

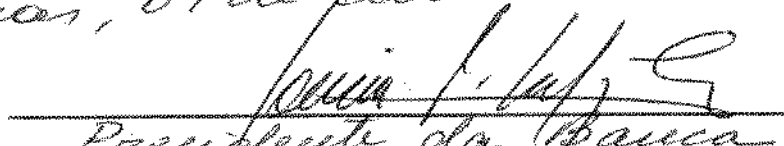
EFEITO DE MAGNÉSIO, FERRO E CONALBUMINA NO  
DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACE-  
LULARES E PAREDE CELULAR DE *Staphylococcus*  
*aureus* S-6 .

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS E AGRÍCOLA

PARECER

Este exemplar corresponde a redação final da tese defendida por Elisa Yoko Hirooka e aprovada pela Comissão Julgadora em 09.11.84. Campinas, 09 de novembro de 1984

  
Presidente da Banca

EFEITO DE MAGNÉSIO, FERRO E CONALBUMINA NO  
DESENVOLVIMENTO, PRODUÇÃO DE PROTEÍNAS EXTRACELULARES  
E PAREDE CELULAR DE *Staphylococcus aureus* S-6.

ELISA YOKO HIROOKA

ORIENTADORA

PROFa DRA SONIA PRESA CAGGIANI DE SALZBERG

Tese apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola da Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP, para a obtenção do título de Doutor em Ciências de Alimentos.

CAMPINAS

1984

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, FEAA / UNICAMP e Laboratório de Cristalografia do Instituto de Física " Gleb Wataghin" / UNICAMP, com o auxílio financeiro concedido pelo Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico CNPq .

A

meus pais, Masaru e Lourdes

minha irmã, Regina

meus irmãos, Milton e Roberto,

com carinho.

## AGRADECIMENTOS

- À Profa Dra Sonia P. C. de Salzberg pela orientação, estímulo e apoio durante a realização desta pesquisa.
- À Profa Dra Iris C. L. Torriani pelas facilidades concedidas durante a análise de parede celular por difração de raios X e interpretação e discussão dos resultados obtidos.
- Ao Prof. Dr. Merlin S. Bergdoll pelo suprimento de enterotoxinas estafilocócicas A e B, assim como os respectivos antissoros e reagentes necessários para o ensaio imunoenzimático.
- À Dra Mary L. Evenson pelas sugestões detalhadas para a determinação de enterotoxina A através do método imunoenzimático.
- Ao Prof. Dr. Fumio Yokoya pela assistência nos equipamentos do Laboratório de Microbiologia e fornecimento de reagentes para a determinação de desidrogenase lática.
- À Associação Brasileira de Indústria de Alimentos / ABIA pela gentileza das cópias deste trabalho.
- À Profa Dra Débora Q. Tavares pela atenção e pacientes explicações de técnicas de microfotografias.
- Ao Prof. Fernando C. Pagnocca pelas importantes sugestões e cuidados ao iniciar este trabalho de pesquisa.
- Aos Profs: Shiduca I. Jankevicius, José Vitor Jankevicius e Eiko N. Itano pelo apoio dado à minha permanência na UNICAMP, no período de elaboração deste trabalho.
- Aos Profs Drs: Aldo Foesi e Nilce C. Meirelles pelo fornecimento de conalbumina purificada e a metodologia de determinação de desidrogenase lática.

- Ao Prof. José Luís Pereira pelo auxílio na obtenção de plasma e determinação quantitativa de coagulase, assim como parte da correção ortográfica.
- Aos Profs. Drs: Pilar R. de Massaguer, Tomomasa Yano, Vanderlei P. Canhoz, Valdomiro Sgarbieri e Antonio M. Serrano pelas criteriosas observações da tese.
- Às amigas Hêlia, Regina, Maura, Beth, Célia, pela amizade e ajuda nos momentos de dificuldade, que tornaram a estada em Campinas, muito agradável e divertida.
- Ao pessoal do Laboratório de microbiologia, Rosinha, Fernando, Paula, Mari, Gláucia, Denise, Ilse, Eliana, Dona Olívia e Dona Maria, pelo apoio e amizade.
- Ao José Alfredo e Christina do Laboratório de Cristalografia pela assistência técnica durante as análises pela difração de raios X.
- À secretaria do Dpto de Ciência de Alimentos, Cícera, Jarde te e Marquinhos pelo empréstimo de IBM para a datilografia.
- Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, pela disponibilidade e atenção durante a revisão bibliográfica.
- À Direção da Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, e a todos aqueles que contribuíram com amizade e compreensão, a oportunidade de aprender e pesquisar.

## RESUMO

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito da concentração dos íons magnésio e ferro, assim como da proteína conalbumina no desenvolvimento da linhagem *Staphylococcus aureus* S-6. As outras propriedades estudadas foram a produção de proteínas extracelulares coagulase, nuclease e as enterotoxinas A (EEA) e B (EEB) e a estrutura de parede celular. A remoção de íons do hidrolizado de caseína, meio NAK (2,5 µg/mL de íons ferro e magnésio) com alumina deu origem ao meio denominado NAKSA (0,4 µg/mL de ferro 0,1 µg/mL de magnésio). Este tratamento afetou o desenvolvimento de *S. aureus* S-6, obtendo-se células com morfologia alterada, diminuição do peso seco e modificações na produção das proteínas extracelulares DNase, coagulase e as enterotoxinas A e B, assim como a enzima intracelular desidrogenase láctica. A adição de 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ao meio NAKSA levou à recuperação do peso seco, porém não houve restabelecimento total da morfologia celular. Para este valor de magnésio, o nível de DNase aumentou 3,5 vezes em relação ao meio NAK, enquanto que a concentração das proteínas extracelulares restantes, assim como intracelulares analisadas, não atingiu os valores obtidos no meio NAK. Foi constatado que este aumento da atividade nucleásica não se deve a um dano da célula ao nível de membrana, nem ao efeito do íon magnésio ou de componentes da parede celular na atividade enzimática, mas devido a uma maior produção e liberação da enzima pelo microrganismo. A quantidade de enterotoxina B produzida foi afetada por variações na concentração de magnésio, enquanto que a de enterotoxina A permaneceu constante. A adição de ferro em concentrações superiores a 1,19 µg/mL, ao meio NAKSA mais

1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  teve como consequência efeitos adversos, tanto para o desenvolvimento do microrganismo, quanto sobre a liberação de DNase e EEB, indicando que o equilíbrio iônico desempenha um papel importante no desenvolvimento normal das células. A adição de conalbumina ao meio NAKSA mais 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  não apresentou efeitos inibitórios nas propriedades estudadas, ocorrendo inclusive um ligeiro estímulo na produção das proteínas extracelulares no meio NAKSA. Em relação à fração das enzimas extracelulares associadas à célula, verificou-se que a DNase superficial liberada pela ação da lisostafina foi aproximadamente 200 vezes inferior à concentração da mesma enzima presente no sobrenadante da cultura. A quantidade de DNase presente na parede celular foi aproximadamente igual àquela presente nos protoplastos. A linhagem *S. aureus* S-6 apresentou variações durante o armazenamento e transferências sucessivas, tais como aumento ou diminuição na produção das proteínas extracelulares em estudo. A análise por difração de raios X mostrou que as paredes celulares do microrganismo desenvolvido nos meios NAK e NAKSA, não apresentam diferenças ao nível da estrutura tridimensional, embora tenham sido observadas alterações morfológicas marcantes, através de microscopia ótica.



## ABSTRACT

This research was developed to study the effect of the ions magnesium and iron and the protein conalbumin in the development of the strain *Staphylococcus aureus* S-6. Other properties studied were the production of extracellular proteins coagulase, nuclease and enterotoxins A (SEA) and B (SEB) and cell wall structure. The ion remotion from the casein hydrolysate (NAK medium) containing iron and magnesium at the concentration of 2.5 µg/mL each, originated the NAKSA medium containing 0.4 µg/mL of iron and 0.1 µg/mL of magnesium. This treatment affected the development of *S. aureus* S-6 when compared to the one obtained using the NAK medium. The cells showed altered morphology, dry weight decrease and modification of the extracellular proteins production DNase, coagulase and the enterotoxins A and B, as well as the intracellular enzyme lactic dehydrogenase. The addition of 1.11 µg/mL of  $Mg^{2+}$  to the NAKSA medium produced complete recovery of the cell dry weight, but only partial recovery of the cell morphology. At this magnesium level the DNase concentration increased 3.5 times as related to the concentration in the NAK medium. On the other hand, the remainder of the exoproteins under study did not achieve the values obtained in the NAK medium. It was verified that the increase in nuclease activity was not due to cell injury at the membrane level, either to the effect of the magnesium ion or the cell wall components on the enzyme activity, but to a higher production and releasing of the enzyme by the microorganism. The production of enterotoxin B was affected by differences in the magnesium concentration, although enterotoxin A remained constant.

The addition of iron at concentration 1.19  $\mu\text{g}/\text{mL}$  to the NAKSA medium plus 1.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $\text{Mg}^{2+}$  had a negative effect on the growth of the microorganism, as well as the releasing of DNase and SEB, indicating that the ionic equilibrium is important for the adequate cell development. The addition of conalbumin to the NAKSA plus 1.11  $\mu\text{g}/\text{mL}$  of  $\text{Mg}^{2+}$  medium did not show inhibitory effects on the properties under study. On the other hand, the addition of this protein to the NAKSA medium promoted the production of the extracellular proteins. With respect to the cell associated extracellular enzymes fraction, it was verified that the surface DNase released by lysostaphin action was about 200 times lower than the fraction of the same enzyme present in the culture supernatant. The DNase present at the cell wall was approximately the same present in the cell protoplasts. The strain *S. aureus* S-6 showed variations during the storage and transference period such as increase or decrease in the production of the extracellular proteins under study. The X-ray diffraction analysis indicated that the cell wall of the microorganism growing in the NAK and NAKSA medium have no differences at the structural level, even though strong morphological differences were observed by optical microscopy.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| 1 - INTRODUÇÃO .....                                     | 1  |
| 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....                          | 3  |
| 2.1 - <i>Staphylococcus aureus</i> .....                 | 3  |
| 2.2 - Meios de cultura .....                             | 5  |
| 2.3 - Influência do íon magnésio .....                   | 6  |
| 2.4 - Influência do íon ferro .....                      | 12 |
| 2.5 - Influência de conalbumina .....                    | 16 |
| 2.6 - Parede celular .....                               | 18 |
| 2.7 - Estrutura da parede celular .....                  | 21 |
| 2.8 - Proteínas extracelulares .....                     | 22 |
| 3 - MATERIAIS E MÉTODOS .....                            | 25 |
| 3.1 - Microrganismo .....                                | 25 |
| 3.2 - Meio de cultura .....                              | 25 |
| 3.3 - Esquema geral da pesquisa .....                    | 27 |
| 3.4 - Preparação do inóculo .....                        | 28 |
| 3.5 - Condições de crescimento .....                     | 28 |
| 3.6 - Determinação do peso seco .....                    | 30 |
| 3.7 - Morfologia celular .....                           | 30 |
| 3.8 - Determinação de DNase .....                        | 31 |
| 3.9 - Determinação de coagulase .....                    | 34 |
| 3.10- Determinação de enterotoxinas estafilocócicas .... | 36 |
| 3.11- Determinação de desidrogenase lática ( LDH ) ..... | 42 |
| 3.12- Liberação de enzimas extracelulares superficiais.. | 43 |
| 3.13- Determinação de desidrogenase lática ( LDH ) ..... | 45 |
| 3.14- Preparação de parede celular .....                 | 46 |
| 3.15- Estudo do efeito da parede celular na atividade de |    |

|   |     |
|---|-----|
| DNase .....   | 49  |
| 3.16- Efeito de magnésio e ferro na atividade de DNase..  | 49  |
| 3.17- Difração de raios X .....   | 50  |
| 4 - RESULTADOS .....  | 56  |
| 4.1 - Efeito de magnésio no desenvolvimento e secreção<br>de proteínas extracelulares em <i>S. aureus</i> S-6 .....       | 56  |
| 4.2 - Efeito de ferro no desenvolvimento e secreção de<br>proteínas extracelulares em <i>S. aureus</i> S-6 .....          | 69  |
| 4.3 - Efeito da conalbumina no desenvolvimento e secreção<br>de proteínas extracelulares em <i>S. aureus</i> S-6 ..       | 74  |
| 4.4 - Estudo da localização de atividade das enzimas coa<br>gulase e nuclease em <i>S. aureus</i> S-6 .....               | 78  |
| 4.5 - Enzimas intracelulares: efeito da concentração iô-<br>nica do meio de cultura .....                                 | 80  |
| 4.6 - Efeito da parede celular na atividade de DNase ...  | 84  |
| 4.7 - Efeito de magnésio e ferro na atividade de DNase..  | 86  |
| 4.8 - Efeito do tempo de armazenamento e do número de<br>transferências da cultura, na produção de exopro<br>teínas ..... | 87  |
| 4.9 - Estudo da estrutura de parede celular por difração<br>de raios X .....  | 91  |
| 5 - DISCUSSÃO .....   | 99  |
| 5.1 - Efeito de magnésio .....  | 99  |
| 5.2 - Efeito de ferro .....   | 106 |
| 5.3 - Efeito da conalbumina .....   | 111 |
| 5.4 - Enzimas extracelulares associadas à superfície ce-<br>lular .....   | 113 |

|   |     |
|---|-----|
| 5.5 - Efeito do tempo de armazenamento e do número de transferências da cultura na produção de proteínas extracelulares ..... | 118 |
| 5.6 - Estudo da estrutura de parede celular por difração de raios X .....   | 120 |
| 6 - CONCLUSÕES .....  | 127 |
| 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....  | 130 |
| 8 - APÊNDICE .....  | 144 |

