uma experiência.

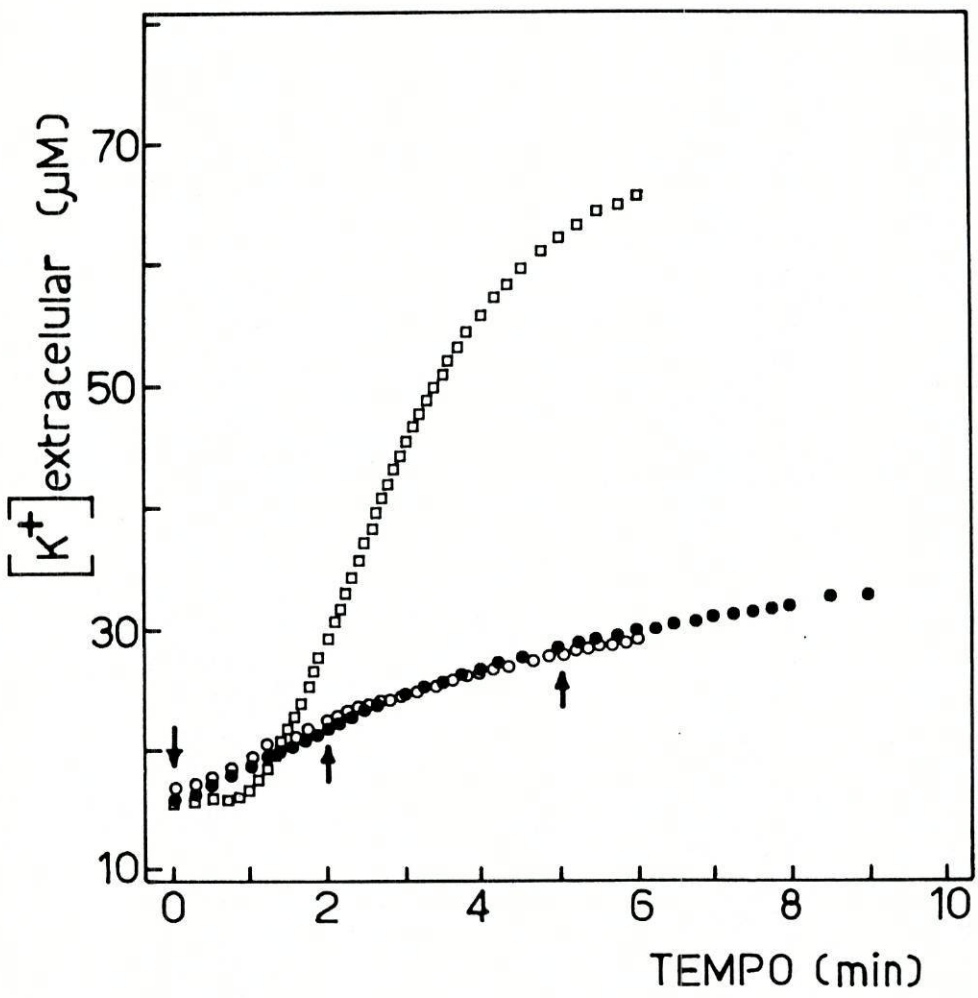


FIGURA B.6. Influência de um tratamento com $HgCl_2$ no efluxo de K^+ induzido por 40 μM $CuSO_4$. Células suspensas em tampão Na^+-PIPES. A concentração extracelular de K^+ foi determinada utilizando um eléctrodo específico. □, ausência de pré-tratamento; ○, adição de 50 μM Hg^{2+} ao tempo zero, e Cu^{2+} 2 min depois; ●, adição de 50 μM Hg^{2+} ao tempo zero, e Cu^{2+} 5 min depois. Resultados de uma experiência.

ANEXO C

ANEXO C

A ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* *).

Estudei a absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae* em condições experimentais idênticas às utilizadas nos restantes estudos sobre o modo de acção dos iões cúpricos nas células desta espécie. Estudei também a influência do Hg^{2+}, Ca^{2+}, Mg^{2+}, e N-etilmaleimida, na absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae*. Na secção 2. é relacionada a absorção do Cu^{2+} com o efluxo de K^{+}. No Trabalho IX são relacionados os níveis de absorção do Ca^{2+}, Cd^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} e Zn^{2+}, com a afinidade destes catiões para os principais grupos funcionais da célula bacteriana.

C.a. Material e Métodos.

As células foram cultivadas em meio YGS e suspensas em tampão 10 mM Na^{+}-PIPES conforme descrito nos Trabalhos I, II, III e VIII.

O cobre foi adicionado sob a forma de sulfato, o cálcio, magnésio e mercúrio, sob a forma de cloreto.

Para o estudo da absorção do Cu^{2+}, utilizei o seguinte método. A 9 ml de suspensão bacteriana, adicionei 1 ml de soluções de $CuSO_4$, de forma à concentração final variar entre 10 e 200 µM. O número médio de amostras por concentração de cobre foi de 6.1. Após 30 min à temperatura ambiente, as suspensões foram centrifugadas. A cada sedimento adicionei 10 ml de tampão Na^{+}-PIPES, procedendo a nova centrifugação. Os sobrenadantes foram então cuidadosamente separados das células. A estas adicionei 2.5 ml de HNO_3 (20 % v/v), após o que foram autoclavadas a 1 atm durante 15 min.

---

*) Resultados sumariamente apresentados no Trabalho IX.

O cobre foi então doseado nas amostras por espectrometria de absorção atómica, utilizando um espectrofotómetro Varian 1250 trabalhando com chama de ar-acetileno, a 327.4 nm com 0.2 nm de largura de fenda.

Para o estudo da influência de diferentes pré-tratamentos na absorção de Cu^{2+}, os iões ou moléculas foram adicionados às suspensões, e após um tempo variável, as células foram tratadas com $CuSO_4$. A determinação do cobre absorvido realizou-se de acordo com o método anteriormente descrito.

C.b. Resultados e Discussão.

A absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae*.

Resultados apresentados anteriormente (Cabral & Silva, 1984) indicaram que a absorção do Cu^{2+} pelas células de *P. syringae* é um processo muito rápido, que se completa essencialmente em alguns minutos. Por esta razão, o Cu^{2+} foi quantificado nas células após 30 min de tratamento.

Os resultados obtidos encontram-se representados na Figura C.1 e na Tabela C.1.. Se os iões Cu^{2+} se encontrarem uniformemente distribuídos nas células (*i. e.* tanto à superfície como no interior), os níveis de absorção de cobre pelas células de *P. syringae* correspondem a concentrações molares celulares que variam entre 1.7 e 59.9 mM Cu^{2+}. Admitindo uma distribuição uniforme do cobre nas células e entre as células, a coluna 5 da Tabela C.1. indica que as células de *P. syringae* concentraram os iões cúpricos algumas centenas de vezes em relação à sua concentração inicial na solução. Com uma concentração inicial de 200 μM Cu^{2+}, a quantidade de cobre absorvido corresponde aproximadamente a 2.4 % do peso seco das células.

O gráfico inserido na Figura C.1. representa a isotérmica de absorção, em que as quantidades de Cu^{2+} absorvido são representadas em função da concentração final no sobrenadante (concentração de equilíbrio). O coeficiente de variação médio foi inferior a 10 %, o que indica um erro experimental aceitável. Com uma concentração inicial de Cu^{2+} compreendida entre 10 e 50 μM (correspondente a concentrações de equilíbrio inferiores a 20 μM Cu^{2+}), os valores das quantidades de Cu^{2+} absorvido parecem dispor-se segundo uma curva convexa, apesar da curvatura ser muito ligeira. A esta primeira fase, parece seguir-se uma curva concâva. A isotérmica de absorção seria assim do tipo «S» do sistema de classificação de Giles *et al.* (1960). Este tipo de isotérmica indica que a uma primeira fase de absorção cooperativa,

segue-se uma absorção do tipo «Langmuiriano». Saliente-se no entanto que a quantidade de Cu^{2+} absorvido com a mais elevada concentração testada (200 µM) é muito inferior ao nível de saturação das células.

A absorção de metais por células eucarióticas e procarióticas tem sido objecto de intensa investigação. No entanto, dado que as condições experimentais utilizadas pelos diferentes investigadores têm sido muito diversas, torna-se difícil comparar os resultados entre si. Nalguns casos, a absorção é estudada na presença de uma fonte energética e assim a quantidade de metal absorvido pode ser resultado de uma simultânea absorção passiva e transporte activo. Nos casos em que as células são tratadas com o metal na ausência de uma fonte de energia, alguns dos meios de suspensão utilizados não são muito adequados, dado que contêm moléculas que podem ligar quantidades significativas de iões metálicos. Em muitos trabalhos publicados, algumas das condições experimentais, nomeadamente a concentração celular das suspensões, expressa em peso seco por unidade de volume, não são referidas. Trata-se de um dado muito importante, dado que, como foi mostrado por vários investigadores, a quantidade de metal absorvido depende da concentração inicial, e esta é uma função da concentração celular da suspensão. A comparação dos resultados entre si também exige que se conheçam as três variáveis principais nos problemas de absorção, as concentrações inicial, de equilíbrio e de absorção, e em alguns dos trabalhos publicados, os valores de algumas destas variáveis não são apresentados. Mais informativo do que a relação entre a quantidade absorvida e a inicial é a relação entre a quantidade absorvida e a concentração final no sobrenadante (concentração de equilíbrio), dado que esta relação permite caracterizar o tipo de absorção dos iões ou moléculas pelas células. O sistema clássico de classificação das isotérmicas de absorção é o de Giles *et al.* (1960).

Cotter & Trevors (1988), utilizando um eléctrodo específico para o cobre, estudaram a absorção de Cu^{2+} pelas células de duas estirpes de *Escherichia coli* (uma estirpe selvagem, sensível ao Cu^{2+}, e uma resistente a este metal) suspensas em tampão PIPES. Ao fim de 15 min de exposição a 30 - 200 µM Cu^{2+}, a quantidade de Cu^{2+} absorvido era, em ambas as estirpes, uma função linear da concentração inicial de Cu^{2+}, sendo o valor mais elevado de cobre absorvido de aproximadamente 12 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$. Os autores não apresentaram as isotérmicas de absorção correspondentes, nem explicitaram qual a concentração celular da suspensão, pelo que não é possível conhecer qual o tipo de mecanismo de absorção dos

iões cúpricos pelas células das duas estirpes de *Escherichia coli*. Saliente-se no entanto que as quantidades de Cu^{2+} absorvidas pelas células de *Escherichia coli* são de uma ordem de grandeza muito superior às que observei em *P. syringae* (e como será referido seguidamente, também muito superiores às observadas em muitas outras espécies de microrganismos). Este facto pode ser devido a diferenças no comportamento das células de *Escherichia coli* e *P. syringae*. Esta explicação é no entanto pouco provável, considerando que a estrutura e composição das células destas duas espécies não são certamente tão díspares. Esta diferença nos níveis de absorção do cobre pode ainda ser devido ao método de doseamento deste metal. Cotter & Trevors dosearam o Cu^{2+} utilizando um eléctrodo específico, e este só é sensível a iões livres, não ligados a moléculas. Em *P. syringae*, verifiquei que um tratamento com Cu^{2+} resulta num efluxo de fosfato inorgânico, «materiais-absorvendo-a-260 nm» e «moléculas-contendo-ribose» (Trabalho II). Estes metabolitos incluem moléculas que ligam fortemente catiões metálicos, como o fosfato inorgânico, os nucleótidos e o RNA. Se um fenómeno semelhante ocorrer nas células de *Escherichia coli* tratadas com Cu^{2+}, uma parte do Cu^{2+} presente no sobrenadante pode não ser detectado pelo eléctrodo específico, por estar ligado a moléculas libertadas pelas células. Dado que a avaliação da quantidade de cobre absorvido foi feita pela diferença entre as concentrações inicial e final no sobrenadante, uma avaliação por defeito da concentração final do sobrenadante pode levar a uma avaliação errada por excesso da quantidade de cobre absorvida pelas células. Uma explicação adicional para a diferença observada nos níveis de absorção de cobre pelas células de *Escherichia coli* e *P. syringae*, pode residir na utilização por Cotter & Trevors de suspensões de reduzida concentração celular. O esclarecimento desta questão exigiria o doseamento directo do cobre presente nas células de *Escherichia coli*. Apesar da acentuada diferença nos níveis de absorção do cobre pelas células de *Escherichia coli* e *P. syringae*, é de salientar, no entanto, que em ambas as espécies, a quantidade de cobre absorvido foi aproximadamente directamente proporcional à concentração inicial de cobre no sobrenadante.

Baldry & Dean (1980) estudaram a absorção de cobre por diversos microrganismos. As estirpes bacterianas (a maioria das quais não identificadas, e isoladas de ambientes fortemente poluídos) foram cultivadas num meio mínimo contendo entre 78 μM e 1.57 mM Cu^{2+}. No meio da fase exponencial ou no início da fase estacionária, as células foram separadas por centrifugação, e o cobre doseado por colorimetria, nas células ou nos sobrenadantes. Num meio contendo 78 μM Cu^{2+}, das 137 estirpes bacterianas estudadas, 40 não cresceram, em 37 o conteúdo em cobre era

inferior a 0.05 % do peso seco, em 52 estirpes era de 0.1 - 0.2 %, e em 8 era de 0.3 - 0.5 %. Em algumas estirpes, foi estudada a absorção de cobre em meios contendo diversas concentrações de Cu^{2+}. Na presença de 157 µM Cu^{2+}, a quantidade de cobre absorvido variou entre 0.1 e 0.9 % do peso seco, com 0.4 mM Cu^{2+}, entre 0.2 e 0.9 %, com 0.8 mM Cu^{2+}, entre 1.1 e 1.2 %; na presença de 1.6 mM Cu^{2+}, não se observou crescimento em qualquer das estirpes estudadas. Baldry & Dean concluíram que não existiam diferenças muito acentuadas nas quantidades de cobre absorvidas pelas diferentes estirpes bacterianas, e que estas eram função da concentração de Cu^{2+} no meio de cultura. Nas células de *P. syringae* suspensas em tampão Na^{+}-PIPES, constatei que um tratamento com 200 µM Cu^{2+} resulta na absorção de uma quantidade de cobre equivalente a aproximadamente 2.4 % do peso seco das células (Tabela C.1.), um nível de absorção superior ao observado nas estirpes bacterianas utilizadas por Baldry & Dean. Saliente-se no entanto que as condições experimentais utilizadas foram diferentes. As células de *P. syringae* foram suspensas num tampão que não apresenta uma capacidade significativa para ligar catiões metálicos (Good *et al.*, 1966) e na ausência de uma fonte de energia. Baldry & Dean quantificaram o cobre absorvido em células em crescimento num meio de cultura contendo diversos sais e que era tamponado pela adição de uma concentração elevada (12 g l^{-1}) de TRIS. Neste meio, a concentração de iões cúpricos disponíveis era muito provavelmente inferior à concentração total de Cu^{2+}, dado que uma parte dos iões cúpricos deveriam estar ligados a moléculas presentes no meio de cultura (*cf.* sub-secção 4.1.1.). Baldry & Dean publicaram, no ano seguinte, um estudo sobre a absorção de cobre por células de *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas fluorescens*, cultivadas na ausência de um de vários nutrientes essenciais e posteriormente tratadas com 0.8 mM $CuSO_4$ a 4 °C durante 60 h. As células de *Pseudomonas fluorescens* absorveram quantidades de cobre correspondentes a 0.52 - 0.96 % do seu peso seco. Saliente-se que o meio de cultura utilizado era basicamente o que tinha sido usado no estudo publicado anteriormente, contendo portanto uma elevada concentração de TRIS.

Rome & Gadd (1987), utilizando um eléctrodo específico, estudaram a absorção de Cu^{2+} pelas células de três espécies de fungos filamentosos. Concluíram que a absorção do Cu^{2+} pelo micélio de *Cladosporium resinae* e *Penicillium italicum* era do tipo «Langmuiriano», correspondendo a absorção máxima à saturação de uma monocamada com iões cúpricos. Pelo contrário, a absorção de Cu^{2+} pelo micélio de *Rhizopus arrhizus* ocorria com a formação de multicamadas. Torna-se difícil discutir os resultados apresentados por Rome & Gadd, e compará-los com os que obtive em *P. syringae*, dado que: (i) Os símbolos utilizados em todos os gráficos são de dimen-

sões excessivamente grandes, dificultando a sua interpretação e extrapolação de valores. (ii) Nas isotérmicas de absorção apresentadas na Fig. 1, não são referidas as concentrações iniciais de Cu^{2+}. (iii) Na Fig. 6, onde as concentrações de cobre absorvido são representadas em função das concentrações iniciais, os valores são de difícil interpretação, dado que se as concentrações iniciais forem transformadas em valores relativos à massa celular, na primeira parte das curvas, as quantidades de cobre absorvido são superiores às que existiam na solução, o que não é possível; refira-se no entanto que as dimensões excessivamente grandes dos símbolos utilizados causa uma apreciável margem de erro na extrapolação de valores deste gráfico. A estas razões acresce o facto de as quantidades de cobre absorvido terem sido calculadas pela diferença entre as concentrações iniciais e finais de cobre no sobrenadante (utilizando um eléctrodo específico), não se tendo realizado um estudo comparativo com um doseamento directo do cobre nas células. Pelas razões referidas no parágrafo anterior, os valores assim obtidos podem ter um erro apreciável.

Hassall (1963) e McBrien & Hassall (1965) estudaram a absorção de Cu^{2+} pelas células da alga verde unicelular *Chlorella vulgaris*. Para efeito de comparação com os resultados que obtive em *P. syringae*, os valores das concentrações de cobre apresentados por estes investigadores foram convertidos em unidades molares relativas à massa celular. Os valores encontram-se representados na Figura C.2., onde se pode observar que a absorção do Cu^{2+} pelas células desta alga parece ser do tipo «Langmuiriano», e que para concentrações de cobre iniciais superiores a 0.2 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$, as células de *Chlorella* absorvem menos Cu^{2+} do que as células da bactéria *P. syringae*.

Tobin *et al.* (1984) estudaram a absorção de iões metálicos pelo micélio macerado do fungo *Rhizopus arrhizus*. Não foram referidas as concentrações iniciais dos metais, nem a concentração celular das suspensões. Os resultados obtidos permitiram concluir que a absorção do Cu^{2+} por esta biomassa era do tipo «Langmuiriano», atingido-se a saturação com aproximadamente 0.2 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$, que correspondia a uma concentração de equilíbrio de 1.5 - 3.0 mM Cu^{2+}.

Uma comparação dos resultados que obtive na bactéria *P. syringae* com os referidos na bibliografia para a alga *Chlorella* e o fungo *Rhizopus arrhizus* indica que as células desta espécie bacteriana parecem apresentar uma capacidade de absorver mais Cu^{2+} do que as células das duas espécies de organismos eucarióticos. Refira-se no entanto que as condições experimentais utilizadas nestes estudos não foram idênticas e que estas podem influenciar significativamente os níveis de absorção dos metais.

Componentes sub-celulares isolados, como a mitocôndria de células animais também absorvem quantidades significativas de iões cúpricos (Cederbaum & Wainio, 1972a). Entre 1 e 3.5 mM C^{2+} inicial, a quantidade de cobre absorvido foi directamente proporcional à concentração no meio de incubação. Com 6 mM Cu^{2+} inicial, as mitocôndrias tinham absorvido aproximadamente 2 µmol Cu^{2+} (mg proteína)$^{-1}$.

Para uma correcta comparação dos níveis de absorção de cobre pelas células de *P. syringae* com o de células de outros microrganismos, seria necessário levar a cabo experiências em que os diferentes tipos celulares fossem expostos ao Cu^{2+} em condições experimentais constantes, em particular, idêntico meio de suspensão e concentração celular.

A influência do Hg^{2+} e da N-etilmaleimida na absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae*.

Se as células de *P. syringae* são pré-tratadas com Hg^{2+}, a quantidade de Cu^{2+} absorvido é significativamente reduzida (Tabelas C.2. a C.4.). A concentração de Hg^{2+} (entre 25 e 100 µM) e o tempo de pré-tratamento (2 - 30 min) não influenciam significativamente os níveis desta redução, que é de 0.014 µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$ (para uma concentração inicial de 50 µM Cu^{2+}).

Um pré-tratamento com N-etilmaleimida (NEM) ou Hg^{2+} reduz a absorção de Cu^{2+} a níveis semelhantes (Tabelas C.5. a C.7.).

A um pH perto da neutralidade, a reacção da NEM com grupos amina ou imidizole é muito reduzida, podendo considerar-se um reagente específico de grupos sulfidrilo (Ji, 1983). O Hg^{2+} apresenta uma elevadíssima afinidade para os grupos sulfidrilo, superior à do Cu^{2+} (Trabalho IX). É assim de esperar que após ligação do Hg^{2+}, este não seja deslocado dos grupos sulfidrilo pelos iões cúpricos.

O facto de a NEM ser um reagente específico dos grupos sulfidrilo, e de um pré-tratamento com NEM ou Hg^{2+} resultar numa redução semelhante da quantidade de Cu^{2+} absorvido, sugere que esta redução foi uma consequência directa da não ligação dos iões cúpricos a grupos sulfidrilo das células de *P. syringae*.

O facto de se ter obtido um efeito semelhante com os diferentes tratamentos com Hg^{2+} ou NEM, sugere que os grupos sulfidrilo acessíveis foram na sua totalidade bloqueados pelos iões de mercúrio ou pelas moléculas de N-etilmaleimida.

Os resultados sugerem assim que aproximadamente 10 % do Cu^{2+} absorvido pelas

células de *P. syringae* se encontra ligado a grupos sulfidrilo. Em mitocôndrias de células animais, Cederbaum & Wainio (1972c) referiram que um tratamento com *p*-cloromercúriobenzoato, reduzia em 13 - 33 % a quantidade de cobre absorvida por estas estruturas sub-celulares, e na presença de Hg^{2+}, a redução era superior a 50 %.

Influência do Ca^{2+} e Mg^{2+} na absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae*.

Um pré-tratamento com 100 µM Ca^{2+} ou Mg^{2+} não diminui significativamente a quantidade de Cu^{2+} absorvido com uma concentração inicial de 25 a 75 µM (Tabela C.8.), mas concentrações 50 vezes superiores destes metais alcalino-terrosos têm este efeito (Tabelas C.9. a C.12.).

Na influência do Ca^{2+} e do Mg^{2+} na absorção do Cu^{2+} parece assim ser determinante a relação entre a concentração dos metais alcalino-terrosos e a concentração de Cu^{2+}, como seria de esperar para entidades que competem para um número restrito de locais de ligação. A afinidade do Ca^{2+} e do Mg^{2+} para os locais de ligação disponíveis nas células é muito inferior à dos iões cúpricos (Trabalho IX), pelo que só na presença de uma largo excesso destes metais alcalino-terrosos em relação ao Cu^{2+}, é que a ligação deste é afectada. O Ca^{2+} e o Mg^{2+} só reduziram a absorção do Cu^{2+}, quando presentes a concentrações muito superiores à do Hg^{2+}. Este resultado deve-se muito provavelmente ao facto do Hg^{2+} apresentar uma afinidade para os grupos funcionais muito superior à exibida por estes metais alcalino-terrosos (Trabalho IX).

Uma redução do cobre absorvido pela presença simultânea de metais alcalino-terrosos, foi referida por vários investigadores noutros tipos celulares. Cederbaum & Wainio (1972a) observaram que na presença de 1 a 10 mM Ca^{2+} ou Mg^{2+}, a quantidade de cobre absorvido por mitocôndrias de células animais era reduzida em 10 a 17 %. Na presença de 1.0 mM Mg^{2+}, a absorção de cobre (40 µM inicial) pelo micélio de *Penicillium spinulosum* é reduzida em aproximadamente 40 % (Townsley & Ross, 1985).

C.c. Bibliografia.

BALDRY, M. G. C. & DEAN, A. C. R. 1980. Copper accumulation by bacteria, moulds and yeasts. *Microbios* **29**, 7-14.

BALDRY, M. G. C. & DEAN, A. C. R. 1981. Environmental change and copper uptake by *Bacillus subtilis* subsp. *niger* and by *Pseudomonas fluorescens*. *Biotechnology Letters* **3**, 142-147.

CABRAL, J. P. S. & SILVA, M. T. 1984. Binding of copper to *Pseudomonas syringae*: a chemical and morphological study. Proceedings of the 2nd working group on *Pseudomonas syringae* pathovars, pg. 43-44. The Hellenic Phytopathological Society, Athens.

CAMPBELL, R. C. 1967. Statistics for biologists. Cambridge University Press, Cambridge, 242 pg. .

CEDERBAUM, A. I. & WAINIO, W. W. 1972a. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. I. Quantitative aspects and stability. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 4593-4603.

CEDERBAUM, A. I. & WAINIO, W. W. 1972c. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. III. Role of mitochondrial phospholipids and thiols. *Journal of Biological Chemistry* **247**, 4615-4620.

COTTER, C. & TREVORS, J. T. 1988. Copper adsorption by *Escherichia coli*. *Systematic and Applied Microbiology* **10**, 313-317.

GILES, C. H., MACEWAN, T. H., NAKHAWA, S. N. & SMITH, D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society* **1960**, 3973-3993.

GOMEZ, K. A. & GOMEZ, A. A. 1984. Statistical procedures for agricultural research. John Wiley & Sons, Inc., New York, 680 pg. .

HASSALL, K. A. 1963. Uptake of copper and its physiological effects on *Chlorella vulgaris*. *Phisiologia Plantarum* **16**, 323-332.

JI, T. H. 1983. Bifunctional reagents. Methods in Enzymology, vol. 91, pg. 580-609. Academic Press.

MCBRIEN, D. C. H. & HASSALL, K. A. 1965. Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. *Physiologia Plantarum* **18**, 1059-1065.

ROME, L. & GADD, G. M. 1987. Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium resinae* and *Penicillium italicum*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **26**, 84-90.

TOBIN, J. M., COOPER, D. G. & NEUFELD, R. J. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Applied and Environmental Microbiology* **47**, 821-824.

TOWNSLEY, C. C. & ROSS, I. S. 1985. Copper uptake by *Penicillium spinulosum*. *Microbios* **44**, 125-132.

TABELA C.1.

NÍVEIS DE ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

$[Cu^{2+}]$ inicial (μM)	$[Cu^{2+}]$ absorvido (μmol mg p. s.$^{-1}$)	$[Cu^{2+}]$ absorvido (mM)[2]	$[Cu^{2+}]$ absorvido n° iões célula^{-1}	Factor de concentração[3]
10	0,011	1,7	$1,8 \times 10^{7}$	170 x
20	0,038	5,9	$6,3 \times 10^{7}$	295 x
30	0,055	8,6	$9,2 \times 10^{7}$	287 x
40	0,078	12,2	$1,3 \times 10^{8}$	305 x
50	0,110	17,2	$1,8 \times 10^{8}$	344 x
60	0,138	21,5	$2,3 \times 10^{8}$	358 x
70	0,159	24,8	$2,7 \times 10^{8}$	354 x
80	0,177	27,6	$3,0 \times 10^{8}$	345 x
90	0,204	31,8	$3,4 \times 10^{8}$	353 x
100	0,224	34,9	$3,7 \times 10^{8}$	349 x
200	0,381[4]	59,9	$6,4 \times 10^{8}$	299 x

---

[1] Células suspensas em tampão Na^{+}-PIPES (pH 6.5) à temperatura ambiente; tempo de tratamento, 30 min. O Cu^{2+} foi doseado por espectrometria de absorção atómica. Número médio de amostras por concentração de Cu^{2+}: 6.1; coeficiente de variação médio: 8.9 %; limite de detecção do Cu^{2+} nas células: 0.001 μmol (mg peso seco)$^{-1}$. As células controlo (não tratadas com $CuSO_4$) não apresentavam quantidades detectáveis de Cu^{2+} (inferiores aos limites de detecção).

[2] Admitindo que os iões Cu^{2+} se encontram uniformemente destribuídos no invólucro e no citoplasma; admitindo ainda que 1 mg de peso seco corresponde a 3.6×10^{9} células (*cf.* Trabalhos anexos), e que o volume médio de uma célula é de 1.8 μm^3 (valor obtido utilizando a metodologia descrita no Trabalho V).

[3] Razão entre a concentração inicial de Cu^{2+} no sobrenadante e a concentração final de Cu^{2+} nas células.

[4] Este nível de absorção corresponde aproximadamente a 2.4 % do peso seco das células.

TABELA C.2.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Tratamento	Cu^{2+} absorvido (média 4 amostras) (μmol mg p. s.$^{-1}$)	Coeficiente de variação (% média)
25 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.107	1.3
50 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.113	2.0
75 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.107	2.6
100 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.109	4.5
0 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	**0.124**	**6.4**
40 μM Hg^{2+} 5 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.112	3.8
40 μM Hg^{2+} 15 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.110	4.9
40 μM Hg^{2+} 30 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.111	3.2

---

[1] Células suspensas em tampão Na^{+}-PIPES foram pré-tratadas com diversas concentrações de $HgCl_2$ (25 - 100 μM) por vários períodos de tempo (2 - 30 min), após o que se adicionou 50 μM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica.

TABELA C.3.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE*.

Análise de Variância da Tabela C.2. [1]

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F observado
Tratamentos	7	$8,86 \times 10^{-4}$	$1,27 \times 10^{-4}$	6,25** [3]
Erro experimental	24	$4,86 \times 10^{-4}$	$2,03 \times 10^{-5}$	

Teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias: M/C=9.64 com 7 DF [2]

---

[1] Procedimento descrito em Campbell (1967). Os cálculos foram realizados num computador Amstrad PCW 8256 trabalhando em precisão simples.

[2] Variâncias residuais semelhantes em todos os grupos para 5 % de probabilidade (X^2=14.07)

[3] Significativo ao nível de 1 %.

TABELA C.4.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE*.

Comparação dos pré-tratamentos com Hg^{2+} em relação ao controlo pelo método da «Menor diferença significativa» (LSD) [1].

Comparação dos diversos pré-tratamentos com Hg^{2+} na absorção de Cu^{2+} pelo teste de Duncan (DMRT) [1].

Pré-tratamento[2]	Cu^{2+} absorvido[3] (μmol mg p. s.$^{-1}$)	Diferença em relação ao controlo (μmol mg p. s.$^{-1}$)	DMRT
25 μM Hg^{2+} 2 min	0.107	- 0.017** [4]	a[5]
50 μM Hg^{2+} 2 min	0.113	- 0.011**	a
75 μM Hg^{2+} 2 min	0.107	- 0.017**	a
100 μM Hg^{2+} 2 min	0.109	- 0.015**	a
40 μM Hg^{2+} 5 min	0.112	- 0.012**	a
40 μM Hg^{2+} 15 min	0.110	- 0.014**	a
40 μM Hg^{2+} 30 min	0.111	- 0.013**	a
0 (controlo)	**0.124**	**0**	b

---

[1] Procedimento descrito em Gomez & Gomez (1984).

[2] Após o pré-tratamento com Hg^{2+}, as células foram pós-tratadas com 50 μM Cu^{2+} durante 30 min.

[3] Média de 4 amostras.

[4] Diferença significativa ao nível de 1 % de probabilidade (LSD=6.59 x 10^{-3} para 5 % de probabilidade; 8.94 x 10^{-3} para 1 % de probabilidade).

[5] Os tratamentos representados pela mesma letra não são significativamente diferentes ao nível de 5 % de probabilidade.

TABELA C.5.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} OU N-ETILMALEIMIDA (NEM) NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Tratamento	Cu^{2+} absorvido (média 3/4 amostras) (μmol mg p. s.$^{-1}$)	Coeficiente de variação (% média)
25 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.105	4.1
100 μM NEM 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.105	2.0
0 → 50 μM Cu^{2+} 30 min	**0.114**	2.2

---

[1] Células suspensas em tampão Na^{+}-PIPES foram pré-tratadas com 25 μM $HgCl_2$ ou 100 μM NEM por 2 min, após o que se adicionou 50 μM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica.

TABELA C.6.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} OU N-ETILMALEIMIDA (NEM) NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE*.

Análise de Variância da Tabela C.5. [1]

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F observado
Tratamentos	2	$1,75 \times 10^{-4}$	$8,76 \times 10^{-5}$	8,50* [2]
Erro experimental	8	$8,24 \times 10^{-5}$	$1,03 \times 10^{-5}$	

Teste de Bartlett para homogeneidade de variâncias: M/C=1.53 com 2 DF [3]

---

[1] Procedimento descrito em Campbell (1967). Os cálculos foram realizados num computador Amstrad PCW 8256, trabalhando em precisão simples.

[2] Significativo ao nível de 5 %.

[3] Variâncias residuais semelhantes em todos os grupos para 5 % de probabilidade (X^2=5.99).

TABELA C.7.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM Hg^{2+} OU N-ETILMALEIMIDA (NEM) NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE*.

Comparação dos tratamentos pelo método da «Menor diferença significativa» (LSD) [1].

Tratamento	Cu^{2+} absorvido (µmol mg p. s.$^{-1}$)	Diferença em relação ao tratamento em comparação (µmol mg p. s.$^{-1}$)	
25 µM Hg^{2+} + 50 µM Cu^{2+} 30 min	0,1055	- 0,0085 ** [2]	0,00025^{ns} [3]
100 µM NEM + 50 µM Cu^{2+} 30 min	0,10525	- 0,00875**	0
0 + 50 µM Cu^{2+} 30 min	0,114	0	

---

[1] Procedimento descrito em Gomez & Gomez (1984).

[2] Diferença significativa ao nível de 1 % (LDS=0.0082).

[3] Diferença não significativa ao nível de 5 % (LSD=0.0052).

TABELA C.8.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM 100 µM Ca^{2+} OU Mg^{2+} NA ABSORÇÃO DE Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Comparação dos pré-tratamentos com Ca^{2+} ou Mg^{2+} em relação ao controlo, pelo método da «Menor diferença significativa» (LSD) [2].

Tratamento	Diferença no Cu^{2+} absorvido em relação à ausência de pré-tratamento (média de 2 amostras) (µmol mg p. s.$^{-1}$)
100 µM Ca^{2+} 10 min → 25 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.0035 ns [3]
100 µM Mg^{2+} 10 min → 25 µM Cu^{2+} 30 min	+ 0.0095 ns
0 → **25 µM Cu^{2+} 30 min**	0
100 µM Ca^{2+} 10 min → 50 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.030 ns
100 µM Mg^{2+} 10 min → 50 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.028 ns
0 → **50 µM Cu^{2+} 30 min**	0
100 µM Ca^{2+} 10 min → 75 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.0025 ns
100 µM Mg^{2+} 10 min → 75 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.0110 ns
0 → **75 µM Cu^{2+} 30 min**	0

---

[1] Células suspensas em tampão Na^+-PIPES foram pré-tratadas com 100 µM $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ durante 10 min, após o que se adicionou 25 a 75 µM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica.

[2] Procedimento descrito em Gomez & Gomez (1984).

[3] Diferença não significativa ao nível de 5 % (LSD=0.036).

TABELA C.9.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM 5 mM Ca^{2+} OU Mg^{2+} NA ABSORÇÃO DE 25 µM Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Análise de Variância [2]

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F observado
Tratamentos	2	$1,37 \times 10^{-3}$	$6,83 \times 10^{-4}$	57,7 ** [3]
Erro experimental	9	$1,06 \times 10^{-4}$	$1,18 \times 10^{-5}$	

---

[1] Células suspensas em tampão Na^{+}-PIPES foram pré-tratadas com 5 mM $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ durante 2 min, após o que se adicionou 25 µM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica. Realizaram-se 4 amostras por tratamento.

[2] Procedimento descrito em Campbell (1967) sobre valores expressos em µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$. Os cálculos foram realizados num computador Amstrad PCW 8256, trabalhando em precisão simples.

[3] Significativo ao nível de 1 %.

TABELA C.10.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM 5 mM Ca^{2+} OU Mg^{2+} NA ABSORÇÃO DE 25 µM Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Comparação do pré-tratamento com Ca^{2+} ou Mg^{2+} em relação ao controlo, pelo método da «Menor diferença significativa» (LSD) [2].

Tratamento	Diferença do Cu^{2+} absorvido em relação à ausência de pré-tratamento (µmol mg peso seco^{-1})
5 mM $CaCl_2$ 2 min → 25 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.025 ** [3]
5 mM $MgCl_2$ 2 min → 25 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.016 **
0 → 25 µM Cu^{2+} 30 min	0

---

[1] Células suspensas em tampão Na^+-PIPES foram pré-tratadas com 5 mM $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ durante 2 min, após o que se adicionou 25 µM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica. Realizaram-se 4 amostras por tratamento.

[2] Procedimento descrito em Gomez & Gomez (1984).

[3] Diferença significativa ao nível de 1 % (LSD=0.0082).

TABELA C.11.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM 5 mM Ca^{2+} OU Mg^{2+} NA ABSORÇÃO DE 50 µM Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Análise de Variância [2]

Origem da variação	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Quadrado médio	F observado
Tratamentos	2	$6,83 \times 10^{-3}$	$3,41 \times 10^{-3}$	202 ** [3]
Erro experimental	9	$1,35 \times 10^{-4}$	$1,69 \times 10^{-5}$	

---

[1] Células suspensas em tampão Na^{+}-PIPES foram pré-tratadas com 5 mM $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ durante 2 min, após o que se adicionou 50 µM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica. Realizaram-se 4 amostras por tratamento.

[2] Procedimento descrito em Campbell (1967) sobre valores expressos em µmol Cu^{2+} (mg peso seco)$^{-1}$. Os cálculos foram realizados num computador Amstrad PCW 8256, trabalhando em precisão simples.

[3] Significativo ao nível de 1 %.

TABELA C.12.

INFLUÊNCIA DE UM PRÉ-TRATAMENTO COM 5 mM Ca^{2+} OU Mg^{2+} NA ABSORÇÃO DE 50 µM Cu^{2+} PELAS CÉLULAS DE *P. SYRINGAE* [1].

Comparação do pré-tratamento com Ca^{2+} ou Mg^{2+} em relação ao controlo, pelo método da «Menor diferença significativa» (LSD) [2].

Tratamento	Diferença do Cu^{2+} absorvido em relação à ausência de pré-tratamento (µmol mg peso seco^{-1})
5 mM $CaCl_2$ 2 min → 50 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.057 ** [3]
5 mM $MgCl_2$ 2 min → 50 µM Cu^{2+} 30 min	- 0.042 ** [4]
0 → 50 µM Cu^{2+} 30 min	0

---

[1] Células suspensas em tampão Na^+-PIPES foram pré-tratadas com 5 mM $CaCl_2$ ou $MgCl_2$ durante 2 min, após o que se adicionou 50 µM $CuSO_4$. Ao fim de 30 min, as suspensões foram centrifugadas e o Cu^{2+} doseado nas células por espectrometria de absorção atómica. Realizaram-se 4 amostras por tratamento.

[2] Procedimento descrito em Gomez & Gomez (1984).

[3] Diferença significativa ao nível de 1 % (LSD=0.0098).

[4] Diferença significativa ao nível de 1 % (LSD=0.010).

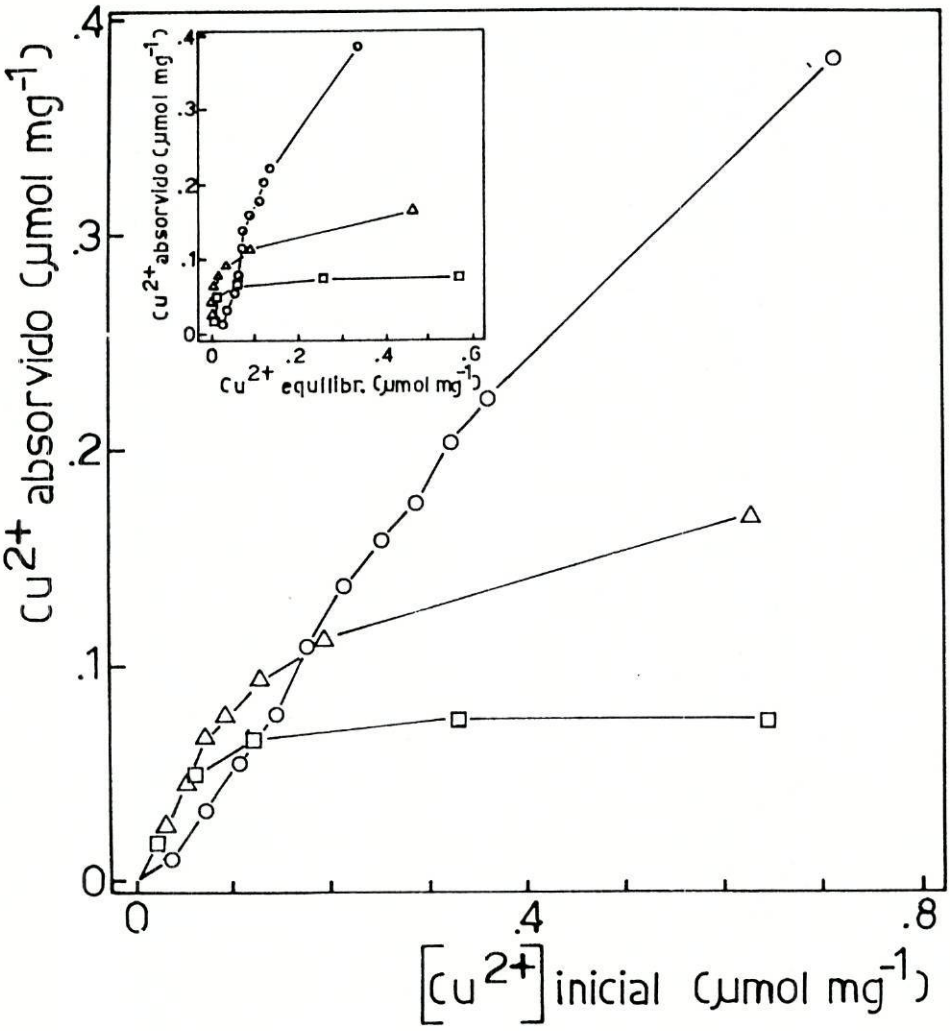


FIGURA C.2. Comparação da absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae* (O) com a da alga verde unicelular *Chlorella vulgaris* (△, □).

No gráfico principal, o Cu^{2+} absorvido é representado em função da concentração inicial de Cu^{2+}. No gráfico inserido, o Cu^{2+} absorvido é representado em função da concentração de equilíbrio. Os resultados de *P. syringae* foram extraídos da Figura C. 1. (as concentrações de Cu^{2+} inicial e de equilíbrio foram convertidas em unidades relativas à massa celular). Os resultados de *Chlorella vulgaris* foram obtidos a partir de valores apresentados nos trabalhos de Hassall (1963) e McBrien & Hassall (1965). Os valores de Hassall (1963) (△) foram obtidos a partir dos apresentados na Fig. 4 deste trabalho, e considerando que 3×10^8 células desta alga pesam 20 mg de peso seco (McBrien & Hassall, 1965). Os valores de McBrien & Hassall (1965) (□) foram extraídos da Tabela 2 deste trabalho, e correspondem à média do Cu^{2+} absorvido por células iluminadas e na escuridão.

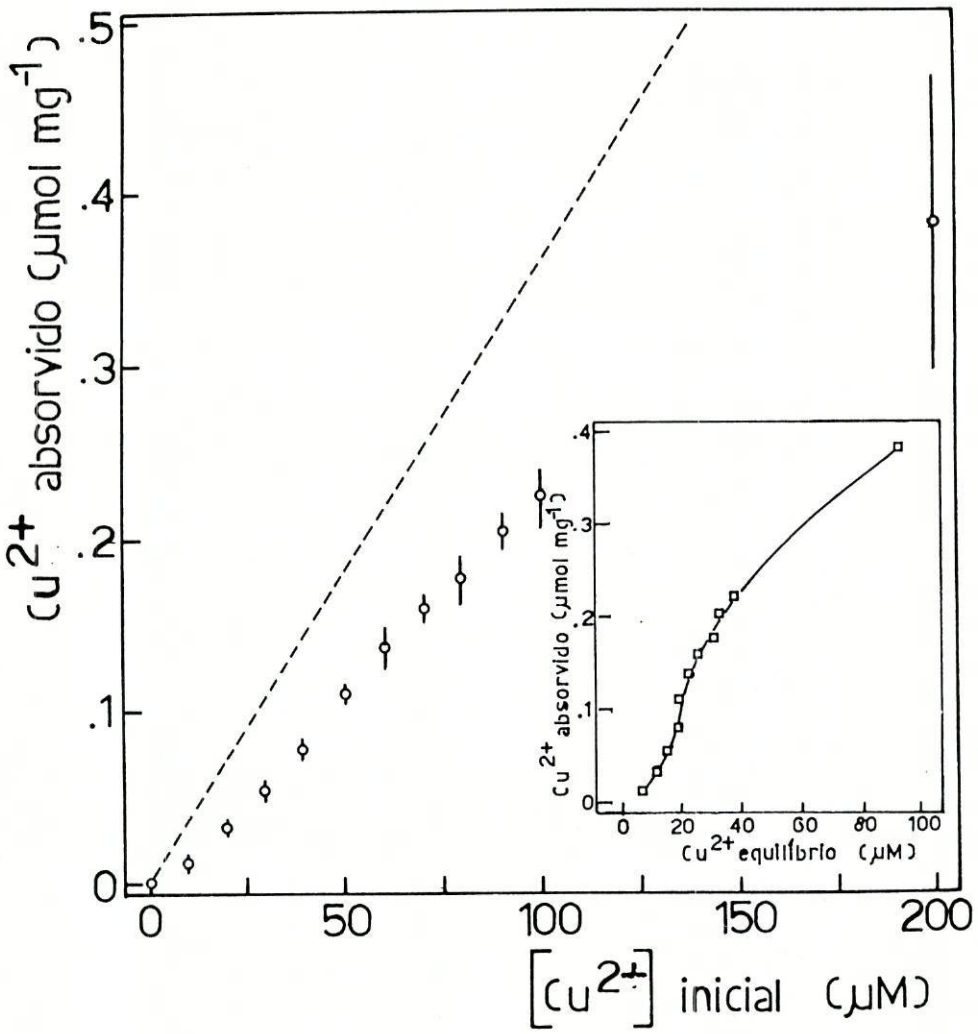


FIGURA C.1. Absorção de Cu^{2+} pelas células de *P. syringae*, suspensas em tampão 10 mM Na^{+}-PIPES e tratadas com $CuSO_4$ durante 30 min. O Cu^{2+} foi doseado nas células por espectrometria de absorção atómica. Número médio de determinações por concentração de Cu^{2+}: 6,1; coeficiente de variação médio: 8,9 %; limite de detecção do Cu^{2+} nas amostras: 0,001 µmol (mg peso seco)$^{-1}$.

No gráfico principal, as quantidades de Cu^{2+} absorvido são representadas em função da concentrações iniciais de Cu^{2+}. As barras representam os desvios padrões das médias. A linha a tracejado representa a absorção pelas células da totalidade do Cu^{2+} adicionado à suspensão.

No gráfico inserido, o Cu^{2+} absorvido é representado em função da concentração de Cu^{2+} no sobrenadante final (concentração de equilíbrio).

TRABALHO I

Erratum

Os valores apresentados na terceira coluna da Tabela 1 (taxas máximas de efluxo de K^+) devem ser multiplicados por 0.001.

Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability

João P. S. Cabral

Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 4100 Porto, Portugal

Abstract

In *Pseudomonas syringae,* Cu^{2+} induce a significant loss of K^+ from the cells. The course of the efflux followed an approximately sigmoidal pattern. The maximum rate of K^+ efflux, the time needed to achieve this rate and the maximum amount of K^+ released from the cells, were dependent on copper concentration. Pre-treatment with several divalent cations modified markedly the parameters of potassium efflux induced by copper, by increasing the maximum rate of K^+ efflux and the amount of K^+ released after 4 min of copper treatment, and decreasing the time required to achieve the maximum rate. The addition of copper to cell suspensions resulted in a progressive decrease in the number of viable cells. Pre-treatment with Mg^{2+} or Ca^{2+} resulted in a decrease in the lethality of copper ions.

Introduction

Over a very wide range of bacterial species, cupric ions show, *in vitro*, high bactericidal activity (Shankar and Bard, 1952; Pratt, 1953; Maurer *et al.*, 1975; Baldry *et al.*, 1977; Nelson *et al.*, 1978; Zevenhuiven *et al.*, 1979). It has been reported that copper can inhibit several enzymes and metabolic pathways in bacterial cells (Kleiner, 1978; Green *et al.*, 1985; Domek *et al.*, 1987; Lowe *et al.*, 1987). In agricultural practice, copper has been used with success to control bacterial diseases of plants (Conlin and McCarter, 1983; Gitaitis *et al.*, 1986).

Bacterial cells accumulate high concentrations of potassium ions. The ions are abundant in the cytoplasm, either in the free space or bound to several macromolecules and cytoplasmic constituents, such as DNA and ribosomes. In several bacterial species two transport systems for K^+ have been reported (Meury and Kepes, 1981; Kobayashi, 1982; Harold and Kakinuma, 1985). The physiological functions of these systems are to maintain the intracellular level of K^+ required for normal protein synthesis and proper enzyme function, and to regulate the cytoplasmic pH and osmolarity (Meury and Kepes, 1981; Kobayashi, 1982; Meury *et al.*, 1985; Harold and Kakinuma, 1985). Intracellular potassium is retained against a concentration gradient by the cytoplasmic membrane. It has been found that in bacterial cells a very wide range of chemical agents, namely thiol reagents, induce leakage of intracellular free potassium as a consequence of membrane injury and breakdown of the permeability barrier (Meury *et al.*, 1980; Meury and Kepes, 1981; Bakker *et al.*, 1987).

The aims of this investigation were to find out whether Cu^{2+} induce leakage of potassium from *P. syringae* cells, and to correlate this process with the kinetics of cell death.

Published and © 1989 by The Faculty Press
88 Regent Street, Cambridge, Great Britain

Materials and methods

Culture and cell suspensions

Pseudomonas syringae ATCC 12271 was maintained on nutrient agar (NA, Difco) slopes at 4°C. Cells were grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6.2). The medium was sterilized by autoclaving at 121°C for 20 min. Cultures (100 ml) in 250 ml Erlenmeyer flasks were incubated with orbital shaking at 27°C. At the end of the exponential phase (corresponding with 1.0 to 3.0 x 10^9 cfu x ml^{-1}), cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in 10 mM PIPES buffer (pH adjusted to 6.5 with NaOH). The absorbance (at 568 nm; 1 cm light path) was adjusted to 1.06 using a Shimadzu double-beam spectrophotometer. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10 and the final suspension had a concentration of approximately 0.28 mg dry weight of cells ml^{-1} ($\sim 10^9$ cfu ml^{-1}).

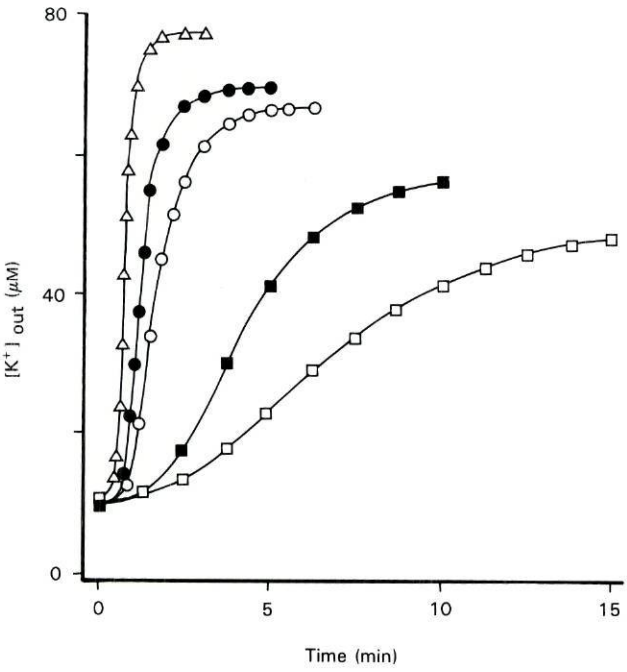


Figure 1 Time course of K^+ efflux induced by copper in *P. syringae*. Cell suspensions in 10 mM Na^+-PIPES buffer (pH 6.5) were treated with solutions of copper sulphate at final concentrations ranging from 15 to 40 μM Cu^{2+}. The extracellular K^+ concentration was assayed with a potassium selective electrode. The concentration of free intracellular K^+ (measured in a sonicated sample) was approximately 75 μM. Final concentrations of Cu^{2+} were as follows: □, 15 μM; ■, 20 μM; ○, 25 μM; ●, 30 μM; and △, 40 μM. Results are from one experiment.

K^+ leakage experiments

The release of K^+ from cells was followed using a K^+ specific electrode (Metrohm EA 301-K) calibrated in the range 10 to 100 μM K^+, with a reference electrode (Metrohm 6.0726.100), and the potential derived was monitored in a pH/mV meter which is sensitive to changes of 0.1 mV (Metrohm 654). Following the addition of the metal ions, potassium release was measured every 5 sec. All experiments were carried out in a thermostatically-controlled vessel (22.5 ± 0.1°C). The rate of potassium efflux (the amount of potassium released per mg dry weight and per 5 sec) was calculated between every two successive readings. Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+} were added as sulphates, and Ba^{2+}, Ca^{2+} and Mg^{2+} as chlorides. The influence of divalent cations on copper induced K^+ efflux was determined by pre-incubating cells with 100 μM divalent cation, and adding copper after 2 min at a final concentration of 20 μM. The time course of potassium efflux was then studied as described above.

Cell survival

Samples were withdrawn from treated suspensions and serially diluted in distilled water prior to spread plating on NA plates (four replicates). For each sample (0.05 ml) the total volume of diluent was 20 ml, and the total time for dilution and plating approximately 3 min. The colonies were counted after 3 days incubation at 22 — 24°C. The influence of Mg^{2+} and Ca^{2+} on cell death induced by copper was determined by pre-incubating cells with 100 μM divalent cation, and adding copper after 2 min at a final concentration of 60 μM. The kinetics of cell death were then studied as described above.

Results

K^+ efflux

Among the metal ions tested for the ability to induce potassium efflux in *P. syringae* (Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Cu^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}, at concentrations up to 0.1 mM), only copper (at concentrations higher than 15 μM) induced a significant loss of potassium. The efflux induced by copper concentrations in the range 15—200 μM Cu^{2+} is shown in Figures 1, 2, and 3. Between 15 and 200 μM Cu^{2+} the course of the potassium efflux followed a common pattern (Figure 1).

After the addition of copper, the rate of efflux progressively increased with time until a maximum was achieved. Between 15 and 40 μM Cu^{2+}, increasing copper concentration resulted in increases in the maximum rate of K^+ efflux and decreases in the time needed to achieve this rate. Copper concentrations higher than 40 μM resulted in a progressive decrease in the maximum rate and an increase in the time required to reach this rate (Figure 2). At all Cu^{2+} concentrations, after reaching a maximum, the rate of K^+ efflux progressively decreased to zero.

The efflux induced by copper in *P. syringae* also had the following characteristics: (1) with copper concentrations up to 200 μM, the maximum amount of K^+ released from the cells did not exceed the free potassium

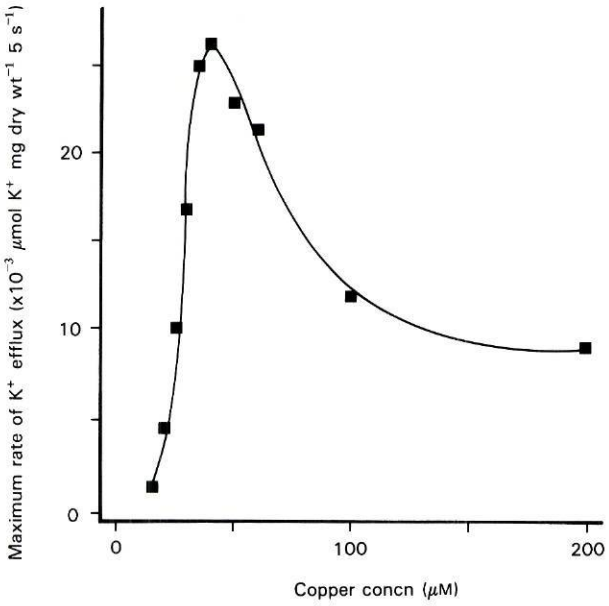


Figure 2 Maximum rate of K^+ efflux against copper concentration. Results are means from two to five experiments.

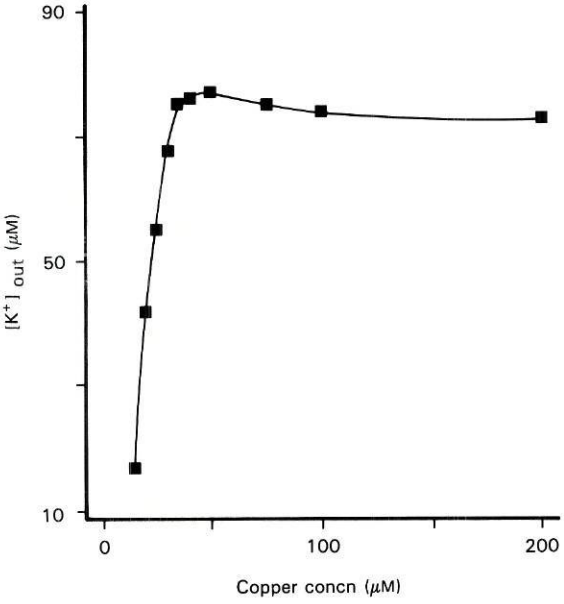


Figure 3 Potassium released after 4 min following the addition of copper (μM) against copper concentration (μM). Results are means from two to five experiments.

Table 1 Influence of pre-treatment with various divalent cations (100 μM) on the parameters of the potassium efflux induced by 20 μM Cu^{2+} in *P. syringae*

Cation added before Cu^{2+}	K^+ released 4 min after addition of copper (μM)	Maximum rate of K^+ efflux*	Time to reach maximum rate (min)
None	35.8	4.2	3.54
Mg^{2+}	63.9	11.7	1.83
Ca^{2+}	54.0	5.1	2.37
Ba^{2+}	75.2	18.7	1.21
Mn^{2+}	75.6	30.7	0.79
Ni^{2+}	78.4	14.6	1.00
Co^{2+}	79.8	14.4	1.14
Zn^{2+}	46.7	3.8	1.81
Cd^{2+}	75.7	9.2	1.53

* μmol K^+ mg dry wt^{-1} 5 sec^{-1}.
Results are means from two to four experiments.

concentration of the cells (as measured in a sonicated sample). (2) Between 15 and 40 μM Cu^{2+}, an increase in copper concentration resulted in an increase in the maximum amount of K^+ released. Copper concentrations higher than 40 μM did not increase the total amount of potassium released from the cells (Figure 3).

Effect of divalent metal ions

Pre-treatment with 100 μM Mg^{2+}, Ca^{2+}, Ba^{2+}, Mn^{2+}, Ni^{2+}, Co^{2+}, Zn^{2+} or Cd^{2+} was found to modify the parameters of the potassium efflux induced by 20 μM Cu^{2+}. The results are presented in Table 1. The cations increased the maximum rate of K^+ efflux and the amount of K^+ released after 4 min of copper treatment, and decreased the time needed to reach the maximum rate.

Bacterial death

The addition of 30-50 μM Cu^{2+} to cell suspensions resulted in a progressive decrease in the number of viable cells. Increasing copper concentration resulted in increasing the lethality of copper ions (Figure 4). Pre-treatment with 100 μM Mg^{2+} or Ca^{2+} was found to decrease the lethal action of 60 μM Cu^{2+} (Figure 5).

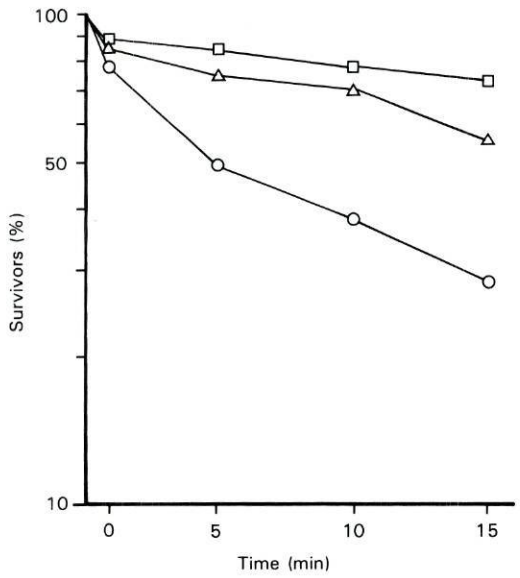


Figure 4 Time course of cell death induced by copper in *P. syringae*. Cell suspensions in 10 mM Na^+-PIPES were treated with solutions of copper sulphate with final concentrations ranging from 30 to 50 μM Cu^{2+}. Samples were diluted in distilled water and plated on nutrient agar (Difco). □, 30 μM Cu^{2+}; Δ, 40 μM Cu^{2+}; and ○, 50 μM Cu^{2+}. Results are means from two experiments.

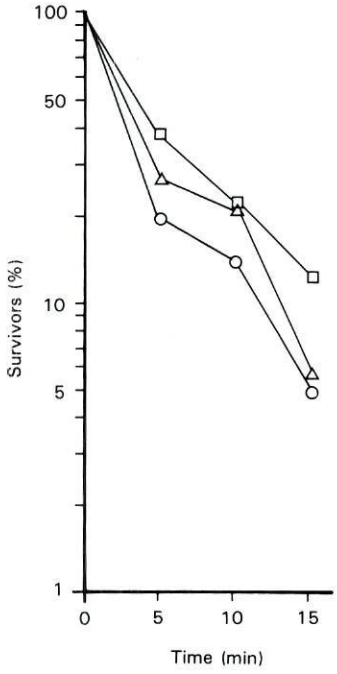


Figure 5 Influence of Mg^{2+} and Ca^{2+} (100 μM) on the course of cell death induced by 60 μM Cu^{2+} in *P. syringae*. Δ, Mg^{2+}-Cu^{2+}; □, Ca^{2+}-Cu^{2+}; and ○, Cu^{2+}. Results are means from two experiments.

Discussion

Copper induces leakage of K^+ from blue-green algae (Gupta and Arora, 1978), green algae (McBrien and Hassal, 1965), yeast cells (Rome and Gadd, 1987; Theuvenet *et al.*, 1987) and human erythrocytes (Vincent and Blackburn, 1958). It can now be reported that Cu^{2+} can also induce a rapid leakage of potassium from bacterial cells. Ba^{2+}, Ca^{2+}, Cd^{2+}, Co^{2+}, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+} (at concentrations up to 0.1 mM, and for times of exposure up to 1 h), in contrast, did not cause detectable potassium efflux from *P. syringae* cells. In human erythrocytes, Vincent and Blackburn (1958) reported that Cd^{2+} and Zn^{2+} (1 mM) induced very little potassium leakage, and Co^{2+}, Ni^{2+} and Mn^{2+} (at concentrations up to 2 mM) did not cause any detectable potassium efflux after treatment for 1 h. In *Chlorella,* De Filippis (1979) also reported that 0.1 mM Co^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+} (1 h treatment) caused very little K^+ loss.

In *Chlorella* treated with 0.048—1.6 μmol Cu^{2+} per mg dry weight of cells, the efflux of potassium is completed about 4 h after the addition of copper (McBrien and Hassal, 1965). In *P. syringae* with 15—40 μM Cu^{2+} (0.535—1.43 μmol Cu^{2+} mg dry wt^{-1}) the process of potassium efflux is much faster, being completed 20—30 min, respectively, after the addition of copper. This fact is probably due to the marked difference in the envelope of plant and bacterial cells.

Pre-treatment of the cells with several divalent cations was found to increase the maximum rate of K^+ efflux and the amount of potassium released after copper treatment. Since the target for the induction of K^+ efflux by copper ions is the cytoplasmic membrane, these results suggest that the divalent metal ions facilitate the diffusion of copper ions across the outer membrane and peptidoglycan layer.

Two hypotheses can be advanced to interpret these results: (1) the addition of divalent cations to negatively charged phospholipid vesicles can result in a significant increase in the permeability of the membrane (Papahadjopoulos and Bangham, 1966; Dijck *et al.*, 1975; Papahadjopoulos *et al.*, 1977; Deleers *et al.*, 1986). Similar effects can occur in the vicinity of the transition from gel to liquid-crystalline phases (Papahadjopoulos *et al.*, 1973). This phenomenon has been interpreted as a result of the existence of structural discontinuities between fluid and solid domains in the phospholipid matrix (Papahadjopoulos *et al.*, 1973; Papahadjopoulos *et al.*, 1977). The observed effect of divalent cations on the potassium efflux induced by copper could be due to an increase in the permeability of the phospholipid component of the outer membrane. (2) The binding of divalent metal ions to the anionic groups of LPS molecules could affect the spatial organization of these molecules in the outer membrane (Emmerling *et al.*, 1977; Strain *et al.*, 1983); this could lead to a modification in its permeability properties, with concomitant change in the pattern of K^+ efflux induced by copper ions. Treatment of *Escherichia coli* cells with relatively high concentrations of several divalent cations (in Tris buffer) have been reported to induce a pronounced increase in the permeability of the outer membrane to macromolecules (Bukau *et al.*, 1985).

The results concerning cell viability are heavily conditioned by the method used. Indeed, with damaged bacterial cells, the ability to recover and give rise

to a colony is directly related to the chemical composition of the dilution and plating media (Scheusner *et al.*, 1971a,b; Bissonnette *et al.*, 1975; Przybylski and Witter, 1979; McFeters *et al.*, 1982). The assessment of cell viability is, therefore, always conditioned by these factors. A comparison of the pattern of potassium efflux and cell death suggests the following conclusions.

Firstly, *P. syringae* cells can lose most of the intracellular free potassium without being irreversibly damaged. For instance, cells treated with 30 and 40 μM Cu^{2+} for 5 min lost most of the unbound intracellular potassium but 85 and 76% of the cells were still alive. In *Chlorella vulgaris*, McBrien and Hassal (1965) also reported that cells could lose most of the cellular potassium and still give rise to colonies on agar plates. In coliforms exposed to aggressive environments such as low pH, river and distribution water, and chemical agents such as detergents and copper ions, it has been reported that the plate counts in a general purpose medium are generally higher than the plate counts in selective media containing bile salts. While healthy coliform cells are resistant to the action of bile salts, stressed (injured) cells became sensitive (Scheusner *et al.*, 1971a,b; Przybylski and Witter, 1979; McFeters *et al.*, 1982; Domek *et al.*, 1984; Singh and McFeters, 1986). Since a rich medium was used to assess cell viability, the number of *P. syringae* cells damaged by copper ions is, most probably, higher than the number killed. It may be that *P. syringae* cells which have lost all the unbound intracellular potassium due to copper treatment, are able to reaccumulate potassium in copper-free plating medium to the level necessary for life support and growth.

Secondly, the leakage of potassium from the cells is probably not the primary cause of cell death. This conclusion is supported by the differing effect of Mg^{2+} and Ca^{2+} on the pattern of potassium efflux and cell death. Both alkaline-earth cations increased the efflux of K^+, but decreased the lethal action of Cu^{2+} in *P. syringae*. The protective effect of magnesium and calcium against the toxicity of heavy metals has been described by Marsh (1945). A similar lack of correlation between the inhibition of cell growth and K^+ was recorded in *Chlorella* treated with Cu^{2+} (McBrien and Hassal, 1965) and in *Saccharomyces cerevisiae* treated with chemical agents (Theuvenet *et al.*, 1987). The opposite conclusion was presented by Kroll and Anagnostopoulos (1981) with *Serratia marcescens* treated with phenol.

It has been reported that copper can inhibit several enzymes and metabolic pathways in bacterial cells (Kleiner, 1978; Green *et al.*, 1985; Domek *et al.*, 1987; Lowe *et al.*, 1987). These data, and the results presented here, indicate that most probably an inhibition of enzymatic systems present in the periplasmic space and cytoplasmic membrane is the primary cause of death of *P. syringae* cells treated with copper.

Acknowledgements

I am especially indebted to Dr M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental), and Dr A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London) for guidance and helpful

discussions. Part of the equipment used was bought with a grant from Oporto University (CI number 52-86/87). This work was supported by I.N.I.C. (grants PB/1 and 83-CEN-12).

References

BAKKER E. P., Booth I. R., Dinnbier U., Epstein W. and Gajewska A. 1987. Evidence for multiple K^+ export systems in *Escherichia coli. J. Bact.* **169** 3743–9.

BALDRY M. G. C., Hogarth D. S. and Dean A. C. R. 1977. Chromium and copper sensitivity and tolerance of *Klebsiella (Aerobacter) aerogenes. Microbios Letters* **4** 7–16.

BISSONNETTE G. K., Jezeski J. J., McFeters G. A. and Stuart D. G. 1975. Influence of environmental stress on enumeration of indicator bacteria from natural waters. *Appl. Microbiol.* **29** 186–94.

BUKAU B., Brass J. M. and Boos W. 1985. Ca^{2+}-induced permeabilization of the *Escherichia coli* outer membrane: comparison of transformation and reconstitution of binding-protein-dependent transport. *J. Bact.* **163** 61–8.

CONLIN K. C. and McCarter S. M. 1983. Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv tomato *in vitro* and in controlling bacterial speck. *Pl. Dis.* **67** 639–44.

DE FILIPPIS L. F. 1979. The effect of heavy metal compounds on the permeability of *Chlorella* cells. *Z. Pflanzenphysiol.* **92** 39–49.

DELEERS M., Servais J. P. and Wülfert E. 1986. Neurotoxic cations induce membrane rigidification and membrane fusion at micromolar concentrations. *Biochim. biophys. Acta* **855** 271–6.

DIJCK P. W. M. Van, Ververgaert P. H. J. Th., Verveleij A. J., Deenen L. L. M. Van and Gier J. De. 1975. Influence of Ca^{2+} and Mg^{2+} on the thermotropic behaviour and permeability of liposomes prepared from dimyristoyl phosphatidylglycerol and mixtures of dimyristoyl phosphatidylglycerol and dimyristoyl phosphatidylcholine. *Biochim. biophys. Acta* **406** 465–78.

DOMEK M. J., Lechevalier M. W., Cameron S. C. and McFeters G. A. 1984. Evidence for the role of copper in the injury process of coliform bacteria in drinking water. *Appl. Environ. Microbiol.* **48** 289–93.

DOMEK M. J., Robbins J. R., Anderson M. E. and McFeters G. A. 1987. Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. *Can. J. Microbiol.* **33** 57–62.

EMMERLING G., Henning U. and Gulik-Kryzywchi T. 1977. Order-disorder conformational transition of hydrocarbon chains in lipopolysaccharide from *Escherichia coli. Eur. J. Biochem.* **78** 503–9.

GITAITIS R. D., Bell D. K. and Smittle D. A. 1986. Epidemiology and control of bacterial blight and canker of cowpea. *Pl. Dis.* **70** 187–90.

GREEN J., Prior S. D. and Dalton H. 1985. Copper ions as inhibitors of protein C of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *Eur. J. Biochem.* **153** 137–44.

GUPTA A. B. and Arora A. 1978. Morphology and physiology of *Lyngbya nigra* with reference to copper toxicity. *Physiologia Pl.* **44** 215–20.

HAROLD F. M. and Kakinuma Y. 1985. Primary and secondary transport of cations in bacteria. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **456** 375–83.

KLEINER D. 1978. Inhibition of the respiratory system in *Azotobacter vinelandii* by divalent transition metal ions. *FEBS Letters* **96** 364–6.

KOBAYASHI H. 1982. Second system for potassium transport in *Streptococcus faecalis. J. Bact.* **150** 506–11.

KROLL R. G. and Anagnostopoulos G. D. 1981. Potassium leakage as a lethality index of phenol and the effect of solute and water activity. *J. appl. Bact.* **50** 139–47.

LOWE J. A., Chan Y. M. and Tsang J. C. 1987. Investigation of biosynthesis of prodigiosin and its condensing enzyme in *Serratia marcescens. Microbios* **51** 71–80.

MARSH P. B. 1945. Salts as antidotes to copper in its toxicity to the conidia of *Sclerotinia fructicola. Phytopathology* **35** 54–61.

MAURER L., Reinbold G. W. and Hammond E. G. 1975. Effect of copper on microorganisms in the manufacture of Swiss cheese. *J. Dairy Sci.* **58** 1630–6.

McBRIEN D. C. H. and Hassal K. 1965. Loss of cell potassium by *Chlorella vulgaris* after contact with toxic amounts of copper sulphate. *Physiologia Pl.* **18** 1059–65.

McFETERS G. A., Cameron S. C. and Lechevalier M. W. 1982. Influence of diluents, media, and membrane filters on detection of injured waterborne coliform bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* **43** 97–103.

MEURY J., Lebail S. and Kepes A. 1980. Opening of potassium channels in *Escherichia coli* membranes by thiol reagents and recovery of potassium tightness. *Eur. J. Biochem.* **113** 33–8.

MEURY J. and Kepes A. 1981. The regulation of potassium fluxes for the adjustment and maintenance of potassium levels in *Escherichia coli. Eur. J. Biochem.* **119** 165–70.

MEURY J., Robin A. and Monnier-Champeix P. 1985. Turgor-controlled K^+ fluxes and their pathways in *Escherichia coli. Eur. J. Biochem.* **151** 613–9.

NELSON E. J., Coyle M. B. and Silver M. S. 1978. An evaluation of the antimicrobial action of copper against aerosolized organisms. *Respirat. Care* **23** 476–82.

PAPAHADJOPOULOS D. and Bangham A. D. 1966. Biophysical properties of phospholipids. II. Permeability of phosphatidylserine liquid crystals to univalent ions. *Biochim. biophys. Acta* **126** 185–8.

PAPAHADJOPOULOS D., Jacobson K., Nir S. and Isac T. 1973. Phase transitions in phospholipid vesicles. Fluorescence polarization and permeability measurements concerning the effect of temperature and cholesterol. *Biochim. biophys. Acta* **311** 330–48.

PAPAHADJOPOULOS D., Vail W. J., Newton C., Nir S., Jacobson K., Poste G. and Lazo R. 1977. Studies on membrane fusion. III. The role of calcium-induced phase changes. *Biochim. biophys. Acta* **465** 579–98.

PRATT D. 1953. Growth inhibitory action of copper for *Mycobacterium phlei. J. Bact.* **65** 157–9.

PRZYBYLSKI K. S. and Witter L. D. 1979. Injury and recovery of *Escherichia coli* after sublethal acidification. *Appl. Environ. Microbiol.* **37** 261–5.

ROME L. De and Gadd G. M. 1987. Measurement of copper uptake in *Saccharomyces cerevisiae* using a Cu^{2+}-selective electrode. *FEMS Microbiol. Letters* **43** 283–7.

SCHEUSNER D. L., Busta F. F. and Speck M. L. 1971a. Injury of bacteria by sanitizers. *Appl. Microbiol.* **21** 41–5.

SCHEUSNER D. L., Busta F. F. and Speck M. L. 1971b. Inhibition of injured *Escherichia coli* by several selective agents. *Appl. Microbiol.* **21** 46–9.

SHANKAR K. and Bard R. C. 1952. The effect of metallic ions on the growth and morphology of *Clostridium perfringens. J. Bact.* **63** 279–90.

SINGH A. and McFeters G. A. 1986. Recovery, growth, and production of heat-stable enterotoxin by *Escherichia coli* after copper-induced injury. *Appl. Environ. Microbiol.* **51** 738–42.

STRAIN S. M., Fesik S. W. and Armitage I. M. 1983. Structure and metal-binding properties of lipopolysaccharides from heptoseless mutants of *Escherichia coli* studied by ^{13}C and ^{31}P nuclear magnetic resonance. *J. biol. Chem.* **258** 13466–77.

THEUVENET A. P. R., Kessels B. G. F., Blankensteijn W. M. and Borst-Pauwels G. W. F. H. 1987. A comparative study of K^+ loss from a cadmium-sensitive and a cadmium-resistant strain of *Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Letters* **43** 147–53.

VINCENT P. C. and Blackburn C. R. B. 1958. The effects of heavy metal ions on the human erythrocyte. I. Comparisons of the action of several heavy metals. *Aust. J. exp. Biol.* **36** 471–8.

ZEVENHUIVEN L. P. T. M., Dolfing J., Eshuis E. J. and Schoelten-Koerselman I. J. 1979. Inhibitory effects of copper on bacteria related to the free ion concentration. *Microb. Ecol.* **5** 139–46.

Accepted 12 January 1989

News to authors

We can process your manuscripts for CYTOBIOS and MICROBIOS rapidly providing the typescript and illustrations have been carefully and accurately prepared in the correct style.

Papers for *MICROBIOS LETTERS* will be published very swiftly, and in many instances take only about eight to ten weeks from acceptance to publication. In general, manuscripts for *MICROBIOS LETTERS* should not exceed 5,000 words in length, and include only one or two Tables and/or Figures. Those papers which are too long for *MICROBIOS LETTERS* on submission will be considered for either MICROBIOS or CYTOBIOS.

By following the style of our biomedical journals meticulously you can obtain the advantages of some of the most rapid publication rates for research papers available anywhere.

Read the leaflets prepared for authors, entitled *Information for contributors* and *Photographic illustrations,* and send manuscripts for the biomedical journals MICROBIOS, CYTOBIOS and *MICROBIOS LETTERS* to *The Executive Editor, The Faculty Press, 88 Regent Street, Cambridge, England.*

* MICROBIOS, CYTOBIOS and MICROBIOS LETTERS are all prestige biomedical research journals.

* Fifty reprints are provided free.

* World-wide distribution, so authors invariably receive many requests for reprints.

* Three volumes of each title are published annually. Each volume consists of three to four issues.

* Subscription rates and leaflets for authors are available from *The Faculty Press, 88 Regent Street, Cambridge, England.*

THE FACULTY PRESS 88 Regent Street Cambridge England

MICROBIOS

is an international biomedical research journal devoted to fundamental studies of viruses, bacteria, micro-fungi, microscopic algae, and protozoa. It is concerned with all aspects of micro-organisms, but lays particular emphasis upon chemical microbiology.

Original observations are accepted on the applications of microbiology in the fields of pharmaceutical and chemical production; food manufacture and spoilage; public health and sanitation; biodeterioration; pharmacology and immunology.

Papers on the organisation and metabolic activities of micro-organisms are published, as well as work on cell-virus interactions. Manuscripts which are especially welcome are those dealing with the chemical anatomy of micro-organisms, and the biochemical and biophysical factors that affect microbial activity.

CYTOBIOS

is a trans-world biomedical research journal which publishes original investigations into all aspects of cell organization. Contributions will be accepted on the behaviour, structure and function of animal and plant cells, including studies on extra-cellular products and subcellular organelles.

The journal emphasizes work at chemical and molecular levels. It publishes original papers on cytogenetics; cell division and growth; cell physiology and pathology; immunochemistry and immunobiology. Manuscripts are solicited which correlate findings in the biochemical and biophysical fields with morphological, cytological and physiological knowledge.

Discoveries resulting from advances in, and application of, modern biological and medical techniques to cytology are particularly welcome. So also are cytochemical papers which contribute to an understanding of cell organization and to the study of organic fine structure.

MICROBIOS LETTERS

is a biomedical research journal having the fundamental aim of very rapid publication, and distribution to a wide international readership. It is intended for short and preliminary communications, but may include some longer papers and reviews. In general manuscripts should not exceed 5,000 words in length and include only one or two Tables and/or Figures.

Although primarily designed to augment MICROBIOS covering any microbiological studies, MICROBIOS LETTERS will consider papers in such fields as cellular pharmacology, virology, bacteriology, biochemistry, immunology, molecular biology, biochemical genetics, and biophysics.

THE FACULTY PRESS 88 Regent Street Cambridge England

TRABALHO II

FEMS Microbiology Letters 72 (1990) 109–112
Published by Elsevier

FEMSLE 04180

Cupric ions induce both an efflux of potassium and low molecular mass metabolites in *Pseudomonas syringae*

João P.S. Cabral

I.N.I.C., Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Porto, Portugal

Received 18 April 1990
Revision received 24 May 1990
Accepted 10 June 1990

Key words: *Pseudomonas syringae*; K^+ efflux; Pool metabolites

1. SUMMARY

Cu^{2+} induced an efflux of potassium, inorganic phosphate, 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules in *Pseudomonas syringae*. No detectable amounts of aspartic and glutamic acids leaked from the cells. It is proposed that the release of inorganic phosphate and other low molecular mass anionic metabolites probably played a role in re-equilibrating the internal charge balance after the exit of K^+ ions.

2. INTRODUCTION

Bacterial cells have very high intracellular solute concentration, usually ranging from 0.3 to 0.6 Osm [1–3]. Potassium is the dominant free cation in the cytoplasm of bacteria, the intracellular concentration, in non-halophiles growing in normal conditions, usually ranging from 0.15 to 0.68 M [1,3–5]. In addition, bacterial cells present considerable amounts of soluble, relatively low molecular mass compounds, such as amino acids, purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides ('pool' constituents) [6]. K^+ ions are required for normal protein synthesis [7], optimum function of several enzyme systems [8], and regulation of cytoplasmic pH [9] and osmolarity [5,10,11]. In normal growing conditions, the uptake of K^+ is accompanied by accumulation of glutamic and aspartic acids [2,3]. In addition, osmotically stressed bacterial cells can accumulate other osmolytes such as proline, betaine and trehalose [2,3,12,13]. Both in normal and in conditions giving rise to osmotic stress, it has been found that the glutamate and aspartate pools account for only part of the anionic charges required to balance the accumulated K^+ [2,3,14].

It is reported in this paper that in *Pseudomonas syringae* Cu^{2+} induces an efflux of inorganic phosphate and other low molecular mass molecules together with the K^+, and that the leakage of the anionic metabolites probably played a role in the maintenance of the electric charge balance of the cytoplasm of K^+ depleted cells.

Corresponaence to: J.P.S. Cabral, I.N.I.C., Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal.

0378-1097/90/$03.50 © 1990 Federation of European Microbiological Societies

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Culture and cell suspensions

Pseudomonas syringae ATCC 12271 was grown in a semi-synthetic medium [15], with shaking at 27° C. At the end of the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in 10 mM Na^+-Pipes buffer (pH adjusted to 6.5 with NaOH). The absorbance at 568 nm was adjusted to 1.06 using a Lambda 3 Perkin-Elmer double beam spectrophotometer with 1 cm light path cuvettes. In all experiments this cell suspension was diluted 9 : 10, and the final suspension had concentration of approx. 0.28 mg dry weight of cells ml^{-1}.

3.2. Sample preparation

Cell suspensions were treated with copper concentrations ranging from 2.5 to 50 μM at room temperature (22–23° C). After 10 min the suspensions were centrifuged and the supernatant filtered through a 0.45 μm pore filter (Sartorius). The time between the addition of copper ions and the end of filtration was 15 min.

3.3. Assay of K^+

Potassium was assayed in the supernatants using a Corning flame photometer.

3.4. Assay of inorganic phosphate

A modification of the method of Murphy and Riley [16] was used employing AnalaR KH_2PO_4 (BDH Ltd.) as the standard. The concentrated stock reagent contained antimony potassium tartrate (0.137 g), ammonium molybdate (6 g) and 70 ml concentrated H_2SO_4 made to 1000 ml with water. Before use the stock reagent was diluted 5-fold and 0.1 g of Na ascorbate was added per 100 ml of diluted reagent. Phosphate-free glassware was used.

Samples for assay (2 ml) were dried at 110° C, and 5.5 ml of diluted reagent was added. After 45 min, the absorbance was read at 720 nm, using a Lambda 3 Perkin-Elmer spectrophotometer with 1 cm light path cuvettes.

3.5. Assay of 260 nm-absorbing materials

260 nm-absorbing materials were assayed by measuring the absorbance at 260 nm in a Lambda 3 Perkin-Elmer spectrophotometer with 1 cm light path quartz cuvettes.

3.6. Assay of ribose-containing material

Ribose-containing molecules were assayed by the orcinol method as described in Plummer [17] using RNA-sodium salt from *Torula* yeast (Sigma type II-S) as the standard.

3.7. Descending paper chromatography

Samples (2 ml) were dried at 100° C, 0.2 ml of Pipes buffer was added and 10 μl of the concentrated samples were applied to Whatmann no. 1 paper. The solvent used was a mixture of Butan-1-ol/pyridine/H_2O (6 : 4 : 3). The amino acids were detected using ninhydrin (0.25% in acetone).

3.8. Determination of the total concentration of 'pool' metabolites

Fresh untreated cell suspensions were centrifuged and the pellets resuspended in 0.6 N perchloric acid at 4° C [6]. After 15 min, the suspensions were filtered through a 0.45 μm pore filter. K^+, 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules were assayed as described above in the supernatant of the initial cell suspension and after treatment with cold perchloric acid. The total amount of a pool metabolite was considered to be equal to the amount present in the supernatants of the initial and $HClO_4$ treated suspensions.