LISTA DE TABELAS

Tabela

|    |  |    |
|----|--|----|
| 1  | - Efeito de magnésio sobre o crescimento e a morfologia de <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 57 |
| 2  | - Efeito de magnésio na produção de EEA e EEB em <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 63 |
| 3  | - Efeito de magnésio na produção de DNase e na liberação de desidrogenase lática em <i>S. aureus</i> S-6 .....                         | 65 |
| 4  | - Efeito de magnésio na produção de coagulase em <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 66 |
| 5  | - Efeito da adição de magnésio em meio NAK, no crescimento, morfologia e produção de DNase pelo <i>S. aureus</i> S-6 .....             | 68 |
| 6  | - Efeito combinado de ferro e magnésio no crescimento de <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 70 |
| 7  | - Efeito combinado de ferro e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por <i>S. aureus</i> S-6 .....                         | 73 |
| 8  | - Coagulase no sobrenadante de culturas de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvidas em meio contendo diferentes concentrações de ferro ..... | 75 |
| 9  | - Efeito combinado de conalbumina e magnésio no crescimento de <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 76 |
| 10 | - Efeito combinado de conalbumina e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por <i>S. aureus</i> S-6 ...                     | 77 |
| 11 | - Tratamento das células de <i>S. aureus</i> S-6 com lisostafina: DNase liberada e DNase retida nos protoplastos ..                    | 79 |
| 12 | - Atividade de desidrogenase lática expressa em absorção - Curva padrão .....  | 81 |
| 13 | - Desidrogenase lática em células de <i>S. aureus</i> S-6 de -   |    |

|    |  |     |
|----|--|-----|
|    | desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA adicionado de magnésio, ferro e conalbumina .....  | 83  |
| 14 | - Efeito de parede celular na atividade de DNase no sobrenadante dos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> em <i>S. aureus</i> S-6 .....           | 84  |
| 15 | - Efeito de parede celular na atividade de DNase nos sobrenadantes diluídos dos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,1 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> em <i>S. aureus</i> S-6 ..... | 85  |
| 16 | - Efeito de magnésio na atividade de DNase de <i>S. aureus</i> S-6 .....   | 86  |
| 17 | - Efeito de ferro na atividade de DNase de <i>S. aureus</i> S-6 .....  | 87  |
| 18 | - Atividade das enzimas coagulase e DNase em subculturas de <i>S. aureus</i> S-6 mantidas sob diferentes condições .....   | 89  |
| 19 | - Efeito combinado de transferências sucessivas e do armazenamento a 10°C na produção de EEA e EEB em <i>S. aureus</i> S-6 .....                                       | 90  |
| 20 | - Diagrama da parede celular de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido em meio NAK, com 13 horas de exposição aos raios X .....   | 97  |
| 21 | - Composição iônica do meio NAK e NAKSA .....  | 144 |

## LISTA DE FIGURAS

Figura

### MATERIAIS E MÉTODOS

|   |   |    |
|---|---|----|
| 1 | - Esquema geral da pesquisa .....                                 | 29 |
| 2 | - Montagem experimental para difração de raios X .....            | 51 |
| 3 | - Esquema da montagem experimental para difração de raios X ..... | 53 |
| 4 | - Representação esquemática da lei de Bragg .....                 | 55 |

### RESULTADOS

|    |  |    |
|----|--|----|
| 5  | - <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido em meio NAK .....  | 58 |
| 6  | - <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido em meio NAKSA .....  | 59 |
| 7  | - Efeito de 1,11 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> sobre <i>S. aureus</i> S-6 em meio NAKSA .....  | 60 |
| 8  | - Efeito de 10,10 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> sobre <i>S. aureus</i> S-6 em meio NAKSA .....   | 61 |
| 9  | - Efeito de 18,78 µg/mL de Fe <sup>2+</sup> sobre <i>S. aureus</i> S-6 em meio NAKSA contendo 1,11 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> ..... | 71 |
| 10 | - Diagrama de difração de raios X obtido com células integrais de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido no meio NAK ....               | 92 |
| 11 | - Diagrama de difração de raios X obtido com parede celular de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido no meio NAK .....                 | 93 |
| 12 | - Diagrama de difração de raios X obtido com células integrais de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido no meio NAKSA ..               | 94 |
| 13 | - Diagrama de difração de raios X obtido com parede celular de <i>S. aureus</i> S-6 desenvolvido no meio NAKSA .....               | 95 |
| 14 | - Representação esquemática do diagrama de difração de raios X obtido com parede celular de <i>S. aureus</i> S-6 ...               | 96 |



## APÊNDICE

|    |  |     |
|----|--|-----|
| 15 | - Curva padrão para a determinação de DNase pelo método turbidimétrico .....           | 145 |
| 16 | - Relação entre concentração de DNase e substrato despolimerizado .....                | 146 |
| 17 | - Curva padrão para determinação de coagulase pelo método quantitativo .....           | 147 |
| 18 | - Curva padrão para a determinação de enterotoxina A pelo método imunoenzimático ..... | 148 |
| 19 | - Curva padrão para a determinação de enterotoxina B pelo método de OUDIN .....        | 149 |
| 20 | - Determinação do tempo de reação enzima - substrato para desidrogenase lática .....   | 150 |
| 21 | - Curva padrão para a determinação de desidrogenase lática .....                       | 151 |

## 1 - INTRODUÇÃO

Os microrganismos possuem uma grande variabilidade fenotípica, podendo esta, envolver apenas mudanças quantitativas nos componentes celulares ou mais drasticamente mudanças qualitativas na estrutura e/ou função celular. Assim, sob condições de desnutrição, várias alterações podem ocorrer numa célula microbiana, com a finalidade de compensar estas deficiências nutricionais.

O papel de vários nutrientes no desenvolvimento celular tem sido motivo de estudo através do tempo. Porém o efeito de muitos elementos inorgânicos ainda não é suficientemente conhecido, por serem na sua maioria micronutrientes, o que dificulta sua total eliminação e detecção nos meios de cultura, em estudos comparativos.

Entretanto, sabe-se que os íons metálicos desempenham um papel crucial nos processos biológicos. Entre estes, o magnésio é considerado como sendo um dos íons essenciais ao funcionamento normal de diversos sistemas biológicos. Várias pesquisas têm sido realizadas, inclusive com *Staphylococcus aureus*, para estudar o efeito deste íon, que tem-se mostrado importante entre outras atividades, no controle da divisão celular e na morfologia celular.

O presente trabalho foi desenvolvido com a finalidade de estudar o efeito da concentração do íon magnésio no crescimento da linhagem *S. aureus* S-6, num meio de cultura constituído por hidrolizado de caseína, cujos íons foram esgota

dos através de um tratamento com alumina. Os efeitos do magnésio na morfologia celular e na produção de DNase, coagulase e enterotoxinas A e B foram analisados utilizando culturas desenvolvidas em meios contendo concentrações conhecidas de magnésio e outros cátions. Determinou-se também a concentração mínima de magnésio necessária ao desenvolvimento do microrganismo.

O efeito da conalbumina e do íon ferro foi estudado no desenvolvimento da linhagem *S. aureus* S-6 cultivada em concentrações de magnésio consideradas ótimas, assim como o efeito combinado destes íons e da conalbumina nas propriedades acima citadas.

As células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em diferentes condições foram tratadas com lisostafina, uma enzima que lisa a parede celular deste microrganismo, a fim de liberar as exoenzimas ligadas ou presentes na superfície celular. As exoenzimas ligadas foram comparadas quantitativamente com as mesmas enzimas naturalmente presentes no sobrenadante da cultura.

O efeito dos íons e da conalbumina foi estudado na enzima intracelular desidrogenase lática. Esta enzima foi também utilizada como indicador indireto da integridade da membrana citoplásmica, sob diferentes condições de cultura.

Na última etapa, a parede celular foi isolada e analisada por difração de raios X, a fim de detectar possíveis diferenças entre a parede de células desenvolvidas em meio completo e em meios deficientes em magnésio.

## 2 - REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 - *Staphylococcus aureus*

Grande número de trabalhos tem sido publicados em relação à taxonomia de *Staphylococcus aureus* ( 30,48 ), desde que em 1871 Von Recklinhausen descreveu a presença de microrganismos Gram positivos em forma de cocos, em isolados de pacientes com processos infecciosos ( 68 ).

A oitava edição de Bergey ( 7 ) classifica a família *Micrococcaceae* em três gêneros: *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus*, sendo que o gênero *Staphylococcus* é subdividido em: *S.aureus*, *S.epidermidis* e *S.saprophyticus*. Entretanto, publicações recentes propõem novas espécies de estafilococos ( 48 ).

De acordo com HOOVER et alii ( 30 ) e KLOOS ( 48 ), os estafilococos coagulase positivos são divididos em três espécies: *S.aureus*, *S.intermedius* e *S.hycus*, enquanto que os estafilococos coagulase negativos são subdivididos em mais de dez espécies. Esta divisão exagerada de estafilococos coagulase negativos tem sido recentemente criticada por GOODFELLOW et alii ( citado por HOOVER et alii, 30 ).

Além da importância em processos infecciosos, o *S.aureus* apresenta um papel de destaque na área de higiene alimentar, já que a enterotoxina por ele produzida é responsável por aproximadamente 30% das intoxicações alimentares ( 2,68 ). Entretanto, as intoxicações estafilocócicas são raramente fatais

e apresentam um quadro clínico onde predominam os vômitos, após um período de incubação de 2 a 6 horas ( 2 ).

Até o presente foram identificadas e purificadas as enterotoxinas: EEA, EEB, EEC<sub>1</sub>, EEC<sub>2</sub>, EEC<sub>3</sub>, EED, EEE e EEF. A EEF merece menção à parte, já que foi recentemente detectada no Food Research Institute, USA e apresenta um quadro clínico mais complexo do que outras enterotoxinas\*. Apesar destes estudos exaustivos, 5% dos casos de intoxicação estafilocócica são devidas à ingestão de enterotoxinas desconhecidas ( 4 ).

Tendo em vista que estas toxinas são produtos extracelulares, torna-se importante o estudo da sua produção e do mecanismo de liberação ao meio externo ( 43,106 ).

Apesar da detecção direta de enterotoxinas ser o método mais correto para incriminar os alimentos contaminados, um grande número de pesquisas tem sido desenvolvidas com o intuito de substituir esta metodologia cara e laboriosa, pela detecção de outros metabólitos que sempre acompanham a produção de enterotoxina, de fácil detecção em qualquer laboratório de microbiologia de alimentos. Entre estes, a enzima termonuclease (TNase) é considerada como sendo a mais adequada para a triagem ( 19,101) embora muitas linhagens produtoras de TNase não sejam produtoras de enterotoxina ( 29,74 ). Um outro problema referente à TNase está em alguns metabólitos produzidos por outras bactérias, como *Streptococcus faecalis*, que inativam esta enzima ( 63 ).

O *S.aureus* S-6 utilizado nesta pesquisa é uma linhagem produtora de uma quantidade elevada de EEB, juntamente com pequena quantidade de EEA, e tem sido utilizada por v

\* - Comunicação pessoal de Dr Bergdoll.

rios pesquisadores, para diferentes finalidades ( 33,35, 36,37, 43, 58, 67, 80, 81, 83, 101 ).

## 2.2 - Meios de cultura

De acordo com REISER e WEISS ( 89 ), os meios contendo um hidrolizado de caseína, NZ Amine ( NAK ) a 4% ou 3% de NAK adicionado a 3% de PHP ( hidrolizado protéico), ambos enriquecidos com niacina e tiamina, são considerados como os melhores meios para a produção de enterotoxinas estafilocócicas no laboratório, o que também se aplica a outras proteínas extracelulares ( 39 ).

Vários meios de composição definida têm sido desenvolvidos com a finalidade de produzir enterotoxina, porém nenhum deles conseguiu-se atingir um nível de produção de enterotoxina comparáveis aos meios complexos acima mencionados ( 58, 67 ). Não se sabe a razão pela qual os meios contendo NZ-Amine favorecem a maior produção de proteínas extracelulares, porém tentativas de desenvolver meios semelhantes isentos de peptídios não têm tido êxito, sugerindo assim, a necessidade de certos peptídios na produção de exoproteínas ( 39 ).

Além dos meios de composição definida, um outro enfoque no estudo da influência de nutrientes na produção de metabólitos extracelulares é a remoção seletiva de nutrientes, em meios de culturas complexos.

Com esta finalidade, DONALD et alii ( 17 ) testaram 38 métodos para a remoção de metais traços de um meio de cultura. Estes autores classificaram os vários métodos exis-

tentes para a remoção de metais em : aqueles que empregam substâncias sólidas para a adsorção dos elementos traços, sendo o adsorvente, subsequentemente removido por filtração; e os que empregam agentes quelantes, os quais se combinam com metais presentes formando complexos líquidos imiscíveis em água, que posteriormente são removidos pela extração com solventes orgânicos.

Entre os vários métodos utilizados, DONALD et alii ( 17 ) concluíram que o tratamento com alumina é o mais eficiente e menos laborioso para a remoção dos metais, apesar de não se obter a remoção total destes íons ( 81 ).

### 2.3 - Influência do íon magnésio

O íon magnésio desempenha importantes funções no controle do sistema metabólico e fisiológico, sendo considerado um dos íons essenciais na manutenção da integridade celular ( 31,36,109 ).

De acordo com a revisão recentemente realizada por HARDER e DIJKHUIZEN ( 28 ), embora se conheça um sistema de transporte específico para o íon magnésio, pouco se sabe sobre a atividade deste sistema. Assim, existem evidências de que o *Bacillus subtilis* sob limitação deste íon, excreta compostos que ligam ao magnésio. Outros têm mostrado que a parede celular de microrganismos desenvolvidos em meios deficientes em magnésio apresentam um aumento de afinidade para este íon, através de um sítio específico de ligação, no qual o cátion pode ser concentrado e posteriormente translocado.

Estudos relacionados com a alteração morfoló-

gica de microrganismos desenvolvidos em meios deficientes em magnésio foram realizados inicialmente por WEBB ( 112 ), que observou a produção de formas filamentosas em *Clostridium perfringens* . A influência do íon no controle da divisão celular também foi observada em leveduras por WALKER e DUFFS (109).

WEBB ( 113 ) observou que certa anormalidade morfológica ocorria também na presença de excesso de magnésio . Quando se comparou a necessidade do íon nas bactérias Gram positivas e Gram negativas, foi constatado que o requerimento deste cátion era consideravelmente maior nos organismos Gram positivos. Segundo WEBB ( 114 ), tanto as bactérias Gram positivas como as Gram negativas liberam o íon magnésio por difusão, quando suspensos em meio livre deste íon. As bactérias Gram negativas reutilizam rapidamente o magnésio liberado, enquanto que nas Gram positivas, a reassimilação é incompleta, o que resulta na desintegração da estrutura celular.

Estudos feitos por TEMPEST et alii ( 102 ) contradizem estas observações. Eles fizeram observações detalhadas sobre a influência da limitação de magnésio em *B. subtilis* e *Enterobacter aerogenes* , utilizando o mesmo meio de cultura para ambos microrganismos. O conteúdo de magnésio, embora diferente nos vários estágios de crescimento das culturas, foi similar entre ambas para todas as fases. Assim, a variação observada por WEBB ( 113 ) entre Gram positivos e negativos não teria o significado inicialmente descrito, uma vez que não controlou as fases de crescimento. De acordo com TEMPEST et alii ( 102 ), o magnésio celular está fortemente ligado, não sendo possível removê-lo pela suspensão dos microrganismos em solução salina a 20°C. Quando os organismos crescidos em meio deficiente em mag-



nésio eram suspensos em meio contendo íon, este era rapidamente adsorvido em quantidade variável, dependendo da concentração de magnésio extracelular ou da composição do diluente. O *B. subtilis* apresentava maior capacidade de adsorção, porém com menor afinidade. Esta diferença entre adsorção e afinidade pode explicar o maior crescimento de *E. aerogenes* em relação a *B. subtilis* no meio de reposição.

Por outro lado, segundo HURST et alii ( 36 ), o conteúdo de magnésio celular em *S. aureus* não apresentou variações significativas durante o crescimento. O nível de magnésio nas células cultivadas em meio com a concentração adequada de íon foi de 2,1 µg/mg de massa celular após 6 horas de cultura, e de 2,2 µg/mg após 20 horas, embora tenha-se verificado um leve decréscimo para 1,85 µg/mg, após 11 horas de cultivo.

A análise de magnésio total presente em leveduras cultivadas pelo método de crescimento sincronizado, realizada por WALKER e DUFFS ( 109 ), revelou que existe uma diminuição constante na concentração de magnésio, à medida que as células crescem, seguida de um rápido influxo do íon imediatamente antes da divisão celular. Os autores propõem a hipótese de que a queda na concentração de magnésio atuaria como regulador do tamanho celular, freando eventualmente a formação de fuso, assim como uma mudança a nível de membrana citoplasmática, que permitiria uma entrada rápida de magnésio antes da divisão. Isto é, uma falta na concentração intracelular deste íon atinge um nível tal que permite a polimerização da turbulina e a consequente formação de fuso. Uma vez completada a separação dos cromossomos, um influxo rápido de magnésio causaria a quebra do fuso, produzindo a divisão nuclear e celular.

O conteúdo de magnésio aumenta com a velocidade de crescimento, em paralelo ao conteúdo ribossômico, o que leva a crer que a maior parte do magnésio intracelular esteja associada com os ribossomos. Em relação ao metabolismo celular, a deficiência deste íon geralmente provoca um aumento na respiração celular ( 28 ).

De acordo com JOHN e GOLDBERG ( 40 ),  $Mg^{2+}$ ,  $K^+$  e  $PO_4^{3-}$  são importantes para a estabilidade dos ribossomos, e na carência destes íons, ocorre um aumento na degradação proteica e uma inibição da síntese de RNA. Segundo estes autores, em condição de carência, os ribossomos constituem uma boa reserva intracelular destes íons através da hidrólise seletiva de RNA ribossômico, o que leva à liberação de proteínas ribossômicas. A falha de um polipeptídeo normal em se associar na forma multimérica, faz com que a célula reconheça estes polipeptídeos como proteínas anormais, desencadeando processos de hidrólise seletiva. O efeito proteolítico nestas condições parece proteger a célula contra o acúmulo de proteínas intracelulares aberrantes e potencialmente nocivas, que são incapazes de funcionar em um meio de concentração iônica alterada.

O íon magnésio estabiliza a membrana citoplasmática e este efeito pode ser observado tanto em protoplastos livres como em fragmentos de membrana.

SCHERRER e GERHARDT ( 95 ) observaram que concentrações de 0,01 M de magnésio na cultura de *Bacillus megaterium* produzia uma redução relativamente pequena, mas significativa na porosidade da membrana citoplasmática, embora não afetasse a parede celular. Entretanto MARQUIS ( 61 ) observou que o magnésio e outros cátions em concentração relativamente alta

também afetam a parede celular de bactérias, especialmente Gram positivas, levando a uma contração da estrutura da parede.

De acordo com HURST et alii ( 36 ), o íon magnésio desempenha várias funções na membrana citoplasmática, sendo uma delas, a de ligar fosfolipídios a grupos carboxílicos de proteínas presentes na mesma. Fosfolipídios contendo magnésio têm sido encontrados em *Pseudomonas*. Em estreptococos, bacilos e micrococos, quando se procede a remoção de magnésio ocorre uma remoção simultânea de ATPase localizada na membrana.

De acordo com CUTINELLI e GALDIERO ( 16 ) a parede de *S. aureus* liga aproximadamente 14 ueq dos íons  $K^+$  ou  $Na^+$  e aproximadamente 85 ueq de  $Mg^{2+}$  ou  $Ca^{2+}$  por grama de parede, peso seco, indicando que a capacidade de ligação é a mesma para os íons de mesma valência. Quando uma suspensão de parede celular é titulada na presença de íons divalentes, ocorre uma diminuição maior de pH, do que na mesma titulação realizada com cátions monovalentes, indicando que os divalentes ligam-se a dois grupamentos acídicos dissociáveis, formando complexos.

LAMBERT et alii ( 53 ) estudaram a ligação de magnésio ao ácido teicóico tipo ribitol e a influência de grupos alanil ester, utilizando a linhagem *S. aureus* H. Os autores concluíram que o magnésio forma pontes através de grupamentos difosfato, em cadeias de ácido teicóico adjacentes entre si na parede celular, e sugerem que nas células intactas, o ácido teicóico da parede forma um sistema integrado para suprir cátions à membrana citoplasmática. Deste modo, o ácido teicóico providencia reserva de magnésio ligado, que por sua vez é transferido ao ácido lipoteicóico e posteriormente à membrana celular ( 34 ).

Em resumo, as evidências mostram que os agrupamentos negativamente carregados como os ácidos teicóicos e teicurônicos desempenham um papel fundamental na assimilação de cátions providenciando um meio iônico adequado para a membrana citoplasmática ( 110 ). Além destes grupamentos aniônicos, recentemente tem-se demonstrado que os grupos reativos dos peptidoglicanos também contribuem significativamente para as propriedades de retenção de íons metálicos ( 96 ).

Em relação às bactérias Gram negativas, a quantidade de íons ligados à parede é comparativamente menor do que em Gram positivas. Estudos realizados por HOYLE e BEVERIDGE ( 32 ) na parte mais externa da parede ( membrana externa ) de *Escherichia coli*, tem revelado que  $Mg^{2+}$  e  $Ca^{2+}$  são retidos em quantidades equimolares; entretanto, a proporção de  $Ca^{2+}$  total na parede / membrana externa ( 29% ) é substancialmente maior do que a mesma relação para o  $Mg^{2+}$  ( 4% ), refletindo uma situação em que alguns cátions, por exemplo  $Ca^{2+}$ , são retidos pela membrana externa em maior proporção do que outros ( ex.,  $Mg^{2+}$  ). Isto permitiria a participação de magnésio em camadas mais internas do envelope celular e também em funções citoplasmáticas. Sob condições de saturação, ocorre uma retenção seletiva de certos cátions, e a deposição dos íons em uma das superfícies da membrana, o que sugere a existência de pelo menos um sítio distinto de ligação assimétrica localizado na membrana externa.