4. RESULTS AND DISCUSSION

The characteristics of the process of potassium efflux induced by cupric ions in *P. syringae* and its relation with cell viability have been recently reported by Cabral [15]. With copper concentrations higher than 15 μM, the process of efflux was essentially completed 15 min after the addition of copper ions. The determinations in the present study were therefore carried out after 15 min of copper treatment. The results are shown in Figs. 1 and 2. Very low Cu^{2+} concentrations induced leakage of K^+, inorganic phosphate, 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules. Leakage of these metabolites was not the result of

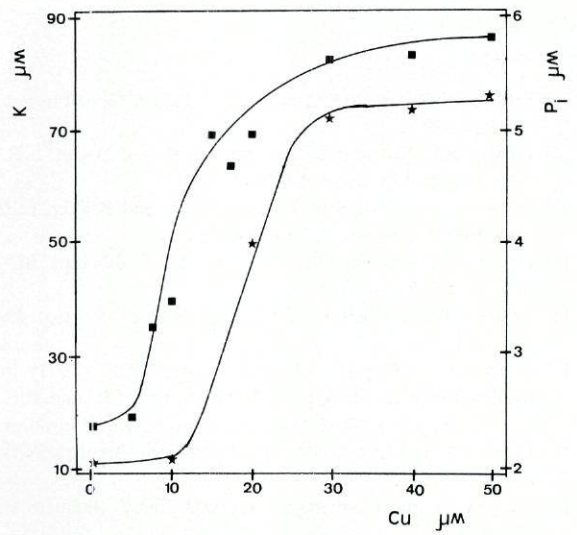


Fig. 1. Potassium and inorganic phosphate concentration in the supernatant of cell suspensions after 15 min copper treatment as a function of copper concentration. Release of: ■, K^+; ★, inorganic phosphate. Results are means from two experiments.

cell disintegration since no lysed cells were observed by light microscopy. In a short-term interaction between an antibacterial agent and a bacterial cell where no enzymic degradation of macromolecules is expected to occur, the determination of the absorbance at 260 nm should reflect mainly the amount of purines, pyrimidines, nucleosides and nucleotides released from the cells, and the orcinol reaction, the ribonucleosides and ribonucleotides leaked from the cells (pool metabolites). The release of potassium ions was therefore accompanied by leakage of pool metabolites, and some of these were negatively charged molecules, such as inorganic phosphate and nucleotides. The supernatants of control and copper treated cells were analysed by paper chromatography in order to detect leakage of amino acids. No observable spot corresponding to the anionic amino acids aspartate and glutamate was detected in the chromatograms.

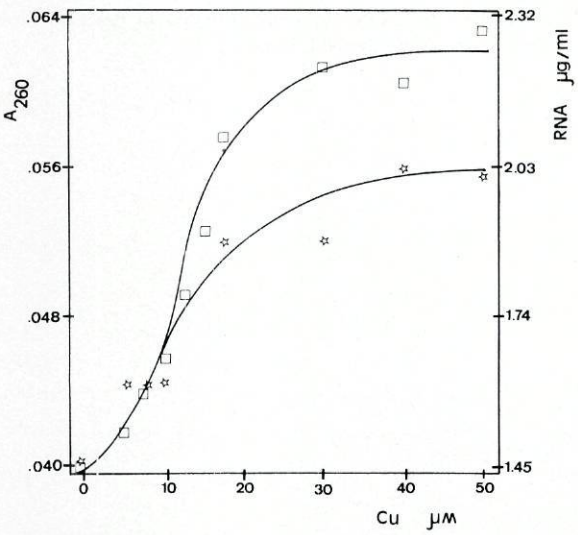


Fig. 2. 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules concentration in the supernatant of cell suspensions after 15 min copper treatment as a function of copper concentration. Release of: □, 260 nm-absorbing materials; ☆, ribose-containing molecules. Results are means from two experiments.

To evaluate the significance of the amount of the leaked materials, the concentration of pool metabolites of untreated cell suspensions were determined as described in MATERIAL AND METHODS and found to be 79.7 μM K^+, 0.170 $A_{260\,nm}$ and 16.5 μg RNA ml^{-1}. The results therefore indicated that cupric ions induced the leakage of all the intracellular unbound K^+, but only a fraction of the pool 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules were released by copper treatment. These results suggested that most probably, cupric ions did not cause a gross and extensive, but rather a specific damage of the cytoplasmic membrane. This conclusion is supported by the following observations: after 15 min of treatment with 30 μM Cu^{2+}, which caused almost maximum leakage of K^+, inorganic phosphate, 260 nm-absorbing materials and ribose-containing molecules, 75% of the cells remained viable [15]; cell suspensions treated with 100 μM dodecylguanidine acetate for 15 min, treatment found to induce a profound disorganization of the cytoplasmic membrane and leakage of most of the pool metabolites, showed an external concentration of 80 μM K^+, 16 μM P_i, 0.11 $A_{260\,nm}$ and 8.1 μg RNA ml^{-1} (unpublished results).

It has been reported that in *E. coli* cells growing in normal media the main anionic osmolytes are glutamic and aspartic acids [2,3]. According to Epstein [14], glutamate pools account for only 20% of the anionic charges needed to balance the

accumulated K^+. Dinnbier et al. [3] showed that while the internal K^+ concentration was approx. 0.4 M, the glutamate plus aspartate concentration reached only 64 mM. The fact that the patterns of release of K^+, inorganic phosphate, 260 nm-absorbing materials and ribose containing molecules as functions of copper concentration were similar, and the fact that no detectable amounts of anionic amino acids were present in the supernatants of copper treated cells suggested that K^+ efflux was matched to an efflux of anionic pool metabolites, such as inorganic phosphate and nucleotides. It is suggested that these anionic metabolites probably played a role in the maintenance of the electric charge balance in the cytoplasm of this organism, and that the positive charges lost by leaked potassium were partially compensated for the simultaneous loss of negative charges of phosphate ions and nucleotides. In addition, this processes could also have been accompained by an influx of Na^+ ions present in the buffer.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am especially indebted to Dr. A.R.W. Smith (Thames Polytechnic, London) for the modified method to assay inorganic phosphate, and for guidance and helpful discussions. This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (Grants PB/1 and 83-CEN-12).

REFERENCES

[1] Schultz, S.G. and Solomon, A.K. (1961) J. Gen. Physiol. 45, 355–369.
[2] Larsen, P.I., Sydnes, L.K., Landfald, B. and Strøm, A.R. (1987) Arch. Microbiol. 147, 1–7.
[3] Dinnbier, U., Limpinsel, E., Schmid, R. and Bakker, E.P. (1988) Arch. Microbiol. 150, 348–357.
[4] Christian, J.H.B. and Waltho, J.A. (1962) Biochim. Biophys. Acta 65, 506–508.
[5] Epstein, W. and Schultz, S.G. (1965) J. Gen. Physiol. 49, 221–234.
[6] Herbert, D., Phipps, P.J. and Strange, R.E. (1971) in Methods in Microbiology, Vol. 5B (Norris, J.R. and Ribbons, D.W., eds.), Academic Press, New York and London.
[7] Lubin, M. and Ennis, H.L. (1964) Biochim. Biophys. Acta 80, 614–631.
[8] Klenow, H. and Hennengsen, I. (1969) Eur. J. Biochem. 9, 133–141.
[9] Booth, I.R. (1985) Microbiol. Rev. 49, 359–378.
[10] Christian, J.H.B. and Waltho, J.A. (1961) J. Gen. Microbiol. 25, 97–102.
[11] Meury, J., Robin, A. and Monnier-Champeix (1985) Eur. J. Biochem. 151, 613–619.
[12] Measures, J.C. (1975) Nature 257, 398–400.
[13] Yancey, P.H., Clark, M.E., Hand, S.C., Bowlus, R.D. and Somero, G.N. (1982) Science 217, 1214–1222.
[14] Epstein, W. (1986) FEMS Microbiol. Rev. 39, 73–78.
[15] Cabral, J.P.S. (1989) Microbios 60, 141–150.
[16] Murphy, J. and Riley, J.P. (1962) Anal. Chim. Acta 27, 31–36.
[17] Plummer, D.T. (1987) An Introduction to Practical Biochemistry, McGraw-Hill, London.

TRABALHO III

Journal of General Microbiology (1990), **136**, 2481–2487. *Printed in Great Britain*

Plasmolysis induced by very low concentrations of Cu^{2+} in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271, and its relation with cation fluxes

JOÃO P. S. CABRAL

INIC, Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre 823, 4100 Porto, Portugal

(*Received 17 April 1990; revised 2 August 1990; accepted 13 August 1990*)

Very low concentrations of $CuSO_4$ induced a massive leakage of K^+ from *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 cells suspended in distilled water, Ca^{2+}/PIPES or Na^+/PIPES. Cell suspensions in distilled water, Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES, treated with Cu^{2+}, showed appreciable increases in optical density, whereas suspensions in Na^+/PIPES were unaffected. The addition of monovalent cations to suspensions in distilled water, Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES prevented the optical density increase induced by Cu^{2+}, whereas the addition of Ca^{2+} or Mg^{2+} to suspensions in distilled water did not have this effect. Cells suspended in Na^+/PIPES and treated with Cu^{2+} showed no major ultrastructural alterations, but cells treated with Cu^{2+} in distilled water showed pronounced plasmolysis. At all Cu^{2+} concentrations, two types of cells were observed, normal and heavily plasmolysed. An increase in Cu^{2+} concentration resulted in an increase in the percentage, but not in the degree of plasmolysis, of the plasmolysed cells. Cells suspended in distilled water or Na^+/PIPES bound significant amounts of copper. Cu^{2+} concentrations that induced leakage of most of the unbound K^+ did not saturate the copper-binding sites in the cells. These results indicated that plasmolysis is a direct consequence of the massive K^+ leakage from the cells, in agreement with the notion that K^+ is the main osmolyte in bacteria grown under normal conditions. Monovalent (but not divalent) cations prevented plasmolysis induced by copper by entry into the cells after the release of K^+ ions. Na^+ and Li^+ probably replaced resident K^+ ions in the neutralization of negative charges of cytoplasmic constituents. K^+ efflux and plasmolysis, induced by Cu^{2+}, appeared to be essentially 'all-or-nothing' effects.

Introduction

Pseudomonas syringae van Hall is one of the most important plant pathogens, having a very wide host range, and causing spots and necrosis of leaves, twigs and fruits, and stem cankers (Bradbury, 1986). Copper compounds have been used for centuries in the control of diseases of plants (Horsfall, 1956), and are effective in the control of several diseases caused by *P. syringae*, namely, the halo blight of beans (Tamietti & Garibaldi, 1984) and the bacterial speck of tomato (Colin & Chafik, 1986; Colin & McCarter, 1983). The mechanism of action of Cu^{2+} as an antibacterial agent is not fully understood. Cu^{2+} ions can inhibit several enzymes and metabolic pathways in bacterial cells (Kleiner, 1978; Green *et al.*, 1985; Domek *et al.*, 1987; Lowe *et al.*, 1987), and in *P. syringae* they can induce leakage of K^+ and low-molecular-mass metabolites, and cause cell death (Cabral, 1989, 1990).

K^+ is the dominant free cation in the cytoplasm of bacterial cells. In non-halophilic bacteria, the intracellular K^+ concentration usually ranges from 0·2 to 0·6 M (Christian & Waltho, 1962; Dinnbier *et al.*, 1988). K^+ ions are required for normal protein synthesis (Lubin & Ennis, 1964), optimum function of several enzyme systems (Klenow & Henningsen, 1969), and regulation of cytoplasmic pH (Booth, 1985). K^+ ions also play a key role in the osmoregulation of bacterial cells. For example, when grown in the presence of sodium chloride, non-halophilic bacteria counteract the osmotic pressure of the medium by accumulating substantial amounts of K^+ (Christian & Waltho, 1961). Halophiles show massive K^+ accumulation, reaching intracellular concentrations as high as 4·6 M (Christian & Waltho, 1962). In osmotically-stressed Gram-negative cells, the internal K^+ concentration is directly proportional to the osmolarity of the medium (Meury *et al.*, 1985), and Gram-negatives, stressed by osmotic shock, can accumulate high concentrations of glutamic acid. This process is intimately related to the uptake of K^+ since the enzyme generally involved in the synthesis of this amino acid is stimulated up to tenfold by high concentrations of K^+ (Measures, 1975). However, since very high concentrations of K^+ are potentially deleterious to enzyme function

0001-6182 © 1990 SGM

(except in halobacteria), bacteria that are under osmotic stress accumulate other 'compatible solutes' such as proline, betaine and trehalose (Measures, 1975; Yancey *et al.*, 1982; Larsen *et al.*, 1987; Dinnbier *et al.*, 1988).

Since K^+ is generally the major osmoactive ion, its rapid depletion from cells should be followed by a contraction of the cytoplasmic membrane and plasmolysis. This phenomenon was reported by Thompson *et al.* (1970) in a marine pseudomonad suspended in a diluted solution of magnesium sulphate. In the present work, which was aimed at obtaining a better understanding of the mode of action of Cu^{2+} as an antibacterial agent, and of the roles of K^+ in bacterial physiology, the same phenomenon was shown to occur when *P. syringae* cells are treated with low concentrations of copper sulphate. A preliminary report of this work has been presented (Cabral & Silva, 1984).

Methods

Culture and cell suspensions. Pseudomonas syringae ATCC 12271 was grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0·5 g $NH_4H_2PO_4$, 0·5 g K_2HPO_4, 0·5 g NaCl, 0·2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6·2). Cultures (100 ml) in 250 ml Erlenmeyer flasks were incubated with shaking at 27 °C. At the end of the exponential phase (corresponding to $1–3 \times 10^9$ c.f.u. ml^{-1}), cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in one of the following media: distilled water (pH 6·5); 2 mM- or 10 mM-Na^+/, Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES buffer (pH adjusted to 6·5 with NaOH, $Ca(OH)_2$ or MgO, respectively). The concentration of Na^+, Ca^{2+} and Mg^{2+} in 2 mM-PIPES buffer was, respectively, 2·7, 1·8 and 1·7 mM. The OD_{568} was adjusted to 1·06, using a Lambda 3 Perkin-Elmer or a Shimadzu double-beam spectrophotometer with 1 cm light-path cuvettes. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10, and the final suspensions had a concentration of approximately 0·28 mg dry weight of cells ml^{-1} ($\simeq 10^9$ c.f.u. ml^{-1}).

Electron microscopy. Cell suspensions in distilled water or in 10 mM-Na^+/PIPES buffer were treated as described below. At intervals, samples were withdrawn and fixed in glutaraldehyde (TAAB, London, UK; final concentration 2·5%, v/v) for 1 d. Dehydration was performed by washing the samples in increasingly concentrated aqueous ethanol, followed by four washings in absolute ethanol. Samples were embedded in Epon resin (TAAB) with infiltration in propylene oxide. Ultrathin sections were cut, and stained with uranyl acetate followed by lead citrate. Observations were carried out in a Siemens Elmiskop IA electron microscope, working at 80 kV. To quantify cell plasmolysis, the following procedure was used: cell suspensions were treated with $CuSO_4$ concentrations ranging from 5 to 40 μM, at room temperature (22–23 °C). After 1·5 h, samples were withdrawn and processed for electron microscopy as described above. Micrographs taken at a magnification 8000× were enlarged 3×, and the percentage of plasmolysed cells for each copper concentration was calculated after counting 500–2000 cells. For each copper concentration, 50 plasmolysed cells were chosen at random, and for each cell, a plasmolysis index was determined planimetrically as the ratio of the weight of the photomicrograph bearing the image of the plasmolysed region to the weight of paper bearing the image of the whole cell. The mean plasmolysis index was calculated by averaging the plasmolysis index of 50 cells examined.

Spectrophotometry. Plasmolysis of the cells was assessed by measuring the change in OD_{568} of suspensions treated with $CuSO_4$ (5–50 μM), at room temperature, using a Lambda 3 Perkin-Elmer or a Shimadzu double-beam spectrophotometer. Cell suspension (3 ml) was placed in each of two glass cuvettes (1 cm light path). $CuSO_4$ solution was rapidly mixed with one of the suspensions and after allowing 15 s for equilibration, the OD_{568} of the treated suspension was read, at intervals, against the untreated suspension.

K^+ leakage experiments. Cell suspensions were treated with $CuSO_4$ concentrations ranging from 2·5 to 40 μM at room temperature. At intervals, the suspensions were filtered through a 0·45 μM pore filter (Sartorius), and potassium was assayed in the filtrate by flame photometry using a Corning flame photometer.

Copper binding experiments. Cell suspensions in distilled water and in 10 mM-Na^+/PIPES buffer were treated with $CuSO_4$ concentrations ranging from 10 to 100 μM at room temperature. After 15 min, cells were harvested by centrifugation, washed with the appropriate suspending medium, and recentrifuged. The pellet was treated with diluted HNO_3 (20%, v/v) and autoclaved at 121 °C for 20 min. Copper was assayed by atomic absorption spectrophotometry, using a Varian 1250 spectrophotometer with an air-acetylene flame, working at 324·7 nm.

Results

K^+ efflux

In distilled water, or 2 mM-Ca^{2+}/ or Na^+/PIPES buffer, very low concentrations of $CuSO_4$ induced a massive leakage of K^+ from the cells. In these suspension media, the course of K^+ efflux and the amount of K^+ released after 15 min of copper treatment followed a sigmoidal pattern (Fig. 1) similar to that in 10 mM-Na^+/PIPES recently described (Cabral, 1989, 1990).

The total concentration of 'pool' K^+ in untreated cell suspensions was estimated to be about 80 μM [0·286 μmol K^+ (mg dry weight)$^{-1}$ (Cabral, 1990)]. Therefore, treatment of the cells suspended in various media with 30–40 μM-Cu^{2+} for 15 min resulted in the release of most or all the intracellular unbound K^+.

The release of K^+ from the cells after addition of $CuSO_4$ was considered to be a direct consequence of the action of added Cu^{2+} ions, since the background concentration of copper in the suspending media was negligible [below the detection limit of the Varian atomic absorption spectrophotometer (0·5 μM)] and treatment of the cells with various metal sulphates did not cause K^+ efflux (Cabral, 1989).

Spectrophotometry

Since K^+ is generally the major osmoactive ion in bacteria, its rapid depletion from the cells was expected to be followed by a contraction of the cytoplasm, with a concomitant increase in the optical density of the treated suspension.

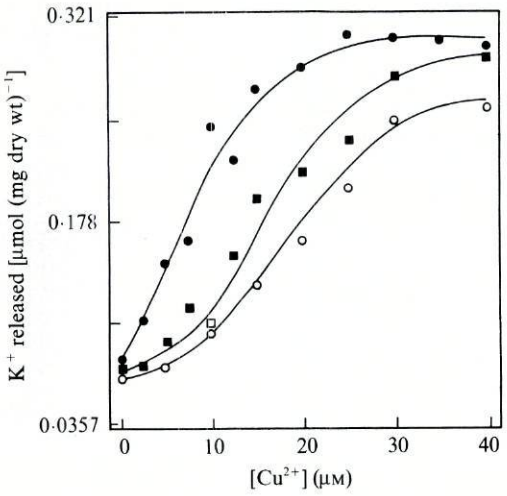


Fig. 1. K^+ released after 15 min of Cu^{2+} treatment, plotted against Cu^{2+} concentration. K^+ was assayed by flame photometry in the supernatant of treated suspensions. Cells were suspended in 2 mM-Na^+/PIPES (■), 2 mM-Ca^{2+}/PIPES (●), or distilled water (○). Mean number of determinations per copper concentration and mean coefficient of variation: 2 mM-Na^+/PIPES 2·0, 14·3%; 2 mM-Ca^{2+}/PIPES 1·6, 6·0%; distilled water 1·9, 16·6%.

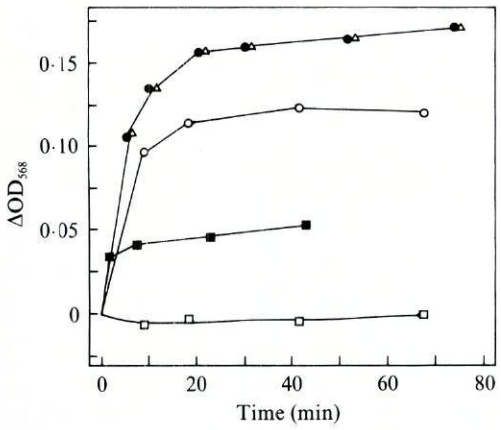


Fig. 2. Time course of increase in OD_{568} in cell suspensions treated with 50 μM-Cu^{2+}. The OD_{568} was measured against an untreated suspension. Cells were suspended in 10 mM-Na^+/PIPES (□), 2 mM-Na^+/PIPES (■), 2 mM-Ca^{2+}/PIPES (●), 2 mM-Mg^{2+}/PIPES (△), or distilled water (○). Results are from one experiment.

To check this hypothesis, cell suspensions were treated with $CuSO_4$ and the OD_{568} monitored as described in Methods. Cu^{2+} treatment of cells suspended in distilled water, Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES buffer indeed resulted in an increase in OD_{568} of the suspension (Fig. 2). With 50 μM-Cu^{2+}, the increase in OD_{568} was essentially complete about 20 min after the addition of Cu^{2+} ions (Fig. 2), and in a fixed-time assay at 15 min, an increase in Cu^{2+} concentration was seen to result in an increase in OD_{568} (Fig. 3).

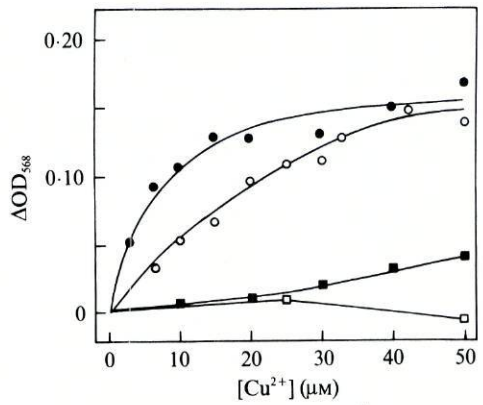


Fig. 3. Increase in OD_{568} after 15 min of Cu^{2+} treatment, plotted against Cu^{2+} concentration. The OD_{568} was measured against an untreated suspension. Cells were suspended in 10 mM-Na^+/PIPES (□), 2 mM-Na^+/PIPES (■), 2 mM-Ca^{2+}/PIPES (●), or distilled water (○). Mean number of determinations per copper concentration and mean coefficient of variation: 2 mM-Ca^{2+}/PIPES 3, 8·6%; distilled water 1·6, 7·5%. For Na^+/PIPES, the results are from one experiment.

In contrast, cell suspensions in Na^+/PIPES buffer did not show a significant increase in OD_{568} after addition of similar $CuSO_4$ concentrations (Figs 2 and 3), although pronounced K^+ leakage was observed. Since all treatments were carried out at the same pH, it seemed possible that the presence of Na^+ ions prevented the increase in OD_{568} induced by Cu^{2+}. To test this hypothesis, suspensions in distilled water, Ca^{2+}/ and Mg^{2+}/PIPES buffer were pre-treated with NaCl. After 2 min, $CuSO_4$ was added, and the OD_{568} was monitored. The addition of Na^+ to suspensions in these media effectively prevented the increase in OD_{568} induced by Cu^{2+} (Fig. 4*a*, *b*). Furthermore, in 2 mM-Na^+/PIPES buffer, the presence of additional NaCl prevented the small increase in OD_{568} induced by Cu^{2+} (Fig. 4*a*). This effect increased with increasing NaCl concentration (Fig. 4*a*). In contrast, the presence of Ca^{2+} or Mg^{2+} in suspensions in distilled water did not prevent the OD_{568} increase induced by Cu^{2+} (data not shown). Other cations were tested for their ability to prevent the Cu^{2+}-induced increase in OD_{568}. Of these, K^+ and Li^+ were also effective with cells suspended in distilled water or in Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES buffer (Fig. 4*a*, *b*, and further data not shown). In cells suspended in distilled water, the presence of monovalent cations (Na^+, K^+ or Li^+) in the suspending medium also resulted in a reversion of the initial small increase in OD_{568} caused by treatment with 40 μM-Cu^{2+} (Fig. 4*b*).

Electron microscopy

The spectrophotometric data strongly suggested that treatment of the cells with very low concentrations of

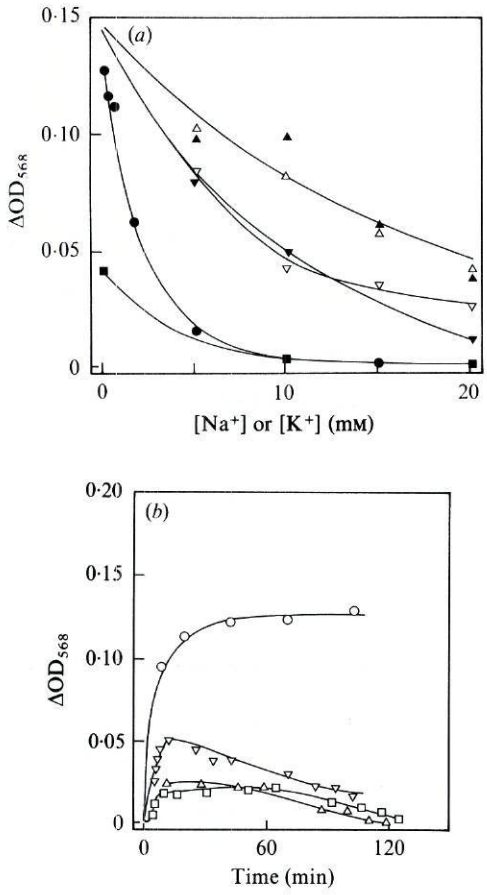


Fig. 4. (*a*) Effect of Na^+ or K^+ concentration on the increase in OD_{568} after 15 min treatment with 50 μM-Cu^{2+}. The OD_{568} was measured against an untreated suspension. The monovalent cations were added 2 min before addition of Cu^{2+}. Cells were suspended in 2 mM-Na^+/PIPES + NaCl (■), 2 mM-Ca^{2+}/PIPES + NaCl (▼), 2 mM-Ca^{2+}/PIPES + KCl (▽), 2 mM-Mg^{2+}/PIPES + NaCl (▲), 2 mM-Mg^{2+}/PIPES + KCl (△) or distilled water + NaCl (●). In distilled water, the mean number of determinations per copper concentration and mean coefficient of variation was 1·8 and 15·8%, respectively. For the other media, the results are from one experiment. (*b*) Effect of the presence of monovalent cations (5 mM) on the time course of increase in OD_{568} in cell suspensions in distilled water treated with 40 μM-Cu^{2+}. The OD_{568} was measured against an untreated suspension. ○, No monovalent cation added; ▽, NaCl; △, KCl; □, LiCl. The results are from one experiment.

Table 1. *Quantification of cell plasmolysis induced by Cu^{2+} in P. syringae cells suspended in distilled water (pH 6·5), 1·5 h after addition of Cu^{2+}*

Pooled results from three experiments are shown.

Cu^{2+} concn (μM)	No. of cells examined	Percentage of plamolysed cells	Mean plasmolysis index*
5	1186	2·53	0·347†
10	2045	15·9	0·319
15	2137	32·8	0·383
20	543	56·0	0·447
25	941	78·9	0·398
30	914	89·1	0·387
40	1366	93·8	0·394

* Calculated as the mean of the plasmolysis index of 50 random plasmolysed cells. The plasmolysis index was determined as described in Methods.

† Due to the very low percentage of plasmolysed cells, for this sample only 20 plamolysed cells were examined.

Table 2. *Binding of Cu^{2+} by cell suspensions in 10 mM-Na^+/PIPES or distilled water*

Copper was assayed by atomic absorption spectrophotometry after digestion of cells with HNO_3. Results are means from four to nine determinations, ±SD.

Initial Cu^{2+} concn		Bound Cu^{2+} [μmol (mg dry wt)$^{-1}$] in cells suspended in:	
(μM)	[μmol (mg dry wt)$^{-1}$]	Na^+/PIPES	Distilled water
10	0·035	0·009 ± 0·004	–
20	0·071	0·033 ± 0·003	–
25	0·089	–	0·060 ± 0·004
30	0·107	0·055 ± 0·006	–
40	0·143	0·078 ± 0·005	–
50	0·178	0·110 ± 0·004	0·141 ± 0·002
60	0·214	0·138 ± 0·011	–
70	0·250	0·159 ± 0·008	–
75	0·268	–	0·195 ± 0·013
80	0·286	0·177 ± 0·013	–
90	0·321	0·202 ± 0·010	–
100	0·357	0·224 ± 0·016	0·291 ± 0·007

$CuSO_4$ resulted in plasmolysis unless monovalent cations were present in the supernatants of the suspensions.

To test this hypothesis, cells suspended in distilled water or Na^+/PIPES were treated with $CuSO_4$ and examined by electron microscopy. The cells suspended in 10 mM-Na^+/PIPES buffer and treated with 10–50 μM-Cu^{2+} for 1 h showed no major ultrastructural alterations, but those suspended in distilled water displayed a pronounced plasmolysis that was not an artefact due to the fixation process, since it could be observed by light microscopy in unfixed cells.

This phenomenon was studied in suspensions in distilled water treated with Cu^{2+} concentrations ranging from 5 to 40 μM, and for times of exposure up to several hours. After the addition of Cu^{2+}, plasmolysis progressively increased with time until a maximum was achieved. At all copper concentrations, two subpopulations could be differentiated: normal cells and heavily plasmolysed cells (Fig. 5). The degree of plasmolysis of individual cells was assessed by a plasmolysis index as described in Methods. The mean plasmolysis index was calculated by averaging the plasmolysis index of 50 plasmolysed cells.

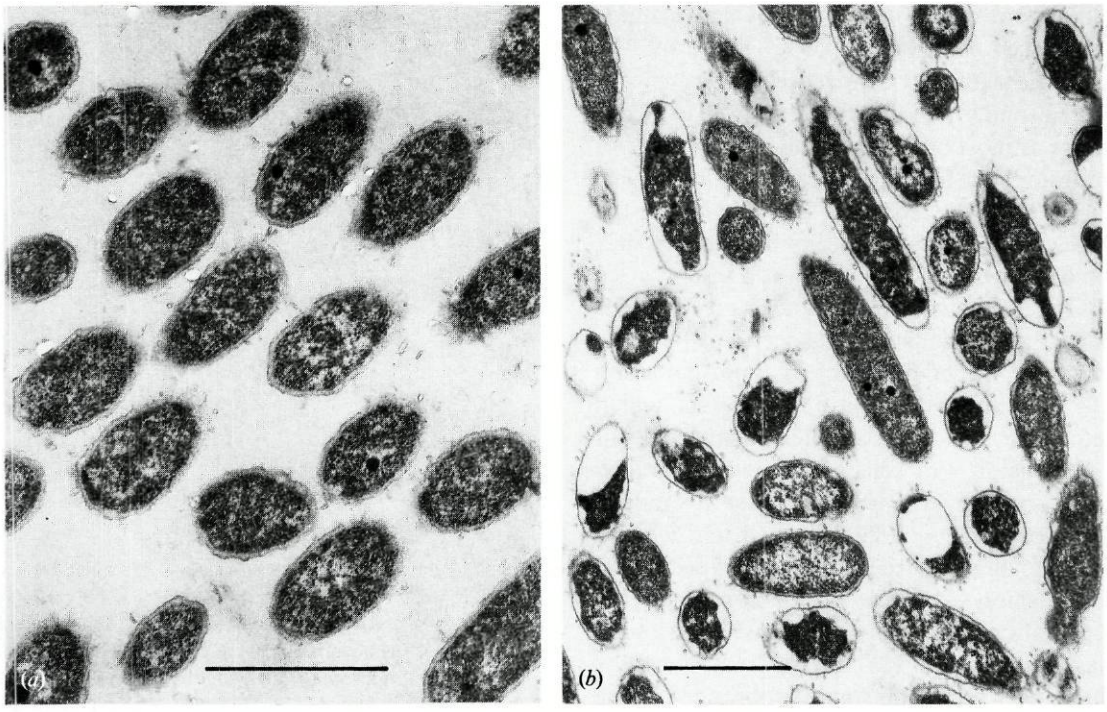


Fig. 5. (*a*) Control cells of *P. syringae* suspended in distilled water. (*b*) Plasmolysis induced by 25 μM-Cu^{2+} in *P. syringae* suspended in distilled water (pH 6·5; 1 h treatment). Fixation with 2·5% glutaraldehyde. Bars, 1 μm.

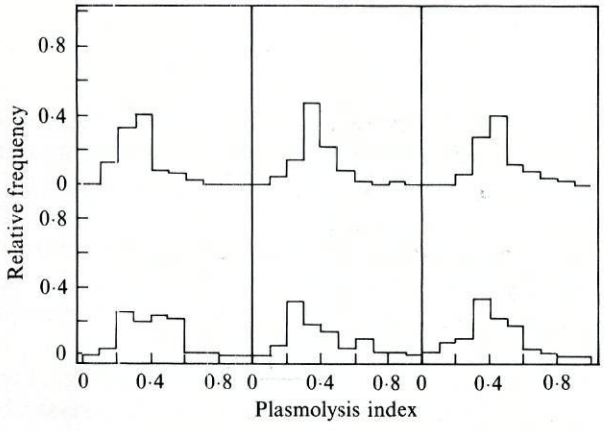


Fig. 6. Distribution of the plasmolysis index in cells of *P. syringae* treated with 10–40 μM-Cu^{2+} for 1·5 h. The plasmolysis index as described in Methods was determined for each of 50 random plasmolysed cells at each copper concentration. Ten equally spaced frequency classes were considered, and for each, the relative frequency was determined by dividing the number of cells belonging to the class by 50. From left to right: upper row: 10, 15, 20 μM-Cu^{2+}; lower row: 25, 30, 40 μM-Cu^{2+}.

This parameter was therefore a measure of the degree of plasmolysis in the population of cells that were plasmolysed. In the range 5 to 40 μM-Cu^{2+}, an increase in Cu^{2+} concentration resulted in an increase in the percentage of plasmolysed cells (Table 1). In contrast, the mean plasmolysis index and the distribution of the plasmolysis index of the cells were similar for all copper concentrations (Table 1, Fig. 6).

Binding experiments

Cells suspended in distilled water or Na^+/PIPES buffer and treated with Cu^{2+} at concentrations up to 100 μM bound a significant amount of the Cu^{2+} ions present in solution (Table 2). For a given initial Cu^{2+} concentration, cells suspended in Na^+/PIPES buffer bound less copper than cells suspended in water (Table 2).

Discussion

It has recently been reported that very low concentrations of $CuSO_4$ induced massive K^+ efflux in *P. syringae* cells suspended in 10 mM-Na^+/PIPES buffer (Cabral, 1989, 1990). The present work has shown that Cu^{2+} also induces significant K^+ loss in cells suspended in distilled water, or 2 mM-Ca^{2+}/ or 2 mM-Na^+/PIPES buffer. K^+ efflux in Ca^{2+}/PIPES buffer occurred at Cu^{2+} concentrations lower than in Na^+/PIPES buffer or distilled water. These observations are in accordance with those reported earlier (Cabral, 1989) in that in Na^+/PIPES

buffer, pre-treatment of the cells with divalent cations (e.g. Ca^{2+}) increased both the rate of K^+ efflux and the amount of K^+ released after copper treatment.

In Na^+/PIPES buffer and distilled water, 40 μM-Cu^{2+} induced leakage of most of the unbound cellular K^+, but did not saturate the binding sites for Cu^{2+} ions. Therefore, besides the Cu^{2+}-binding sites involved in the process of K^+ efflux, *P. syringae* cells have other sites available for Cu^{2+} binding.

Since K^+ is the main osmolyte in bacteria grown under normal conditions and the principal species responsible for maintenance of turgor pressure, its rapid depletion from the cells was expected to cause plasmolysis, which should be detected by an increase in the optical density of the treated suspension. For cells suspended in distilled water and Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES buffer this was indeed observed. Thompson *et al.* (1970) reported that when a marine pseudomonad was suspended in a 0·05 M-$MgSO_4$ solution, cells plasmolysed. These authors concluded that under these conditions, cells showed extensive plasmolysis due to massive leakage of K^+. In yeast cells, K^+ efflux caused by inhibitors of the plasma membrane ATPase has been reported to cause a pronounced decrease in cell volume (Borst-Pauwels *et al.*, 1983). Ohsumi *et al.* (1988) reported that Cu^{2+} induced K^+ loss from yeast cells with a concomitant increase in the turbidity of the suspension due to shrinkage of the cells. However, these authors did not interpret the shrinkage of the cells as being due to K^+ leakage.

In Na^+/PIPES buffer, K^+ leakage was not followed by cell plasmolysis. In distilled water, or Ca^{2+}/ or Mg^{2+}/PIPES buffer, plasmolysis induced by Cu^{2+} could be significantly reduced if cells were pre-incubated with monovalent (but not with divalent) cations. It would appear that externally added Na^+, Li^+ and K^+ effectively antagonized plasmolysis induced by Cu^{2+}, by entering the cells soon after the release of the resident K^+ ions. Results different from these were reported by Thompson *et al.* (1970): in their marine pseudomonad plasmolysed by washing in $MgSO_4$, K^+, but not Li^+, was effective in deplasmolysing the cells.

The results presented in this paper therefore agree with the interpretation that in bacteria grown in normal conditions, K^+ is the main osmoactive solute. Our results also suggest that, under conditions of severe K^+ leakage, Na^+ and Li^+ could enter the cells and probably replace resident K^+ ions in the neutralization of negative charges of cytoplasmic constituents. It has been pointed out by several authors that in non-halophilic bacteria, Na^+ and Li^+ can not (or poorly) substitute for K^+ in metabolism. K^+-dependent enzymes are not activated (and can be inhibited) by Na^+ or Li^+ (Evans & Sorger, 1966; Strickland & Miller, 1968; Klenow & Henningsen, 1969; Bishop & Gill, 1971). Replacement of intracellular K^+ by

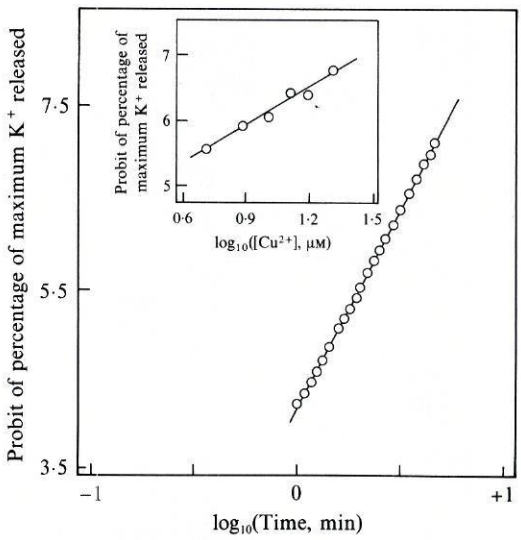


Fig. 7. Probit plot of the time course of K^+ efflux induced by 25 μM-Cu^{2+} in cells suspended in 10 mM-Na^+/PIPES (results taken from Cabral, 1989). K^+ was assayed using a K^+-sensitive electrode. The values of K^+ concentration were converted into percentages of the maximum K^+ released (67 μM), and these were converted to probits by the formula of Davies (1971). Inset: probit plot of maximum K^+ released from the cells in 10 mM-Na^+/PIPES as a function of Cu^{2+} concentration (results taken from Cabral, 1990). K^+ was assayed by flame photometry. The values of K^+ concentration were converted into percentages of the maximum K^+ released (86 μM), and these were converted to probits, as described above.

Na^+ has been reported to cause a severe decrease in protein synthesis and in the composition of rRNA (Ennis & Lubin, 1965). *In vitro*, several activities of the sub-units of the bacterial ribosome are strongly dependent on high K^+ concentrations, but are not influenced by Na^+ or Li^+ (Zamir *et al.*, 1974). Therefore, uptaken Na^+ and Li^+ probably re-equilibrated turgor pressure but did not restore normal metabolism in Cu^{2+}-treated *P. syringae* cells.

If plasmolysis was mainly caused by K^+ leakage, then the loss of K^+ from individual cells could be assessed by examining their morphology. As reported above, at all Cu^{2+} concentrations, two sub-populations could be distinguished: normal cells and heavily plasmolysed cells. The mean plasmolysis index and the distribution of the plasmolysis index of the cells were similar for all Cu^{2+} concentrations, which indicated that probably K^+ efflux and plasmolysis were essentially 'all-or-nothing' reactions. If K^+ loss and plasmolysis were graded responses, an increase in Cu^{2+} concentration would result in an increase in the mean plasmolysis index, and a shift in the distribution of the plasmolysis index to higher values. Further support of this interpretation came from an analysis of the process of K^+ efflux itself. In a 'quantal' ('all-or-nothing') phenomenon (e.g. death by treatment

with a chemical agent), when the susceptibility of the members of the population is normally distributed, the percentage of response (mortality, in the above example) is a sigmoidal function of the dose or time. This curve can be converted into a straight line by probit transformation (Finney, 1952; Hewlett & Plackett, 1979). When the values of the time course of K^+ efflux (studied using a K^+-sensitive electrode and taken from Cabral, 1989) were plotted as probits of the percentages of K^+ released against log time, and the probits of the percentages of maximum K^+ released were plotted against log copper concentration, linear relationships were indeed found (Fig. 7). K^+ loss due to an 'all-or-nothing' reaction has been reported also in yeast cells treated with mercury and several inhibitors of the plasma-membrane ATPase (Passow & Rothstein, 1959; Borst-Pauwels *et al.*, 1983).

I am especially indebted to Dr M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto) and Dr A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London, UK) for guidance and helpful discussions, and to Mrs Teresa Serra for excellent technical assistance in the atomic absorption spectrophotometry. This work was supported by INIC (grants PB/1 and 83-CEN-12).

References

BISHOP, C. C. & GILL, J. E. (1971). Inhibition of *Escherichia coli* DNA polymerase by monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* **227**, 97–105.

BOOTH, I. R. (1985). Regulation of cytoplasmic pH in bacteria. *Microbiological Reviews* **49**, 359–378.

BORST-PAUWELS, G. W. F. H., THEUVENET, A. P. R. & STOLS, A. L. H. (1983). All-or-none interactions of inhibitors of the plasma membrane ATPase with *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta* **732**, 186–192.

BRADBURY, J. F. (1986). *Guide to Plant Pathogenic Bacteria*. Kew: CAB International Mycological Institute.

CABRAL, J. P. S. (1989). Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability. *Microbios* **60**, 141–150.

CABRAL, J. P. S. (1990). Cupric ions induce both an efflux of potassium and low molecular mass metabolites in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters* (in the Press).

CABRAL, J. P. S. & SILVA, M. T. (1984). Binding of copper to *Pseudomonas syringae*: a chemical and morphological study. *Proceedings of the 2nd Working Group on Pseudomonas syringae Pathovars*, pp. 43–44. Athens: Hellenic Phytopathological Society.