Em *S. aureus*, existe uma boa correlação entre a perda de tolerância ao sal e a perda de magnésio celular, e parece que esta seja um dos eventos primários no tratamento térmico subletal ( 33,35,36,37 ). Além da perda de 40% de magnésio celular, ocorre perda de 65% de D-alanina ligada ao ácido teicóico

co e 40 a 50% de lipídios polares da membrana citoplasmática ( 37 ). Embora o meio utilizado por HURST et alii ( 37 ) apresentasse apenas  $3 \times 10^{-6}$  M de  $Mg^{2+}$ , as células recuperaram a concentração normal em aproximadamente uma hora, mesmo na presença de ácido etileno diamino tetraacético ( EDTA ). Portanto, as necessidades nutricionais para o processo de reparo são mais simples do que para o crescimento ( 33 ).

A causa da perda de magnésio em tratamento térmico subletal ainda não está estabelecida, mas os dados indicam que este íon esteja associado com o ácido teicóico e fosfolipídios, sendo a perda destes últimos, a responsável pela perda do íon ( 37 ).

HURST e HUGHES ( 35 ) sugerem que a lesão térmica tem dois alvos primários distintos: a membrana, o que é manifestado pela perda de tolerância a NaCl, e um segundo sítio, possivelmente ácido teicóico, o que é manifestado pela perda de D-alanina e magnésio. Uma reserva superficial de magnésio é necessária para a função adequada de *S. aureus* ( 53 ). A perda de D-alanina durante o aquecimento, leva os microrganismos afetados a ligar magnésio com maior avidez do que as células não aquecidas ( 35 ). LAMBERT et alii ( 53 ) confirmam estes resultados, usando isolados de parede celular de *S. aureus*, onde as paredes deficientes em resíduos de alanina ligam este íon mais fortemente do que as paredes normais.

#### 2.4 - Influência do íon ferro

WEBLEY et alii ( 115 ) estudando o metabolismo

de *Neurospora opaca* em meios deficientes em ferro, observaram que este organismo não apresentava a enzima catalase e que a assimilação de oxigênio em presença de certos substratos estava afetada.

Comparando as atividades metabólicas de *S. aureus* desenvolvidos em meios de glicose na presença ou ausência do íon ferro, THEODORE e SHADE ( 103 ) observaram uma restrição na capacidade oxidativa e uma diminuição na atividade de catalase.

O ferro é considerado como um dos metais mais importantes nos sistemas vivos. A sua deficiência induz na maior parte dos microrganismos, a produção de agentes quelantes, denominados genericamente de siderocromos, ou deferrisiderocromos ( 18 ).

De acordo com EMERY ( 18 ), duas classes de siderocromos são conhecidos, a classe do ácido hidroxâmico e a classe do catecol, sendo o primeiro mais abundante e conhecido, como ferricromo. As bactérias entéricas não produzem siderocromos do tipo ácido hidroxâmico; elas produzem enterobactina ( ou enteroquelina ), que é um triéster cíclico de três moles de N-2,3-dihidroxi-benzoilserina. Além destes, também são citados o citrato férrico e aerobactina ( 14,64 ).

Em vista da diversidade da natureza microbiana, certos microrganismos enfrentam problemas especiais em relação à assimilação de ferro, como no caso das micobactérias, que apresentam uma espessa camada lipídica. Estas produzem a micobactina, um componente insolúvel em água, responsável pelo transporte de ferro na parede, e simultaneamente excretam compostos solúveis em água, as exoquelinas, que tem como função

captar o ferro do meio exterior ( 18 ).

O estudo da utilização cruzada de agentes quelantes entre diferentes espécies e gêneros de bactérias tem sido realizado por MASKELL ( 62 ). Este autor observou o intercâmbio funcional entre os quelantes produzidos por *S. aureus*, *S. epidermidis* e vários gêneros de enterobactérias, sendo os quelantes de enterobactérias muito mais eficazes sobre os cocos do que o inverso, podendo-se dizer o mesmo em relação a *S. epidermidis* e *S. aureus*. Esta diferença no intercâmbio dos agentes quelantes nestas duas espécies de estafilococos, pode refletir na diferença de queladores, *S. aureus* empregando mais eficientemente outras vias.

Em bactérias Gram negativas, após a que-  
lação de ferro, estes íons são retidos pelas proteínas da mem-  
brana externa, que atuam como receptores específicos do comple-  
xo férrico, seguida de transporte dependente de energia. O ferro  
é liberado para o interior da célula, provavelmente após a redu-  
ção do íon  $Fe^{3+}$  para  $Fe^{2+}$  ( 14 ).

Estudos com proteínas receptoras dos agentes  
quelantes tem sido realizados por COULTON ( 14 ), GREWALL et  
alii ( 27 ) e KLEBBA et alii ( 47 ). Os resultados destes traba-  
lhos sugerem que as bactérias entéricas são capazes de responder  
rapidamente às flutuações na concentração extracelular de ferro,  
armazenando este íon nos períodos de excesso, para serem utili-  
zados nos períodos de carência ( 47 ).

Nas bactérias esporuladas, a velocidade de  
assimilação de ferro varia nas diferentes fases de desenvolvimen-  
to da cultura. KANDALA et alii ( 42 ) observaram que em *Bacillus*  
*cereus* T, a assimilação de ferro é muito baixa durante o cres

cimento vegetativo, aumentando rapidamente no final do crescimento, que coincide com a atividade máxima da enzima aconitase. Estes resultados sugerem que a síntese e atividade de aconitase durante os diferentes estágios da esporulação poderia estar regulada pelos níveis de íon ferro nas células.

Por outro lado, um efeito inibitório do íon na atividade celular foi observado por REPINE et alii ( 90 ) e COWART e FOSTER ( 15 ).

O aumento da concentração intrínseca de ferro em *S. aureus*, de 0,19 a 0,76  $\mu\text{g}/10^9$  células, elevou a mortalidade deste microrganismo em presença de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a  $8,8 \times 10^{-3}$  M, de 39% para 100%, embora não afetasse diretamente a velocidade de crescimento ou a viabilidade de *S. aureus* ( 90 ).

COWART e FOSTER ( 15 ) estudaram a produção in vitro de hemolisina por *Listeria monocytogenes* e verificaram que existe uma relação inversa entre a produção de hemolisina e a concentração de ferro no meio de cultura, evidenciando que a produção desta exoproteína está relacionada à concentração do metal.

SIEGEL ( 97 ) cita que o ferro pode afetar a produção de várias toxinas microbianas, como a toxina diftérica, exotoxina A de *Pseudomonas aeruginosa*, neurotoxina de *Shigella dysenteriae*, toxina tetânica e  $\alpha$ -toxina ( lecitinase ) de *Cl. perfringens*. Entretanto, altas concentrações de ferro não reduzem a produção de toxina da linhagem Hall de *Clostridium botulinum* tipo A. De acordo com o autor, o ferro parece também diminuir a eficácia da ação inibitória do nitrito sobre *Cl. botulinum*. Em relação aos dados epidemiológicos, destaca-se que a suplementação da dieta infantil com ferro aumenta



a susceptibilidade das crianças ao botulismo, o que poderia ser explicado pelo efeito estimulante da germinação que este metal produz sobre os esporos. O ferro também afeta a aderência do organismo à parede intestinal, promovendo a colonização.

## 2.5 - Influência de conalbumina

Segundo THIBONDEAU et alii ( 104 ), a conalbumina e a transferrina de aves são produtos do mesmo gen, diferindo apenas no conteúdo de carboidratos.

GOEL e JOSHI ( 26 ) observaram que antigenicamente existe só um tipo de conalbumina, embora eletroforeticamente e / ou quimicamente possam ser distinguidos dois ou mais tipos.

Os estudos químicos das reações de associação dos íons férricos com a conalbumina foram realizados por WARNER e WEBER em 1953 ( 111 ), mas a elucidação detalhada desta proteína tem sido realizada recentemente por ZWEIER ( 116 ). A conalbumina possui dois sítios de ligação para o metal e dois para a ligação de ânions. Íons metálicos diferentes de ferro podem estar ligados nestes sítios, e para cada cátion ligado, são necessários um carbonato ou outro ânion. Dos metais que especificamente se ligam à proteína, o cobre tem sido particularmente útil nos estudos da estrutura e propriedades de metaloproteínas. De acordo com os autores, na presença de carbonato, dois cobs ligam-se especificamente à conalbumina em pH compreendido entre 7,0 e 10,0. Em pH compreendido entre 6,0 e 6,7, o cobre liga-se mais a um dos sítios da conalbumina, denominado de sítio

A, enquanto que a pH entre 6,7 a 7,0, liga-se predominantemente ao sítio B. Em pH entre 8,0 a 11,0, o cobre ligado ao sítio A apresenta um segundo tipo de espectro, o A-2.

Atualmente os estudos relativos ao estado nutricional, conteúdo de ferro na dieta e resistência a infecções bacterianas têm despertado interesse, já que a atividade bacteriostática da transferrina é neutralizada pela saturação desta proteína com o íon ferro ( 18 ).

Baseados nestas observações, SAFONOVA et alii ( 92 ) e VALENTI et alii ( 108 ) realizaram estudos sobre o efeito da conalbumina sobre os estafilococos. Esta proteína não apresentou nenhum efeito sobre o crescimento, nem sobre a formação de pigmentos de *S.aureus* ( 92,108 ). Em relação a estafilococos coagulase negativos, os resultados destes autores foram bastante contraditórios, já que enquanto SAFONOVA et alii ( 92 ) afirmam que todos coagulase negativos foram inibidos, VALENTI et alii ( 108 ) observaram certa variação na resistência à conalbumina.

Para testar a eficiência do sistema de transporte de ferro pela bactéria, VALENTI et alii ( 108 ) adicionaram  $\text{CrCl}_3$  ao meio de cultura, já que a precipitação do íon ferro produzida pelos sais de cromo tem um efeito semelhante ao da conalbumina. Entretanto, alguns estafilococos coagulase positivos não se desenvolviam em concentrações de  $\text{CrCl}_3$  superiores a 10 mM. Este fato indica que entre as linhagens de estafilococo, existe um gradiente de resistência a agentes quelantes de ferro, devido à diferença na eficiência do sistema de transporte de cada linhagem.

ARNOLD et alii ( citado por VALENTI et alii ,

108 ) têm sugerido que a transferrina apresenta não somente um simples mecanismo de retenção de ferro, mas que também participa de uma interação mais complexa com a superfície bacteriana.

## 2.6 - Parede celular

Segundo a revisão feita por SHOCKMAN e BARRET ( 96 ), a parede dos microrganismos Gram positivos é uma camada espessa e amorfa de 20 a 50 nm de espessura, sendo quimicamente definida como um peptidoglicano insolúvel, contendo polímeros covalentemente ligados, como os ácidos teicóico, teicurônico e /ou outros polissacarídeos acídicos ou neutros.

Dependendo da metodologia utilizada para a fixação e pós-coloração, a parede apresenta uma aparência de camada tríplice ou dupla ( 110 ).

Segundo WARD ( 110 ), vários autores têm concluído que tais camadas resultam de diferenças na composição dos diferentes extratos, e tem especulado que os ácidos teicóicos e teicurônicos estão restritos à camada mais externa. Por outro lado, MILLWARD e REAVELEY ( citado por WARD, 110 ) concluíram que a aparência trilamelar de parede não tingida de *S.aureus* e *B. licheniformis* é o resultado de variações no empacotamento dos peptidoglicanos, e não uma consequência da distribuição de polímeros secundários. A remoção dos ácidos teicóico e teicurônico da parede resultou na redução da estrutura ordenada do peptidoglicano, indicando que estes polímeros estão distribuídos por todo o volume da parede ( 9,10 ).