CHRISTIAN, J. H. B. & WALTHO, J. A. (1961). The sodium and potassium content of non-halophilic bacteria in relation to salt tolerance. *Journal of General Microbiology* **25**, 97–102.

CHRISTIAN, J. H. B. & WALTHO, J. A. (1962). Solute concentrations within cells of halophilic and non-halophilic bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta* **65**, 506–508.

COLIN, J. E. & CHAFIK, Z. (1986). Comparison of biological and chemical treatments for control of bacterial speck of tomato under field conditions in Morocco. *Plant Disease* **70**, 1048–1050.

COLIN, K. C. & MCCARTER, S. M. (1983). Effectiveness of selected chemicals in inhibiting *Pseudomonas syringae* pv. *tomato in vitro* and in controlling bacterial speck. *Plant Disease* **67**, 639–644.

DAVIES, R. G. (1971). *Computer Programming in Quantitative Biology*, chapter 14. New York & London: Academic Press.

DINNBIER, U., LIMPSEL, E., SCHMID, R. & BAKKER, E. P. (1988). Transient accumulation of potassium glutamate and its replacement by trehalose during adaption of growing cells of *Escherichia coli* K-12 to elevated sodium chloride concentrations. *Archives of Microbiology* **150**, 348–357.

DOMEK, M. J., ROBBINS, J. R., ANDERSON, M. E. & MCFETERS, G. A. (1987). Metabolism of *Escherichia coli* injured by copper. *Canadian Journal of Microbiology* **33**, 57–62.

ENNIS, H. L. & LUBIN, M. (1965). Pre-ribosomal particles formed in potassium-depleted cells. Studies on degradation and stabilization. *Biochimica et Biophysica Acta* **95**, 605–623.

EVANS, H. J. & SORGER, G. J. (1966). Role of mineral elements with emphasis on the univalent cations. *Annual Review of Plant Physiology* **17**, 47–76.

FINNEY, D. J. (1952). *Probit Analysis*, 2nd edn. Cambridge: Cambridge University Press.

GREEN, J., PRIOR, S. D. & DALTON, H. (1985). Copper ions as inhibitors of protein C of soluble methane monooxygenase of *Methylococcus capsulatus* (Bath). *European Journal of Biochemistry* **153**, 137–144.

HEWLETT, P. S. & PLACKETT, R. L. (1979). *The Interpretation of Quantal Responses in Biology*. London: Edward Arnold.

HORSFALL, J. G. (1956). *Principles of Fungicidal Action*, chapter I. Waltham: Chronica Botanica Company.

KLEINER, D. (1978). Inhibition of the respiratory system in *Azotobacter vinelandii* by divalent transition metal ions. *FEBS Letters* **96**, 364–366.

KLENOW, H. & HENNINGSEN, I. (1969). Effect of monovalent cations on the activity of the DNA polymerase of *Escherichia coli* B. *European Journal of Biochemistry* **9**, 133–141.

LARSEN, P. I., SYDNES, L. K., LANDFALD, B. & STRØM, A. R. (1987). Osmoregulation in *Escherichia coli* by accumulation of organic osmolytes: betaine, glutamic acid, and trehalose. *Archives of Microbiology* **147**, 1–7.

LOWE, J. A., CHAN, Y. M. & TSANG, J. C. (1987). Investigation of biosynthesis of prodigiosin and its condensing enzyme in *Serratia marcescens*. *Microbios* **51**, 71–80.

LUBIN, M. & ENNIS, H. L. (1964). On the role of intracellular potassium in protein synthesis. *Biochimica et Biophysica Acta* **80**, 614–631.

MEASURES, J. C. (1975). Role of amino acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria. *Nature, London* **257**, 398–400.

MEURY, J., ROBIN, A. & MONNIER-CHAMPEIX, P. (1985). Turgor-controlled K^+ fluxes and their pathways in *Escherichia coli*. *European Journal of Biochemistry* **151**, 613–619.

OHSUMI, Y., KITAMOTO, K. & ANRAKU, Y. (1988). Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion. *Journal of Bacteriology* **170**, 2676–2682.

PASSOW, H. & ROTHSTEIN, A. (1960). The binding of mercury by the yeast cell in relation to changes in permeability. *Journal of General Physiology* **43**, 621–633.

STRICKLAND, J. E. & MILLER, O. N. (1968). Inhibition of glycerol dehydrogenase from *Aerobacter aerogenes* by dihydroxyacetone, high ionic strength, and monovalent cations. *Biochimica et Biophysica Acta* **159**, 221–226.

TAMIETTI, G. & GARIBALDI, A. (1984). Eradication of *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* in been seeds in Italy. *Phytobacteriology and Plant Bacterial Diseases of Quarantine Significance* (Italian–US Workshop/Seminar 'Plant Pathology and Quarantine', Rome), pp. 69–76.

THOMPSON, J., COSTERTON, J. W. & MACLEOD, R. A. (1970). K^+-dependent deplasmolysis of a marine pseudomonad plasmolysed in a hypotonic solution. *Journal of Bacteriology* **102**, 843–854.

YANCEY, P. H., CLARK, M. E., HAND, S. C., BOWLUS, R. D. & SOMER, G. N. (1982). Living with water stress: evolution of osmolyte systems. *Science* **217**, 1214–1222.

ZAMIR, A., MISKIN, R., VOGEL, Z. & ELSON, D. (1974). The inactivation and reactivation of *Escherichia coli* ribosomes. *Methods in Enzymology* **30**, 406–426.

TRABALHO IV

ANTIMICROBIAL AGENTS AND CHEMOTHERAPY, Feb. 1991, p. 341–344
0066-4804/91/020341-04$02.00/0
Copyright © 1991, American Society for Microbiology
Vol. 35, No. 2

Damage to the Cytoplasmic Membrane and Cell Death Caused by Dodine (Dodecylguanidine Monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271

JOÃO P. S. CABRAL

Instituto Nacional de Investigação Científica, Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto, Rua do Campo Alegre, 823, 4100 Porto, Portugal

Received 27 September 1990/Accepted 13 November 1990

Treatment of *Pseudomonas syringae* cells with low concentrations of the fungicide dodecylguanidine monoacetate (dodine) resulted in cell death and leakage of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules. The results suggest that dodine causes gross and extensive damage to the cytoplasmic membrane, which is probably implicated in the death of cells.

Pseudomonas syringae van Hall is one of the most important plant pathogens, having a very wide host range and causing spots, necrosis of leaves, twigs, and fruits, and stem cankers (1).

Dodine (dodecylguanidine monoacetate) was introduced in 1956 by the American Cyanamid Company (Princeton, N.J.) as a protective fungicide (30). It is an effective fungicide against apple scab caused by *Venturia* spp. (23–25) and cherry leaf spot caused by *Coccomyces hiemalis* (10), and it has also been used with success in controlling several bacterial plant diseases (9, 21). Dodine is a soluble amphiphile (surfactant) consisting of a hydrophobic apolar group (C_{12} hydrocarbon chain) and a positively charged hydrophilic polar head group (guanidine).

In vitro, dodine severely affects the metabolism of fungal cells. Low concentrations of dodine inhibit growth (2, 8, 26, 31), respiration on glucose and acetate (2, 26), and active transport of ^{32}P, [^{14}C]glucose, [^{14}C]acetate, and L-[^{14}C] phenylalanine (2, 19, 26).

The literature on the action of dodine in bacterial cells is very scarce. It has been reported that dodine inhibits growth and O_2 uptake in *Rhizobium* spp. (13, 29) and the nitrogenase activity of several soil bacteria (18).

The development of an effective chemical control of bacterial plant diseases demands an understanding of the mechanisms of action of active chemical agents. The aim of this study was to evaluate the bactericidal and membrane-damaging activities of dodine in *P. syringae* in order to contribute to a better understanding of the mode of action of this fungicide in bacterial cells.

MATERIALS AND METHODS

Chemicals. Dodine (molecular weight, 287) (analytical grade; solubility in water, 0.063% [wt/vol], according to the manufacturer) was a gift from American Cyanamid Company. Other chemicals were reagent grade.

Culture and cell suspensions. *P. syringae* ATCC 12271 was grown in a semisynthetic medium as previously described (3, 5). Cells were suspended in distilled water (pH 6.5) or 10 mM Na^+-dimethylglutaric acid (DMGA) buffer (10 mM DMGA, pH adjusted to 6.5 with NaOH) to a final concentration of approximately 0.28 mg (dry weight) of cells ml^{-1} (approximately 10^9 CFU ml^{-1}).

Biochemical determinations. Cell suspensions were treated with dodine concentrations ranging from 5 to 75 μM at room temperature (22 to 23°C). At intervals, samples were withdrawn and filtered through a 0.45-μm-pore filter (Sartorius). Biochemical determinations were carried out with the filtrates. K^+ was assayed by using flame photometry, UV-absorbing materials were assayed by measuring the A_{260}, and ribose-containing molecules were assayed by using the orcinol reaction with RNA as the standard, as previously described (4). The total concentration of pool metabolites in untreated suspensions in Na^+-DMGA buffer was determined by extraction with cold perchloric acid, as previously described (4).

Lethality studies. (i) Cell viability. Samples were withdrawn from treated suspensions and serially diluted in distilled water prior to plating on nutrient agar (Difco) plates (four replicates). For each sample (0.05 to 0.1 ml), the total volume of diluent was 20 ml, and the total time for dilution and plating was approximately 3 min. With this method, the concentration of dodine in the diluted sample was negligible (<0.3 μM) and did not influence the assay of viability. The colonies were counted after 3 days at room temperature.

(ii) Determination of the lethal times for 50 and 90% killing. In a quantal phenomenon, such as cell death caused by the action of a chemical agent, the mortality is generally a sigmoidal function of the dose or time. This curve can be converted into a straight line by the probit transformation (12, 14). The values of the parameters of the formula probit of the percentage of dead cells versus $\log_{10}$ time were determined by iterative weighted-regression analysis according to the maximum-likelihood method (12). An original computer program in Fortran IV (7) was adapted to Mallard Basic (Amsoft, Brentwood, England) and was run in an Amstrad PCW 8256 computer working in single precision. The values of the lethal times for each dodine concentration were calculated from the regression equation.

RESULTS

The bactericidal and membrane-damaging activities of dodine in *P. syringae* were assessed in cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer. In these suspending media, control (untreated) cells leaked small amounts of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules (Fig. 1 and 2). After 4 h of incubation, cells in both suspending media remained fully viable. These results indi-

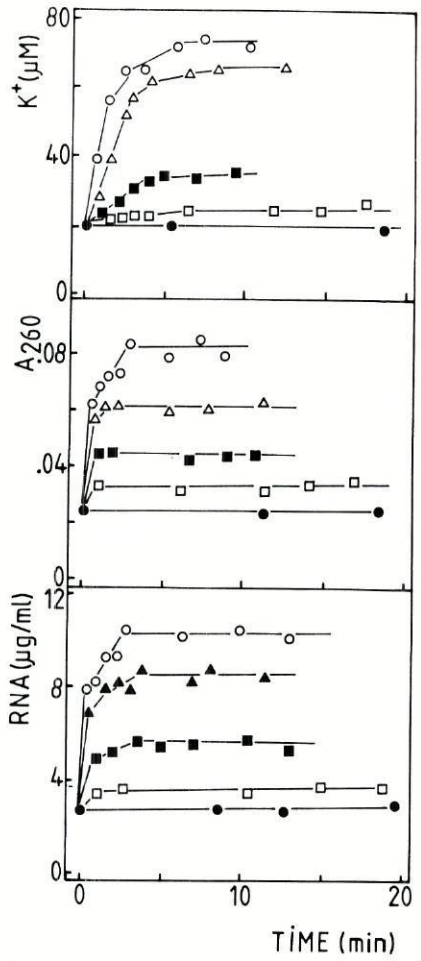


FIG. 1. Time course of leakage of potassium, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules in *P. syringae* cells. The cells were suspended in 10 mM Na^+-DMGA buffer (pH 6.5) and treated with 10 (□), 20 (■), 30 (△), 40 (▲), and 50 (○) μM dodine. Values for controls (●) are also shown. Biochemical determinations were carried out with the supernatants. K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules were assayed as described in the text. The results are from a representative experiment.

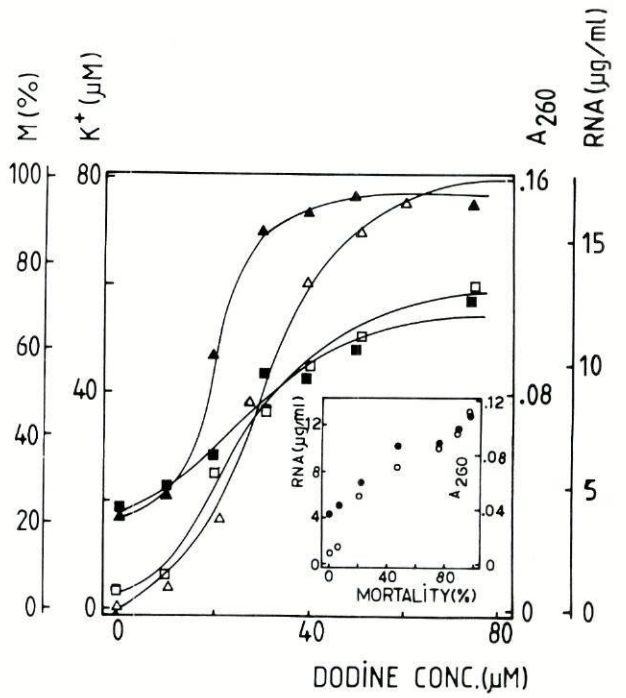


FIG. 2. Mortality (△) and leakage of potassium (▲), UV-absorbing materials (■), and ribose-containing molecules (□) in *P. syringae* cells suspended in distilled water (pH 6.5) and treated with dodine for 15 min. The results of cell viability are from two experiments. Other results are from representative experiments. (Inset) Relationship between the amounts of released UV-absorbing materials (●) and ribose-containing molecules (○) and the percentage of cells killed in *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with dodine for 15 min. Biochemical determinations were carried out with the supernatants. K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules were assayed as described in the text. Cell viability was assessed by plating on nutrient agar.

cate that suspension of *P. syringae* cells in distilled water or Na^+-DMGA buffer did not cause appreciable cell damage. The extent of metabolite release in these media was similar to that in Na^+-PIPES [piperazine-*N*,*N*′-bis(2-ethanesulfonic acid)] buffer, a medium previously used (3–5) to study the action of cupric ions on *P. syringae* cells.

Treatment of *P. syringae* cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer with low concentrations of dodine resulted in a fast leakage of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules (Fig. 1). In both suspending media, after 15 min of dodine treatment, an increase in dodine concentration resulted in an increase in the amounts of leaked K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules (Fig. 2). Comparable levels of release of these metabolites were observed in cells suspended in distilled water and in Na^+-DMGA buffer. In both suspending media, a pronounced efflux of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules was observed with dodine concentrations higher than 30 to 40 μM. With times of exposure to this surfactant of up to 15 min, in the range of concentrations used, no significant number of lysed cells was observed.

Whereas the process of potassium leakage was essentially completed in less than 20 min after the addition of dodine, the efflux of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules continued for at least 8 h. This secondary release of metabolites was a linear function of time. Within the range of 10 to 60 μM dodine, an increase in the surfactant concentration resulted in an increase in the rate of release of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules.

The effect of the fungicide on the viability of *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with dodine concentrations in the range of 10 to 60 μM was evaluated. It was found that treatment of the cells with dodine concentrations higher than 40 μM resulted in a rapid and pronounced decrease in cell viability (Table 1). In *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with 10 to 60 μM dodine for 15 min, the amounts of leaked UV-absorbing materials and ribose-containing molecules were almost directly proportional to the percentage of dead cells (Fig. 2, inset).

DISCUSSION

Untreated *P. syringae* cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer leaked small amounts of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules and re-

TABLE 1. Effect of dodine concentration on *P. syringae* cell viability[a]

Dodine concn (μM)	LT (min)[b]	
	50%	90%
10	2.8×10^3	—[c]
20	3.0×10^3	—
30	2.8×10^1	2.5×10^5
50	1.8×10^{-1}	2.2×10^1
60	1.5×10^{-1}	4.2×10^0

[a] Cells were suspended in distilled water at an initial concentration of approximately 10^9 CFU ml^{-1}. Cell viability was assessed by plating on nutrient agar. The values of the parameters of the formula probit of the percentage of dead cells versus $\log_{10}$ time were determined by iterative weighted-regression analysis (12). The LTs for each dodine concentration were calculated from the regression equation.

[b] LT, Lethal time; 50% and 90%, lethal time for killing of 50 and 90% of the initial population, respectively.

[c] —, Number too big; no biological significance.

mained fully viable, indicating that these suspending media did not cause significant cell stress. It has been reported that some *Rhizobium* strains remained viable and able to nodulate after being stored in water, at room temperature, for 1 year or longer (6). Other authors showed that after 20 or 24 years of storage in distilled water at 10°C, the great majority of the isolates of *Agrobacterium tumefaciens* and fluorescent *Pseudomonas* spp. were still alive, and almost all the isolates of *P. syringae* subsp. *syringae* maintained their ability to produce the toxin syringomycin and were pathogenic to bean seedlings (17). It seems, therefore, that distilled water, although it does not provide a buffered environment, can be used to suspend bacteria (at least certain species) without causing important stress and damage.

Low concentrations of dodine induced rapid leakage of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules from *P. syringae* cells, indicating damage to the cytoplasmic membrane. It has been reported that dodine can disrupt the selective permeability of the cytoplasmic membrane of eucaryotic cells. In fungal cells, dodine induces the loss of ^{32}P (2, 26), P_i (2), amino acids (2), and UV-absorbing materials (2, 26, 27) and increases the permeability of the cytoplasmic membrane to externally added Ni^{2+} (19). In plant cells, dodine induces an efflux of betacyanin and total ions (28). Other cationic amphiphiles (namely, cetyltrimethylammonium bromide, chlorhexidine, and polymyxins) have been reported to cause severe damage to the cytoplasmic membrane in several bacterial species (11, 16, 20, 22).

Treatment of *Escherichia coli* cells with dodecyldiethanolamine causes a rapid leakage of K^+, UV-absorbing materials, ribose- and deoxyribose-containing molecules, and P_i, corresponding to the release of low-molecular-mass metabolites (pool metabolites) (18a). The concentrations of pool metabolites in control (untreated) cell suspensions of *P. syringae* in Na^+-DMGA buffer were determined as described in Materials and Methods and found to be 80 μM K^+, an A_{260} of 0.16, and 16 μg of RNA ml^{-1}. If the rapid initial release of K^+, UV-absorbing materials, and ribose-containing molecules from *P. syringae* cells treated with dodine corresponds to the leakage of pool metabolites, then the results presented in this study indicate that treatment of *P. syringae* cells with dodine concentrations in the range of 40 to 75 μM for 15 min resulted in the release of the great majority of the intracellular K^+ ions and of a significant fraction of the pool of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules. These results, therefore, suggest that the damage to the cytoplasmic membrane of *P. syringae* cells caused by dodine concentrations higher than 40 μM was gross and extensive.

It has been reported that leakage of UV-absorbing materials and of ribose-containing molecules induced by cationic amphiphiles in bacteria is usually a biphasic process: after a rapid efflux caused by the loss of the selective permeability of the cytoplasmic membrane, there is a slow leakage at an approximately constant rate (15, 16, 20). In the present study, a similar secondary release of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules in *P. syringae* cells treated with dodine was observed. In *Pseudomonas aeruginosa* cells treated with polymyxin, the secondary leakage of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules is a consequence of an enzymic degradation of RNA (20). In the present study, it was shown that *P. syringae* cells treated with dodine release UV-absorbing materials and ribose-containing molecules at a constant rate and that the amount of leaked metabolites usually exceeds the pool concentration. These results suggest that the secondary release of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules in *P. syringae* cells treated with dodine is probably also a direct consequence of an enzymic degradation of RNA. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

Low concentrations of dodine were bactericidal to *P. syringae* cells. In other bacterial species, similar high bactericidal activity of dodine has been reported. The growth (expressed in cell mass) of *Rhizobium trifolii* in a liquid culture in the presence of 10- and 50-ppm dodine (approximately 35 and 175 μM) was 17 and 4%, respectively, of the control growth. Growth on the surface of a solid medium was completely arrested in the presence of 50-ppm dodine (13). Paper disks soaked in a 50-ppm dodine solution caused a detectable inhibition zone in a medium previously inoculated with *Rhizobium japonicum* (29).

Dodine concentrations that in this study induced massive leakage of potassium and low-molecular-mass compounds also caused pronounced cell death. The amount of leaked UV-absorbing materials and ribose-containing molecules was proportional to the percentage of cells killed. These results suggest that membrane damage caused by dodine was implicated in the death of *P. syringae* cells. In a study of the mode of action of cetyltrimethylammonium bromide in several bacterial species, it has also been concluded that membrane damage was directly implicated in cell death (22). In several gram-negative bacteria, it was shown that, after 20 min of treatment with polymyxin E, the amount of UV-absorbing materials (at A_{260}) released from the cells was proportional to the percentage of cells killed (11), also suggesting that damage to the cytoplasmic membrane was involved in the death of the cells.

ACKNOWLEDGMENTS

I am especially indebted to A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London, England) and M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental) for guidance and helpful discussions.

This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/CEN/67-90).

REFERENCES

1. **Bradbury, J. F.** 1986. Guide to plant pathogenic bacteria. CAB International Mycological Institute, Kew, England.
2. **Brown, I. F., and H. D. Sisler.** 1960. Mechanisms of fungitoxic action of *n*-dodecylguanidine acetate. Phytopathology **50**:830–839.

3. **Cabral, J. P. S.** 1989. Induction of potassium efflux by cupric ions in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 and its correlation with cell viability. Microbios **60**:141–150.
4. **Cabral, J. P. S.** 1990. Cupric ions induce both an efflux of potassium and low molecular mass metabolites in *Pseudomonas syringae*. FEMS Microbiol. Lett. **72**:109–112.
5. **Cabral, J. P. S.** 1990. Plasmolysis induced by very low concentrations of Cu^{2+} in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271, and its relation with cation fluxes. J. Gen. Microbiol. **136**:2481–2487.
6. **Crist, D. K., R. E. Wyza, K. K. Mills, W. D. Bauer, and W. R. Evans.** 1984. Preservation of *Rhizobium* viability and symbiotic infectivity by suspension in water. Appl. Environ. Microbiol. **47**:895–900.
7. **Davies, R. G.** 1971. Computer programming in quantitative biology. Academic Press, Inc. (London), Ltd., London.
8. **De Waard, M. A., and J. G. M. Van Nistelrooy.** 1983. Negatively correlated cross-resistance to dodine in fenarimol-resistant isolates of various fungi. Neth. J. Plant Pathol. **89**:67–73.
9. **Diener, U. L., and C. C. Carlton.** 1960. Dodine-captan combination controls bacterial spot of peach. Plant Dis. Rep. **44**:136–138.
10. **Eisensmith, S. P., and A. L. Jones.** 1981. Infection model for timing fungicide applications to control cherry leaf spot. Plant Dis. **65**:955–958.
11. **Few, A. V., and J. H. Schulman.** 1953. The absorption of polymyxin E by bacteria and bacterial cell walls and its bactericidal action. J. Gen. Microbiol. **9**:454–466.
12. **Finney, D. J.** 1952. Probit analysis. Cambridge University Press, Cambridge.
13. **Fisher, D. J.** 1976. Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. Pestic. Sci. **7**:10–18.
14. **Hewlett, P. S., and R. L. Plackett.** 1979. The interpretation of quantal responses in biology. Edward Arnold, London.
15. **Hugo, W. B., and M. Frier.** 1969. Mode of action of the antibacterial compound dequalinium acetate. Appl. Microbiol. **17**:118–127.
16. **Hugo, W. B., and A. R. Longworth.** 1964. Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. J. Pharm. Pharmacol. **16**:655–662.
17. **Iacobellis, N. S., and J. E. DeVay.** 1986. Long-term storage of plant-pathogenic bacteria in sterile distilled water. Appl. Environ. Microbiol. **52**:388–389.
18. **Jagnow, G., O. Heinemeyer, and S. Draeger.** 1979. Choice of liquid, semisolid, or soil suspension media: an important factor modifying the effect of pesticides on the nitrogenase (C_2H_2) activity of *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum*, and *Spirillum lipoferum* Beijerinck. Ecotoxicol. Environ. Saf. **3**:152–158.

18a. **Lambert, P. A.** 1974. Ph.D. thesis. Thames Polytechnic, London.

19. **Miller, R. W., and L. R. Barran.** 1977. The effect of ionic surface-active agents on macroconidial plasma membrane of *Fusarium sulphureum*. Can. J. Microbiol. **23**:1373–1383.
20. **Newton, B. A.** 1956. The properties and mode of action of the polymyxins. Bacteriol. Rev. **20**:14–27.
21. **Ray, S., and S. K. Addy.** 1976. Residue levels of dodine in relation to canker development in citrus trees. Indian Phytopathol. **29**:246–250.
22. **Salton, M. R. J.** 1951. The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. J. Gen. Microbiol. **5**:391–404.
23. **Schwabe, W. F. S.** 1980. Greenhouse evaluation of fungicides for apple scab control. Phytophylactica **12**:195–197.
24. **Schwabe, W. F. S.** 1980. Curative activity of fungicides against apple scab leaf infections by *Venturia inaequalis*. Phytophylactica **12**:199–207.
25. **Schwabe, W. F. S.** 1980. Prevention of storage scab of apples. Phytophylactica **12**:209–221.
26. **Solel, Z., and M. R. Siegel.** 1984. Effect of the fungicides guazatine and dodine on growth and metabolism of *Ustilago maydis*. Z. Pflanzenkr. Pflanzenschutz **91**:273–285.
27. **Somers, E.** 1963. The uptake of dodine acetate by *Neurospora crassa*. Meded. Landbouwhogesch. Opzoekingsstn. Staat Gent **28**:580–589.
28. **Srivastava, S., and T. A. Smith.** 1982. The effect of some oligo-amines and -guanidines on membrane permeability in higher plants. Phytochemistry **21**:997–1008.
29. **Tu, C. M.** 1980. Effect of fungicides on growth of *Rhizobium japonicum in vitro*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. **25**:364–368.
30. **Worthing, C. R. (ed.).** 1979. The pesticide manual. A world compendium. The British Crop Protection Council.
31. **Yoder, K. S., and E. J. Klos.** 1976. Tolerance to dodine in *Venturia inaequalis*. Phytopathology **66**:918–923.

TRABALHO V

MODE OF ANTIBACTERIAL ACTION OF DODINE (DODECYLGUANIDINIUM ACETATE) IN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* *).

SUMMARY

Treatment of *Pseudomonas syringae* cells with 50 μM N-dodecylguanidine acetate (dodine) resulted in the rapid degradation and release of RNA and cell lysis. Higher concentrations resulted in a progressive decrease in the intensity of these responses, and the appearance of extensive zones of coagulated cytoplasm, indicating that the decrease in RNA degradation probably resulted from an inhibition of the RNases, due to protein denaturation. Dodine also induced expansion of the outer membrane with the formation of protuberances and intracellular myelin-like structures, which were already evident after 1 min of treatment. This indicates that dodine is able to cross the outer and cytoplasmic membranes rather rapidly, and to form, alone or in combination with cell phospholipids and proteins, considerable amounts of triple-layered profiles.

In *P. syringae* cells, saturation levels of dodine (approximately 25 % of cell dry weight) corresponded to more than five times the amount needed to form a close-packed monolayer of dodine on the cell surface. The different membranous structures formed in dodine-treated cells, and the coagulation of the cytoplasm, seem to be responsible for the uptake of such high amounts of dodine. The uptake isotherm was of the type S, indicating cooperative binding, which could be due to the binding of micelles to the cells and to cytoplasmic proteins, and to the formation of intracellular myelin-like structures. Increasing time of exposure to dodine from 5 to 300 min only slightly decreased the Lethal Doses for 25, 50 and 90 % kill, suggesting that cell death was a rapid event. The present results suggest, in agreement with a previous hypothesis, that the main cause of death of *P. syringae* cells treated with dodine is membrane damage and not secondary alterations in the cells (ribosome degradation, cell lysis and cytoplasm coagulation).

The results presented in this and previous reports indicate that the antibacterial activity of dodine on *P. syringae* is mainly the result of the action of micelles of the surfactant.

---

*) Trabalho submetido para publicação.

INTRODUCTION

Pseudomonas syringae van Hall is one of the most important plant pathogens, causing disease in many plant species (Bradbury, 1986).

Dodine (*n*-dodecylguanidinium acetate) was introduced in 1956 by the American Cyanamid Company as a protective fungicide, under the comercial name of «Cyprex» (Worthing, 1979). Dodine is an effective fungicide against apple scab caused by *Venturia spp.* (Schwabe, 1980a, 1980b, 1980c) and cherry leaf spot caused by *Coccomyces hiemalis* (Eisensmith & Jones, 1981), and has also been used with sucess to control several bacterial plant diseases (Diener & Carlton, 1960; Ray & Addy, 1976). It is a soluble amphiphile (surfactant) consisting of a hydrophobic apolar group (C_{12} hydrocarbon chain) and a positively charged hydrophilic polar head group (guanidine).

Dodine severely affects the metabolism of fungal cells: it inhibits growth (Brown & Sisler, 1960; Yoder & Klos, 1976; De Waard & Van Nistelrooy, 1983; Solel & Siegel, 1984) and the respiration on glucose and acetate (Brown & Sisler, 1960; Solel & Siegel, 1984); it reduces the active transport of ^{32}P, ^{14}C-glucose, ^{14}C-acetate and ^{14}C-L-phenylalanine (Brown & Sisler, 1960; Miller & Barran, 1977; Solel & Siegel, 1984); and it induces loss of ^{32}P (Brown & Sisler, 1960; Solel & Siegel, 1984), P_i (Brown & Sisler, 1960), amino-acids (Brown & Sisler, 1960) and UV-absorbing materials (Brown & Sisler, 1960; Solel & Siegel, 1984). Very few papers have been published on the mode of action of dodine in bacterial cells. Dodine inhibits growth in *Rhizobium* and *Erwinia amylovora* (Zehr, 1968; Fisher, 1976; Tu, 1980), O_2 uptake in *Rhizobium* (Fisher, 1976) and nitrogenase activity of several soil bacteria (Jagnow *et al.*, 1979).

The antimicrobial activity of dodine on the phytopathogenic *Pseudomonas syringae* has been studied (Cabral, 1991). Treatment of the cells with 30 - 40 µM dodine resulted in acute leakage of K^+, UV-absorbing materials and ribose-containing molecules, indicating extensive damage to the cytoplasmic membrane. Futhermore, an increase in dodine concentration resulted in a concomitant increase in the percentage of dead cells and in the amount of leaked pool metabolites, suggesting that membrane damage was implicated in the death of *P. syringae* cells treated with dodine. The aim of the present work was to obtain a better understanding of the mode of action of this fungicide in bacterial cells.

MATERIALS AND METHODS

Reagents. Dodine (analytical grade) was a gift from American Cyanamid Company (USA). Crude dodine was recovered by methanol extraction from a sample of Melprex, a gift from Dr. C. Garrett (Horticultural Research International, East Malling, Maidstone, Kent, England). Both samples were submitted to chemical analysis (Nuclear magnetic resonance and Infra-red spectroscopy; melting point and C-H-N determination) and critical micelle concentration (CMC) determination (Cabral, J. P. S. & Smith, A. R. W., Journal of Interface and Colloid Science, submitted). The results confirmed the high purity of the analytical grade sample, and showed low levels of organic contamination of crude dodine. Depending on the method of determination, the value of the CMC_I of analytical grade dodine was located in the range 16 - 31 µM, and that of crude dodine was 38 µM.

Others chemicals were reagent grade.

Culture and cell suspensions. *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 was grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6.2). At the end of the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in the one of the following media: distilled water (pH 6.5); 10 mM Na^+-DMGA buffer (10 mM dimethylglutaric acid; pH adjusted to 6.5 with NaOH); salts medium (growth medium with yeast extract and glycerol omitted); salts medium with Mg^{2+} omitted. The optical density at 568 nm was adjusted to 1.06, using a model Lambda-3 Perkin-Elmer or a Shimadzu double-beam spectrophotometer with 1 cm light path cuvettes. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10, and the final suspensions had a concentration of approximately 0.28 mg (dry weight of cells) ml^{-1} ($\simeq 10^{8}$ CFU ml^{-1}).

Biochemical determinations.

Sample preparation. Cell suspensions were treated with dodine concentrations ranging from 10 to 210 µM, at room temperature (22.5 ± 0.5 °C) or at 6 °C. At intervals, samples were withdrawn, centrifuged, and the supernantants filtered through a 0.45 µm pore filter (Sartorius). Biochemical determinations were carried out on the filtrates.

UV-absorbing materials were assayed by measuring the absorbance at 260 nm in a model Lambda-3 Perkin-Elmer double beam spectrophotometer with 1 cm light path

quartz cuvettes. Ribose-containing molecules were assayed by the orcinol method (Plummer, 1987, using RNA (sodium salt) from *Torula* (Sigma type II-S) as the standard).

Lethality studies.

Cell viability. Samples were withdrawn from treated suspensions and serially diluted in distilled water prior to plating on nutrient agar (Difco) plates (four replicates). For each sample (0.05 - 0.1 ml) the total volume of diluent was 20 ml, and the total time for dilution and plating approximately 3 min. The colonies were counted after 3 days at room temperature.

Determination of the Lethal Doses for 25, 50 and 90 % killing (LD_{25}, LD_{50} and LD_{90}). Cell viability was evaluated as described above in samples treated for a given time (between 5 and 300 min) with different concentrations of analytical grade dodine. The values of the parameters of the equation, PROBIT of the percentage of dead cells cells *vs.* $\log_{10}$ dodine concentration, were determined using the iterative weighted regression analysis by the maximum likelihood method proposed by Finney (1952). The original computer program of Davies (1971) in Fortran IV was adapted to Mallard Basic (Amsoft, England) and ran in a Amstrad PCW 8256 computer working in single precision. The values of the LDs, for each time of exposure to dodine, were calculated from the regression equation.

Electron Microscopy.

Cell suspensions were treated with dodine concentrations ranging from 10 to 200 µM at room temperature. At intervals, samples were withdrawn and fixed with glutaraldehyde (TAAB, London; final concentration: 2.5 %, v/v, 1 day) - OsO_4 (1 % in veronal acetate buffer [Ryter & Kellenberger, 1958], 1 day) - uranyl acetate (1 % in distilled water, 1 hour). Dehydration was performed by washing the samples in increasingly concentrated aqueous ethanol, followed by four washes in absolute ethanol. Samples were embedded in Epon resin (TAAB, London) with infiltration in propylene oxide. Ultrathin sections were cut, and stained with uranyl acetate followed by lead citrate. Observations were carried out in a Siemens Elmiskop IA electron microscope, working at 80 kV.

Measurement of Dodine uptake.

Cell suspensions were treated with concentrations of crude dodine ranging from 20 to 380 µM, at room temperature. At intervals, samples were withdrawn and

centrifuged. dodine was assayed in the supernatants, using the following procedure, adapted from Scott (1968). To the supernatant (20 ml) was added 1 ml of 1 M sodium acetate/acetic acid buffer (pH 5.6), 1 ml absolute ethanol and 3 ml aqueous solution of Orange II (0.05 %, w/v). The complex dodine-dye was extracted with chloroform (total volume 15 ml), and showed, as predicted by Scott (1968), an absorbance maximum at 485 nm. In the range 30 - 240 µg dodine, a very good correlation ($r = 0.999$; $n=8$) was found between the $A_{485}^{1\ cm}$ and dodine concentration.

Octanol-water partition coefficient.

Portions (3.5 or 5 ml) of a 0.522 mM solution of dodine in distilled water or 0.1 M Na acetate/acetic acid, pH 4.5, were shaken with equal volumes of octan-1-ol in sealed tubes for 48 h at room temperature. The tubes were then centrifuged to break the emulsion and the concentration of dodine in the aqueous phase was determined by the method described above. The concentration in the octanol phase was calculated by difference.

Measurement of cellular and molecular dimensions.

The average dimensions of *P. syringae* cells were determined using the following procedure. Fresh cell suspensions were observed by light microscopy, with 1 000 × magnification. 100 - 180 cells chosen at random were photographed on Kodak Panatomic-X film, and the negatives enlarged to give a final magnification of 6 000 - 7 500 ×. A stage micrometer, photographed in identical conditions as the cells, was used to calculate the exact magnification. The form of *P. syringae* cells were considered to be a straight cylinder surmounted at each end by hemispheres. The use of light microscopy was preferred to the use of electron micrographs, since chemical fixation and dehydration can cause a profond alteration in the shape and dimensions of the cells (Tooze, 1964; Penttila *et al.*, 1974).

The dimensions of dodine molecule were determined by constructing a scale model from the Dreiding Molecular Model Kit (Koch-Light).

RESULTS.

Ultrastructural alterations.

No significant difference was found between the ultrastructural alterations induced by analytical grade and crude dodine in cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer. However, ultrastructural changes induced by this surfactant were strongly dependent on concentration. Whereas treatment of the cells with dodine concentrations up to 20 µM for several hours resulted in no significant structural alteration, higher concentrations caused pronounced cell damage.

P. syringae cells suspended in distilled water and treated with 50 µM dodine exhibited the following ultrastructural changes. After 1 min of treatment (Fig. 2), the most prominent feature was the presence of numerous blebs in the outer membrane (Fig. 2 a). In the extracellular space, numerous spherical particles were present, bounded by a triple-layered membrane, containing no electron-dense material and sometimes of considerable size (Fig. 2 b). Some cells showed expansions of the outer membrane (Fig. 2 b), and some presented incipient intracellular myelin-like structures, composed of concentrically arranged triple-layered membranes. Some ribosomes were disorganized (Fig. 2 b). After 1 h of treatment (Fig. 3), some cells were almost totally devoid of cytoplasmic content. Myelin-like structures were now prominent. After 6 h of treatment, ribosomal disorganization was extensive, and the number of empty cells was much higher than after 1 hour of treatment.

Treatment with 100 µM dodine resulted in a substantially different pattern of structural changes. After 1 min of treatment (Fig. 4), numerous blebs were present on the cell surface, some with a layered content. Some cells showed disorganized ribosomes. Myelin-like structures were observed in the cytoplasm. While cell lysis was already evident after 1 h of treatment with 50 µM dodine (Fig. 3), this phenomenon was not detectable in cells treated with 100 µM dodine for an identical period of time (Fig. 5). Instead, regions of coagulated cytoplasm could be observed. Whereas with 50 µM dodine, the number of empty cells sharply increased with increasing time of exposure to the fungicide, with 100 µM dodine no such trend was observed; instead, after 6 h of treatment with this concentration, cells showed extensive coagulation of the cytoplasm.

The short-term interaction between dodine and *P. syringae* cells, and the effects of high dodine concentrations, were studied in greater detail using cell

suspensions in salts medium. The different types of membranous structures observed in cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer were also seen, at similar dodine concentrations in these cells. After 1 min of treatment with 170 µM dodine, cells showed prominent expansions of the outer membrane (Fig. 6). In some cells, the cytoplasmic membrane appeared fractured and holed, and some regions seemed to have been solubilized. This effect is clearly seen in Fig. 6, where the solubilization of the cytoplasmic membrane has allowed the ribosomes to migrate into the periplasmic space. After 10 min of treatment, cells showed intracellular myelin-like structures. After 30 minutes' contact, there was an increase in the dimensions of the myelin-like intracellular bodies, and in the extent of the solubilization of the cytoplasmic membrane (Fig. 7). Whereas in cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer, dodine caused rapid alterations in the structure of the ribosomes (Fig. 2 b), in cells suspended in salts medium, most of the ribosomes remained intact after 30 minutes' treatment (Fig. 7). If *P. syringae* cells were suspended in salts medium without Mg^{2+}, treatment with dodine resulted in a substantially different pattern of structural alterations. After 1 minutes' treatment with 170 µM-dodine (Fig. 8), many ribosomes were already disorganized. Cells showed regions of coagulated cytoplasm, intracellular myelin-like structures, and large superficial blebs, with a layered content. The cytoplasmic membrane was extensively solubilized, and the outer membrane fractured (Fig. 8, inset).

Biochemical alterations.

If dodine induced a disorganization of the ribosomes, there should be a loss of RNA from the cells. Treatment of *P. syringae* cells with dodine indeed resulted in a steady efflux of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules for at least 8 h (Cabral, 1991). This leakage could correspond to the release of pool metabolites, but this explanation seemed very unlikely, since the concentration of pool metabolites in control (untreated) cell suspensions of *P. syringae* was 0.16 $A_{260\ nm}$ and 16 µg RNA ml^{-1} (Cabral, 1990), and after 3 - 4 h of treatment with dodine concentrations greater than 40 µM, the concentration of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules in the supernatants was already higher than these values, and continued to increase at a constant rate for at least 4 - 5 hours more (data not shown).

If the process of ribosome breakdown occurred in a narrow range of dodine concentrations, the rate of release of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules should be strongly dependent on surfactant concentration. If the rates

were plotted as function of dodine concentration (Figs 9 and 10), similar bell-shaped curves, with maxima near 50 µM dodine, were indeed obtained. Therefore, as expected, dodine concentrations that induced the fastest rates of efflux corresponded to those that induced the rapid degradation of the ribosomes as observed by electron microscopy. Higher dodine concentrations caused lower rates of efflux and of ribosome degradation, and induced cytoplasmic coagulation.

Analytical grade and crude dodine induced similar rates of efflux of UV-absorbing materials. Leakage of ribose-containing molecules was slightly higher with analytical grade than with crude dodine. With high dodine concentrations, both processes were more pronounced in cells suspended in Na^+-DMGA buffer than in cells in distilled water (Figs 9 and 10). If dodine treatment was carried out at 6 ° C, instead of 22.5 ° C, the rate of efflux of UV-absorbing materials induced by dodine treatment was not significant, even with the most effective dose (Fig. 9).

Bactericidal activity.

Lethal Doses decreased only slightly with increasing exposure time (Table 1). Killing of 90 % of the initial population was achieved by treating the cells with dodine concentrations higher than 45 µM. For 50 % kill, the concentration required was greater than 25 µM, and lower dodine concentrations exhibited very low bactericidal activity. When the PROBIT of mortality was plotted against log dodine concentration, for all times of exposure to the surfactant the data could be fitted to two straight lines, with a break point between 25 and 30 µM dodine (Fig. 11 and data not shown). Drug concentrations that induced small decreases in viability (≤ 20 µM) were the same as those that caused no appreciable ultrastructural and biochemical alterations.

Binding experiments.