Segundo SHOCKMAN e BARRETT ( 96 ) a função

da parede é considerada em termos de atividades essenciais na economia das células bacterianas, porém o papel da parede em relação ao meio ambiente tem recebido pouca atenção. Embora a parede não seja uma verdadeira barreira permeável, serve como uma peneira que impede a passagem de moléculas com peso molecular superior a 1.200 ou com o raio hidrodinâmico de Einstein-Stokes superior a 1,1 nm. Entretanto numerosos microrganismos Gram positivos secretam macromoléculas, ou seja produtos extracelulares de tamanhos e pesos moleculares variados, que devem atravessar a parede, a fim de atingir o meio externo. Por outro lado, o DNA de um microrganismo deve atravessar a parede para atingir o núcleo de outro organismo no processo de transformação. O mecanismo pelo qual estas macromoléculas penetram a parede ainda são desconhecidos ( 96 ).

A parede também apresenta uma série de grupos ativos específicos na sua superfície, importantes nos processos de adesão e reconhecimentos que antecedem a síntese de anticorpos ( 71, 76, 86 ).

Deste modo, RÄSÄNEN e ARVILOMMI ( 86 ) tem demonstrado a ativação de linfócitos T e B pelos componentes da parede celular. Por outro lado, MUSHER et alii ( 71 ) verificaram que alguns componentes da parede de *S. aureus* atuam na inibição de fagocitose e quimiotaxia de leucócitos polimorfonucleares.

Segundo OFEK et alii ( 76 ), embora o ácido lipoteicóico ( LTA ) esteja principalmente associado à membrana de organismos Gram positivos, uma parte pode estar exposta na superfície celular, atuando como mediador na aderência de microrganismos a células animais. O LTA fixa-se através de sua ca-

deia de glicerofosfato à região positivamente carregada das proteínas da parede, deixando a parte lipídica livre para a interação com a membrana do hospedeiro.

UMEDA et alii ( 107 ) observaram que a superfície de várias linhagens de *S. aureus* apresenta uma estrutura concêntrica circular e uma borda separando a região "nova" da região "velha". O fator de aglutinação ( clumping factor ) está localizado na superfície "velha", acontecendo o mesmo com a maioria dos receptores para fagos, mas outro componente denominado de proteína A está presente em toda a superfície. Isto indica que o fator de aglutinação e a maioria dos receptores para fagos aparecem em um estágio tardio do ciclo de crescimento, enquanto que a proteína A está presente desde o início do crescimento celular. Especula-se que a transferência de proteína A, após a sua síntese para a superfície celular seja muito rápida. Estes eventos levam a crer que a superfície nova, derivada de célula recém-dividida é funcionalmente menos ativa do que a superfície velha, e que durante o crescimento, o organismo adquire gradualmente as atividades.

AMAKO et alii ( 1 ) observaram que a parede extraída com ácido tricloroacético também apresentava duas áreas, uma com estrutura concêntrica circular, característica de estafilococo e outra com superfície irregular e rugosa. A análise química desta revelou que era constituída principalmente de peptidoglicano. A digestão da parede com lisozima mostrou que as estruturas circulares eram bastante afetadas, desaparecendo 60 minutos após o tratamento. Os autores especulam que o peptidoglicano esteja organizado em disposição circular concêntrica, e após uma ou duas gerações, esta estrutura desa-

parece como resultado da digestão enzimática superficial da atividade de reparo mediada por enzimas autolíticas. Outra possível explicação seria uma expansão da parede, tendo como finalidade o aumento da superfície após a separação celular.

A alteração da superfície celular pode ocorrer também no decorrer do tempo. PEREIRA ( 82 ) comprovou que a transferência diária de uma cultura de *S. aureus* leva a uma variação semelhante a mutação genética e ao crescimento seletivo de variantes, responsáveis pela variação antigênica da população.

## 2.7 - Estrutura da parede celular

Vários métodos físicos e químicos têm sido utilizados nesta última década, com a finalidade de estudar a estrutura da parede celular ( 23,24,44,51,54,55,56,72 ).

Existem controvérsias quanto à semelhança desta estrutura com a quitina ( 9,10,24,44,51,72 ). Porém na última publicação de NAUMANN et alii ( 72 ), utilizando a espectroscopia de infra-vermelho, excluem o modelo de um estado altamente cristalino para o peptidoglicano.

A microscopia eletrônica da fração de mureína de *E. coli*, parcialmente hidrolizada pela ação de endopeptidase e pelo ultra-som, mostram que as cadeias de glicano estão dispostas perpendicularmente ao eixo longitudinal destas células. Estruturas semelhantes foram observadas em *B. subtilis*, porém a cadeia de glicano deste microrganismo parece ser longa demais para estar perpendicular à membrana ( 96 ). Entretanto,

tanto os estudos realizados com difração de raios X , como os de ressonância magnética nuclear ( RMN ), sugerem que as cadeias de glicano correm paralelas à superfície celular, e o peptídeo ligado sai destas cadeias em diferentes direções ( 9,10,51,54, 56 ).

Tendo em vista que os átomos de nitrogênio são encontrados na proximidade dos sítios intermoleculares de interação, e desempenham um papel importante na determinação da estrutura e função biológica, LAPIDOT e IRVING ( 54,55,56 ) estudaram a mobilidade de cadeias de peptidoglicano. Estes autores, utilizando a técnica de RMN mostraram que a parte mais móvel da estrutura de parede celular em *S. aureus* seja a região da pentaglicina.

## 2.8 - Proteínas extracelulares

Muitas proteínas extracelulares são sintetizadas como precursoras, contendo uma extensão amino terminal chamada de sequência de "signal" ou peptídeo "signal", que é removida após o transporte ( 36,66 ).

MICHAELIS e BECKWITH ( 66 ) descrevem dois modelos bastante diferentes para o transporte de proteínas extracelulares, o de BLOBEL et alii e WICKNER .

De acordo com BLOBEL et alii ( citado por MICHAELIS e BECKWITH, 66 ), à medida que a proteína é sintetizada, a sequência de "signal" emerge do ribossomo e se liga à membrana. Esta ligação recruta as proteínas membranares, que juntamente com os componentes ribossômicos, constituem um poro,

pelo qual a cadeia polipeptídica é extrudada pelo processo de co-tradução.

O modelo de WICKNER ( citado por MICHAELIS e BECKWITH, 66 ) não requer este transporte ordenado, enfatizando que a auto-organização proteica atua como mediadora do seu próprio transporte. Isto é, a síntese proteica completa antes que o transporte se inicie, e a sequência de "signal" apenas promove o arranjo do precursor recém-formado, numa conformação compatível com o transporte.

Embora a maioria dos modelos de transporte de proteínas proponham o modelo de co-tradução, nenhuma experiência ainda distinguiu definitivamente os dois processos. O transporte pós-tradução ocorre em algumas proteínas sob condições normais, o que leva a crer que o transporte segundo o modelo de co-tradução é a via normal, ocorrendo o mecanismo pós-tradução apenas sob condições anormais ( 66 ).

Além disso, os eucariotos e procariotos parecem partilhar mecanismos comuns para certos aspectos de transporte de proteínas ( 66 ).

Entretanto, entre as proteínas secretadas pelo oviduto de aves, a ovoalbumina não requer uma sequência de "signal" e para a secreção desta proteína, que representa 50% da proteína total excretada, poderiam estar envolvidos mecanismos especiais que evitassem a competição com outras proteínas secretórias da mesma célula ( 104 ).

Os produtos extracelulares são geralmente excretados na fase pós-exponencial do crescimento microbiano ( 70 , 91 ). As pesquisas realizadas com a produção de componentes extracelulares indicam que a excreção, e produção estejam sujeitos



a mecanismos coordenados de controle ( 13,43 ).

COLEMAN ( 13 ) estudando a produção de proteínas extracelulares por *S. aureus* Wood 46 e uma variante em que a produção de  $\alpha$  - toxina foi reduzida em mais de dez vezes, verificou que as velocidades de formação de proteínas extracelulares totais por estes dois microrganismos eram idênticas . Estes resultados propõem um mecanismo regulatório geral para a formação de proteína extracelular, denominado pelos autores de compensação pleiotrófica, levando à saturação da capacidade produtora de proteínas extracelulares. Esta hipótese é reforçada por BJORKLIND e ARVIDSON ( 5 ), onde uma simples mutação leva à repressão de algumas exoproteínas e uma simultânea desrepressão de outras. A mutação parece influir na velocidade de síntese das exoproteínas secretadas, indicando o envolvimento de um gen regulatório superior.

Muitas das proteínas periplasmáticas dos organismos Gram negativos correspondem a proteínas extracelulares de Gram positivos, presentes no meio exterior. Porém algumas das proteínas extracelulares dos organismos Gram positivos podem ficar retidas na superfície celular ( 20,45,77,78,98,106 ).

Assim, uma boa proporção de DNase ( 77, 78 ), coagulase ( 20 ), penicilinase ( 45 ) em *S. aureus* e fosfatase em *B. licheniformis* ( 98 ) tem sido encontrados associados à superfície celular. Um provável precursor de EEB também foi estudado e identificado em membranas purificadas de *S. aureus* S-6 por TWENTEN e IANDOLO ( 106 ).

KIM et alii ( 45 ), ENGELS e KAMPS ( 20 ) e SPENCER et alii ( 98 ) têm discutido as interações iônicas e outras possíveis modalidades envolvidas na retenção destes produtos extracelulares na superfície celular.

### 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 - Microrganismo

A linhagem utilizada foi *Staphylococcus aureus* S-6 obtida através do Food Research Institute, Universidade de Wisconsin, USA, que apresenta entre outras características, a produção de coagulase, nuclease e as enterotoxinas A e B. O microrganismo foi mantido a 4°C em tubos contendo meio NAK com ágar, através de subculturas em intervalos de aproximadamente um mês.

#### 3.2 - Meio de cultura

##### 3.2.1 - Meio NAK

O meio básico utilizado foi um hidrolizado de caseína a 4% ( N-Z Amine NAK da Sheffield Chemical Co; Lyndhurst, NJ ) adicionado de 10 mg/L de niacina e 0,5 mg/L de tiamina.

##### 3.2.2 - Meio NAKSA

O meio NAK tratado com alumina (  $Al_2O_3$  ) para a remoção de íons, foi denominado de NAKSA. A composição iônica deste meio foi previamente determinada pela absorção atômica.

mica ( 81 ) e está apresentada na tabela 21.

Para a obtenção do meio NAKSA, o meio NAK foi adicionado de 1% de alumina e o pH ajustado a 7,0 ( potenciômetro digital, Corning 110 ) e posteriormente aquecido a 120°C em autoclave por 10 min. Este meio, ainda quente, foi agitado mecanicamente durante 30 a 60 min, decantado em banho de gelo e o sobrenadante filtrado através de filtro Millipore de porosidade 0,45 µm ( 80,81 ).

O tratamento com alumina foi repetido três vezes para garantir a máxima remoção de íons. A vidraria utilizada foi previamente tratada com HCl 5%, para remoção de contaminantes iônicos, e os meios preparados em água desionizada:

O estudo do efeito de magnésio, ferro e conalbumina foi realizado adicionando  $MgSO_4$ ,  $FeSO_4$  e conalbumina purificada ao meio NAKSA.

### 3.2.3 - Meio NAKSA adicionado de magnésio

Para o estudo do efeito do íon magnésio, volumes diferentes de soluções estéreis de  $MgSO_4$  foram adicionados ao meio NAKSA, obtendo-se concentrações finais deste íon compreendidas entre 0,10 e 10,10 µg/mL, considerando que o meio já continha 0,10 µg/mL de  $Mg^{2+}$  residual ( tabela 21 ).

### 3.2.4 - Meio NAKSA adicionado de ferro

Uma solução estéril de  $FeSO_4$  foi adicionada ao meio NAKSA contendo 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ . Esta concentração de mag

nésio foi selecionada por ser a mínima que permitiu a recuperação do crescimento para os valores obtidos com o meio NAK.

As concentrações finais de ferro variaram de 1,19 a 18,78 µg/mL, sendo que o meio NAKSA já continha 0,4 µg/mL de ferro residual ( tabela 21 ).

As mesmas quantidades de ferro também foram adicionadas ao meio NAKSA sem adição de magnésio.