The uptake of dodine was studied in cells suspended in distilled water. No significant difference was found between the amount of dodine bound after 10 min and after several hours' contact with the surfactant, therefore for measurements of equilibrium uptake, the bacteria were routinely removed from suspension after 15 minutes' treatment.

Closely similar results were obtained in three separate experiments (Fig. 12). Over the range 20 - 400 µM dodine, the uptake isotherm (Fig. 12 b) followed the S-type adsorption pattern described by Giles *et al.* (1960). In all these experiments, the first part of the isotherm was slightly convex. Saturation uptake occurred with initial concentrations of dodine much higher than those that caused death and cell damage, indicating that the antibacterial activity of this surfactant was not associated with high levels of uptake. Whereas dodine uptake was a rapid process, being essentially completed in the minutes following contact between the cells and the surfactant, cell lysis and the coagulation of the cytoplasm progressed for several hours, indicating that these processes did not depend on further drug uptake.

Estimate of the amount of dodine necessary to form a closely packed monolayer on the surface of *P. syringae* cells.

The mean cell surface of *P. syringae* cells was estimated to be 10 μm^2, and the average cross-sectional area of the guanidino head group of dodine molecule, as 0.361 nm^2. Assuming that a monolayer is formed by close packing of dodine molecules, and that the head group is attached to the surface with the alkyl chain projecting at right angles, in the extended state, the estimate number of dodine molecules in the monolayer is 2.8×10^7, which corresponds to 0.17 µmol dodine (mg dry weight)$^{-1}$. Saturation of *P. syringae* cells occurred with 0.87 µmol dodine (mg dry wt.)$^{-1}$.

Octanol-water partition coefficients.

Log_{10} P (log_{10} of the octanol-water partition coefficient) of dodine was 1.5 (n=2; CV=12 %), and that of octanol-buffer, 1.96 (n=2; CV=3.2 %).

DISCUSSION

Treatment of *P. syringae* cells with 50 µM dodine resulted in a progressive decrease in the number of ribosomes, and a pronounced efflux of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules, suggesting that the drug induced a time-dependent degradation of RNA. This phenomenon has been described in *Escherichia coli* cells treated with cetyltrimethylammonium bromide (CTAB) or chlorhexidine (Salton, 1951; Hugo & Longworth, 1964a). The fact that the amount of leaked UV-absorbing materials and ribose-containing molecules far exceeded the pool concentration, and the fact that the efflux of these metabolites was linear over time, lasting for many hours, and was virtually nonexistent at low temperatures, strongly suggests that the ribosomal degradation induced by dodine was RNase-mediated. The disorganization of the ribosomes was significantly lower in cells suspended in salts medium rather than in distilled water or Na^+-DMGA buffer. Since the exclusion of Mg^{2+} from the salts medium resulted in the rapid disorganization of the ribosomes, the good preservation of these structures in cells suspended in salts medium seems to a consequence of the presence of Mg^{2+}. This effect could be due to the known stabilizing effect of Mg^{2+} on ribosome structure (McCarthy, 1962; Kelley & Schaechter, 1968), or to the prevention of dodine uptake by Mg^{2+}.

Maximum release of UV-absorbing materials and of ribose-containing molecules, and ribosome degradation, occurred with treatment with 50 µM dodine; at higher concentrations these processes were progressively suppressed. Treatment of *P. syringae* cells with 100 µM dodine resulted in extensive coagulation of the cytoplasm, suggesting that the decrease in ribosomal degradation was probably due to denaturation of RNase(s). A similar phenomenon was described in *E. coli* cells treated with chlorhexidine (Hugo & Longworth, 1964a, 1964b, 1965 and 1966).

In addition to cell lysis and cytoplasm coagulation, dodine induced the formation of several types of novel membranous structures: extracellular empty spherical bodies, blebs and expansions of the outer membrane, and intracellular myelin-like structures, which were already evident in samples fixed only 1 min after the addition of dodine. These structures were not, therefore, formed by newly synthesized molecules of phospholipids, but were probably composed, partially or totally, of dodine. Miller & Barran (1977) reported the formation of myelin-like structures and membrane expansions in dodine-treated fungal cells. In bacterial cells treated with chlorhexidine, the appearance of surface protuberances has been reported (Hugo & Longworth, 1964; Davies *et al.*, 1968), and the electron micrographs

presented by Davies *et al.* (1968) suggested the existence of intracellular myelin-like structures and membrane expansions, although not described by the authors.

The abundance and diversity of the membranous structures formed in dodine-treated cells suggests that the characteristics of this drug molecule, namely its structure, shape and charge, are particularly suitable for the formation of triple-layer membranes. The buildup of these structures in the cytoplasm was very fast, indicating that dodine molecules can cross the outer and cytoplasmic membranes rather rapidly. These results therefore suggest that the hydrophobic-hydrophilic balance of this molecule is particularly suitable both for the formation of artificial bilayers and for easy migration through natural ones. The hydrophobicity of a molecule can be quantified by the determination of the octanol-water partition coefficient. Hansch & Lien (1971) reported the value of Log_{10} P = 1.15 for dodine, but since the material and procedure used by these authors were not specified, it was decided to perform a further determination. The value found (Log_{10} P = 1.5), comparable with that reported by Hansh & Lien (1971), indicates that the dodine molecule is indeed moderately hydrophobic, and supports the above interpretation of the affinity of dodine for membranes.

It has been recently proposed that a short treatment of *P. syringae* cells with medium or high concentrations of dodine results in extensive damage to the cytoplasmic membrane (Cabral, 1991). Electron micrographs presented here clearly support this hypothesis, by demonstrating that dodine can cause fractures and solubilization of the cytoplasmic membrane.

The binding of dodine was a fast phenomenon, being essentially completed in minutes after the initial contact between cells and the surfactant. Similar results have been reported in fungal cells (Brown & Sisler, 1960; Somers, 1963; Somers & Pring, 1966; Miller & Barran, 1977). Saturation of *P. syringae* cells occurred with 0.87 µmol dodine (mg dry wt.)$^{-1}$, which corresponds to a dodine content of approximately 25 % of the cell dry weight. Similar uptake was found in fungus spores (Somers & Pring, 1966). The uptake isotherm of dodine by *P. syringae* cells was of the S type in the classification system of Giles *et al.* (1960). This isotherm is believed to represent cooperative uptake, indicating that molecules absorbed initially facilitate the binding of further molecules. Cooperative binding of cationic amphiphiles to proteins has frequently been reported in the literature (see Tanford, 1980). This type of uptake can be due to the binding of micelles; or it can accompany protein denaturation (Tanford, 1968; Tanford, 1980). In *P. syringae* cells, cooperative uptake occurred at concentrations higher than the critical

micelle concentration for dodine (see Materials and Methods), and also at concentrations that induced cytoplasm coagulation, indicating that this phenomenon was probably due to binding of micelles to the cells and accompanied by the denaturation of cytoplasmic proteins. At the same concentrations, the intracellular myelin-like structures were also formed. The formation of these structures probably also represents a highly cooperative event. The uptake of dodine by fungus conidia was studied by Somers & Pring (1966), who found it to be of the Langmuirian type. However, in the study of Somers & Pring, the first phase of the isotherm was not examined in great detail, and their results do not exclude the possibility of the existence of cooperative binding in the first phase.

There has been some discussion as to whether cationic amphiphiles form a monolayer on the surface of the bacterial cell. In *E. coli*, Salton (1951) and Hugo & Longworth (1964a) showed that, at saturation, the number of CTAB or chlorhexidine molecules bound were in far excess of those needed to form a closely-packed monomolecular layer. These results led Salton (1951) to suggest that CTAB molecules were adsorbed at sites additional to those available at the cell surface, and Hugo & Longworth (1964a) proposed that chlorhexidine molecules could either form multilayers or bind to cytoplasmic constituents. In *P. syringae* cells, saturation levels of dodine (0.87 µmol (mg dry wt.)$^{-1}$), corresponded to more than five times the amount needed to form a closely packed monolayer (0.17 µmol (mg dry wt.)$^{-1}$), indicating that the uptake at saturation could not be accounted for solely on the basis of monolayer formation on the cell surface. Instead, as anticipated by Salton (1951) and Hugo & Longworth (1964a), the different abnormal membranous structures (blebs, membrane expansions and myelin-like structures) formed in dodine treated cells, and cytoplasm coagulation, seem to account for the high amounts of dodine bound.

It has been recently shown (Cabral, 1991) that brief treatment of *P. syringae* cells with dodine concentrations higher than 30 - 40 µM results in massive leakage of K^+ and low molecular mass compounds (pool metabolites) and rapid cell death. With increasing dodine concentration, there was a concomitant increase in the percentage of dead cells and in the amount of leaked pool metabolites, which led to the suggestion that membrane damage could have been implicated in the death of *P. syringae* cells treated with dodine. In the present study, the LDs decreased only slightly between 5 and 300 minutes' exposure to dodine, suggesting that cell death was rapid. The LD_{90} at 5 min was slightly higher than 50 µM dodine, which caused no significant ribosome degradation and no cytoplasmic coagulation. The secondary

cell damage caused by dodine was not therefore the main cause of cell death. Since dodine-induced death appears to occur mainly within minutes of adding the surfactant, the results presented here are consistent with the hypothesis presented previously, that membrane damage was the primary cause of death in dodine-treated cells.

The results presented here and earlier (Cabral, 1991) show that the antibacterial activity of dodine exhibits a clear-cut threshold concentration (approx. 25 μM) that must be exceeded before the drug can cause significant ultrastructural alterations, membrane damage, leakage of pool metabolites, RNA degradation and cell death. Interestingly, this concentration corresponds to the critical micelle concentration of dodine (see Materials and Methods), which suggests that the micelles are the main agent of the antibacterial activity of dodine. In contrast, other cationic surfactants (dodecyldiethanolamine, C_{12}-C_{18}-benzyldimethyl-ammonium chlorides), show the highest bactericidal activity below the CMC (Lambert & Smith, 1977; Tomlinson *et al.*, 1977), which implies that the antimicrobial activity of these compounds is mediated by molecules in free solution.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am especially indebted to Dr. M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto) and Dr. A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London) for guidance and helpful discussions. This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/C/CEN/67-90).

REFERENCES

BRADBURY, J. F. (1986). Guide to plant pathogenic bacteria. Kew. CAB International Mycological Institute.

BROWN, I. F. & SISLER, H. D. (1960). Mechanisms of fungitoxic action of n-dodecylguanidine acetate. *Phytopathology* **50**, 830-839.

CABRAL, J. P. S. (1990). Cupric ions induce both an efflux of potassium and low molecular mass metabolites in *Pseudomonas syringae*. *FEMS Microbiology Letters* **72**, 109-112.

CABRAL, J. P. S. (1991). Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 341-344.

DAVIES, A., BENTLEY, M. & FIELD, B. S. (1968). Comparison of the action of vantocil, cetrimide and chlorhexidine on *Escherichia coli* and its spheroplasts and the

protoplasts of Gram positive bacteria. *Journal of Applied Bacteriology* **31**, 448-461.
DAVIES, R. G. (1971). Computer programming in quantitative biology. Ch 14. London & New York. Academic Press.
DE WAARD, M. A. & VAN NISTELROOY, J. G. M. (1983). Negatively correlated cross-resistence to dodine in fenarimol-resistant isolates of various fungi. *Netherlands Journal of Plant Pathology* **89**, 67-73.
DIENER, U. L. & CARLTON, C. C. (1960). Dodine-captan combination controls bacterial spot of peach. *Plant Disease Reporter* **44**, 136-138.
EISENSMITH, S. P. & JONES, A. L. (1981). Infection model for timing fungicide applications to control cherry leaf spot. *Plant Disease* **65**, 955-958.
FINNEY, D. J. (1952). Probit analysis. Cambridge. Cambridge University Press.
FISHER, D. J. (1976). Effects of some fungicides on *Rhizobium trifolii* and its symbiotic relationship with white clover. *Pesticide Science* **7**, 10-18.
GILES, C. H., MacEWAN, T. H., NAKHWA, S. N. & SMITH, D. (1960). Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution adsorption isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *Journal of the Chemical Society*, 3973-3993.
HANSCH, C. & LIEN, E. J. (1971). Structure-activity relationships in antifungal agents. A survey. *Journal of Medical Chemistry* **14**, 653-670.
HUGO, W. R. & LONGWORTH, A. R. (1964a). Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 655-662.
HUGO, W. R. & LONGWORTH, A. R. (1964b). Effect of chlorhexidine diacetate on "protoplasts" and spheroplasts of *Escherichia coli*, protoplasts of *Bacillus megaterium* and the Gram staining reaction of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 751-758.
HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. (1965). Cytological aspects of the mode of action of chlorhexidine diacetate. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **17**, 28-32.
HUGO, W. B. & LONGWORTH, A. R. (1966). The effect of chlorhexidine on the electrophoretic mobility, cytoplasmic constituents, dehydrogenase activity and cell walls of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **18**, 569-578.
JAGNOW, G., HEINEMEYER, O. & DRAEGER, S. (1979). Choice of liquid, semisolid, or soil suspension media: an important factor modifying the effect of pesticides on the nitrogenase (C_2H_2) activity of *Clostridium pasteurianum*, *Azotobacter chroococcum*, and *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Ecotoxicology and Environmental Safety* **3**, 152-158.
KELLEY, W. S. & SCHAECHTER, M. (1968). The "life cycle" of bacterial ribosomes. *Advances in Microbial Physiology* **2**, 89-142.
LAMBERT, P. A. & SMITH, A. R. W. (1977). The mode of action of N-(*n*-dodecyl)diethanolamine with particular reference to the effect of protonation on uptake by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **103**, 367-374.
McCARTHY, B. J. (1962). The effects of magnesium starvation on the ribosome content of *Escherichia coli*. *Biochimica et Biophysica Acta* **55**, 880-888.
MILLER, R. W. & BARRAN, L. R. (1977) The effect of ionic surface-active agents on macroconidial plasma membrane of *Fusarium sulphureum*. *Canadian Journal of Microbiology* **23**, 1373-1383.
PENTTILA, A., KALIMO, H. & TRUMP, B. F. (1974). Influence of glutaraldehyde and/or osmium tetroxide on cell volume, ion content, mechanical stability, and membrane permeability of Ehrlich ascites tumor cells. *Journal of Cell Biology* **63**, 197-214.
PLUMMER, D. T. (1987). An introduction to practical biochemistry. London. McGraw-Hill Book Company.
RAY, S. & ADDY, S. K. (1976). Residue levels of dodine in relation to canker development in citrus trees. *Indian Phytopathology* **29**, 246-250.
RYTER, A. & KELLENBERGER, E. (1958). Étude au microscope électronique de plasmas contenant de l'acide désoxyribonucléique. I. Les nucléoides des bactéries en

croissance active. *Zeitschrift für Naturforschung* **13B**, 597-605.
SALTON, M. R. J. (1951). The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology* **5**, 391-404.
SCHWABE, W. F. S. (1980a). Greenhouse evaluation of fungicides for apple scab control. *Phytophylactica* **12**, 195-197.
SCHWABE, W. F. S. (1980b). Curative activity of fungicides against apple scab leaf infections by *Venturia inaequalis*. *Phytophylactica* **12**, 199-207.
SCHWABE, W. F. S. (1980c). Prevention of storage scab of apples. *Phytophylactica* **12**, 209-211.
SCOTT, G. V. (1968). Spectrophotometric determination of cationic surfactants with Orange II. *Analytical Chemistry* **40**, 768-772.
SOLEL, Z. & SIEGEL, M. R. (1984). Effect of the fungicides guazatine and dodine on growth and metabolism of *Ustilago maydis*. *Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschütz* **91**, 273-285.
SOMERS, E. (1963). The uptake of dodine acetate by *Neurospora crassa*. *Mededelingen Landbouwhogeschool Opzoekingssta Staat Gent* **28**, 580-589.
SOMERS, E. & PRING, R. J. (1966). Uptake and binding of dodine acetate by fungal spores. *Annals of Applied Biology* **58**, 457-466.
TANFORD, C. (1968). Protein denaturation. *Advances in Protein Chemistry* **23**, 121-282.
TANFORD, C. (1980). The hydrophobic effect: formation of micelles and biological membranes. 2nd. ed. New York. John Wiley & Sons.
TOMLINSON, E., BROWN, M. R. W. & DAVIES, S. S. (1977). Effect of colloidal association on the measured activity of alkylbenzyldimethylammonium chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Chemistry* **20**, 1277-1282.
TOOZE, J. (1964). Measurements of some cellular changes during the fixation of amphibian erythrocytes with osmium tetroxide solutions. *Journal of Cell Biology* **22**, 551-563.
TU, C. M. (1980). Effect of fungicides on growth of *Rhizobium japonicum in vitro*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* **25**, 364-368.
WORTHING, C. R. Ed. (1979). The pesticide manual. A world compendium. The British Crop Protection Council.
YODER, K. S. & KLOS, E. J. (1976). Tolerance to dodine in *Venturia inaequalis*. *Phytopathology* **66**, 918-923.
ZEHR, E. I. (1968). Selected organic fungicides and dimethyl sulfoxide as supplements to streptomycin for fire blight control on Bartlett pear. *Phytopathology* **58**, 1624-1629.

TABLE 1

Lethal Doses for killing 25, 50 and 90 % (LD_{25}, LD_{50}, LD_{90}) of the initial population of *Pseudomonas syringae* cells suspended in distilled water and treated with dodine (analytical grade)*.

Time of exposure (min)	LD_{25} (μM)	LD_{50} (μM)	LD_{90} (μM)
5	21	29	56
30	21	29	49
60	20	26	46
90	17	24	49
120	24	29	44
300	24	29	42

---

* The initial concentration was approximately 10^9 CFU ml^{-1}. Number of determinations per dodine concentration: 1 - 2. Viability was assessed by plating on nutrient agar. The parameters of the equation Probit (% of dead cells) *vs.* $\log_{10}$ (dodine concentration in μM) were determined by iterative weighted regression analysis (Finney, 1952), using the computational scheme of Davies (1971). The LDs, for each time of exposure to the surfactant, were calculated from the regression equation.

FIGURE 1 Control (untreated) *Pseudomas syringae* cells suspended in distilled water. OM: outer membrane; R: ribosomes. Bar, 0.2 µm.

FIGURE 2 *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with 50 µM dodine (analytical grade) for 1 min.
(a) Numerous blebs (BL) are present on the cell surface.
(b) Spherical empty bodies limited by a triple-layer membrane (SB) are present in the extracellular space. Some cells show expansions of the outer membrane (arrow). Some of the ribosomes are disorganized.
OM: outer membrane; CM: cytoplasmic membrane. Bar, 0.2 µm

FIGURE 3 *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with 50 µM dodine (analytical grade) for 1 h. Some cells are almost totally devoid of cytoplasm. Prominent myelin-like structures (MS), composed of concentrically arranged triple-layer membranes, are present in the cytoplasm. Some of the ribosomes are disorganized. Bar, 0.2 µm

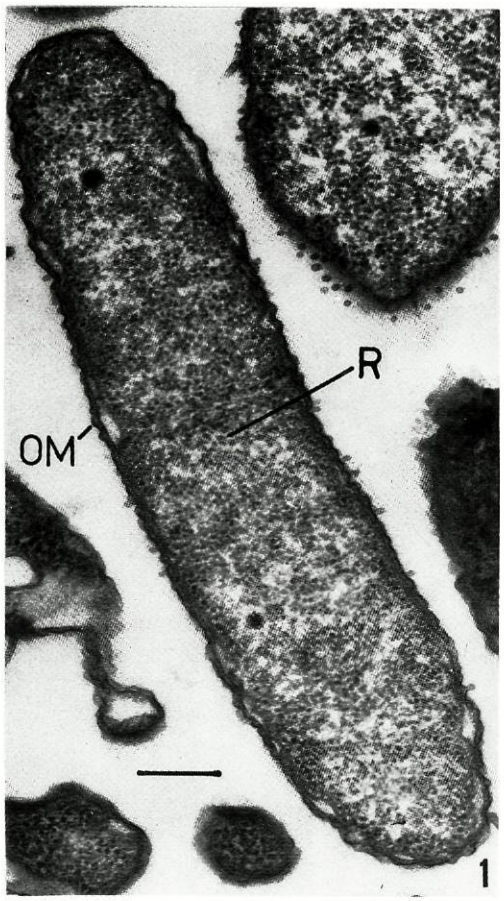
FIGURE 4 *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with 100 µM dodine (analytical grade) for 1 min. Cells show numerous blebs (BL) with a layered content, and myelin-like structures (MS). OM: outer membrane. Bar, 0.2 µm.

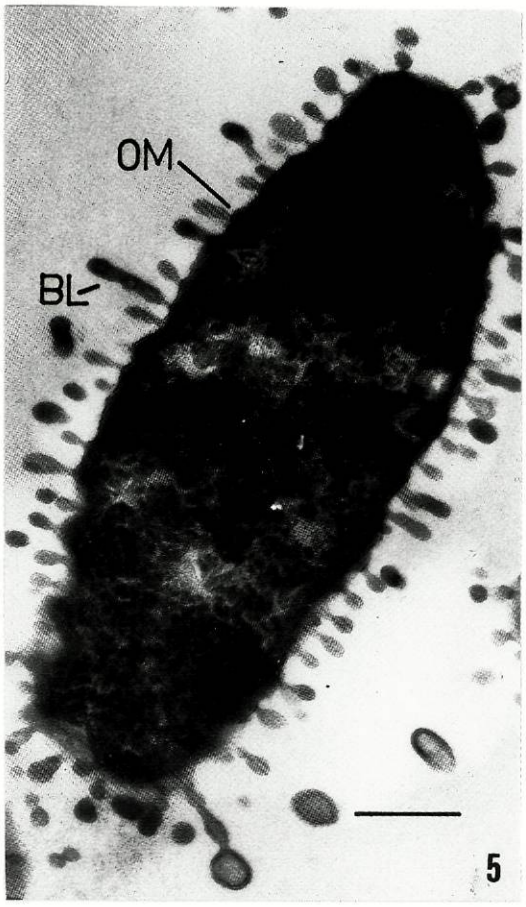
FIGURE 5 *P. syringae* cells suspended in distilled water and treated with 100 µM dodine (analytical grade) for 1 h. Numerous blebs (BL) with a layered content are present on the cell surface. Cells show zones of coagulated cytoplasm. No signficant numbers of lysed cells are observable. OM: outer membrane. Bar, 0.2 µm.

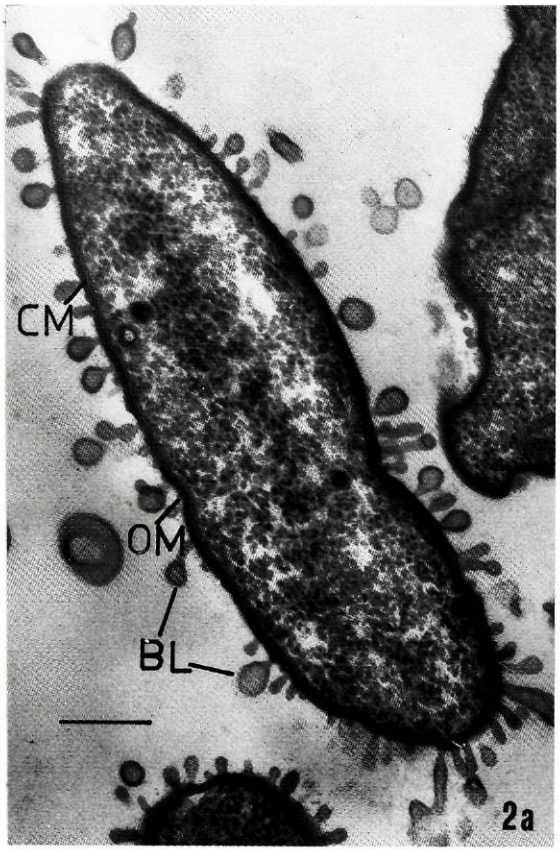
FIGURE 6 *P. syringae* cells suspended in salts medium and treated with 170 µM crude dodine for 1 min. One cell shows a prominent expansion of the outer membrane. The cytoplasmic membrane is extensively solubilized (arrow), allowing the passage of ribosomes into the periplasmic space. OM: outer membrane; CM: cytoplasmic membrane; R: ribosomes. Bar, 0.2 µm.

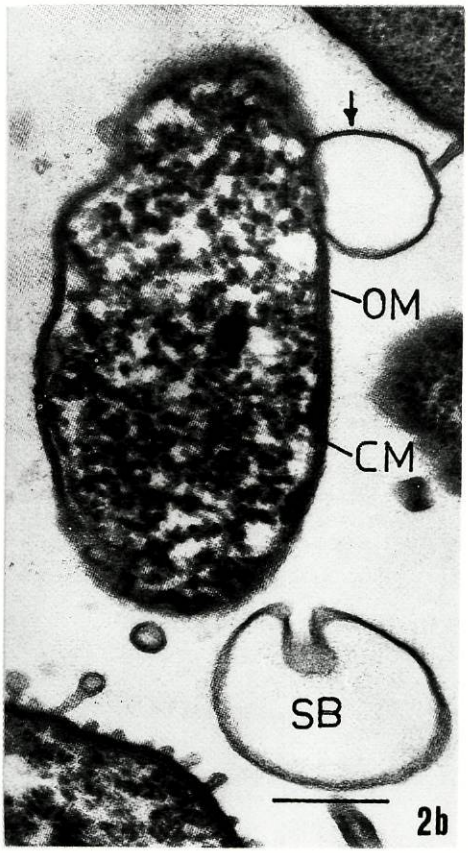
FIGURE 7 *P. syringae* cells suspended in salts medium and treated with 170 µM crude dodine for 30 min.
(a) Cells show extensive intracellular myelin-like structures (MS) and other types of apposed triple-layered membranes (arrow). Most of the ribosomes (R) are preserved.
(b) The cytoplasmic membrane is extensively solubilized (arrows).
OM: outer membrane; CM: cytoplasmic membrane. Bar, 0.2 µm.

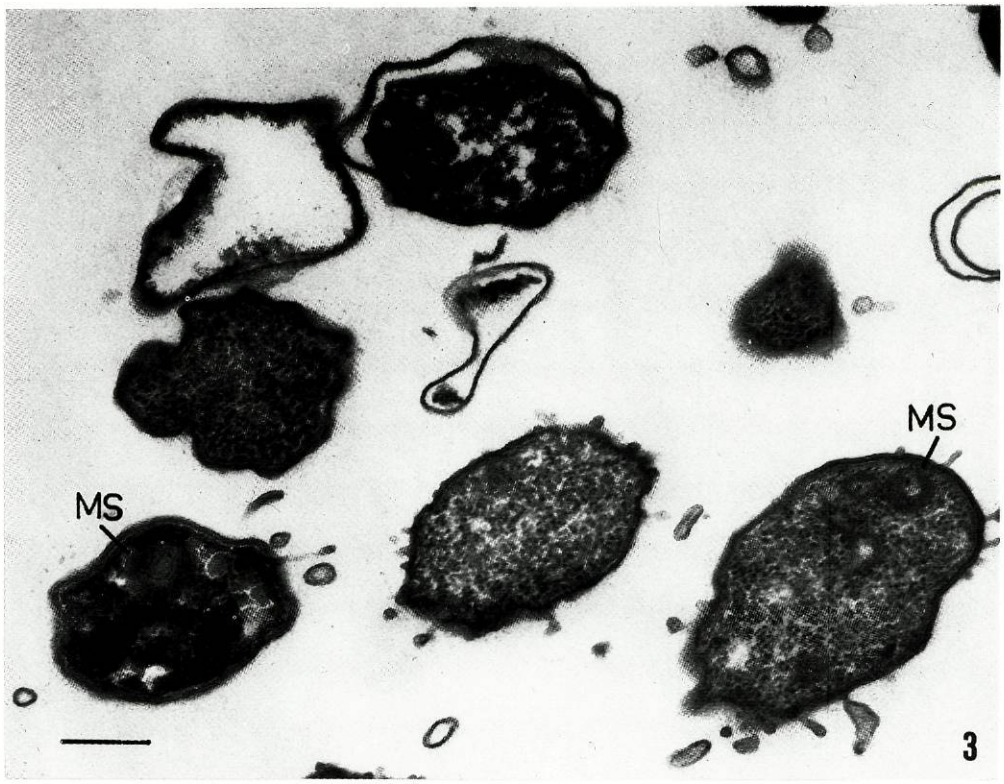
FIGURE 8 *P. syringae* cells suspended in salts medium, without Mg^{2+}, and treated with 170 µM crude dodine for 1 min. Cells show blebs (BL) with a layered content, and zones of coagulated cytoplasm. Some of the ribosomes are disorganized. Bar, 0.2 µm.
Inset: detail of the cell surface (magnification of the marked rectangle). Blebs (BL) are filled with concentrically arranged triple-layered membranes. The cytoplasmic membrane (CM) is extensively solubilized. The outer membrane (OM) is fractured (arrows). Bar, 0.1 µm.

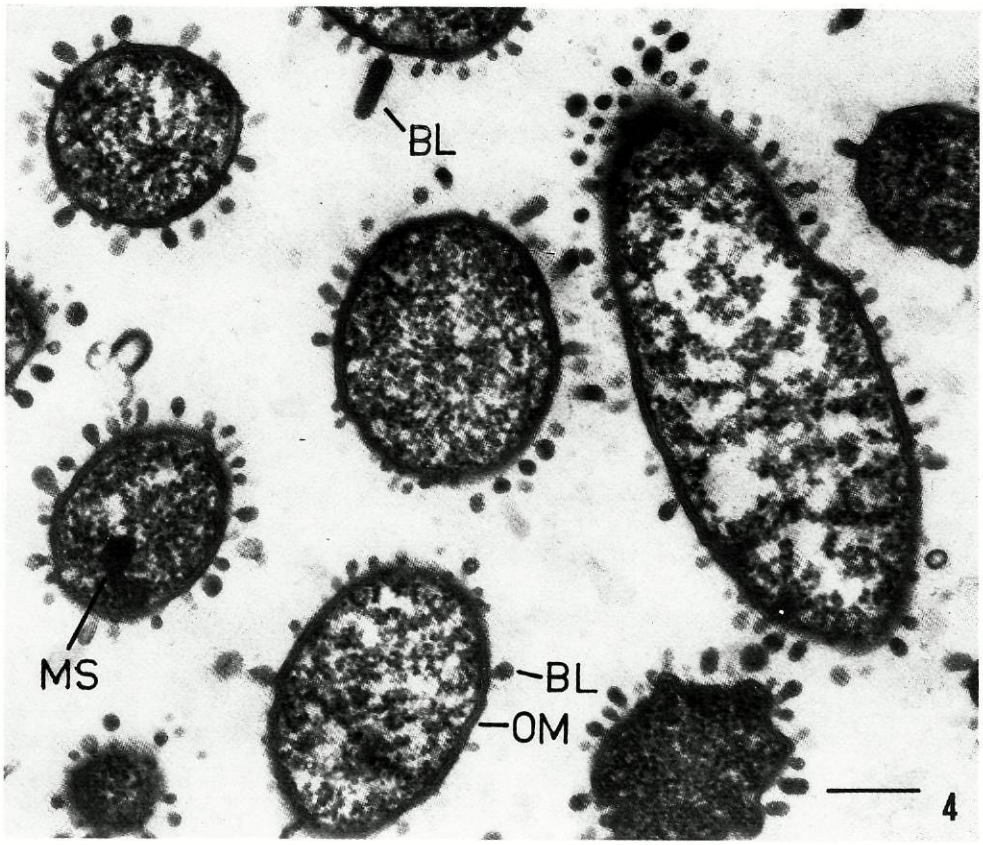

R
OM
1

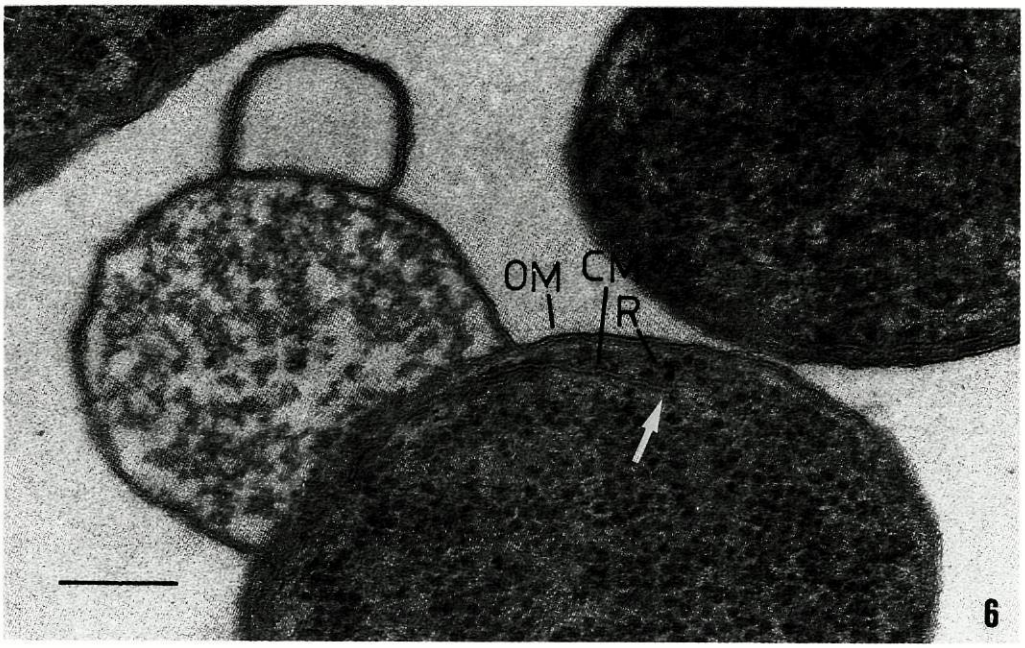

OM
BL
5

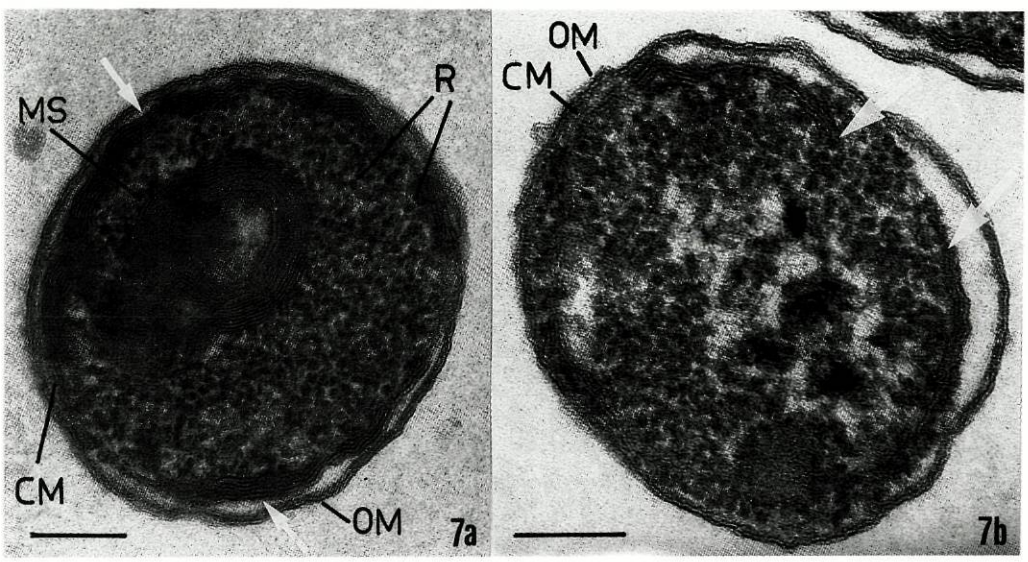

CM
OM
BL
2a

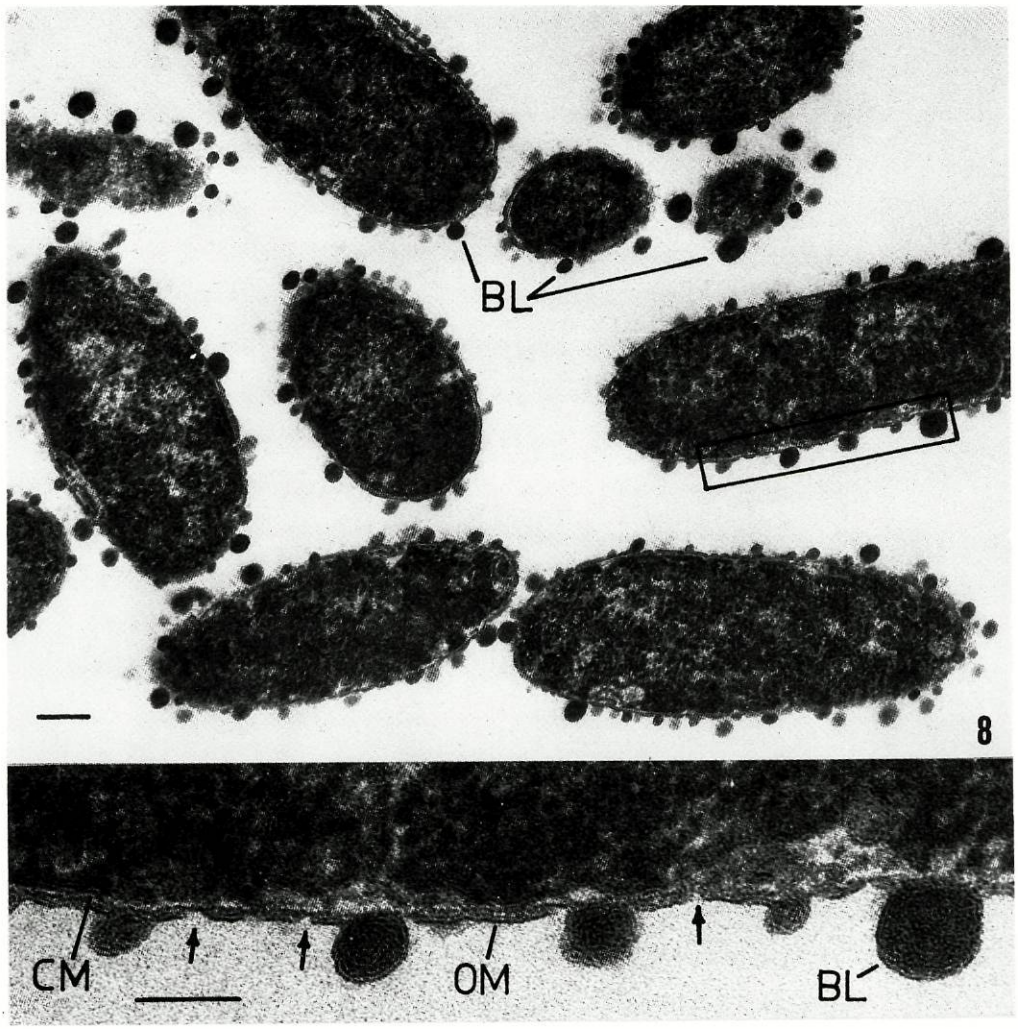

OM
CM
SB
2b


MS
MS
3


BL
MS
BL
OM
4


OM
CM
R
6


MS
R
CM
OM
7a
OM
CM
7b


BL
8
CM
OM
BL

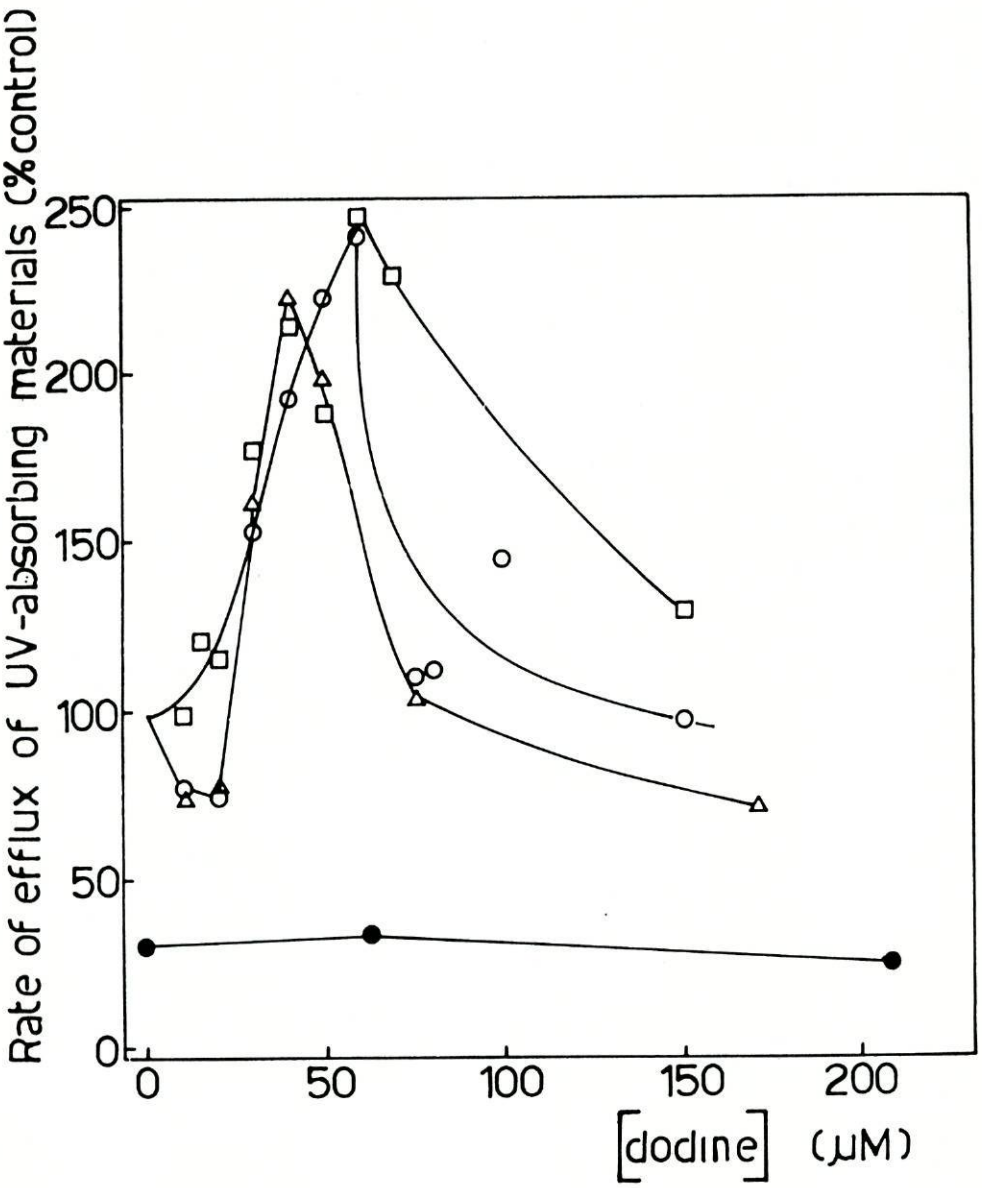


FIGURE 9 Rate of efflux of UV-absorbing materials (% of the controls) as a function of dodine concentration (μM), at 22.5 and 6 ° C. Untreated suspensions showed the following rates ($A_{260\ nm}$ units min^{-1}): distilled water, 22.5 ° C: 2.5×10^{-4}; Na^+-DMGA buffer, 22.5 ° C: 1.5×10^{-4}; distilled water, 6 ° C: 0.8×10^{-4}. △ cells in distilled water at 22.5 ° C, and treated with analytical grade dodine; ○ cells in distilled water at 22.5 ° C, and treated with crude dodine; ● cells in distilled water at 6 ° C, and treated with crude dodine (results expressed as percentages of the control at 22.5 ° C); □ cells in Na^+-DMGA buffer at 22.5 ° C, and treated with analytical grade dodine. Mean number of determinations per dodine concentration and mean coefficient of variation: distilled water, 22.5 ° C, crude dodine: 2.5, 22 %; Na^+-DMGA-buffer: 2.5, 17 %. For other situations, the results are from one experiment.

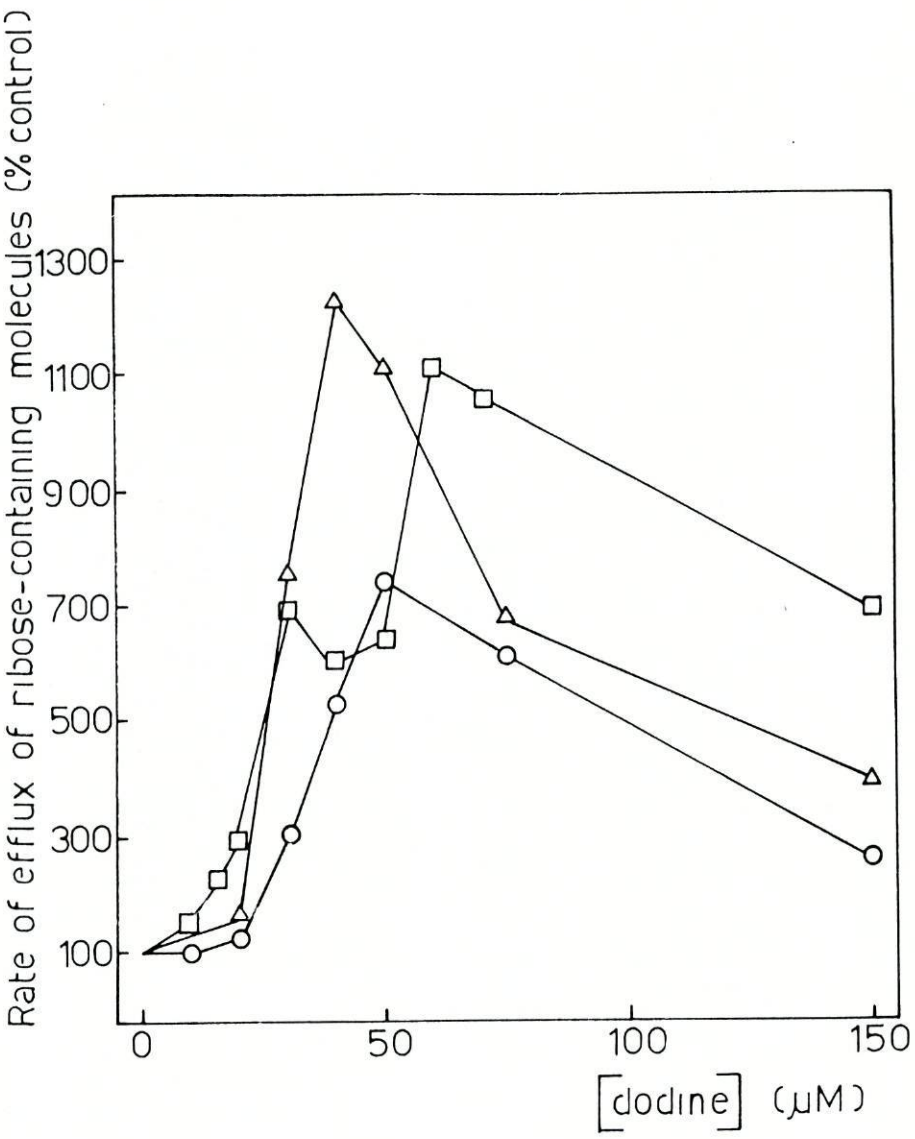


FIGURE 10 Rate of efflux of ribose-containing molecules (% of controls) as function of dodine concentration (μM), at 22.5 ° C. Untreated suspensions showed the following rates (μg RNA ml^{-1} min^{-1}): distilled water: 3.7×10^{-3}; Na^+-DMGA buffer: 2.1×10^{-3}. △ cells in distilled water and treated with analytical grade dodine; O cells in distilled water and treated with crude dodine; □ cells in Na^+-DMGA buffer and treated with analytical grade dodine. Mean number of determinations per dodine concentration and mean coefficient of variation: distilled water, crude dodine: 2, 29 %; Na^+-DMGA buffer: 2, 27 %. For distilled water, analytical dodine, the results are from one experiment.

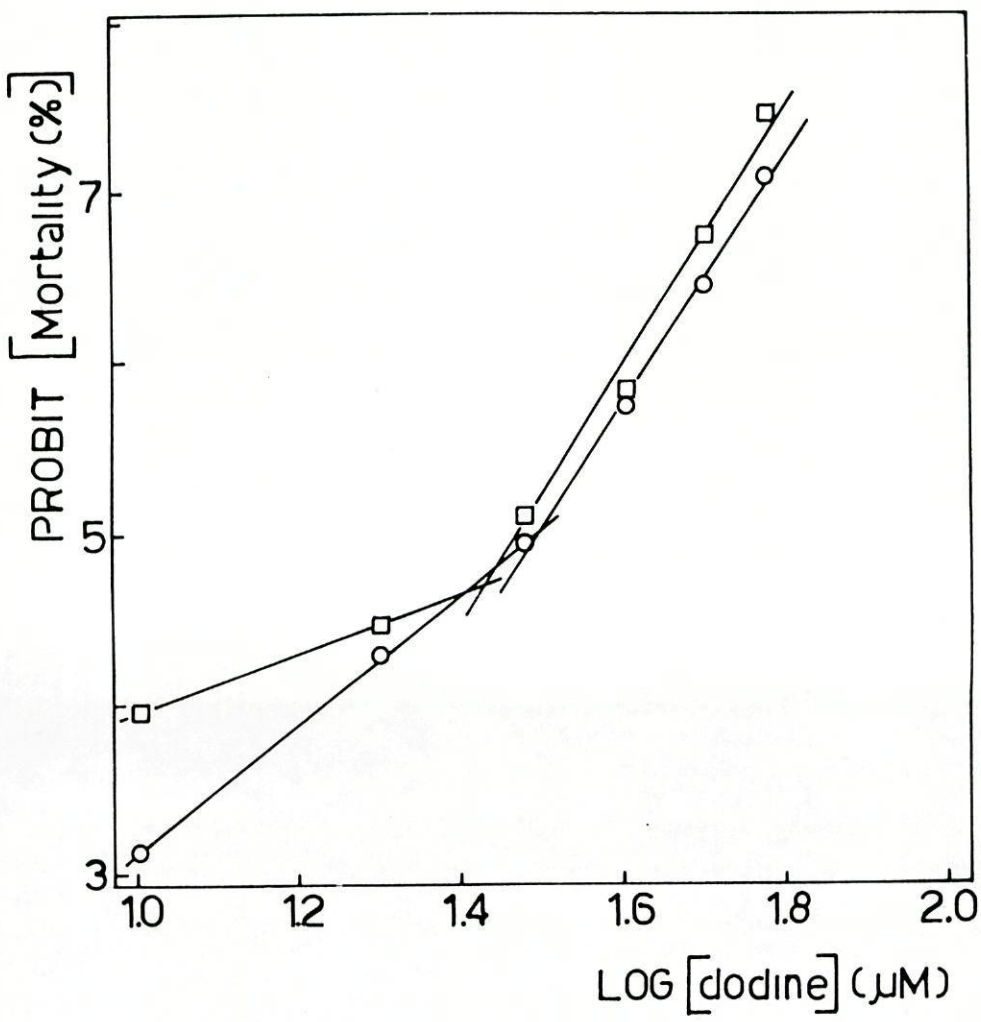


FIGURE 11 PROBIT of the percentage of killed cells as a function of $\log_{10}$ dodine concentration. Cells were suspended in distilled water, and treated with analytical grade dodine for 30 min (O) or 120 min (□). The initial concentration was approximately 10^8 CFU ml^{-1}. Viability was assessed by plating on nutrient agar.

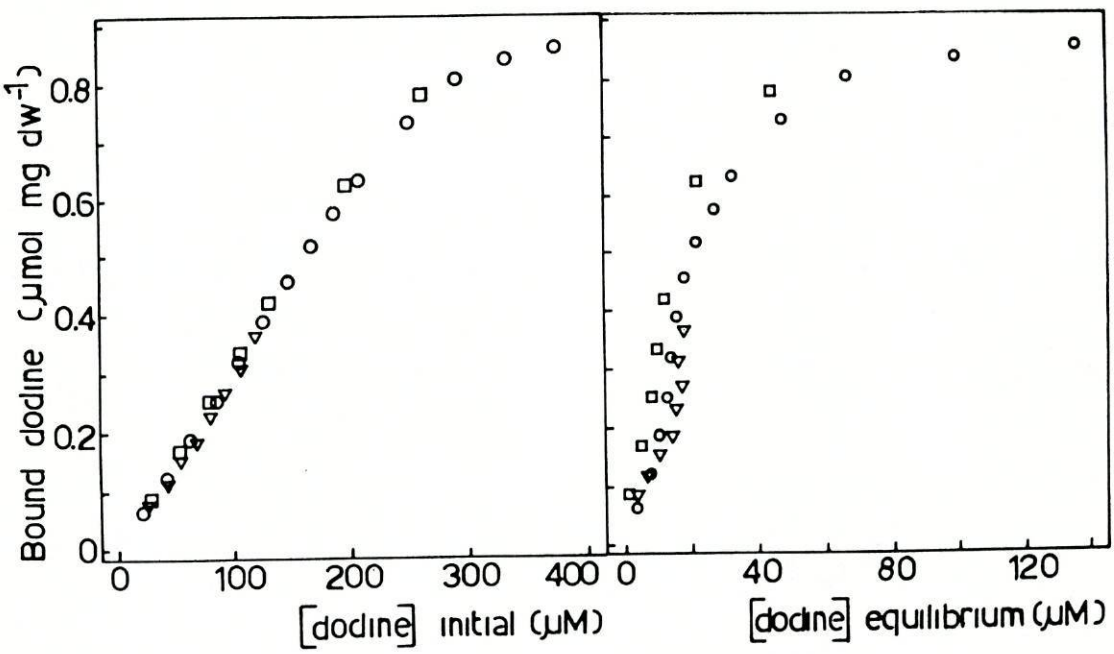


FIGURE 12 Cells were suspended in distilled water and treated with crude dodine for 15 min. Dodine was assayed in the supernatant by the dye complex method of Scott (1968), and the uptake was calculated by difference. Results from three experiments are shown separately.
(a) Bound dodine as a function of initial dodine concentration.
(b) Bound dodine as a function of equilibrium dodine concentration.

TRABALHO VI

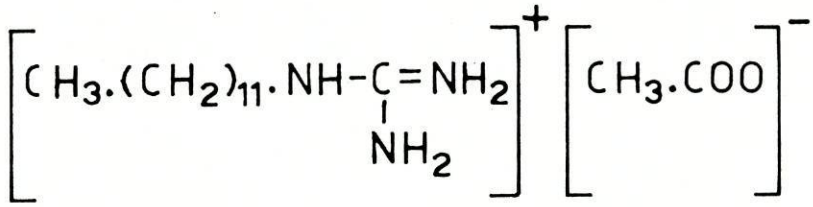
DETERMINATION OF THE CRITICAL MICELLE CONCENTRATION OF DODECYLGUANIDINE MONOACETATE (DODINE) *).

ABSTRACT

Critical micelle concentrations (CMCs) of pure dodecylguanidine monoacetate (dodine) were determined at 22 °C by UV spectroscopy, and from measurements of dye complexation, surface tension and capillary rise. Over the range 5 - 260 μM dodine, two discontinuities were found in the relationship between the physical parameter of the solution and dodine concentration. It is proposed that the two discontinuities corresponded to the CMC_I and CMC_{II}. Depending on the method of determination, the CMC_I of dodine fell within the range 16 - 31 μM, and that of the CMC_{II} within the range 110 - 120 μM. The CMC_I of a sample of crude dodine, extracted from Melprex, was determined from surface tension measurements and was found to be similar to that of pure dodine. In comparison with other detergents of similar molecular structure, dodine displayed an extremely low CMC_I.

INTRODUCTION

Dodecylguanidine monoacetate (dodine; I) was introduced in 1959 by the American Cyanamid Company as a protective fungicide, under the commercial name of «Cyprex» (1). It has been used with success to control several diseases of plants caused by fungi and bacteria (1,2,3).



(I)

---

*) Trabalho realizado em colaboração com A. R. W. Smith, School of Biological and Chemical Sciences, Thames Polytechnic, London. Submetido para publicação.

Dodine is an amphiphilic surfactant, consisting of a hydrophobic apolar dodecyl chain and a positively-charged hydrophilic polar guanidine head group. At low concentrations in water, amphiphiles exist as isolated molecules; but as the concentration approaches the CMC_I, the isolated molecules associate to form spherical micelles. When the micelle concentration of some amphiphiles in aqueous solution reaches a certain value, a further transition can occur resulting in the appearance of rod-like micelles. This concentration is usually referred as the CMC_{II}. At the two CMCs, there are abrupt changes in the physical properties of the amphiphile solution (4).

Several studies on the interaction of organic molecules with ionic and non-ionic surfactants have stressed the fact that the nature and type of the interaction between surfactants and some proteins strongly correlates with the CMC_I of the former (5,6). The interaction of surfactants with bacterial cells has also been found to be highly dependent on the CMC. With several cationic surfactants (dodecyldiethanolamine and C_{12}-C_{16}-benzyldimethylammonium chlorides), the highest bactericidal activity is observed at concentrations lower than the CMC_I, suggesting that the monomeric form of the surfactant is principally responsible for bactericidal activity (7,8). The determination of the CMC of a surfactant is therefore very important in any mode-of-action study of an amphiphile.

The antimicrobial activity of dodine on the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* has been investigated (9). It was found that treatment of the cells with low concentrations of dodine resulted in cell death and damage to the cytoplasmic membrane. To the best of our knowledge there are no published data on the CMC of dodine (see American Cyanamid Company 1985. Material safety data sheet - Cyprex ® technical fungicide. American Cyanamid Cyanamid Company, Sheet nº 2195-01; Wayne; pp. 1-5); therefore in view of its importance, we have determined the value of the CMC for dodine.

Several methods have been proposed for the determination of the CMC of amphiphiles (4). In this study, the four that were employed were: UV spectroscopy, dye complexation, surface tension and capillary rise.

MATERIALS AND METHODS

Dodecylguanidine monoacetate (dodine). Dodine (analytical grade) was a gift from the American Cyanamid Company, Princeton, New Jersey, USA. Crude dodine was recovered by methanol extraction from a sample of Melprex; a gift from Dr. C. M. E. Garrett, Institute for Horticultural Research, East Malling, Maidstone, Kent, England. Both samples were submitted to elemental analysis and melting point determination.

NMR spectroscopy. ^{1}H-NMR spectra were recorded from 50 mg of analytical grade or crude dodine, dissolved in 100 % CD_3OD, at 270 MHz in a Jeol JNM-GX 270 FT-NMR spectroscope at 20 ° C, from 64 accumulations with a pulse width of 3.2 µs, a pulse delay of 2.27 s, and an acquisition time of 2,73 s. Spectra were referenced to external TMS (δ = 0.00 ppm).

^{13}C spectra were recorded from the same samples at 67.8 MHz at 20 ° C, from 3 000 accumulations with a pulse width of 4.7 µs, a pulse delay of 1.00 s, and an acquisition time of 0.9 s. Spectra were referenced to external TMS (δ = 0.00 ppm), and the assignments of methyl and methylene carbons were confirmed by DEPT.

IR spectroscopy. IR spectra were recorded from samples of analytical and crude dodine, mixed with Nujol or KBr, in a Philips analytical PU9800 FT-IR spectrometer.

Preparation of dodine solutions. All glassware and cuvettes were cleaned in DECON, rinsed twice in water double-distilled in glass, and dried before use. All experiments were done at 22.5 ± 0.5 ° C in air-conditioned room, using solutions of dodine prepared in water double-distilled in glass.

Determination of the Critical Micelle Concentration (CMC).

(i) By UV spectroscopy. All measurements were carried out in a Model Lambda-3 Perkin-Elmer double-beam UV-visible range spectrophotometer, using 1 cm light-path quartz cuvettes, with water double-distilled in glass as the blank. UV spectra were recorded over the range 190 - 300 nm for concentrations of dodine in water ranging from 5 to 260 µM. From these, λ_{max} and the absorbance at λ_{max} were determined for each concentration.

(ii) By dye complexation. The method used was essentially that of Corrin & Harkins (10). Solutions of bromocresol purple (BCP), 0.01 g l^{-1}, were prepared in 0.1 M Na acetate/acetic acid buffer, pH 4.5, containing various concentrations of dodine in the range 5 to 260 µM. The absorbance of each was determined at 610 nm in the Lambda-3 spectrophotometer against a blank of either the buffered dye alone, or distilled water.

(iii) From surface tension measurements. Determinations on aqueous solutions of dodine were carried out using a Du Noüy tensiometer (Cambridge Instrument Co.). After each determination, the mica plate was thoroughly washed with acetone (analytical grade).

(iv) From capillary rise measurements. Determinations were made using 5 µL micropipettes (Supracaps) of reproducible bore. For each determination, a new micropipette was immersed in aqueous dodine solution so that the lower end was 1 cm below the meniscus. The height of the column of liquid was recorded after 5 minutes' equilibration.

RESULTS

Purity of dodine.

Analytical grade dodine gave m. pt. 136 - 137 ° C (published value, 136 ° C), and elemental analysis (with expected values in parentheses) gave C, 63.15 % (62.67 %); H, 12.68 % (11.57 %); N, 14.43 % (14.62 %); O by difference, 9.74 % (11.13 %). Crude dodine gave m. pt. 133 - 134 ° C, and elemental analysis revealed C, 63.33 %; H, 12.05 %; N, 13.74 %; O by difference, 10.88 %.

The ^{1}H-NMR spectra of both analytical grade and crude dodine displayed a triplet centred on 0.894 ppm (alkyl methyl protons; 3H); a broad singlet at 1.29 ppm (alkyl methylene protons; 20H); a quintuplet centred on 1.58 ppm (methylene adjoining the alkyl methyl group; 2H); a singlet at 1.89 ppm (acetate methyl protons; 3H); a triplet centred on 3.14 ppm (methylene protons adjoining the guanidino group; 2H) and a broad peak at 5.01 ppm (guanidino protons; 5H).

The ^{13}C spectra of both analytical grade and crude dodine displayed peaks at 14.52 ppm (alkyl methyl C); 24.32 ppm (acetate methyl C); 23.77, 27.78, 29.94, 30.40, 30.51, 30.70, 30.74, 30.79, 30.81 and 33.11 ppm (alkyl methylene Cs); 42.38 ppm

(methylene C adjoining the guanidino group); 158.76 ppm (guanidino C) and 180.56 ppm (acetate carboxyl C).

Neither the ^{1}H nor the ^{13}C spectrum of crude dodine displayed any signals that were not present in the spectra of the analytical grade material.

The IR spectrum of analytical grade dodine in Nujol displayed the following bands: 718 cm^{-1} [$(CH_2)_n$; $n \geq 4$]; 920, 1011 and 1040 cm^{-1} (acetate); 1377 and 1460 cm^{-1} (methyl C-H bending); 1470 and 1478 cm^{-1} (methylene C-H bending); 1410 and 1557 cm^{-1} (carboxylate stretching); 1618 cm^{-1} (N-H bending); 1688 cm^{-1} (C=N stretching); 2853 and 2922 cm^{-1} (methylene C-H stretching); 2953 cm^{-1} (methyl C-H stretching); 3368 cm^{-1} (N-H stretching); 502, 537, 575, 621, 652, 669, 768, 891, 961, 1088, 1115, 1154, 1234, 1316 and 1341 cm^{-1} (unassigned). Identical bands were observed in the IR spectrum of analytical grade dodine in KBr, and crude dodine in Nujol. The spectrum of crude dodine did not show any band that could not be found in the spectrum of the analytical grade material.

Critical Micelle Concentration of dodine. The results of CMC determinations of analytical grade and crude dodine are summarized in Table I.

(i) UV spectroscopy. The UV spectra of aqueous solutions were determined at concentrations ranging from 5 μM to 260 μM dodine (analytical grade), but solutions of greater strength were too turbid for spectrophotometry. As shown in Fig. 1, concentration-dependent changes were found to take place in the far UV. With low concentrations, no absorbance maximum was evident within the range 190 - 300 nm, but as the concentration exceeded 21 μM, a maximum began to emerge in the region of 190 nm. In a plot of A_{max} *versus* dodine concentration (Fig. 2), the data could be fitted to two straight lines with a break point at 120 μM dodine. Between 21 and 210 μM dodine, in a plot of λ_{max} *versus* dodine concentration (Fig. 3), the data could be fitted to two curved lines with an inflection point at 110 μM dodine.

(ii) Dye complexation. In this method, increasing concentrations of the surfactant are added to a buffered aqueous solution of a proper dye. At the CMC there is an abrupt change in the spectrum of the solution due to the intercalation of dye molecules in micelles of the surfactant. In the present study, the dye used was the weak acid BCP, pK ≃ 6. Mixtures were prepared in buffer at pH 4.5, at which about 3 % of the dye molecules are negatively charged. The undissociated dye has a $\lambda_{max} \simeq 428$ nm, whereas the anion has $\lambda_{max} \simeq 587$ nm (Fig. 4).

With relatively concentrated dodine (e.g. 261 μM), BCP solutions underwent a pronounced spectral shift, consisting of a fall in absorbance at 428 nm (λ_{max}) accompanied by the appearance of a new maximum at 610 nm. Dodine concentrations down to 31 μM yielded similar spectra, showing absorbance maxima at 428 and 610 nm; but only the absorbance at 610 nm was linearly correlated with concentration (Fig. 5), and no absorbance at this wavelength could be detected at concentrations below 26 μM.

(iii) Surface tension. The surface tension of aqueous solutions of analytical grade or crude dodine was determined at concentrations ranging from 5 to 210 μM (Fig. 6). The surface tension fell with increasing concentration. In a plot of surface tension *versus* log concentration of analytical grade dodine (Fig. 6), the data could be fitted to three straight lines with break points at 20 and 115 μM. A similar plot of data obtained with crude dodine gave two straight lines with a break point at 38 μM, but no evidence was found of a second discontinuity.

(iv) Capillary rise. A graph of capillary rise against dodine concentration in water yielded a biphasic plot with a break point at 16 μM dodine (Fig. 7). However, the surfaces of clean glassware containing dodine solutions rapidly lost their wettability, probably due to the affinity of the guanidino headgroups for the negatively-charged polar glass surface, which would have caused the nonpolar tails to be presented to the aqueous phase. Due to the reduction in the available polar surface, the polar interaction of the glass surface with water was diminished; therefore, since the supportable height of the water column level was lessened, the capillary rise observed at a given dodine concentration would have been depressed to a greater extent than expected, which may have influenced the value obtained for the CMC by this method.

DISCUSSION

In this study, four methods were used to determine the CMC of analytical grade dodine: UV spectroscopy, dye complexation, surface tension and capillary rise. The results obtained all indicated that in the range 5 - 260 μM there were two discontinuities in the relation between the physical parameter of the solution and dodine concentration.

In the UV spectrum, the absorbance maximum shifted to longer wavelength with increasing concentration, and emerged into the range 190 - 195 nm at 21 µM dodine. The relation between the A_{max} and dodine concentration was biphasic, showing a break-point at 120 µM dodine.

The addition of dodine to BCP in buffer at pH 4.5, at concentrations higher than 31 µM, caused a pronounced change in the spectrum of the dye solution; the absorbance at 428 nm was reduced, and the small peak at 587 nm was replaced by one of λ_{max} approx. 610 nm. In the relation between surface tension and log dodine concentration, two discontinuities were found at 20 and 115 µM dodine, and in the plot of capillary rise against log dodine concentration, a break point could be detected at about 16 µM dodine. The most plausible explanation for these results is that the two discontinuities corresponded to the CMC_I and CMC_{II}. Proof that the shift in the absorption spectrum of BCP on adding dodine corresponded to the uptake of the dye into the non-polar phase offered by the dodine micelles, was obtained by showing that chloroform extracts of BCP solutions containing 260 µM dodine also displayed absorbance maxima at 428 and 610 nm, whereas when BCP solutions containing no dodine were extracted, although the peak at 428 nm was present, no significant absorbance was seen between 550 and 650 nm. The change of environment from aqueous to an hydrophobic milieu therefore yielded a bathochromic shift in the absorbance peak of the BCP anion from 587 to 610 nm. At concentrations greater than the CMC_I, an increase in surfactant concentration resulted in a concomitant increase in the concentration of micelles, giving a proportionate increase in the absorbance due to BCP-dodine micelle complexes at 610 nm (Fig. 5).

The capillary rise measurements yielded rather a low value for CMC_I compared with data obtained by other methods. Since dodine tends to interact readily with glass surfaces (see Results), coating them with a hydrophobic surface, it is probable that the loss of the polar surface affected the "wettability" of the glass and yielded anomalous surface tension values.

As the two CMCs correspond to different changes in the structural organization of the aggregated amphiphile molecules in water, methods suitable for the determination of CMC_I may not be adequate for the determination of CMC_{II}. For the determination of CMC_I, the method used must be sensitive to micelle concentration, whereas for the determination of CMC_{II} the method should detect the change in micelle shape. By UV spectroscopy, it was possible to detect both CMCs, since in both transitions there was a change in the organization of the surfactant molecules. In contrast, the dye complexation method could not be expected to detect

CMC_{II} since it only detects the movement of BCP anions into a hydrophobic phase, and although the micelles are of differing species, they do not take up the anions differently.

Different methods for the determination of CMC usually give slightly differing results. Of the four methods used, three gave closely-similar values for CMC_I. Only the value obtained by the dye complexation method differed substantially, probably because the determination was carried out in acetate buffer at pH 4.5, whereas the other determinations were done in distilled water between pH 5.2 and 5.5. The pKa of dodine has not been determined (see American Cyanamid Company 1985. Material safety data sheet - Cyprex ® technical fungicide. American Cyanamid Cyanamid Company, Sheet nº 2195-01; Wayne; pp. 1-5) but is probably near that of the guanidinium group of arginine (approx. 12; ref. 11), therefore below pH 9 almost all dodine molecules in solution are positively charged. It is therefore unlikely that differences in pH would have affected the CMC; it is more probable that the CMC value obtained in sodium acetate was higher because of the difference in ionic strength, or the presence of excess acetate.

The CMC_I of crude dodine, determined from measurements of surface tension, was found to be 38 μM, compared with 20 μM of analytical grade dodine; but with crude dodine, no evidence was found, using this method, for the existence of a CMC_{II}.

Analytical and crude dodine were submitted to chemical analysis. The results confirmed the high purity of the analytical grade sample, and showed that the contamination of crude dodine by organic material was low. Nonetheless, it is likely that crude dodine contained impurities that were the cause of the observed discrepancy in the data from surface tension measurements between the two samples of dodine.

In Table II are presented some published values for the CMCs of surfactants with dodecyl chains. CMC_I of dodine is much lower than the CMC_I of several comparable cationic surfactants, and lower than that of non-ionic surfactants. However, it is higher than the CMC of insoluble amphiphiles such as phospholipids and lipoteichoic acids (12,13).

It has been recently shown that dodine concentrations higher than 30 - 40 μM cause severe membrane damage and cell death in the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* (9). It is therefore proposed that the micelles are the principal agent of the antibacterial activity of dodine towards *P. syringae*. In contrast, other cationic surfactants show their greatest bactericidal activity below

the CMC_I, as monomers in solution. Further studies are needed to confirm this hypothesis.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Dr. B. Z. Chowdhry (Thames Polytechnic) for helpful discussions in the preparation of this paper, Dr. N. Rees for NMR spectroscopy, and Dr. Daniela Fleming and Dr. Adelina Macedo (Chemistry Department, Faculty of Sciences, Oporto University) for IR spectra and melting point determinations.

This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/C/CEN/67/90).

REFERENCES

1. Jepson, W. F., *Meded. Landbouwwet. Opzoek. Staat Gent* **26**,1365 (1961).

2. Diener, U. L., and Carlton, C. C., *Plant Dis. Rep.* **44**,136 (1960).

3. Ray, S., and Addy, K., *Indian Phytopathol.* **29**,246 (1976).

4. Hoffman, H., and Ulbricht, W., *in* "Thermodynamic Data for Biochemistry and Biotechnology" (H.-J. Heinz, Ed.). p. 297. Springer-Verlag, Berlin, 1986.

5. Nozaki, Y., Reynolds, J. A., and Tanford, C., *J. Biol. Chem.* **249**,4452 (1974).

6. Robinson, N. C., and Tanford, C., *Biochemistry* **14**,369 (1975).

7. Lambert, P. A., and Smith, A. R. W., *J. Gen. Microbiol.* **103**,367 (1977).

8. Tomlinson, E., Brown, M. R., and Davies, S. S., *J. Med. Chem.* **20**,1277 (1977).

9. Cabral, J. P. S., *Antimicrob. Agents Chemother.* **35**,341 (1991).

10. Corrin, M. L., and Harkins, W. D., *J. Am. Chem. Soc.* **69**,679 (1947).

11. White, A., Handler, P., and Smith, E. L., "Principles of Biochemistry". McGraw-Hill, New York, 1964.

12. Tanford, C., "The Hydrophobic Effect: Formation of Micelles and Biological Membranes". p. 112. John-Wiley & Sons, New York, 1980.

13. Wicken, A. J., Evans, J. D., and Know, K. W., *J. Bacteriol.* **166**,72 (1986).

14. Helenius, A., McCastlin, D. R., Fries, E., and Tanford, C., *Methods Enzymol.* **56**,734 (1979).

15. Helenius, A., and Simons, K., *Biochim. Biophys. Acta* **415**,29 (1975).

TABLE I Critical micelle concentrations of dodecylguanidine monoacetate (dodine) determined by different methods

Compound	Method	CMC_I	CMC_{II}
Analytical grade dodine	Dye complexation[a]	31 µM	-
	UV spectroscopy[b]	21 µM	110/120 µM[c]
	Surface tension[b]	20 µM	115 µM
	Capillary rise[b]	16 µM	-
Crude dodine[d]	Surface tension[b]	38 µM	-

All determinations were carried out at 22.5 °C. Results from 1 - 6 determinations.

[a] The CMC was determined in 0.1 M acetate buffer, pH 4.5.

[b] The CMC was determined in distilled water.

[c] By λ_{max} and A_{max} respectively.

[d] Crude dodine was extracted from Melprex.

TABLE II **CMC_I of surfactants bearing dodecyl chains**

Non-ionic surfactants	
C_{12} E_8	87 µM [a]
C_{12} sorbitan E_{20}	59 µM [a]
Anionic surfactants	
sodium dodecyl sulphate	8.2 mM [b]
sodium dodecyl sulphonate	9.8 mM [b]
Cationic surfactants	
dodecyl ammonium chloride	150 mM [c]
dodecyl methylammonium chloride	150 mM [c]
dodecyl dimethylammonium chloride	160 mM [c]
dodecyl trimethylammonium chloride	200 mM [c]
dodecyl benzyldimethylammonium chloride	7.8 mM [c]
dodecyl pyridinium chloride	150 mM [c]
Zwitterionic surfactants	
lysolecithin C_{12}	0.9 mM [a]

[a] Ref. (14)

[b] Ref. (15)

[c] Ref. (4)

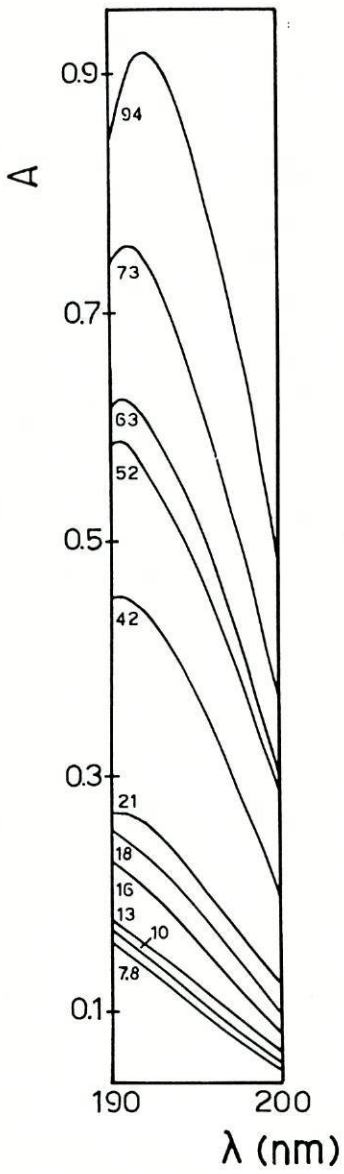


FIG. 1 UV spectra of aqueous solutions of dodine (analytical grade) at concentrations ranging from 7.8 to 94 µM. The blank was distilled water. The numbers refer to the µmolar concentration of dodine.

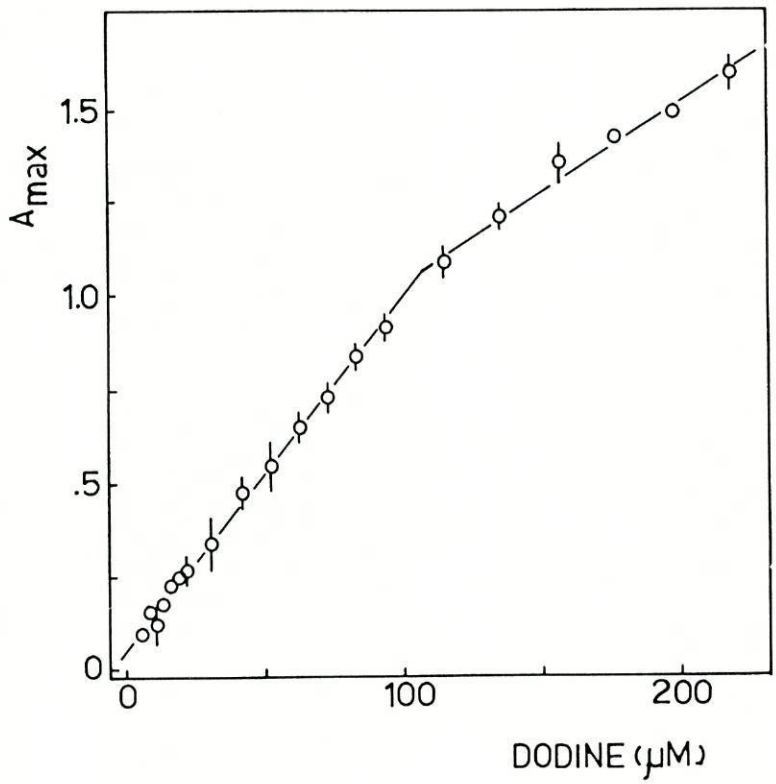


FIG. 2 Relationship between the absorbance maximum (190 - 200 nm) of aqueous solutions of dodine (analytical grade) and the surfactant concentration. Results from more than one determination are represented as the mean ± SD. Mean number of determinations *per* dodine concentration: 2.1. The break point at 120 μM dodine is ascribed to the CMC_{II}.

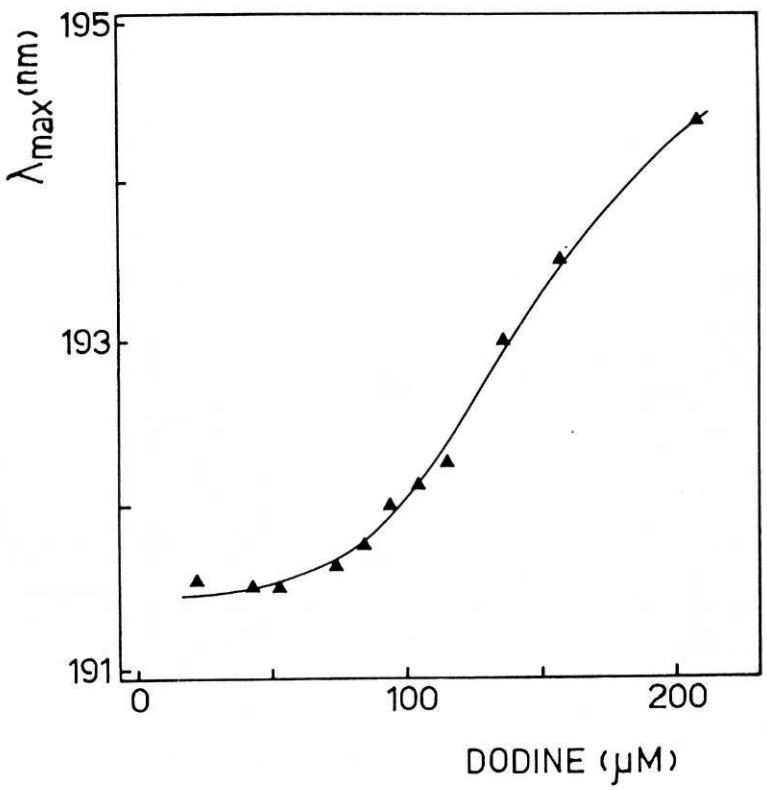


FIG. 3 Relationship between λ_{max} of aqueous solutions of dodine (analytical grade) and surfactant concentration. Results from one experiment. The inflexion point at 110 μM is ascribed to the CMC_{II}

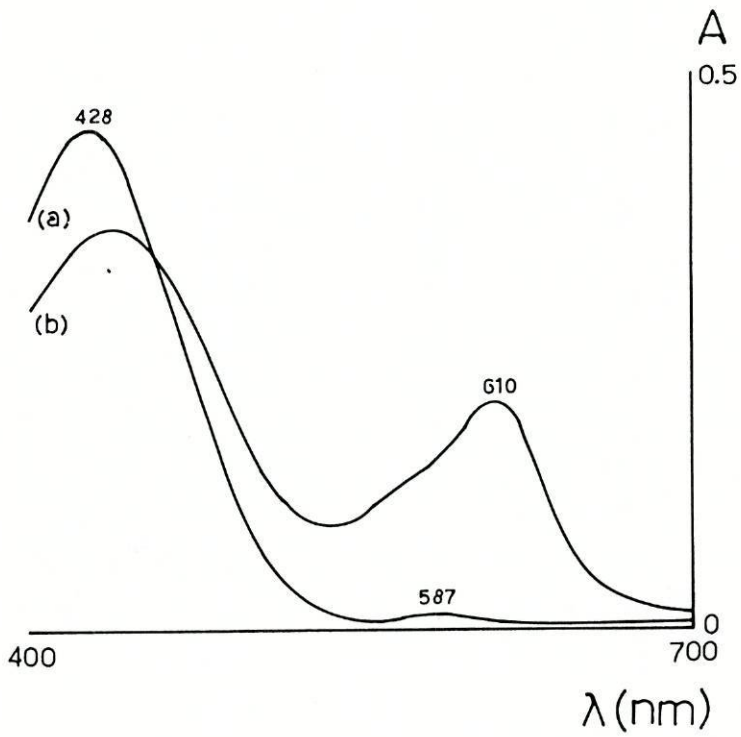


FIG. 4 Absorption spectrum between 400 and 700 nm of 0.001 % (w/v) BCP in acetate buffer, pH 4.5 *versus* buffer alone.
(a) BCP alone. The absorbance maximum at 428 nm is due to the undissociated dye; the maximum at 587 nm is due to the anion.
(b) BCP with 261 µM dodine (analytical grade). The absorbance maximum at 610 nm corresponds to that of the dye anion intercalated in the micelles of positively-charged dodine molecules.

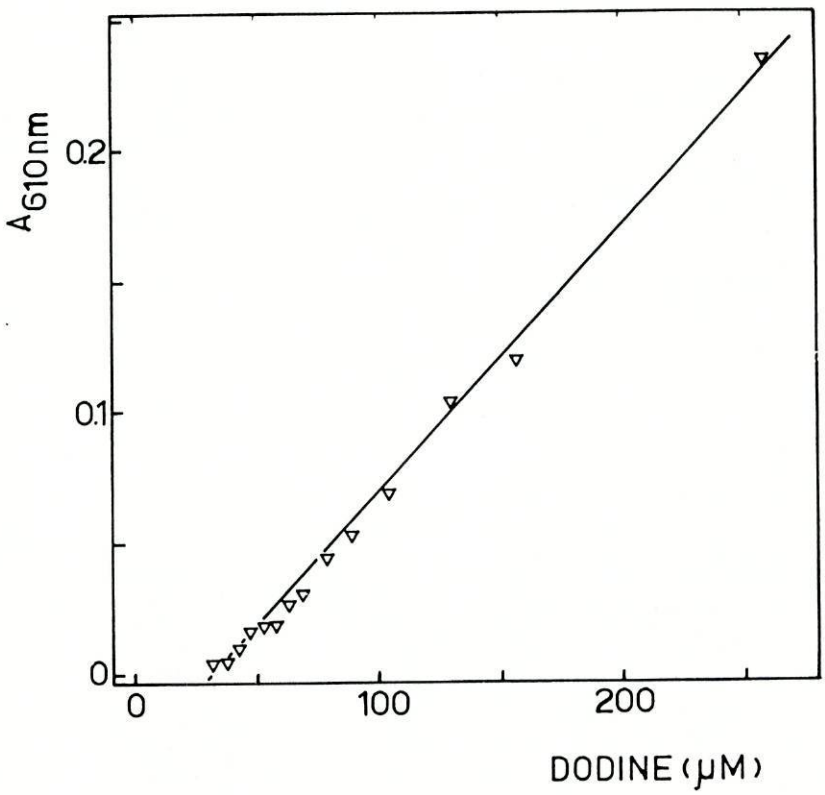


FIG. 5 Relationship between the absorbance at 610 nm of the BCP-dodine complex, and the concentration of dodine (analytical grade). The blank was buffered BCP. Results from one experiment.