### 3.2.5 - Meio NAKSA adicionado de conalbumina

Um volume de 0,6 mL de solução de conalbumina 5,0 mg/mL foi adicionado a 9,0 mL do meio NAKSA contendo 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ . O mesmo procedimento foi efetuado com o mesmo meio sem magnésio. Os volumes finais foram completados com água desionizada.

### 3.3 - Esquema geral da pesquisa

As culturas de *S.aureus* nos meios NAK e NAKSA adicionadas de diferentes concentrações de magnésio, ferro e conalbumina foram analisadas com relação à morfologia e desenvolvimento celular, assim como à produção de enterotoxinas, enzimas extracelulares e intracelulares e estudo da parede celular.

A prova de coagulase em tubo foi realizada utilizando culturas em caldo. Para os estudos morfológicos, difração de raios X e determinação de enzimas extracelulares superficiais e intracelular desidrogenase lática ( LDH ) foram

utilizadas células previamente lavadas. Os demais ensaios foram realizados utilizando os sobrenadantes de culturas.

A atividade de DNase no sobrenadante da cultura foi também estudada em presença de parede celular e concentrações variáveis de ferro e magnésio, com o intuito de estabelecer a existência ou não de um efeito destes elementos na atividade enzimática.

O esquema geral da pesquisa está apresentado na figura 1.

#### 3.4 - Preparação do inóculo

Um volume de 1,0 mL de cultura de *S. aureus* S-6 em meio NAK incubado a 37°C durante 18 a 24 horas foi colocado num tubo em forma de "L", contendo 5,0 mL de meio NAKSA. Esta nova cultura foi incubada a 37°C e 200 rpm até atingir uma absorbância de 0,3 a 600 nm, o que corresponde a aproximadamente  $5 \times 10^9$  células / mL.

O inóculo padrão em todos os experimentos correspondeu a 0,1 mL desta cultura diluída a 1:5 em água desionizada. Esta alíquota foi adicionada a 10,0 mL de cada um dos meios a serem ensaiados, em tubos com tampa rosqueada de dimensões 25x200 mm.

#### 3.5 - Condições de crescimento

Todas as culturas foram incubadas a 37°C du -

FIGURA 1 - Esquema Geral da Pesquisa

Meio de cultura + Inóculo

37°C/16 horas  
200 rpm

Coagulase em  
Tubo

10.000 rpm/10min.  
4°C

Células

Sobrenadante

Coloração  
de Gram

Peso  
Seco

Enzima  
Intracelular

Enzima  
Extracelular

Difração de  
raios-X

Obtenção de  
parede celular

DNase  
M. Quantita-  
tivo

Coagulase  
LDH

Enterotoxi-  
nas

Lisostafina  
(meio hipotô-  
nico)

Lisostafina  
(meio isotô-  
nico)

Ultrasom

Tratamento com  
Alumina ou ml-  
croesferas de vi-  
dro

M.Semi-quantitativo  
M.Quantitativo

EFA

EEB

Difração da  
Parede  
Raios-X

Efeito da Parede  
na DNase

11.000rpm/  
15 min.  
4°C

DNase

LDH

Protoplastos

Sobrenadante

DNase

DNase

rante 16 horas, com agitação a 200 rpm , em incubador de temperatura e velocidade controlada ( New Bruswick Scientific Co., Inc. ).

### 3.6 - Determinação do peso seco

Para cada ensaio, 8,5 mL de cultura foram centrifugados a 10.000 rpm por 15 min ( centrífuga refrigerada mo - delo 13-20 A da International Equipment Company ). As células foram lavadas com água desionizada, novamente centrifugadas a 10.000 rpm e ressuspendidas em 5,0 mL com água desionizada.

Alíquotas de 2,0 mL foram colocadas em placas de Petri de 10x50 mm, em duplicatas, secas na estufa de 55°C e posteriormente equilibradas à temperatura ambiente em dessecador. As pesagens foram repetidas até atingir peso constante ( balança analítica, Mettler H35 ).

O peso seco foi expresso em mg/mL.

### 3.7 - Morfologia celular

A morfologia celular foi estudada através da observação microscópica dos microrganismos desenvolvidos nos diferentes meios de cultura e tingidos pelo método de coloração de Gram.

As microfotografias do microrganismo foram realizadas com fotomicroscópio da Zeiss, utilizando-se ocular 10x, objetiva 100x, optovar 1,25, resultando num aumento final

de 1.600 vezes.

O filme empregado foi Fuji color 100 ASA (35 mm).

### 3.8 - Determinação de DNase

A enzima DNase foi determinada pelo método semiquantitativo em lâmina de LACHICA et alii ( 52 ) e pelo método turbidimétrico quantitativo de ERICKSON e DEIBEL ( 22 ).

#### 3.8.1 - Método em lâmina

Este método também denominado ágar azul de orto-toluidina - DNA ( TDA ), tem como fundamento a mudança de cor do meio originalmente azul para rosa, devido ao rompimento de DNA pela ação da enzima.

Uma alíquota de 4,0 mL do meio preparado de acordo com LACHICA et alii ( 52 ) foi colocada sobre uma lâmina de microscópio e após a solidificação do ágar, efetuaram-se orifícios de aproximadamente 3,0 mm de diâmetro.

A cultura ( suspensão ou sobrenadante ) a ser testada foi colocada nos orifícios com pipeta Pasteur e a seguir as lâminas incubadas a 37°C por 4 horas em câmara úmida.

A quantificação aproximada foi determinada , medindo-se a zona de clareamento formada ao redor dos orifícios.



### 3.8.2 - Método turbidimétrico

Neste método a atividade enzimática é determinada pela medida da turbidez (absorbância) proveniente da precipitação ácida de DNA não hidrolizado. A turbidez é correlacionada com a quantidade de DNase presente, através de uma curva padrão previamente construída com quantidades conhecidas de DNA.

#### 3.8.2.1 - Substrato

Bacto-DNA (Difco) foi dissolvido em água desionizada para uma concentração final de 1000 µg/mL, aquecida em banho de água a 100°C durante 30 min, imediatamente esfriada em água corrente e estocada a 4°C.

#### 3.8.2.2 - Preparação da curva padrão

Alíquotas de volumes compreendidos entre 0,25 e 1,50 mL da solução de DNA 1000 µg/mL, correspondendo às concentrações de 250, 500, 750, 1000, 1250 e 1500 µg de DNA foram colocadas em tubos, e o volume ajustado a 9,0 mL com o tampão borato 0,2 M pH 8,6 contendo  $10^{-3}$  M de  $\text{CaCl}_2$ .

A seguir, adicionou-se 1,0 mL de HCl 4,0 N, a mistura homogeneizada em ciclomixer (Clay Adams) e incubadas a 37°C por 10 min. A leitura foi realizada a 600 nm em espectrofotômetro (Spectronic 20 de Bausch & Lomb).

A curva padrão obtida está apresentada na figura 15.

### 3.8.2.3 - Relação entre concentração de DNase e substrato despolimerizado.

O estudo da relação existente entre a concentração de enzima e substrato despolimerizado foi realizado utilizando-se nuclease microcócica da Millipore Corporation, Freehold, NJ, 07728 ( 15231 U/mg, 4797 NFCP . 090444, 12324 unidades).

A solução de enzima diluída a  $10^{-4}$  foi adicionada em tubos contendo 1,0 mL de DNA 1000  $\mu\text{g/mL}$  e tampão borato, de forma a se obterem concentrações variadas de até 15 ng / mL e o tempo de reação cronometrada até 15 min. A seguir adicionou-se 1,0 mL de HCl 4,0 N e incubou-se a 37°C por 10 min para o desenvolvimento da turbidez.

O controle da reação, denominado B<sub>2</sub>, era constituído de 1,0 mL de solução de DNA 1000  $\mu\text{g/mL}$ , 8,0 mL de tampão borato e 1,0 mL de HCl 4,0 N.

Para a obtenção de absorvância equivalente ao DNA despolimerizado, os valores obtidos foram subtraídos da absorvância de B<sub>2</sub>. A quantidade de DNA despolimerizado foi obtido, entrando-se com este valor na curva padrão apresentada na figura 15. Com estes dados e a quantidade correspondente da enzima adicionada, construiu-se a curva apresentada na figura 16.

### 3.8.2.4 - Detecção da atividade de DNase

Um volume de 1,0 mL de sobrenadante adequadamente diluído em tampão borato 0,2 M pH 8,6 foi adicionado a um tubo contendo 1,0 mL de solução de DNA padrão ( 1000  $\mu\text{g/mL}$ )

e 7,0 mL de tampão borato. Após homogeneização em agitador, a mistura foi incubada a 37°C por 15 min e posteriormente adicionada de 1,0 mL de HCl 4,0 N.

As leituras foram realizadas a 600 nm e a atividade enzimática expressa como µg de DNA / mL / min.

Para o cálculo, subtraiu-se o valor da absorbância obtida na amostra ( A ) de B<sub>2</sub> ( A<sub>B2</sub> ), obtendo-se assim a absorbância equivalente ao DNA despolimerizado ( A<sub>DNA despol</sub> ).

$$A_{\text{DNA despol}} = A_{B2} - A$$

Com este valor e através da curva padrão ( figura 15 ), obteve-se a quantidade de DNA despolimerizado.

A atividade enzimática foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\mu\text{g DNA/mL/min} = \frac{\text{DNA despol.} \times \text{diluição da amostra}}{V \times t}$$

onde:

V = volume da reação ( 10,0 mL )

t = tempo de incubação ( 15 min )

### 3.9 - Determinação de coagulase

A enzima coagulase foi determinada pelo método em tubo desenvolvido por MEYER ( 65 ) e pelo método quantitativo desenvolvido por PEREIRA e SALZBERG ( 84 ), utilizando-se o plasma suíno.

### 3.9.1 - Preparo de plasma suíno

O plasma foi obtido de acordo com a técnica de RATNOFF e MENZIC ( 87 ), utilizando-se oxalato como anticoagulante. O plasma obtido foi dividido em porções de 15,0 mL e liofilizado ( L 400 GS, Edwards do Brasil ) e redissolvido ao volume original, com água destilada estéril, imediatamente antes do uso.

### 3.9.2 - Método de coagulase em tubo

A prova de coagulase em tubo foi efetuada seguindo-se essencialmente a metodologia recomendada por MEYER ( 65 ).

A 0,3 mL de cultura foi adicionado 0,3 mL de plasma suíno e os tubos mantidos a 37°C em banho de água por 4 horas. Conforme a intensidade da coagulação, as reações foram classificadas de 0 a 4+.

### 3.9.3 - Determinação quantitativa de coagulase

A determinação quantitativa de coagulase foi feita seguindo-se a metodologia desenvolvida por PEREIRA e SALZBERG ( 84 ).

Para a reação, 1,0 mL de sobrenadante a ser analisado foi colocado em tubo de ensaio contendo 1,0 mL de plasma suíno, 3,0 mL de tampão fosfato sódico 0,01 M pH 6,4 e 6,0 mL de solução salina a 0,85%. Os tubos contendo a mistura de reação foram colocados em banho de água a 37°C durante 3 horas.

O coágulo de aspecto fibroso foi lavado com tampão fosfato 0,01 M pH 6,4 e seco na estufa a 55°C.

A fibrina obtida foi redissolvida em 1,0 mL de NaOH 0,1 N a 56°C por 30 min em banho de água e a quantidade de proteína determinada pelo método de Folin-Ciocalteu.

Para a quantificação utilizou-se uma curva padrão contendo os valores de absorvância relacionados às concentrações de fibrinogênio ( figura 17, retirado da referência 84).

A atividade enzimática foi expressa como µg de fibrinogênio / mL.

### 3.10 - Determinação de enterotoxinas estafilocócicas

A enterotoxina A foi quantificada pelo método imunoenzimático "Enzyme linked immunosorbent assay" - "ELISA" ( 25 ), e a enterotoxina B, pelo método de OUDIN ( 2,68,79,89).