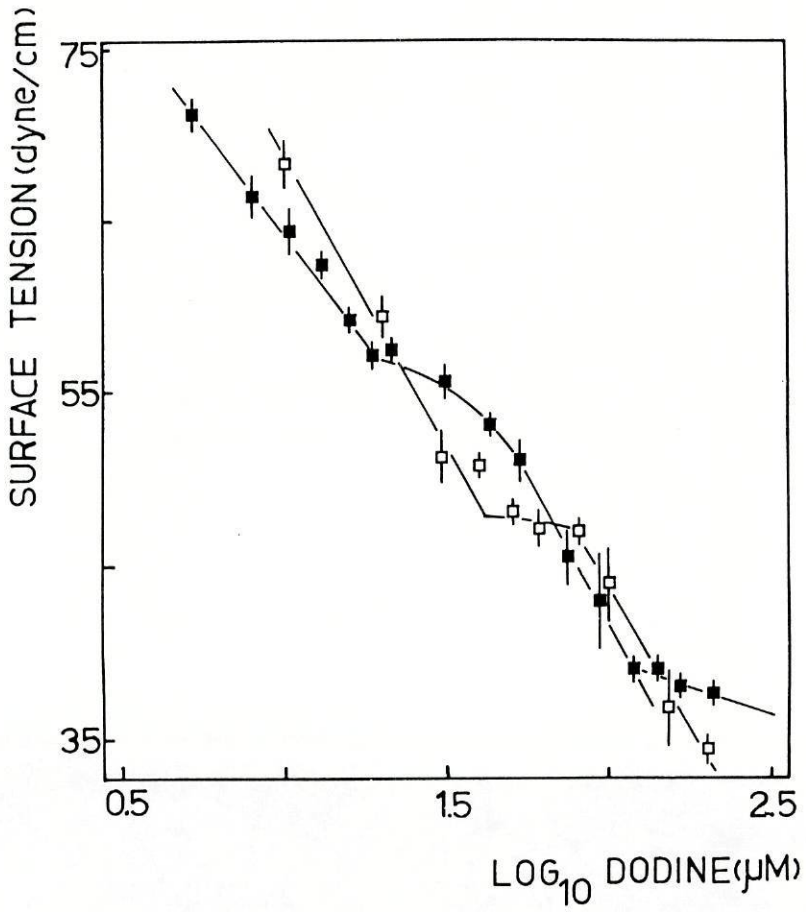


FIG. 6 Surface tension as a function of $\log_{10}$ dodine concentration in aqueous solution (means ± SD). ■ , analytical grade dodine; □ , crude dodine. Mean number of determinations *per* dodine concentration: analytical grade dodine: 2.9; crude dodine: 3. The plot for analytical grade dodine, displaying two break points at 20 and 115 μM, probably corresponding to the CMC_I and CMC_{II}. The plot for crude dodine, showing a break point at 38 μM, ascribable to the CMC_I.

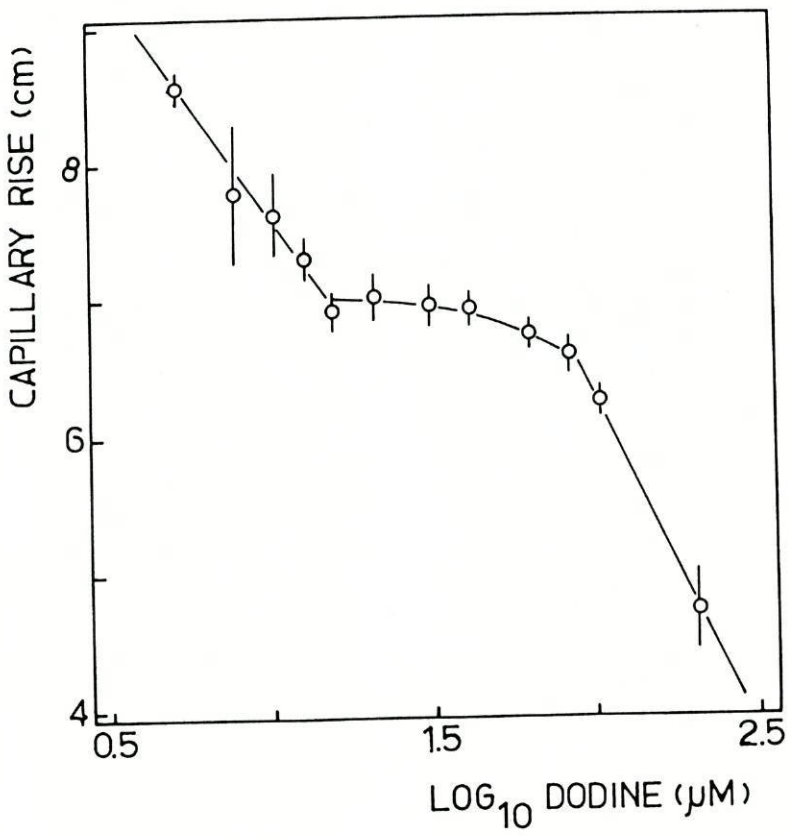


FIG. 7 Capillary rise as a function of $\log_{10}$ dodine (analytical grade) concentration in aqueous solution (means ± SD). Mean number of determinations *per* dodine concentration: 4.9. The break point at 16 μM dodine probably corresponds to the CMC_I.

TRABALHO VII

n-DODECYLGUANIDINIUM ACETATE (DODINE) CAUSES SEVERE MEMBRANE DAMAGE IN *PSEUDOMONAS SYRINGAE*, ABOVE THE CRITICAL MICELLE CONCENTRATION *).

ABSTRACT

The critical micelle concentration of dodine is 25 μM. Treatment of *Pseudomonas syringae* cells with 15 - 20 μM dodine resulted in low levels of K^+ release, but surfactant concentrations in excess of 30 μM caused extensive and rapid K^+ efflux, and significant leakage of inorganic phosphate. These results suggest that treatment with dodine concentrations above 30 μM resulted in extensive damage to the cytoplasmic membrane, in agreement with previous findings from this laboratory.

The addition of 5 - 10 μM dodine also caused an increase in the rate of oxygen consumption in the presence of glycerol, but an increase in concentration from 10 to 40 μM resulted in a concomitant decrease in O_2 consumption. Earlier work showed that in this range of surfactant concentrations, there was a progressive increase in the amount released of uv-absorbing materials and ribose-containing molecules. Since leaked metabolites could include the coenzymes that are required for glycerol oxidation, the results suggest that the inhibition of O_2 uptake could have been due, at least in part, to coenzyme drainage from the cells. Since dodine also inhibited O_2 consumption in the presence of succinate, the surfactant also inhibited the components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase.

Dodine concentrations above the critical micelle concentration therefore caused a pronounced increase in the rate of release of K^+ and inorganic phosphate and the complete cessation of oxygen consumption in the presence of glycerol or succinate, indicating that the micellar form of dodine was more damaging to the cytoplasmic membrane then the free molecules.

---

*) Trabalho submetido para publicação.

INTRODUCTION

Dodine (*n*-dodecylguanidinium acetate) was introduced in 1956 by the American Cyanamid Company as a protective fungicide, under the commercial name of «Cyprex» (Worthing, 1979). It has been used with success to control several diseases of plants caused by fungi and bacteria (Diener & Carlton, 1960; Jepson, 1961; Ray & Addy, 1976; Worthing, 1979). Dodine is a soluble amphiphile (surfactant) consisting of a hydrophobic group (C_{12} hydrocarbon chain) and a positively charged hydrophilic head group (guanidine).

Amphiphiles can induce profound alterations in the permeability of artificial phopholipid membranes (Ruiz *et al.*, 1988), and can cause membrane solubilization when the concentration reaches the critical micelle concentration (CMC), or after saturation of the bilayer with surfactant molecules (Lichtenberg *et al.*, 1983; Lichtenberg, 1985). Amphiphiles can also cause severe damage to the cytoplasmic membrane of bacterial cells, inducing a rapid release of pool metabolites (Salton, 1951; Hugo & Longworth, 1964; Rye & Wiseman, 1964; Lambert & Hammond, 1973; Silva *et al.*, 1979).

The interaction of surfactants with bacterial cells is directly dependent on concentration provided that it is below the CMC. With several cationic surfactants (dodecyldiethanolamine and C_8-C_{18}-benzyldimethylammonium chlorides), the highest bactericidal activity is observed at concentrations lower than the CMC (Lambert & Smith, 1977; Tomlinson *et al.*, 1977). In contrast, the antibacterial activity of dodine has been found to increase sharply above the CMC, suggesting that the micelles of dodine are the main agent of the antibacterial activity (Cabral, 1991; Cabral, J. P. S. & Smith, A. R. W. *Journal of Colloid and Interface Science*, submitted). The present findings corroborate this hypothesis by showing that the efflux of K^+ and inorganic phosphate, and the inhibition of the O_2 consumption with glycerol or succinate, were very pronounced with dodine concentrations above the CMC. In addition, the results suggest that the inhibition of respiration caused by dodine was primarily a consequence of membrane damage.

MATERIALS AND METHODS.

Reagents. Dodine (analytical grade) was a gift from the American Cyanamid Company (USA). Crude dodine was recovered by methanol extraction from a sample of

Melprex, a gift from Dr. C. Garrett (Horticultural Research International, East Malling, England). Both samples were submitted to chemical analysis (nuclear magnetic resonance spectrometry and infra-red spectroscopy; melting point and C-H-N analysis) and critical micelle concentration determination (Cabral, J. P. S. & Smith, A. R. W., *Journal of Colloid and Interface Science*, submitted). The results confirmed the high purity of the analytical grade sample, and showed that the organic contamination of crude dodine was low. Depending on the method of determination, the value of the CMC_f of analytical grade dodine was located in the range 16 - 31 µM, and that of crude Dodine was 38 µM.

Other chemicals were reagent grade.

Culture and cell suspensions. *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 was grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6.2). At the end of the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in distilled water (pH 6.5) or Na^+-DMGA buffer (10 mM dimethylglutaric acid; pH adjusted to 6.5 with NaOH). The optical density at 568 nm was adjusted to 1.06 with a model Lambda-3 Perkin-Elmer double beam spectrophotometer with 1 cm light path cuvettes. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10, and the final suspension had concentration of approximately 0.28 (mg dry weight of cells) ml^{-1}.

Leakage of inorganic phosphate. Cell suspensions were treated with dodine concentrations ranging from 5 to 100 µM, at (22.5 ± 0.5 °C. After 2 min of treatment with surfactant, the suspensions were filtered through a 0.45 µm pore filter (Sartorius). Inorganic phosphate was assayed in the filtrates using a modification of the method of Murphy & Riley (1962) with AnalaR KH_2PO_4 (BDH) as the standard. The concentrated stock reagent contained antimony potassium tartrate (0.137 g), ammonium molybdate (6 g) and 70 ml conc. H_2SO_4 made to 1 000 ml with water. Before use the stock reagent was diluted five-fold and 0.1 g of Na ascorbate was added per 100 ml of diluted reagent. Acid-washed glassware was used. Samples for assay (2 ml) were dried at 110 °C, and 5.5 ml of diluted reagent was added. After 45 min, the absorbance was read at 720 nm, with a model Lambda-3 Perkin Elmer double beam spectrophotometer with 1 cm light path cuvettes.

K^+ leakage experiments. The time course of the K^+ efflux induced by dodine was studied with a K^+-sensitive glass electrode (Kent Industrial Measurements, model 1057-200, England) with a double liquid junction reference electrode (Philips R 44/2-SD/1 Pye-Unicam, Cambridge, England). The potential derived was monitored with a pH/mV meter (Corning Ion-Analyzer 250), which is sensitive to changes of 0.1 mV. Before use, the electrode was throughly washed with distilled water, followed by acetone, and immersed in 0.1 M KCl for 2.5 min. The electrode was rinsed with distilled water and calibrated with KCl solutions in the range 10 - 100 µM. After a further rinse, the electrode was ready for use. Following the addition of dodine, K^+ release was measured every 5 s, until no more was lost from the cells. The rate of efflux (the amount of K^+ released per mg dry wt per 5 s) was calculated between every two sucessive readings, and the highest of these values was considered to be the maximum rate of K^+ efflux. All experiments were carried out in a thermostatically-controlled vessel (22.5 ± 0.1 °C), equipped with a magnetic stirrer.

Effect of dodine on the O_2 consumption in the presence of glycerol or succinate. Oxygen uptake by *P. syringae* cells was measured polarographically with a stirred Clark-type oxygen electrode (Rank Brothers, Cambridge, England), calibrated with fully-aerated suspending medium (for 100 % oxygenation) and sodium dithionite solution (for 0 % oxygenation).

To measure the respiration of the cells in the presence of a given substrate, fully-oxygenated cell suspension (2.7 ml) was pipetted into the electrode chamber maintained at 22.5 ± 0.1 °C, and the system was hermetically sealed. Substrate solution (0.2 ml of succinate or glycerol solution, final concentration: 1 mM) was then added, and after 15 - 25 % of the available oxygen had been consumed, dodine solution (0.1 ml) was added to give a final concentration ranging from 5 to 40 µM. The rates of oxygen uptake immediately before and after dodine treatment were then compared.

RESULTS

In cells suspended in distilled water, there were no significant changes in pH after the addition of dodine, a necessary condition for the use of the glass electrode in unbuffered suspensions. The time course of K^+ efflux induced by 15 - 100 µM crude dodine in cells suspended in distilled water is shown in Fig. 1.

Immediately after the addition of dodine, cells began to leak K^+. The rate of efflux progressively increased until a maximum was achieved, after which the rate decreased to zero. The process of K^+ efflux was directly dependent on dodine concentration. Treatment of the cells with 15 or 20 µM dodine resulted in low levels of K^+ release, but higher surfactant concentrations caused a pronounced efflux (Fig. 1). The amount of K^+ released after 4 min of surfactant treatment and the maximum rate of efflux both showed a very pronounced increase at 20 - 30 µM dodine (Fig. 1, inset and Fig. 2). Due to interference by Na^+, the electrode could not be used to study the efflux of K^+ in suspensions in Na^+-DMGA buffer. Attempts to use a liquid membrane electrode, which is virtually unaffected by the presence of sodium ions and by pH were unsuccessful since the surfactant interfered with this electrode, apparently by destroying the potential (Hammond & Lambert, 1974).

Treatment of *P. syringae* cells with dodine for a very short period of time also resulted in the release of inorganic phosphate (Fig. 2). As with K^+, the amount of P_i released after surfactant treatment for 2 min showed a sharp increase at 20 - 30 µM dodine (Fig. 2). Comparable results were obtained with cells suspended in distilled water or Na^+-DMGA buffer, and treated with analytical grade or crude dodine.

The influence of dodine in the O_2 uptake of *P. syringae* cells was studied in cells oxidizing glycerol or succinate. Fresh cell suspensions exhibited moderate levels of endogenous respiration (Fig. 3). The addition of 5 µM dodine to cells suspended in distilled water and using glycerol as substrate resulted in a slight increase in the respiration rate, but higher concentrations induced a progressive decrease in O_2 consumption (Fig. 3). The alteration in the respiration rate was detected soon after the addition of the surfactant (Fig. 3). Treatment with 35 µM dodine resulted in a complete cessation of the O_2 uptake in 1 - 2 min (Fig. 3). Similar results were obtained with cells suspended in Na^+-DMGA buffer (Fig. 4). The O_2 uptake with succinate was inhibited at slightly higher dodine concentrations then the respiration with glycerol (Fig. 4). Similar results were obtained with crude dodine. The endogenous respiration of the cells was also progressively inhibited in this concentration range. After incubation with strong aeration for 5 - 9 h, at 22.5 °C, which caused no appreciable decrease in cell viability, the endogenous respiration of the cells was only slightly inferior to the initial respiration rate. In these partially-starved cells, complete inhibition of the O_2 uptake was also observed in the presence of glycerol or succinate with 35 - 40 µM dodine. Substantial reduction of the endogenous respiration was only achieved with

extensive periods of strong aeration (24 h), but this treatment caused a significant decrease in cell viability.

DISCUSSION.

It was previously shown that a brief treatment of *Pseudomonas syringae* cells with dodine concentrations higher than 30 - 40 μM resulted in rapid leakage of K^+, uv-absorbing materials and ribose-containing molecules, indicating extensive damage to the cytoplasmic membrane (Cabral, 1991). Interestingly, this concentration corresponds to the CMC of this surfactant (Cabral, J. P. S. & Smith, A. R. W., *Journal of Colloid and Interface Science*, submitted), which suggested that micelles are the main agent of the membrane-damaging activity of dodine. The present work was aimed to substantiate this hypothesis.

Potassium efflux is a good indicator of membrane damage (Lambert & Hammond, 1973). With flame photometry, it was previously shown that dodine induces K^+ loss from *P. syringae* cells (Cabral, 1991). The time course of K^+ efflux can be followed continuously using a K^+-sensitive electrode (Lambert & Hammond, 1973). The information yielded by this technique has been under-exploited since, invariably, only the crude values of the extracellular K^+ concentrations have been analyzed. In the present study, with the aim of detecting the influence of micellization on the process of K^+ release induced by dodine, a new parameter in the kinetics of the release of K^+ was considered: the maximum rate of K^+ efflux. It was indeed found that this rate increased sharply at 20 - 30 μM dodine. In addition, the total amount of K^+ released from the cells after 4 min of surfactant treatment also increased pronouncedly at the CMC.

In addition to the release of K^+ and inorganic phosphate, dodine also induced drastic alterations in the oxygen consumption by *P. syringae* cells with glycerol or succinate as substrates. The addition of 5 - 10 μM dodine resulted in a slight but significant increase in the respiration rate. This phenomenon has been described with other amphiphiles acting on other bacterial species; for example, long chain fatty acids on *Bacillus megaterium* and *Micrococcus lysodeikticus* (Galbraith & Miller, 1973); polymyxin E on *Pseudomonas aeruginosa*, and octapeptins on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* (Storm *et al.*, 1977); and it is thought to be the result of uncoupling of oxidative phosphorylation due to a permeabilization of the bilayer to protons (Dawes, 1986).

Treatment of *P. syringae* cells with dodine concentrations, ranging from 10 to 40 μM, resulted in a progressive inhibition of the O_2 consumption with glycerol. The oxidation of this substrate depends on the presence of intracellular NAD^+, $NADP^+$, FAD, Coenzyme A and TPP (Lessie & Phibbs, 1984; Schlegel, 1986). In previous work (Cabral, 1991) it was found that in this range of surfactant concentrations, increasing dodine concentration resulted in a concomitant increase in the amount of uv-absorbing materials and ribose-containing molecules released from the cells. These leaked metabolites could include coenzymes, suggesting that the inhibition of the O_2 consumption with glycerol could have been due (at least partially) to a drainage of the cofactors identified above from the cells. The metabolism of succinate is very different from that of glycerol, since it is oxidized to fumarate by succinate dehydrogenase, which is located in the cytoplasmic membrane, the resulting reducing equivalents being transferred directly to the respiratory chain (Dawes, 1986). The fact that dodine also inhibited the O_2 consumption with succinate suggests that the components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase were also inhibited by this surfactant. It should be pointed out that octylguanidine is a known potant inhibitor of the mitochondrial F_o-F_1 H^+-ATP synthase (Papa *et al.*, 1975; Pansini *et al.*, 1978). The fact that the O_2 consumption with glycerol was inhibited at dodine concentrations lower than that with succinate suggests that dodine inhibits respiration firstly by causing drainage of coenzymes, and then by a direct interaction with the components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase. Further studies are needed to confirm this hypothesis. Storm *et al.* (1977) also postulated that the inhibition of the bacterial respiration by polymyxins and octapeptins was primarly a consequence of membrane damage.

In artificial phospholipid membranes, it has been reported that when the amphiphile concentration reaches the CMC there is the formation of mixed micelles, composed of amphiphile and phospholipid molecules, with concomitant solubilization of the bilayer (Jackson *et al.*, 1982; Ollivon *et al.*, 1988). It would appear that the rapid and pronounced efflux of metabolites and complete arrest of respiration in *P. syringae* cells treated with dodine concentrations above approximately 25 - 30 μM, was the result of a gross damage to the cytoplasmic membrane, caused by the interaction between micelles of dodine and the phopholipid bilayer.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am especially indebted to Dr. M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto) and Dr. A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London) for guidance and helpful discussions, and for the modified method to assay inorganic phosphate. This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/C/CEN/67/90).

REFERENCES

CABRAL, J. P. S. 1991 Damage to the cytoplasmic membrane and cell death caused by dodine (dodecylguanidine monoacetate) in *Pseudomonas syringae* ATCC 12271. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* **35**, 341-344.

DAWES, E. A. 1986 *Microbial Energetics*. Glasgow and London: Blackie & Son Limited.

DIENER, U. L. & CARLTON, C. C. 1960 Dodine-captan combination controls bacterial spot of peach. *Plant Disease Reporter* **44**, 136-138.

GALBRAITH, H. & MILLER, T. B. 1973 Effect of long chain fatty acids on bacterial respiration and amino acid uptake. *Journal of Applied Bacteriology* **36**, 659-675.

HAMMOND, S. M. & LAMBERT, P. A. 1974 Interference with potassium-sensitive membrane electrodes by certain surface-active compounds. *Journal of Electroanalytical Chemistry and Interfacial Electrochemistry* **53**, 155-158.

HUGO, W. R. & LONGWORTH, A. R. 1964 Some aspects of the mode of action of chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 655-662.

JACKSON, M. L., SCHMIDT, C. F., LITMAN, B. J. & ALBERT, A. D. 1982 Solubilization of phosphatidylcholine bilayers by octyl glucoside. *Biochemistry* **21**, 4576-4582.

JEPSON, W. F. 1961 Melprex dodine: a new organic fungicide. *Mededelingen Landbouwhogeschool Opzoekingssta Staat Gent* **26**, 1365-1369.

LAMBERT, P. A. & HAMMOND, S. M. 1973 Potasium fluxes, first indication of membrane damage in micro-organisms. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **54**, 796-799.

LAMBERT, P. A. & SMITH, A. R. W. 1977 The mode of action of N-(*n*-dodecyl)diethanolamine with particular reference to the effect of protonation on uptake by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* **103**, 367-374.

LESSIE, T. G. & PHIBBS, P. V. 1984 Alternative pathways of carbohydrate utilization in pseudomonads. *Annual Review of Microbiology* **38**, 359-387.

LICHTENBERG, D. 1985 Characterization of the solubilization of lipid bilayers by surfactants. *Biochimica et Biophysica Acta* **821**, 470-478.

LICHTENBERG, D., ROBSON, R. J. & DENNIS, E. A. 1983 Solubilization of phospholipids by detergents. Structural and kinetic aspects. *Biochimica et Biophysica Acta* **737**, 285-304.

MURPHY, J. & RILEY, J. P. 1962 A modified single solution method for the determination of phosphate in natural waters. *Analytica Chimica Acta* **27**, 31-36.

OLLIVON, M., EIDELMAN, O., BLUMENTHAL, R. & WALTER, A. 1988 Micelle-vesicle transition of egg-phosphatidylcholine and octyl glucoside. *Biochemistry* **27**, 1695-1703.

PAPA, S., TUENA DE GÓMEZ-PUYOU, M. & GÓMEZ-POYOU, A. 1975 On the mechanism of action of alkylguanidines on the oxidative phosphorylation in mitochondria. *European Journal of Biochemistry* **55**, 1-8.

PANSINI, A., GUERRIERI, F. & PAPA, S. 1978 Control of proton conduction by the H^+-ATPase in the inner mitochondrial membrane. *European Journal of Biochemistry* **92**, 545-551.

RAY, S. & ADDY, S. K. 1976 Residue levels of dodine in relation to canker development in citrus trees. *Indian Phytopathology* **29**, 246-250.

RUIZ, J. R., GOÑI, F. M. & ALONSO, A. 1988 Surfactant-induced release of liposomal contents. A survey of methods and results. *Biochimica et Biophysica Acta* **937**, 127-134.

RYE, R. M. & WISEMAN, D. 1964 Release of phosphorus-32-containing compounds from *Micrococcus lysodeikticus* treated with chlorhexidine. *Journal of Pharmacy and Pharmacology* **16**, 516-521.

SALTON, M. R. J. 1951 The adsorption of cetyltrimethylammonium bromide by bacteria, its action in releasing cellular constituents and its bactericidal effects. *Journal of General Microbiology* **5**, 391-404.

SCHLEGEL, H. G. 1986 *General Microbiology*. Cambridge: Cambridge University Press.

SILVA, M. T., SOUSA, J. C. F., POLÓNIA, J. J. & MACEDO, P. M. 1979 Effects of local anesthetics on bacterial cells. *Journal of Bacteriology* **137**, 461-468.

STORM, D. R., ROSENTHAL, K. S. & SWANSON, P. E. 1977 Polymyxin and related peptide antibiotics. *Annual Review of Biochemistry* **46**, 723-763.

TOMLINSON, E., BROWN, M. R. & DAVIES, S. S. 1977 Effect of colloidal association on the measured activity of alkylbenzyldimethylammonium chlorides against *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Medical Chemistry* **20**, 1277-1282.

WORTHING, C. R. ed. 1979 *The Pesticide Manual. A World Compendium*. The British Crop Protection Council.

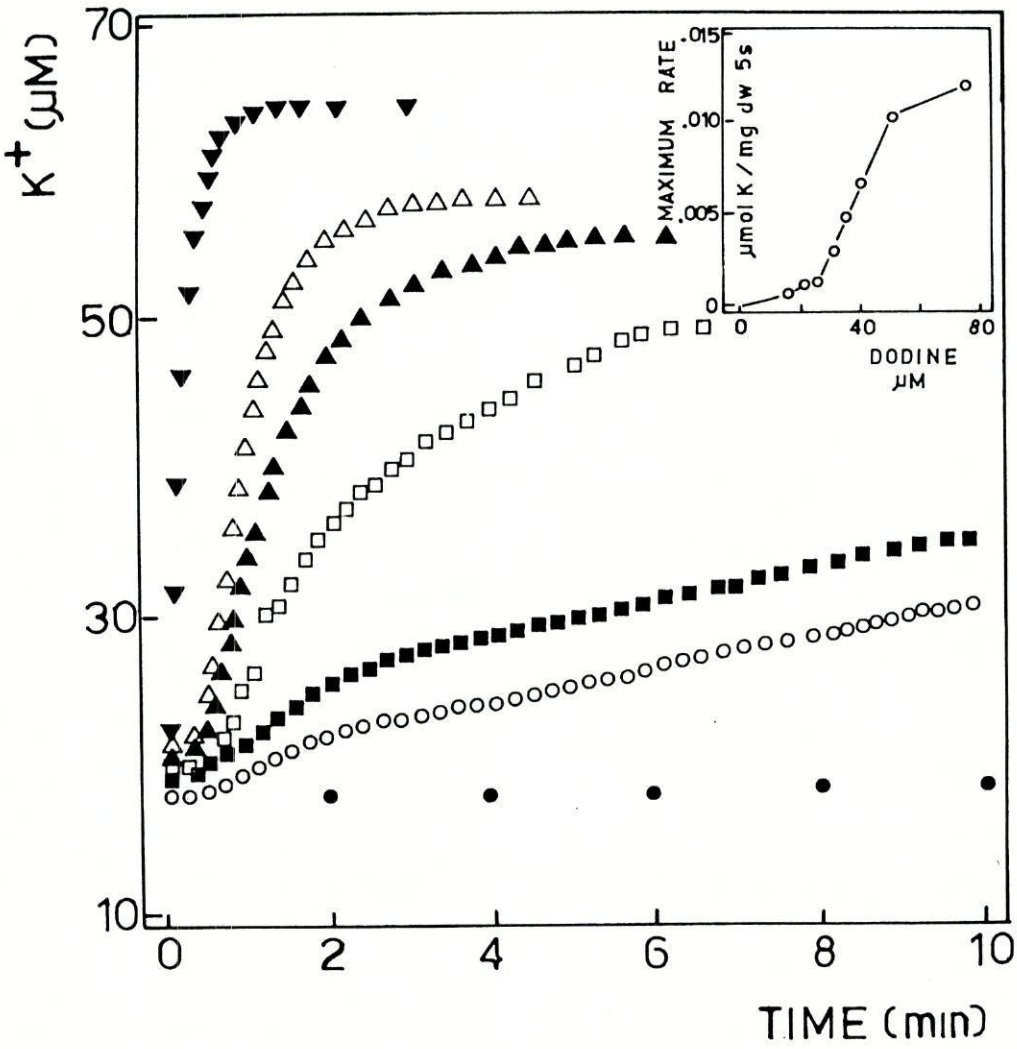


FIGURE 1 Time course of K^+ efflux induced by dodine in *P. syringae*. Cell suspensions in distilled water (pH 6.5) were treated with crude dodine at final concentrations ranging from 15 to 100 µM. The extracellular K^+ concentration was assayed with a K^+-sensitive electrode. Final concentrations of dodine were as follows: ○ 15 µM; ■ 20 µM; □ 30 µM; ▲ 40 µM; △ 50 µM; ▼ 100 µM; ● , control. Results from a representative experiment.

Inset: Maximum rate of K^+ efflux (µmol K^+ (mg dry wt)$^{-1}$ 5 s^{-1}) plotted against dodine concentration (µM). Results from four experiments. Mean coefficient of variation: 17 %.

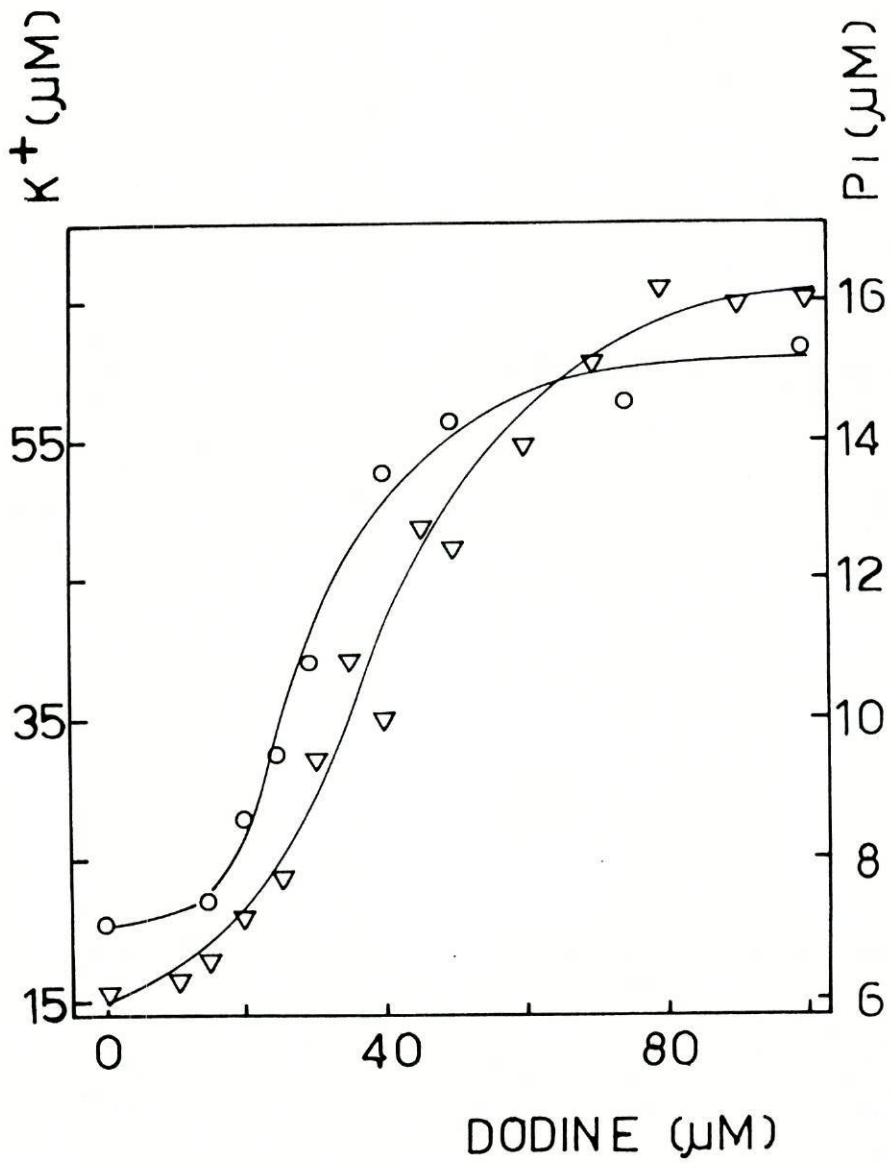


FIGURE 2 Leakage of K^+ (O) and inorganic phosphate (▽) induced by dodine in *P. syringae*. K^+ was assayed using a K^+-sensitive electrode, in cell suspensions in distilled water treated with crude dodine for 4 min. Inorganic phosphate was assayed as described in Methods in the supernatant of cell suspensions in Na^+-DMGA buffer treated with analytical grade dodine for 2 min.

Mean number of determinations per dodine concentration and mean coefficient of variation: K^+: 2.2, 10 %; P_i: 1.5, 8 %.

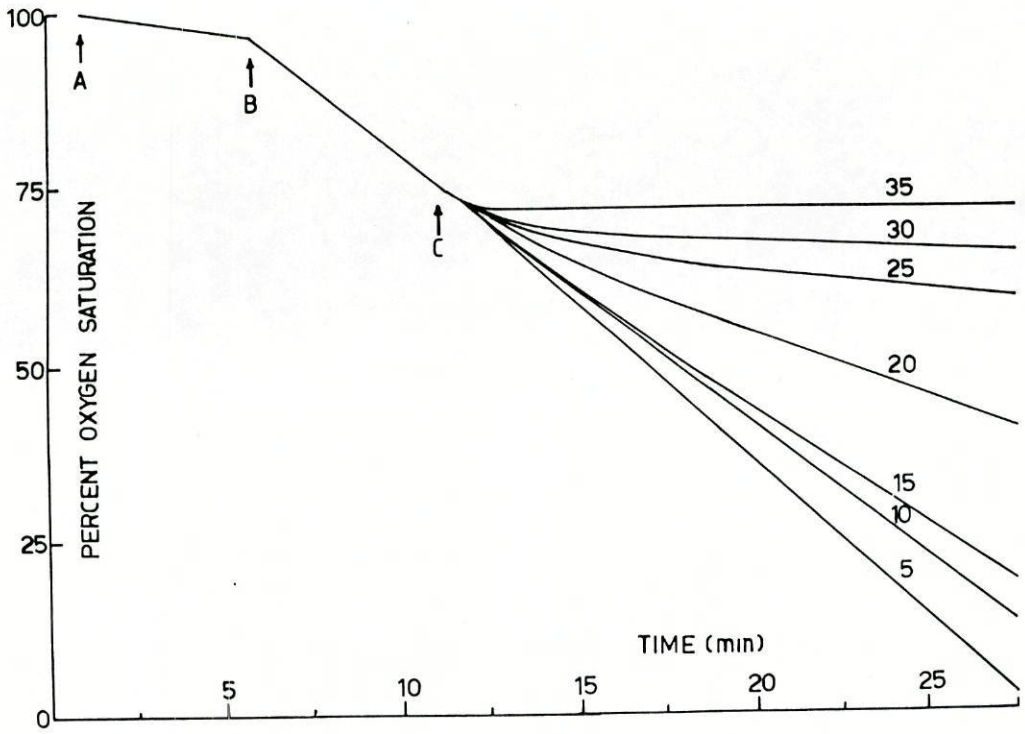


FIGURE 3 Effect of addition of various concentrations of analytical grade dodine upon the rate of glycerol oxidation by *P. syringae* cells suspended in distilled water. Cells were grown in a semi-synthetic medium containing salts, glycerol and yeast extract. Oxygen electrode traces were recorded after the addition of the cell suspension (A), 1 mM glycerol (B) and dodine (C). Numbers indicate the final concentrations of dodine applied (5 - 35 μM). Results from a representative experiment.

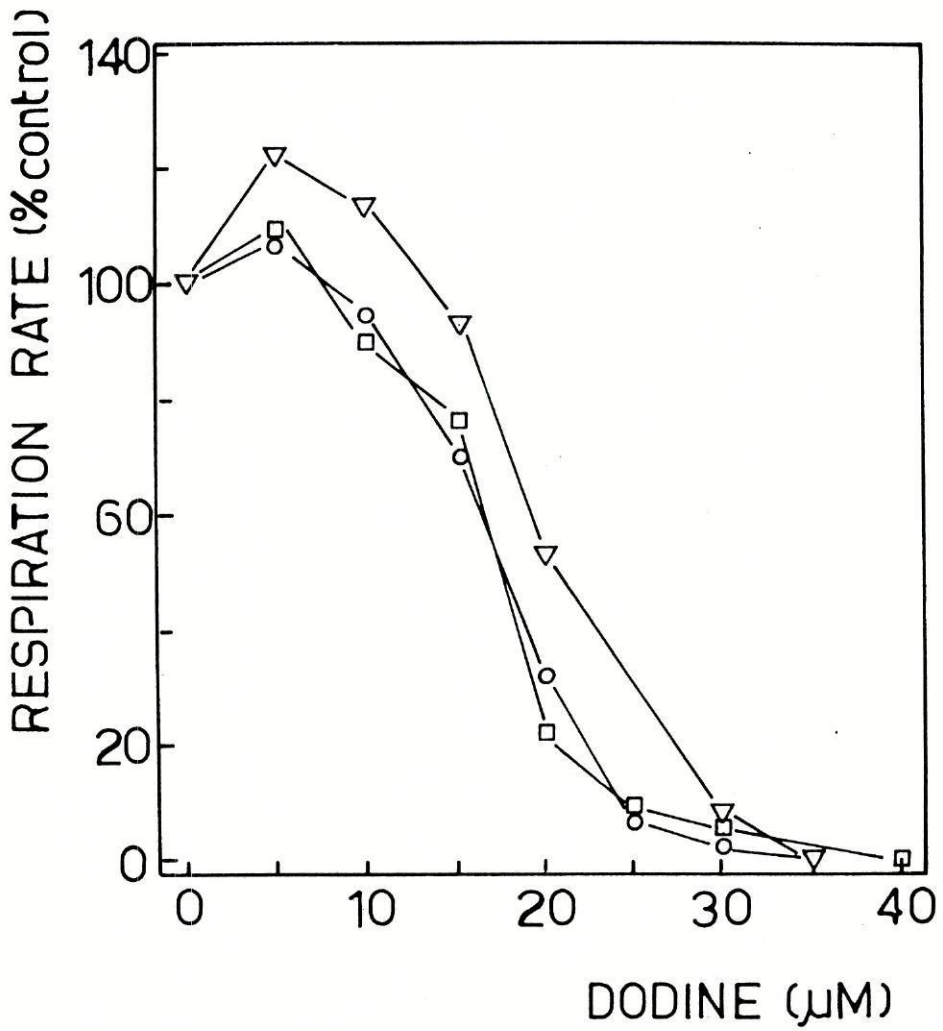


FIGURE 4 Respiration rate (% of control) of *P. syringae* cells in the presence of glycerol or succinate, plotted as function of dodine (analytical grade) concentration (μM). O , cells suspended in distilled water containing glycerol; □ , cells suspended in Na^+-buffer containing glycerol; ▽ , cells suspended in distilled water containing succinate. Substrate concentration, 1 mM. The respiration rates (μmol O_2 (mg dry wt)$^{-1}$ min^{-1}) of untreated suspensions were as follows: distilled water, with glycerol: 0.035 (n=10; CV=12 %); distilled water, with succinate: 0.028 (n=2; CV=6 %); Na^+-DMGA buffer, with glycerol: 0.021 (n=13; CV=22 %). Results from two to four experiments. Mean coefficients of variation: distilled water, glycerol: 17 %; distilled water, succinate: 16 %; Na^+-DMGA buffer, glycerol: 18 %.

TRABALHO VIII

THE ANTIBACTERIAL ACTION OF CUPRIC IONS IN *PSEUDOMONAS SYRINGAE* *).

1. SUMMARY

Cu^{2+} was bactericidal to the phytopathogenic bacterium *Pseudomonas syringae* in the micromolar range. Cu^{2+} also inhibited O_2 consumption with glycerol, glucose or succinate as substrates, but at concentrations lower than those that caused death. The patterns of the alterations in the respiration of these substrates were very similar. Treatment of the cells with 5 - 10 μM Cu^{2+} resulted in an increase in the respiration rate, but higher concentrations were inhibitory. Complete cessation of the respiration was observed with 20 - 25 μM Cu^{2+}. The results suggest that Cu^{2+} inhibit components of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase. Previous reports from this laboratory have shown that Cu^{2+} also induce acute K^+ loss in *P. syringae*. In the present study, it was found that most of the cells that had completely blocked respiration and lost most of the intracellular unbound K^+, when transferred to nutrient agar, gave rise to colonies, suggesting that these phenomena were reversible. This hypothesis was supported by the observation that the chelating agents, diethyldithiocarbamate or ethylenediaminetetraacetic acid, were able to restore the respiration and to stop the release of K^+ in Cu^{2+}-treated cells. It would appear that the constituents of the plating medium were able to remove the copper ions from the inhibitory sites.

2. INTRODUCTION

Pseudomonas syringae is one of the most important phytopathogenic bacteria, having a very wide host range, causing spots and necrosis of leaves, twigs and fruits, and stem cankers [1]. Copper compounds have been used for centuries in the control of plant diseases [2], and are effective in the control of several diseases caused by *P. syringae* [3-5].

---

*) Trabalho aceite para publicação na revista *FEMS Microbiology Letters*.

In a very wide range of bacterial species, cupric ions show, in vitro, very high bactericidal activity [6-9], but the mechanism of action of Cu^{2+} as antibacterial agent is not fully understood. Cupric ions can inhibit several enzymes and metabolic pathways in bacterial cells [10-18], and in *P. syringae* induce plasmolysis, leakage of K^+ and low molecular mass metabolites, and cause cell death [19-21].

The aims of this work were to study the action of Cu^{2+} in the respiration of *P. syringae* cells, and to correlate this with the bactericidal activity and K^+ loss.

3. MATERIALS AND METHODS

3.1. Culture and cell suspensions.

Pseudomonas syringae ATCC 12271 was grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6.2). At the end of the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in 10 mM Na^+-Pipes buffer (pH adjusted to 6.5 with NaOH). The OD_{568} was adjusted to 1.06. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10, and the final suspension had concentration of 0.28 (mg dry weight of cells) ml^{-1} (10^9 cfu ml^{-1}).

3.2. Lethality studies.

Cell suspensions were treated with 5 - 100 µM $CuSO_4$. After 1 - 15 min, samples were withdrawn and serially diluted in distilled water prior to plating on nutient agar (Difco) plates. The colonies were counted after 3 days at room temperature. The values of the parameters of the equation, Probit of the percentage of dead cells vs. $\log_{10}$ Cu^{2+} concentration, were determined using the iterative weighted regression analysis by the maximum likelihood method proposed by Finney [22]. The original computer program of Davies [23] in Fortran IV was adapted to Mallard Basic (Amsoft, England) and ran in a Amstrad PCW 8256 computer working in single precision. The values of the LDs, for each time of exposure to Cu^{2+}, were calculated from the regression equation.

3.3. K^+ leakage experiments.

The release of K^+ from the cells was followed using a K^+ specific electrode (Metrohm EA 301-K), with a reference electrode (Metrohm 6.0726.100), and the

potential derived was monitored in a pH/mV meter (Metrohm 654). All experiments were carried out in a thermostatically-controlled vessel (22.5 ± 0.1 °C).

3.4. Effect of Cu^{2+} on the O_2 consumption in the presence of various substrates.

Oxygen uptake was measured polarographically by use of a Clark-type oxygen electrode (Rank Brothers, Cambridge, England), calibrated with fully-aerated Pipes buffer (for 100 % oxygenation) and sodium dithionite solution (for 0 % oxygenation). The fully-oxygenated cell suspension (2.7 ml) was pipetted into the electrode chamber maintained at 22.5 ± 0.1 °C, and the system was hermetically sealed. Substrate (final concentration, 1 mM) was then added, and after 15 - 25 % of the available oxygen had been consumed, $CuSO_4$ was added to a final concentration ranging from 5 to 30 µM.

4. RESULTS AND DISCUSSION

Previous observations from this laboratory on the bactericidal activity of Cu^{2+} in *P. syringae* [19] have been extended in the present study by the determination of lethal doses. Cu^{2+} exhibited high bactericidal activity against *P. syringae* cells in the µmolar range (Table 1). Similar results have been reported by several authors in a very wide range of bacterial species [6,7,9,24], suggesting that the killing of the cells by very low concentrations of Cu^{2+} is probably a common phenomenon in bacteria.

It has been reported that Cu^{2+} are potent inhibitors of several enzymes and metabolic pathways in bacterial cells [11-14,16-18]. With the aim to identify possible causes of death in *P. syringae* cells treated with $CuSO_4$, the action of this salt in the respiration of various substrates was studied.

Fresh cell suspensions exhibited moderate levels of endogenous respiration (0.006 µmol O_2 (mg dry wt.)$^{-1}$ min^{-1}). In the presence of 1 mM glycerol, succinate or glucose, the rate of O_2 consumption (µmol O_2 (mg dry wt.)$^{-1}$ min^{-1}) rose to 0.034, 0.019 and 0.021, respectively. The addition of Cu^{2+} to *P. syringae* cells using glycerol, succinate or glucose, resulted in very similar patterns of alterations in the rates of O_2 consumption. The addition of 5 - 10 µM Cu^{2+} resulted in a significant increase in the respiration rate, but higher concentrations were inhibitory (Fig. 1). Complete cessation of the O_2 consumption was observed with 20 - 25 µM

Cu^{2+}. After incubation with strong aeration for several hours, which caused no appreciable decrease in cell viability, the endogenous respiration was only slightly inferior to the initial respiration rate. Substancial reduction of the endogenous respiration was only achieved with very extended periods of strong aeration (24 h), but this was found to cause a significant decrease in cell viability.

The increase in the respiration rate by drug treatment is thought to be the result of an uncoupling of the oxidative phosphorylation due to the permeabilization of the cytoplasmic membrane to protons [25]. The metabolism of the substrates used in the present study follow different routes. Glycerol and glucose are transported into the cells, and then dehydrogenated mainly via the Entner-Doudoroff pathway and then in the TCA cycle [26], but succinate is directly oxidized to fumarate by succinate dehydrogenase, which transfers the resultant reducing equivalents to ubiquinone [25]. The inhibition of the O_2 consumption could have been due to an inhibition of the transport of the substrate into the cells, an inhibition of the intracellular catabolism, namely by drainage of coenzymes and cofactors, and/or an inhibition of components of the respiratory chain or the H^+-ATP synthase. In a recent report from this laboratory [20] it was shown that treatment of *P. syringae* cells in this range of Cu^{2+} concentrations resulted in a restricted release of UV-absorbing materials and ribose-containing molecules, therefore suggesting that a drainage of coenzymes was not involved in the inhibition of the respiration caused by Cu^{2+}. The fact that the respiration of glycerol, glucose and succinate were inhibited at similar Cu^{2+} concentrations suggests that this phenomenon was due to an inhibition of the respiratory chain and/or the H^+-ATP synthase.

The metabolism of copper-injured bacterial cells was studied by Domek *et al.* [15,24], who found that these cells exhibited a marked reduction in the respiration of glucose or lactose. The effect of Cu^{2+} on mitochondrial metabolism was studied by Cederbaum & Wainio [27], who concluded that the succinate dehydrogenase and the NADH-ubiquinone segment of the respiratory chain (complex I) were inhibited by µmolar concentrations of Cu^{2+}, but much higher Cu^{2+} concentrations were needed to inhibit the F_oF_1 H^+-ATP synthase. Considering the similarity between the respiratory apparatus of bacteria and mitochondria, it is tempting to suggest that Cu^{2+} inhibit the respiration by interacting with components of the respiratory chain before the quinone pool.

A comparison of the results of the action of Cu^{2+} on the respiration and viability in *P. syringae* led to the observation that Cu^{2+} concentrations (20 - 25

μM) that completely inhibited the respiration were only slightly bactericidal (Table 1), i. e., *P. syringae* cells can have the respiration completely blocked, but, when plated on nutrient agar most gave rise to colonies. These results suggest that in this range of Cu^{2+} concentrations, the inhibition of the respiration was, at least partially, a reversible phenomenon. To test this hypothesis, *P. syringae* cells respiring glycerol were treated with 20 μM Cu^{2+}, and after a variable period of time, the copper-chelator sodium diethyldithiocarbamate (DDC) was added. It was indeed found that this post-treatment restored the O_2 consumption with glycerol, this effect decreasing with increasing the time between both treatments (Fig. 1, inset). EDTA was also found to restore the respiration of glycerol, but less efficiently then DDC. Cederbaum & Wainio [27] also observed that the inhibition of the respiration of mitochondria by Cu^{2+} could be completely relieved by the addition of metal chelators, such as EDTA.

In previous reports from this laboratory [19-21] it was shown that Cu^{2+} are potent inducers of K^+ loss from *P. syringae* cells. A treatment with 20 μM Cu^{2+} resulted in the release of most of the intracellular unbound K^+ in less than 15 min of treatment. It is now shown that this treatment was only slightly bactericidal, since more than 75 % of the Cu^{2+}-treated cells gave rise to colonies (Table 1). It is now accepted that K^+ ions fulfil crucial roles in bacterial metabolism (see for instance refs. 28-30). It is therefore difficult to envisage how K^+-depleted *P. syringae* cells could have grow, unless they were able to re-accumulate K^+ when plated on nutrient agar. Support of the hypothesis that Cu^{2+}-induced K^+ efflux was a reversible phenomenon, came from the study of the action of DDC on this process. It was found (Fig. 2) that some seconds after the addition of DDC, the Cu^{2+}-induced K^+ efflux completely stopped. Similar results were obtained with EDTA.

Several authors have reported that DDC is able to remove completely the copper ions from the Cu-Zn superoxide dismutase [31-33]. On the other hand, the medium used for plating *P. syringae* Cu^{2+}-treated cells, nutrient agar, is a rich medium containing peptone, and proteins have generally high affinity for cupric ions [34]. The most likely explanation for the results shown in the present study is that DDC and the constituents of the plating medium, namely peptone, removed the copper ions from the sites involved in the inhibition of the respiration and the induction of K^+ efflux. These results emphasize the importance of the conditions used for assessing the viability in copper-treated cells. Further studies are needed to confirm these hypothesis.

The results presented in this and previous studies [19-21] indicate that Cu^{2+},

in the micromolar range of concentrations, induce K^+ leakage, inhibit the respiration and cause death in *P. syringae* cells. However, in this range of Cu^{2+} concentrations, the release of inorganic phosphate, UV-absorbing materials and ribose-containing molecules was very rectricted. It appears therefore that Cu^{2+} affect only some functions of the cytoplasmic membrane of *P. syringae* cells.

ACKNOWLEDGEMENTS

I am especially indebted to Dr. M. T. Silva (Centro de Citologia Experimental da Universidade do Porto) and Dr. A. R. W. Smith (Thames Polytechnic, London) for guidance and helpful discussions. This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/C/CEN/67-90).

REFERENCES

[1] Bradbury, J. F. (1986) Guide to Plant Pathogenic Bacteria, CAB International Mycological Institute, Kew.

[2] Horsfall, J. G. (1956) Principles of Fungicidal Action, chapter I, Chronica Botanica Company, Waltham.

[3] Colin, K. C. and McCarter, S. M. (1983) Plant Dis. 67, 639-644.

[4] Tamietti, G. and Garibaldi, A. (1984) in Phytobacteriology and Plant Diseases of Quarantine Significance, pp. 69-76. Italian-US Workshop/Seminar - Plant Pathology and Quarantine. Rome.

[5] Colin, J. E. and Chafik, Z. (1986) Plant Dis. 70, 1048-1050.

[6] Shankar, K. and Bard, R. C. (1952) J. Bacteriol. 63, 279-290.

[7] Schreiber, D. R., Gordon, A. S. and Millero, F. J. (1985) Can. J. Microbiol. 31, 83-87.

[8] Evans, S. L., Tolbert, C., Arceneaux, J. E. L. and Byers, B. R. (1986) Antimicrob. Agents Chemother. 29, 342-343.

[9] Jonas, R. B. (1989) Appl. Environ. Microbiol. 55, 43-49.

[10] Kleiner, D. (1978) FEBS Lett. 96, 364-366.

[11] Van Heerikhuizen, H., Albracht, S. P. J., Slater, E. C. and Van Rheenen, P. S. (1981) Biochim. Biophys. Acta 657, 26-39.

[12] Adams, M. W. W. and Mortensen, L. E. (1984) J. Biol. Chem. 259, 7045-7055.

[13] Green, J., Prior, S. D. and Dalton, H. (1985) Eur. J. Biochem. 153, 137-144.

[14] Sawers, R. G. and Boxer, D. H. (1986) Eur. J. Biochem. 156, 265-275.

[15] Domek, M. J., Robbins, J. E., Anderson, M. E. and McFeters, G. A. (1987) Can. J. Microbiol. 33, 57-62.

[16] Lowe, J. A., Chan, Y. M. and Tsang, J. C. (1987) Microbios 51, 71-80.

[17] Schindler, F. and Winter, J. (1987) Biochim. Biophys. Acta 913, 81-88.

[18] Fernandez, V. M., Rua, M. L., Reyes, P., Cammack, R. and Hatchikian, E. C. (1989) Eur. J. Biochem. 185, 449-454.

[19] Cabral, J. P. S. (1989) Microbios 60, 141-150.

[20] Cabral, J. P. S. (1990) FEMS Microbiol. Lett. 72, 109-112.

[21] Cabral, J. P. S. (1990) J. Gen. Microbiol. 136, 2481-2487.

[22] Finney, D. J. (1952) Probit Analysis. 2nd edn. Cambridge University Press, Cambridge.

[23] Davies, R. G. (1971) Computer Programming in Quantitative Biology, chapter 14, Acadamic Press, New York and London.

[24] Domek, M. J., LeChevallier, M. W., Cameron, S. C. and McFeters, G. A. (1984) Appl. Environ. Microbiol. 48, 289-293.

[25] Dawes, E. A. (1986) Microbial Energetics, Blackie, Glasgow and London.

[26] Lessie, T. G. and Phibbs Jr., P. V. (1984) Ann. Rev. Microbiol. 38, 359-387.

[27] Cederbaum, A. I. and Wainio, W. W. (1972) J. Biol. Chem. 247, 4604-4614.

[28] Lubin, M. and Ennis, H. L. (1964) Biochim. Biophys. Acta 80, 614-631.

[29] Ennis, H. L. and Lubin, M. (1965) Biochim. Biophys. Acta 95, 605-623.

[30] Rhoads, D. B., Wood, A. and Epstein, W. (1977) Biochim. Biophys. Acta 469, 45-51.

[31] Misra, H. P. (1979) J. Biol. Chem. 254, 11623-11628.

[32] Cocco, D., Calabrese, L., Rigo, A., Argese, E. and Rotilio, G. (1981) J. Biol. Chem. 256, 8983-8986.

[33] Cocco, D., Calabrese, L., Rigo, A., Marmocchi, F. and Rotilio, G. (1981) Biochem. J. 199, 675-680.

[34] Gurd, F. R. N. and Wilcox, P. E. (1956) Adv. Protein Chem. 11, 311-427.

TABLE 1

Lethal Doses for killing 25, 50 and 90 % (LD_{25}, LD_{50}, LD_{90}) of the initial population of *P. syringae* cells suspended in 10 mM Na^+-Pipes buffer (pH 6.5) and treated with $CuSO_4$*.

Time of exposure (min)	LD_{25} (μM)	LD_{50} (μM)	LD_{90} (μM)
1	49	65	111
10	33	47	87
15	32	41	69

---

* Cell suspensions with 10^9 cfu ml^{-1} were treated with Cu^{2+} concentrations ranging from 5 to 100 μM. At intervals, samples were withdrawn, diluted in distilled water, and plated on nutrient agar (Difco). The mean number of determinations per Cu^{2+} concentration varied between 2.3 and 2.7. The parameters of the equation Probit (% of dead cells) vs. $\log_{10}$ (Cu^{2+} concentration in μM) were determined by iterative weighted regression analysis [22], using the computational scheme of Davies [23]. The LDs, for each time of exposure to Cu^{2+}, were calculated from the regression equation.

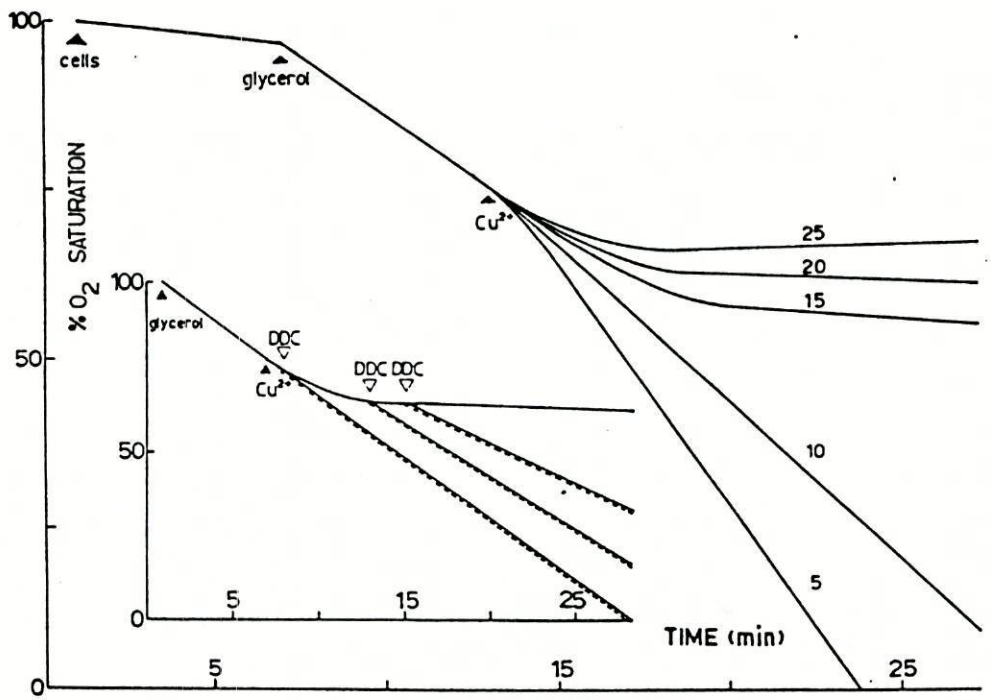


FIGURE 1 Effect of addition of various concentrations of Cu^{2+} upon the rate of O_2 consumption with glycerol by *P. syringae* cells suspended in Na^+-Pipes buffer (pH 6.5). Cells were grown in a semi-synthethic medium containing salts, glycerol and yeast extract. Oxygen electrode traces were recorded after the adition of the cell suspension, 1 mM glycerol and $CuSO_4$. Results from a representative experiment.

Inset: Effect of a post-treatment with sodium diethyldithiocarbamate (DDC) on the O_2 consumption with glycerol in Cu^{2+}-treated *P. syringae* cells suspended in Na^+-Pipes buffer. DDC (200 µM) was added 1, 6 or 8 min after the addition of 20 µM Cu^{2+}. Results from a representative experiment.

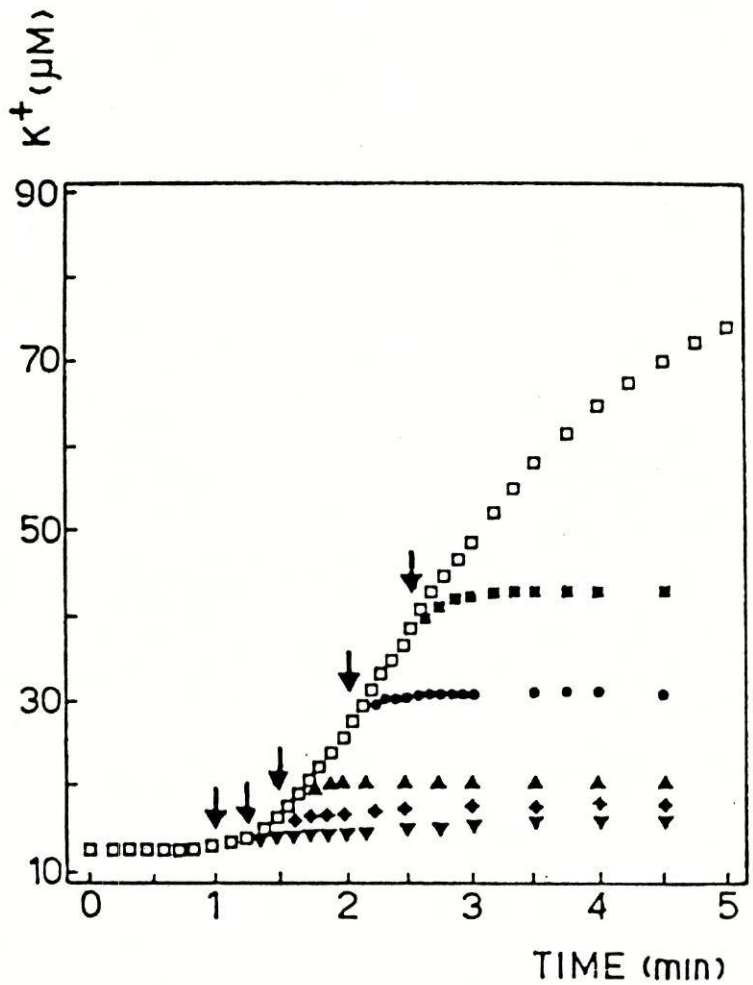


FIGURE 2 Effect of a post-treatment with sodium diethyldithiocarbamate (DDC) on the Cu^{2+}-induced K^+ efflux in *P. syringae* cells suspended in Na^+-Pipes buffer. Cu^{2+} (20 µM) was added at time zero, and DDC (200 µM), 60 (▼), 75 (◆), 90 (▲), 120 (●) or 150 (■) s after. K^+ was assayed in the supernatant using a K^+-specific electrode. Results from a representative experiment.

TRABALHO IX

SELECTIVE BINDING OF METAL IONS TO *PSEUDOMONAS SYRINGAE* CELLS *).

ABSTRACT

According to the binding capacity of *Pseudomonas syringae* cells, the metal ions tested in this study formed three groups: Ca^{2+} and Mg^{2+}; Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}; Cu^{2+} and Hg^{2+}. Treatment of the cells with Ca^{2+} or Mg^{2+} did not result in significant binding of these metals. The uptake of Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}, followed the Langmuirian type, the cells being saturated with approximately 0.1 µmol (mg dry wt)$^{-1}$. On the contrary, the amount of bound Cu^{2+} and Hg^{2+} increased with increasing initial concentration and exceeded 0.3 µmol (mg dry wt)$^{-1}$, still below the saturation level. The order of affinity of the metals for *P. syringae* cells was similar to the one for unidentate binding to simple molecules such as acetate, adenosine-monophosphate, cysteine and imidazole, and for chelate formation, suggesting that binding of the metals to *P. syringae* cells was mainly governed by these types of bonds. In the presence of Hg^{2+} or N-ethylmaleimide, there was a significant decrease in copper binding suggesting that sulfhydryl groups were involved in the binding of Cu^{2+} to *P. syringae* cells.

With low Cu^{2+} or Hg^{2+} concentration (200 µM), cells bound more than 45 % of the available metal in solution, corresponding to more than 2 and 6 % (respectively) of their dry weight. The results indicate that *P. syringae* cells are potential candidates for biosorbents of these metals in polluted environmental systems.

INTRODUCTION

Pseudomonas syringae is one of the most important phytopathogenic bacteria, having a very wide host range, and causing spots and necrosis of leaves, twigs and fruits, and stem cankers (Bradbury, 1986). *P. syringae* has also been found on the surface of weeds and in plant refuse (Latorre and Jones, 1979).

---

*) Trabalho submetido para publicação.

Micro-organisms can bind significant amounts of metals from solution (Tobin *et al.*, 1984; Hughes and Poole, 1989). Metal ions can bind to unidentate (single) ligands or through chelation (Gurd and Wilcox, 1956; Brill, 1977; Sigel and Martin, 1982; Hughes and Poole, 1989). Although bacterial cells are composed of a multitude of molecular species, there are only few functional groups available for metal binding (Gurd and Wilcox, 1956; Passow *et al.*, 1961; Brill, 1977; Hughes and Poole, 1989). Metal ions exhibit very different affinities for these binding sites (Gurd and Wilcox, 1956; Passow *et al.*, 1961; Sillén and Martell, 1964, 1971; Hughes and Poole, 1989), and these affinities can be expected to determine the extent of binding to the cells. In the present study, the metal binding capacity of *P. syringae* cells is compared with the affinity of the metals for unidentate binding to small molecules and for chelate formation.

Heavy metal pollution is an important problem of modern world, since there is a daily output to the environment of significant amounts of metals, and most of these are highly toxic to all living systems and are not easily biotransformed (Gadd and Griffiths, 1978; Hughes and Poole, 1989; Gadd, 1990). Micro-organisms have been used to remove metal ions from polluted environmental systems, but most of the studies have been concerned with the use of fungal and algal cells in the removal of radionuclides (Hutchins *et al.*, 1986; Hughes and Poole, 1989; Gadd, 1990). In the present study, with low initial concentrations of Cu^{2+} and Hg^{2+}, *P. syringae* cells bound high amounts of these metals, suggesting that these cells are strong biosorbents of copper and mercury.

MATERIALS AND METHODS

Culture and cell suspensions. *Pseudomonas syringae* ATCC 12271 was grown in a medium containing (per litre of distilled water): 0.5 g $NH_4H_2PO_4$, 0.5 g K_2HPO_4, 0.5 g NaCl, 0.2 g $MgSO_4.7H_2O$, 5 g yeast extract (Difco) and 5 g glycerol (pH 6.2). Cultures (100 ml) in 250 ml Erlenmeyer flasks were incubated with orbital shaking at 27 °C. At the end of the exponential phase, cells were harvested by centrifugation, and washed and suspended in 10 mM Na^+-PIPES buffer. The absorbance (at 568 nm, 1 cm light path) was adjusted to 1.06. In all experiments this cell suspension was diluted 9:10, and the final suspension had concentration of 0.28 (mg dry weight of cells) ml^{-1}.

Metal binding experiments. All glassware (Pyrex) was cleaned with detergent, immersed in diluted HNO_3-H_2SO_4 for 1 day, thoroughly washed with distilled water and dried before use. Cell suspensions (10 ml) were treated with $CaCl_2$, $CdSO_4$, $CuSO_4$, $HgCl_2$, $MgCl_2$, $NiSO_4$ or $ZnSO_4$ at room temperature (21 - 23 °C). After 30 min, cells were harvested by centrifugation, washed with 10 ml PIPES buffer, and recentrifuged. The pellets were treated with diluted HNO_3 (20 %, v/v) and autoclaved at 121 °C for 20 min. The metals were assayed by atomic absorption spectrometry, using a Varian 1250 spectrometer with an air-acetylene flame, working at (nm): 422.7 (Ca), 228.8 (Cd), 327.4 (Cu), 253.7 (Hg), 285.2 (Mg), 232 (Ni), 213.9 (Zn). Using this technique, the detection limit of the metals was (nmol (mg dry wt.)$^{-1}$): 2 (Ca), 0.4 (Cd), 1 (Cu), 13 (Hg), 0.3 (Mg), 15 (Ni) and 0.3 (Zn).

Statistical analysis. Overall comparisons of treatment means were carried out using analysis of variance according to the layout of Campbell (1967). Multiple comparisons of the means were carried out using the Duncan's multiple range test according to Steel and Torrie (1981). All the calculations were carried out in a Amstrad PCW 8256 computer, working in single precision.

RESULTS AND DISCUSSION

The binding of metal ions to *Pseudomonas syringae* cells is shown in Fig. 1, where bound concentrations are plotted against initial concentrations in the supernatant. The results clearly indicate that, according to the binding capacity of the cells, the divalent metal ions tested in this study formed three groups: Ca^{2+} and Mg^{2+}; Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}; Cu^{2+} and Hg^{2+}.

Control (untreated) *P. syringae* cells showed significant levels of calcium and magnesium, but no detectable amounts of cadmium, copper, mercury, nickel and zinc. Whereas the treatment of *P. syringae* cells with 25 - 100 µM Ca^{2+} or Mg^{2+}, did not result in significant binding of these alkaline earth metal ions, the addition of Cd^{2+}, Cu^{2+}, Hg^{2+}, Ni^{2+} or Zn^{2+} resulted in the binding of considerable amounts of these metals. The amount of bound copper and mercury increased with increasing the initial concentration, reaching levels higher than 0.3 µmol (mg dry wt)$^{-1}$, whereas the uptake of Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+} did not increase beyond approximately 0.1 µmol (mg dry wt)$^{-1}$. Uptake isotherms (not shown) of Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}, were of the «Langmuirian» type, and those of Cu^{2+} and Hg^{2+} of the «S» type, in the classi-

fication system of Giles *et al.* (1960).

Metal ions can bind to organic molecules by unidentate (single) binding or through chelation (Gurd and Wilcox, 1956; Brill, 1977; Hughes and Poole, 1989). Although the strength of binding in chelates is generally much greater than that of unidentate binding (Gurd and Wilcox, 1956; Hughes and Pole, 1989), the number of chelate sites in a cell will probably be very small in comparison with the number of groups involved in unidentate binding (cf. Gurd and Wilcox, 1956). Although bacterial cells are very complex entities, composed of a multitude of different molecular species, there are only few sites available for unidentate metal binding, and these are, at a pH near neutrality, mainly the carboxylate, phosphate, sulfhydryl and imidazole goups, the amine being effective only at alkaline pH, and the amide groups only through chelation (Gurd and Wilcox, 1956; Passow *et al.*, 1961; Brill, 1977; Sigel and Martin, 1982; Tobin *et al.*, 1984; Hughes and Poole, 1989). An approximate quantification of the affinities of metal ions for these functional groups can be made using the stability constants of the complexes between the metals and simple molecules such as acetate, adenosine-monophosphate, cysteine and imidazole (Gurd and Wilcox, 1956), and these are presented in Table 1. It is striking the similitude between the affinities of the metals for these molecules and for *P. syringae* cells. Among the metal ions tested, Cu^{2+} and Hg^{2+} have the highest affinity for all the functional groups and were those bound by the cells in larger amounts. Ca^{2+} and Mg^{2+} showed opposite behaviour, and Cd^{2+}, Ni^{2+} and Zn^{2+}, an intermediate position. Interestingly, the affinity of metal ions for chelate formation follows a similar general order (Gurd and Wilcox, 1956): $Hg^{2+} > Cu^{2+} > Ni^{2+} > Zn^{2+} > Cd^{2+} > Mg^{2+}$. In particular in proteins, binding of metals to the amide group is only significantly achieved through chelation, and this generally involves substitution of a nitrogen bound amide hydrogen, for which metals exhibit the following order of effectiveness (Sigel and Martin, 1984): $Cu^{2+} > Ni^{2+} >> Zn^{2+}$, the alkaline earth metal ions not being effective. It would appear therefore that unidentate binding and chelation are determinant factors in the uptake of these metals by *P. syringae* cells. Nakajima *et al.* (1981) also found that the amount of Cu^{2+} bound by the cells of *Chlorella regularis* was far higher than the amount of Zn^{2+}, Cd^{2+} and Ni^{2+}. The fact that control cells showed significant levels of calcium and magnesium, but no detectable amounts of the other metal ions, most probably reflects the compositon of the growth medium, which has only trace amounts of the later metals.

The data presented in Table 1 predicts that sulfhydryl groups will probably

be among the first sites of Cu^{2+} binding (*cf.* Gurd and Wilcox, 1956). If this is the case, blocking of these groups should result in a decrease in Cu^{2+} binding. To test this hypothesis, *P. syringae* cells were pre-treated with Hg^{2+} or N-ethylmaleimide (NEM), $CuSO_4$ was then added, and the amount of copper bound was compared with unpre-treated cells. The addition of 25 - 100 µM Hg^{2+}, 2 - 30 min before Cu^{2+}, indeed resulted in a significant decrease in copper binding (Table 2). The mean decrease was 0.014 µmol Cu^{2+} (mg dry wt)$^{-1}$, approximately 10 % of total binding. There was no significant difference between the effect of 25 µM Hg^{2+} and 100 µM NEM (not shown). In contrast, in the presence of 100 µM $CaCl_2$ or $MgCl_2$, no significant decrease in copper binding was observed (not shown). Hg^{2+} has very high affinity for sulphydryl groups, but can bind to other functional groups (Table 1), whereas NEM can be considered to be a sulfhydryl-specific reagent (Ji, 1983). The fact that there was no significant difference between the various treatments with Hg^{2+} and NEM, suggest that only the sulfhydryl groups of the cells were affected by these treatments. The interaction between copper and the mitochondria of animal cells was studied by Cederbaum & Wainio (1972a, 1972b), who also found that in the presence of sulphydryl blocking agents (Hg^{2+} and *p*-chloromercuribenzoate), the amount of bound Cu^{2+} was significantly reduced.

In the present study, it was found that with relatively low initial metal ion concentrations, *P. syringae* cells could bind high amounts of Cu^{2+} and Hg^{2+}. With 200 µM, cells bound more than 45 % of the metal added, which corresponded to more than 2 and 6 % of their dry weight in copper and mercury, respectively, and these amounts were far from the saturation level. The accumulation of Cu^{2+} by different micro-organisms has been studied (Baldry and Dean, 1980; Tobin *et al.*, 1984; Rome and Gadd, 1987). Baldry & Dean (1980) reported that in the presence of 78 µM Cu^{2+}, in the great majority of 198 strains of bacteria, moulds and yeasts, bound copper levels were lower than 0.3 % of the cell dry weight. However, with higher Cu^{2+} concentrations in the growing medium, some bacterial strains could accumulate this metal more than 0.5 % of the cell dry weight. Tobin *et al.* (1984) reported saturation of *Rhizopus arrhizus* biomass with 0.2 µmol Cu^{2+} (mg dry wt)$^{-1}$, and Rome & Gadd (1987) found that the mycelium of *Rhizopus arrizus*, *Cladosporium resinae* and *Penicillium italicum* could bind approximately (µmol Cu^{2+} (mg dry wt)$^{-1}$): 0.150, 0.250 and 0.120, respectively. It should be pointed out that in these studies different experimental conditions (namely the composition and pH of the suspending medium and initial Cu^{2+} concentrations) were used, and therefore the results can not be directly compared (cf. Hughes and Poole, 1989). Nonetheless, these results do

indicate that micro-organisms (in particular *P. syringae*) can uptake considerable amounts of copper, and can probably be used as biosorbents of this metal in polluted environmental systems. Further work is needed in this area.

ACKNOWLEDGMENTS

I am especially indebted to Mrs. Teresa Serra for excellent technical assistance in the atomic absorption spectrophotometry.

This work was supported by Instituto Nacional de Investigação Científica (grants PB/1 and 83-CEN-12) and by Junta Nacional de Investigação Científica e Tecnológica (grant PMCT/C/CEN/67/90).

REFERENCES

BALDRY M. G. C. and Dean A. C. R. 1980. Copper accumulation by bacteria, moulds and yeasts. *Microbios* **29** 7-14.

BRADBURY J. F. 1986. *Guide to plant pathogenic bacteria*. CAB International Mycological Institute, Kew.

BRILL A. S. 1977. *Transition metals in biochemistry*. Springer-Verlag, Berlin-Heldelberg-New York.

CAMPBELL R. C. 1967. *Statistics for biologists*. Cambridge University Press, Cambridge.

CEDERBAUM A. I. and Wainio W. W. 1972a. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. I. Quantitative aspects and stability. *J. biol. Chem.* **247** 4593-603.

CEDERBAUM A. I. and Wainio W. W. 1972b. Binding of iron and copper to bovine heart mitochondria. III. Role of mitochondrial phospholipids and thiols. *J. biol. Chem.* **247** 4615-20.

GADD G. M. 1990. Metal tolerance. *In* Microcrobiology of extreme environments. Edited by C. Edwards. pp 178-210. Open University Press, Milton Keynes.

GADD G. M. and Griffiths A. L. 1978. Microorganisms and heavy metal toxicity. *Microb. Ecol.* **4** 303-17.

GILES C. H., MacEwan T. H., Nakhwa S. N. and Smith D. 1960. Studies in adsorption. Part XI. A system of classification of solution isotherms, and its use in diagnosis of adsorption mechanisms and in measurement of specific surface areas of solids. *J. Chem. Soc.* 1960: 3973-93.

GURD F. R. N. and Wilcox P. E. 1956. Complex formation between metallic cations and proteins, peptides, and aminoacids. *Adv. Protein Chem.* **11** 311-427.

HUGHES M. N. and Poole R. K. 1989. *Metals and micro-organisms*. Chapman and Hall, London & New York.

HUTCHINS S. R., Davidson M. S., Brierly J. A. and Brierly C. L. 1986. Microorganisms in reclamation of metals. *Ann. Rev. Microbiol.* **40** 311-36.

JI T. H. 1983. Bifunctional reagents. *Methods Enzymol.* **91** 580-609.

LATORRE B. A. and Jones A. L. 1979. Evaluation of weeds and plant refuse as potential sources of inoculum of *Pseudomonas syringae* in bacterial canker of cherry. *Phytopathology* **69** 1122-25.

NAKAJIMA A., Horikoshi T. and Sakaguchi T. 1981. Studies on the accumulation of heavy metal elements in biological systems. XVII. Selective accumulation of heavy metal ions by *Chlorella regularis*. *Eur. J. appl. Microbiol. Biotechnol.* **12** 76-83.

PASSOW H., Rothstein A. and Clarkson, T. W. 1961. The general pharmacology of the heavy metals. *Pharmacol. Rev.* **13** 185-224.

ROME L. and Gadd G. M. 1987. Copper adsorption by *Rhizopus arrhizus*, *Cladosporium resinae* and *Penicillium italicum*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **26** 84-90.

SIGEL H. and Martin R. B. 1982. Coordinating properties of the amide bond. Stability and structure of metal ion complexes of peptides and related ligands. *Chem Rev.* **82** 385-426.

SILLÉN L. G. and Martell A. E. 1964. *Stability constants of metal-ion complexes*. Special publication no. 17. The Chemical Society, London.

SILLÉN L. G. and Martell A. E. 1971. *Stability constants of metal-ion complexes*. Special publication no. 25. The Chemical Society, London.

STEEL R. G. D. and Torrie J. H. 1981. *Principles and procedures of statistics. A biometrical approach*. McGraw-Hill Inc.

TOBIN J. M., Cooper D. G. and Neufeld R. J. 1984. Uptake of metal ions by *Rhizopus arrhizus* biomass. *Appl. Environ. Microbiol.* **47** 821-4.

TABLE 1

Selected stability constants of metal ion complexes [a].

Metal ion	Acetate[b]	AMP[c]	Cysteine[d]	Imidazole[e]
	Log K_1	Log K_1	Log K_1/Log β_{12}	Log K_1
Cu^{2+}	2.2/1.6	3.2	-/16	4.3/4.4
Mg^{2+}	1.1/-	2.0	-	-
Ca^{2+}	0.8/-	1.8	-	-
Zn^{2+}	1.5/1.0	2.7	10/18	2.6/2.7
Cd^{2+}	1.8/0.9	-	-/10	2.7/-
Hg^{2+}	-/5.5	-	14/20	3.6
Ni^{2+}	1.4/0.6	2.7	10/19	-/3.2

---

[a] Values taken from the compilations of Sillén & Martell (1964,1971). Values are means of the available tabulated values for a given medium. K_1 = [ML] / [M] × [L], β_{12} = K_1 × K_2 (K_2 = [ML_2] / [ML] × [L]). -, value not available.

[b] *I*(ionic strength)=0 and *I*=1 ($NaClO_4$), respectively.

[c] *I*=0.1 (KNO_3).

[d] *I*=0.01-0.15 and *I*=0.0025-0.17, respectively.

[e] *I*=0.15-0.16 and *I*=0.16 (KNO_3or $NaNO_3$), respectively, except for Hg^{2+} (*I*=0.58, KCl).

TABLE 2

Influence of the presence of Hg^{2+} on the binding of Cu^{2+} to *P. syringae* cells[a].

Treatment	Bound copper[b] (μmol (mg dry wt)$^{-1}$)
25 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.107 a
50 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.113 a
75 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.107 a
100 μM Hg^{2+} 2 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.109 a
0 Hg^{2+} → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.124 b
40 μM Hg^{2+} 5 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.112 a
40 μM Hg^{2+} 15 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.110 a
40 μM Hg^{2+} 30 min → 50 μM Cu^{2+} 30 min	0.111 a

---

[a] Cells suspended in Na^+-PIPES buffer were treated with 25 - 100 μM $HgCl_2$ for 2 - 30 min before the addition of 50 μM $CuSO_4$. After 30 min, copper was assayed in the cells by AAS.

[b] Results are means from 4 determinations. Mean coefficient of variation: 3.6 %. An overall comparison of the means be analysis of variance yielded a significant $F = 6.25$ with 7,24 DF. Treatment means were then compared by the Duncan test. Values followed by the same letter are not significantly different at 5 % level.

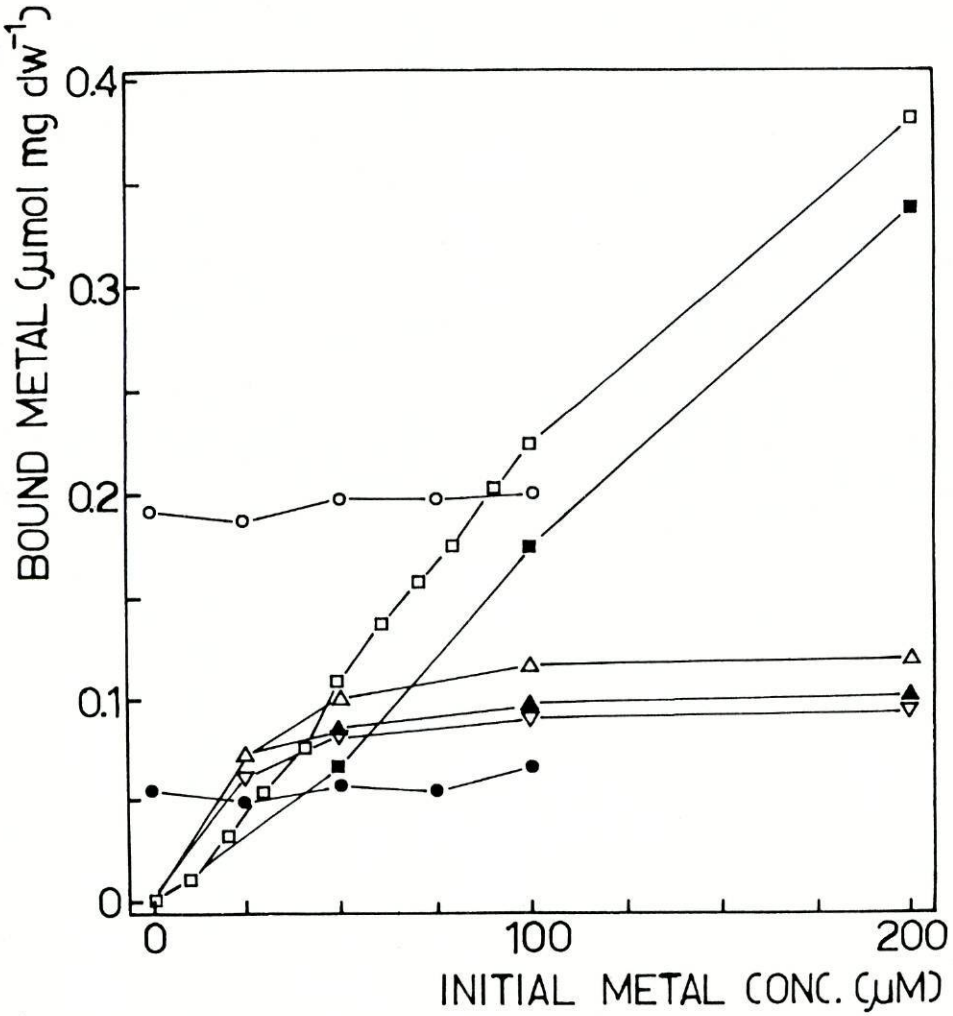


FIGURE 1 - Binding of Ca^{2+} (●), Cd^{2+} (▽), Cu^{2+} (□), Hg^{2+} (■), Mg^{2+} (○), Ni^{2+} (▲) and Zn^{2+} (△) to *P. syringae* cells. Suspensions in Na^{+}-PIPES buffer were treated with a salt of the metal. After 30 min, cells were carefully removed from the supernatant, and the metal assayed in the cells by AAS. Mean number of determinations per metal concentration and mean coefficient of variation: Ca^{2+}: 4.2, 14.8 %; Cd^{2+}: 3.0, 3.6 %; Cu^{2+}: 6.1, 8.9 %; Hg^{2+}: 3.0, 2.4 %; Mg^{2+}: 4.2, 4.2 %; Ni^{2+}: 4.0, 4.4 %; Zn^{2+}: 3.0, 10.3 %. The means of the treatments with Ca^{2+} or Mg^{2+} were compared using analysis of variance. In both cases, the F was not significant at 5 % level (F = 2.06 and 1.41, respectively, with 4,16 DF).