A enterotoxina A padrão, a imunoglobulina G ( IgG ) purificada, o conjugado IgG - enzima, ácido 2,2-azino - di-3-etilbenzotiazol sulfônico ( ABTS ) e esferas de poliestireno utilizados no método imunoenzimático, assim como a enterotoxina B e respectivo antisoro utilizado para o método de OUDIN, foram gentilmente cedidos por Dr Merlin S.Bergdoll e Dra Mary L. Evenson do "Food Research Institute ( FRI ) , USA" .

#### 3.10.1 - Determinação de EEA pelo método imunoenzimático

A determinação imunoenzimática foi realizada

de acordo com o método de FREED et alii ( 25 ).

### 3.10.1.1 - IgG

Como fonte de IgG utilizou-se o lote G-A.II - FRI contendo 10,0 mg de IgG liofilizada.

Para a reação, a IgG foi diluída à concentração final de 10,0 µg/mL em tampão carbonato 0,01 M pH 9,6 e utilizada para o revestimento das esferas de poliestireno ( fase sólida ) .

### 3.10.1.2 - Revestimento da fase sólida

As esferas de poliestireno ( 6,5 mm "Specfi - nish" Precision Plastic Ball Co., Chicago, IL ) foram colocadas num erlenmeyer e lavadas sob agitação a 200 rpm em água desionizada por uma noite. O mesmo procedimento foi repetido utilizando-se tampão carbonato 0,01 M pH 9,6 por 1 a 2 horas.

O revestimento das esferas foi realizado adicionando-se solução de IgG na concentração de 10,0 µg/mL em quantidade suficiente para cobrir todas as esferas. O conjunto foi mantido sob agitação suave durante uma noite.

Após este período, as esferas foram lavadas durante 30 min com tampão fosfato sódico 0,01 M pH 7,2 contendo 0,9% de NaCl e 0,10% de Tween 20 ( PBS-TWN 0,1% ).

As esferas foram mantidas no mesmo tampão até o uso.

### 3.10.1.3 - Conjugado IgG - enzima

O conjugado lote C-A-VI-FRI utilizado consiste de uma parte enzimática, a peroxidase (extraída de "horse radish") conjugada à IgG previamente obtida por fracionamento do antisoro.

O conteúdo de cada frasco foi adequadamente dissolvido em água destilada e diluído para 1:100, 1:150, 1:400, 1:750 e 1:1500 em tampão PBS-TWN 0,1% para determinar a melhor diluição a ser usada. Pelos resultados obtidos, escolheu-se 1:400 como sendo a melhor diluição para este lote de conjugado.

### 3.10.1.4 - Solução substrato $H_2O_2$ - ABTS

A solução substrato foi preparada imediatamente antes do uso, porém as soluções que a compõem: tampão ácido cítrico 0,05 M pH 4,0, solução ABTS 0,06 M e  $H_2O_2$  a 30% podem ser armazenados na geladeira a 4°C, com exceção da solução ABTS, em que o tempo fica restrito a uma semana e não deve ser exposta a luz.

A solução substrato preparada a partir destas soluções estoques contém 1,2 mM de  $H_2O_2$ , 0,6 mM de ABTS em ácido cítrico 0,05 M, pH 4,0.

### 3.10.1.5 - Solução "stopping"

A solução estoque é constituída de duas soluções. A solução A é composta de 8,84 mL de ácido fluorídrico 40% e 12,0 mL de NaOH 0,1 M, completando-se o volume para 1000mL com

água destilada. A solução B é composta de 1,9 g de EDTA tetra-sódico dissolvido em 5,0 mL de água destilada.

Para o preparo da solução de "stopping", adicionou-se 0,1 mL de solução B em 50 mL de solução A.

#### 3.10.1.6 - Curva padrão

A EEA liofilizada foi diluída na concentração final de 50 µg/mL, de acordo com as instruções dos fornecedores ( FRI ) e armazenada a -20°C.

Para a construção da curva padrão, a solução contendo 50 µg/mL foi diluída em série com PBS-TWN 0,1%, obtendo-se as seguintes concentrações de EEA: 0,625; 1,25; 2,50; 5,0 e 10,0 ng/mL. Uma alíquota de 1,0 mL de cada diluição foi colocada em triplicata em tubos de ensaio 16x160 mm, e procedeu-se ao ensaio imunoenzimático.

A seguir, determinou-se a média aritmética das leituras de absorbância ( A ) e subtraiu-se deste valor, a média da absorbância do branco. A curva padrão foi construída utilizando-se a transformação logit-logarítmo, onde os valores de Y foram as absorbâncias expressas como  $\log A/1-A$  e os valores de X foram os logarítmos das concentrações ( figura 18 ).

#### 3.10.1.7 - Detecção de EEA

Para a reação, colocou-se 1,0 mL de sobrenadante da cultura adequadamente diluída em tubo e adicionou-se uma esfera de poliestireno revestida com IgG . O conjunto foi mantido sob agitação durante duas horas à temperatura ambiente.



A seguir, a esfera foi lavada com tampão PBS-TWN 0,1% e colocada em outro tubo contendo 4,0 mL do mesmo tampão, durante 15 min.

O tampão foi descartado e cada esfera transferida para um terceiro tubo contendo 50,0 µL de conjugado IgG - enzima e este agitado levemente durante 15 min em um banho de água a 37°C. A esfera foi novamente lavada e transferida para 2,0 mL de solução de substrato, deixando-se transcorrer a reação durante 40 min, e interrompida pela adição de 1,0 mL de solução "stopping". As leituras foram realizadas a 414 nm.

### 3.10.2 - Determinação de EEB pelo método de OUDIN

Para a quantificação de EEB presente no sobrenadante das culturas em diferentes meios, utilizou-se como toxina padrão EEB lote BT-10 e como antisoro o lote SEB-BS-11 com título de 64, padronizado pelo método de OUDIN ( FRI ).

#### 3.10.2.1 - Preparo dos tubos para imunodifusão

Os tubos de 4 mm de diâmetro interno e 100 mm de comprimento foram revestidos com ágar nobre 0,6% em PBS 0,02 M pH 7,4, adicionando como conservador mertiolate na concentração 1:10.000.

#### 3.10.2.2 - Preparo do ágar-soro

O antisoro foi inicialmente diluído para o do

bro da concentração final desejada em tampão PBS 0,02 M pH 7,4 e equilibrado a 50°C em banho de água. A seguir, o volume foi completado com ágar 0,6% previamente fundido, mantido a 50°C e colocado nos tubos revestidos.

Para determinar a melhor concentração do antiserum a ser utilizada, analisaram-se várias diluições, considerando a diluição 1/50 como sendo a mais adequada para uma melhor visualização da banda de precipitação, cujo comprimento foi proporcional à concentração da toxina.

#### 3.10.2.3 - Curva padrão

A EEB foi diluída em tampão PBS nas concentrações finais de 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg/mL.

A curva foi construída em papel semi-logarítmico, colocando-se o comprimento da banda de precipitação em abcissas e as respectivas concentrações de EEB em ordenadas ( figura 19 ).

#### 3.10.2.4 - Detecção de EEB

Aproximadamente 0,5 mL de sobrenadante da cultura foi colocado em tubo de ágar-soro e vedado com papel parafilme. Após 7 dias de incubação a 25°C, a banda de precipitação foi medida com o auxílio de um paquímetro.

### 3.11 - Determinação de desidrogenase lática ( LDH )

A enzima desidrogenase lática foi determinada segundo o método de MARBACH e WEIL ( 59 ).

#### 3.11.1 - Tempo de reação e curva padrão

Uma solução de LDH ( Boehringer Mannheim ) de aproximadamente 650 U/mL foi diluída em tampão tris-semicarbazida 0,25 M pH 10,0, nas concentrações finais de 100, 200, 400, 800, 1600, 3200 e 6400  $\mu$ U/mL. O procedimento da reação está descrito no item 3.11.2 .

As leituras de absorvância foram efetuadas nos intervalos de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50 e 60 min. Com estes valores, construiu-se uma curva de absorvância versus tempo para diferentes concentrações de LDH, a fim de determinar o tempo de reação ( figura 20 ).

A curva padrão foi construída colocando-se os valores de absorvância em abscissa e as concentrações de enzima expressas em  $\mu$ U/mL em ordenadas ( figura 21 ).

O tempo de reação selecionado foi de 30 min.

#### 3.11.2 - Procedimento

O volume final de reagentes foi de 3,1 mL, distribuídos na seguinte proporção: 2,7 mL de tampão tris-semicarbazida 0,25 M pH 10,0; 0,1 mL de L-lactato 0,45 M ( solução para calibração de Boehringer Mannheim ); 0,2 mL de NAD 3,0 mM e 0,1 mL de solução a ser analisada.

A leitura foi realizada a 340 nm, após 30 min de reação, em espectrofotômetro Spectronic 70 ( Bausch & Lomb ).

### 3.12 - Liberação de enzimas extracelulares superficiais

A liberação de enzimas superficiais e obtenção de protoplastos foi realizada com lisostafina ( Sigma nº L - 8255, com 270 U/mL de atividade ) .

#### 3.12.1 - Tratamento das células com lisostafina

##### 3.12.1.1 - Determinação do tempo de reação

A lisostafina foi dissolvida em tampão tris-HCl 0,05 M pH 7,5 contendo 0,145 M de NaCl ( 46 ) para 500 µg / mL. Uma alíquota de 0,1 mL desta solução foi adicionada às células lavadas e ressuspensas em 10,0 mL de tampão, o que corresponde a uma concentração enzimática de 5,0 µg/mL ( 46 ).

O tempo de incubação foi determinado a 37°C e o aumento de transmitância ( T% ) devido à lise celular foi determinado a 600 nm .

O tempo necessário para o rompimento da parede celular foi 15 min, porém nas experiências subsequentes, utilizou-se 30 min como tempo de incubação, para garantir a liberação total dos protoplastos.

### 3.12.1.2 - Obtenção de protoplastos

Foram utilizados dois meios para a reação enzimática, com finalidades comparativas: tampão tris 0,05 M pH 7,5 contendo 4,5% de NaCl (100) e solução de sacarose 1,2 M (77). O efeito destes solutos na atividade de DNase foi estudado adicionando NaCl e sacarose nas concentrações finais de 4,5% e 1,2M respectivamente, no sobrenadante da cultura em meio NAK. A DNase foi determinada pelo método turbidimétrico descrito no item 3.8.2.

Para estudar a estabilidade dos protoplastos, as células de *S. aureus* S-6 lavadas foram ressuspensas ao volume inicial, em tampão tris 0,05 M pH 7,5 contendo 0,85% e 4,5% de NaCl ou 1,2 M de sacarose, seguido da adição de 5,0µg/mL de lisostafina. A ação da lisostafina foi controlada através da coloração de Gram e da variação no valor de absorbância a 600 nm.

### 3.12.1.3 - Procedimento

As células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em 10,0 mL de diferentes meios de cultura foram lavadas duas vezes em tampão tris 0,05 M pH 7,5 e ressuspensas com o mesmo tampão contendo 1,2 M de sacarose.

A seguir, adicionou-se 0,1 mL de uma solução de lisostafina a 500 µg/mL, para obter uma concentração final de 5,0 µg/mL e deixou-se incubar a 37°C por 30 min, em banho de água. Após este período, centrifugou-se a 11.000 rpm por 15 min, e tanto o sobrenadante como os protoplastos obtidos foram utilizados para a determinação de DNase pelo método turbidimétrico.

### 3.12.2 - Tratamento das células com ultra-som

As células cultivadas em 10,0 mL dos seguintes meios: NAK, NAKSA e NAKSA + 1,11  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Mg}^{2+}$  foram lavadas duas vezes e ressuspensas ao volume original, com água destilada.

As suspensões foram submetidas a tratamento com ultra-som a 50 W ( Biosonik IV, Bronwill, Rochester, NY, 14606 ) e alíquotas retiradas a intervalos regulares de 5, 10, 15 e 20 min e posteriormente centrifugadas a 11.000 rpm por 10 min.

A determinação de DNase pelo método turbidimétrico foi realizada nos sobrenadantes obtidos.

### 3.13 - Determinação de desidrogenase láctica ( LDH )

As células de *S.aureus* S-6 desenvolvidas em 10,0 mL de diferentes meios de cultura foram colhidas e lavadas duas vezes em tampão tris 0,05 M pH 7,5.

As células foram ressuspensas em 2,0 mL do mesmo tampão, adicionadas de 0,1 mL de lisostafina 500  $\mu\text{g/mL}$  e incubadas a 37°C por uma hora.

A seguir, a atividade de LDH foi determinada pelo método de MARBACH e WEIL ( 59 ), descrito no item 3.11.2.

### 3.14 - Preparação de parede celular

A parede celular de *S. aureus* S-6 foi preparada para duas finalidades: o estudo da estrutura pelo método de difração de raios X e para o estudo de possível efeito da parede na atividade de DNase.

Para a escolha do rompimento da estrutura celular foram testadas duas metodologias: o ultra-som e a maceração com alumina ou microesferas de vidro.

#### 3.14.1 - Rompimento celular com ultra-som

As células de estafilococo cultivadas em meio NAK e lavadas duas vezes com água foram colocadas em banho de gelo e submetidas a ultra-som na potência de 50 W. Cada tratamento de ultra-som consistia de 6 min, e a cada intervalo de 2 min era retirada uma alíquota para a observação do efeito, através de coloração de Gram.

#### 3.14.2 - Rompimento celular com alumina ou microesferas de vidro

As células de *S. aureus* lavadas foram tratadas com quantidades adequadas de alumina ou microesferas de vidro, em almofariz previamente refrigerado. O controle da alteração celular foi realizado através da coloração de Gram em amostras retiradas em diferentes intervalos de tempo.

### 3.14.3 - Isolamento da parede celular

Para o ensaio da difração de raios X, foram utilizados os microrganismos desenvolvidos nos meios NAK e NAKSA.

Para o estudo do efeito da parede celular na atividade de DNase, foram utilizados as culturas desenvolvidas em meio NAK.

As células foram coletadas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min e lavadas em água desionizada. As células obtidas foram trituradas com alumina ou microesferas de vidro por 5 min, em almofariz e o material resultante, novamente centrifugado a 2.000 g ( 4.410 rpm ) por 10 min para a remoção de células intactas e alumina ou microesferas de vidro. O sobrenadante obtido foi centrifugado a 15.000 g ( 12.080 rpm ) por 15 min e o "pellet", utilizado para os respectivos ensaios.

### 3.14.4 - Tratamento da parede celular com protease

Para o estudo do possível efeito da parede celular na atividade de DNase, qualquer enzima presente na parede teve de ser eliminada, seja por inativação ou por remoção. Com esta finalidade, a DNase presente foi inativada pela ação de uma protease, que por sua vez foi também inativada.

As proteases inicialmente testadas foram papaína, bromelina, pepsina e tripsina, cujas atividades foram estudadas através da hidrólise de caseína, seguindo-se essencialmente o ensaio descrito por PERLMANN e LORAND ( 85 ). O substrato utilizado foi caseína ( Sigma ) na concentração de 1% em tampão tris 0,05 M pH 8,0, exceto para o ensaio da atividade de



pepsina, realizado a pH 1,7. A atividade proteolítica foi determinada pelo aumento de absorvância a 280 nm em espectrofotômetro de UV ( Perking Elmer ).

Entre as proteases analisadas, escolheu-se a pepsina ( Wako Pure Chemical industries Ltda 1:10.000 ) devido à dificuldade na remoção ou inativação das outras proteases, após o tratamento enzimático da parede celular.

A ação da pepsina sobre a DNase foi estudada no sobrenadante da cultura em meios NAK e na própria suspensão da parede. A perda de atividade da DNase foi determinada pelo método turbidimétrico ( ítem 3.8.2 ).

As concentrações de pepsina testadas para o ensaio foram 250 µg/mL nos pH's 1,7; 2,0 e 3,0 e os tempos de incubação de 15, 30, 45 e 60 min . Todos os ensaios foram realizados sob condições de termoestabilidade em banho de água a 37°C.

Para verificar se a pepsina teria algum efeito proteolítico remanescente durante a determinação de DNase pelo método turbidimétrico, 0,8 mL de pepsina 500 µg/mL foi adicionada a 1,0 mL de sobrenadante e a mistura incubada a 37°C por 35 min . Os resultados mostram que esta protease não inativa a DNase presente no sobrenadante. Conclue-se portanto que neutralizando o pH da solução da parede celular após o tratamento com pepsina , não haverá interferência desta na ação de DNase.

Com base nestes dados, a parede celular do microrganismo desenvolvido em meio NAK foi ressuspendido em 20,0mL de água desionizada, acidificada a pH 2,0 e adicionada de 250 µg/mL de pepsina. A suspensão foi incubada a 37°C por uma hora e a ação da pepsina interrompida pela elevação do pH para 7,0 com NaOH 0,1 N.

### 3.15 - Estudo do efeito da parede celular na atividade de DNase

Para cada 1,0 mL de sobrenadante de cultura de *S. aureus* S-6 desenvolvida nos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , foram adicionados 0,0 a 0,5 mL de suspensão padronizada de parede ( ítem 3.14.4 ) e o volume final completado para 1,5 mL. A seguir, as soluções foram adequadamente diluídas e a atividade de DNase determinada pelo método turbidimétrico.

Na experiência seguinte, 0,1 mL de suspensão de parede foi diretamente adicionada a 1,0 mL de cada um dos sobrenadantes das culturas nos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , adequadamente diluídos. A seguir, foi determinada a atividade de DNase em cada tubo.

### 3.16 - Efeito de magnésio e ferro na atividade de DNase

Alíquotas de 1,0 mL de sobrenadante de uma cultura de *S. aureus* em meio NAK foram adicionadas de volumes adequados de soluções de ferro ou magnésio a 100 µg/mL, a fim de obter as seguintes concentrações de íon: 2,0; 4,0; 8,0; 16,0 µg/mL. A seguir procedeu-se a determinação de DNase pelo método turbidimétrico.

### 3.17 - Difração de raios X

#### 3.17.1 - Preparação das amostras

O estudo da difração de raios X foi realizado com células de *S. aureus* S-6 integrais e parede celular obtida de acordo com o ítem 3.14.3, desenvolvidos no meio NAK e NAKSA.

As amostras preparadas em forma de dispersões foram depositadas sobre substratos de vidro convexo, com o auxílio de pipeta Pasteur. A secagem da amostra foi feita lentamente numa atmosfera com umidade de 75% (solução saturada de  $\text{NaClO}_3$ ) ou 56% (solução saturada de  $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ), num frasco de vidro (93).

#### 3.17.2 - Procedimento

A estrutura da parede celular foi analisada por difração de raios X, utilizando-se a linha  $K_\alpha$  da radiação de cobre (1,54 Å) com filtro de níquel, para atenuar a linha  $K_\beta$ .

Os diagramas da parede celular de *S. aureus* S-6 obtidos com o tratamento com alumina e microesferas de vidro foram idênticas. Porém a perda do material durante o tratamento com alumina foi bastante significativo, preferindo-se o uso de microesferas de vidro.

Um tubo de raios X com alvo de cobre, foco normal e pontual, com potência máxima de 2 KW, alimentado por um gerador Philips, PW - 1140 de alta estabilidade, operando dentro de intervalo de 40 - 45 KV e 20 - 30 mA (0,8 - 1,35 KW) foi utilizado para a análise das amostras.

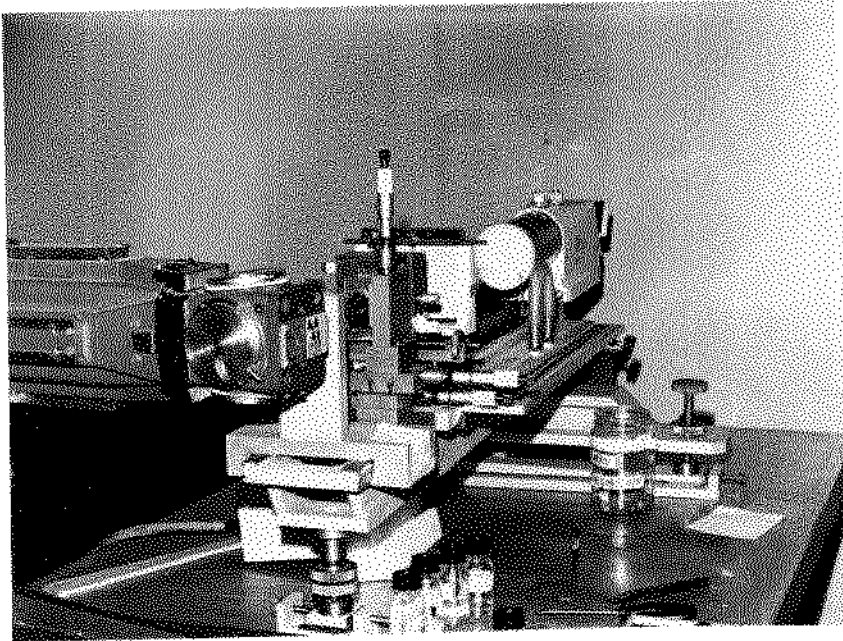


Foto A

Vista do conjunto da montagem experimental.

Foto B  
Vista lateral da montagem experimental.

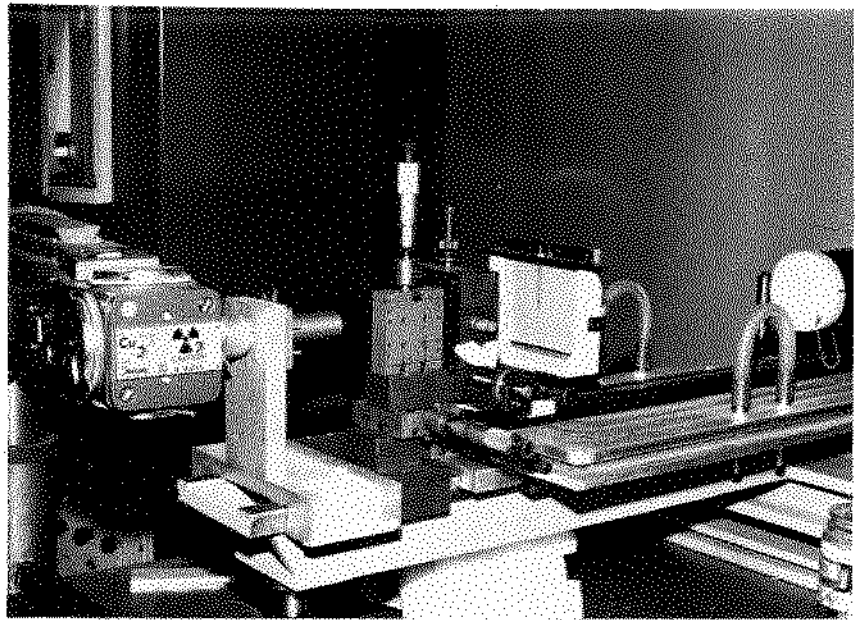


Figura 2 - Montagem experimental para difração de raios X.

As exposições variaram entre 10 e 18 horas.

Uma câmera de baixo ângulo existente no Laboratório de Cristalografia do IFGW, UNICAMP, foi utilizada para obter os diagramas de difração ( figura 2 ). A colimação do feixe foi feita por um sistema de duas fendas pontuais.

Os diagramas de difração foram obtidos por método fotográfico, utilizando-se o filme da Sakura Industrial, de grão fino.

A amostra foi colocada entre a segunda fenda e o filme, sendo que o último encontra-se a 10,4 cm da amostra. A distância da segunda fenda à amostra foi de 3 cm. Durante a exposição, a amostra foi colocada num compartimento especial no qual a umidade era mantida aproximadamente constante com a presença de um recipiente contendo uma solução salina adequada ( 75% de umidade ). As exposições foram realizadas à temperatura ambiente .

O esquema da montagem experimental está apresentado na figura 3.

### 3.17.3 - Leitura dos diagramas de difração

A leitura dos diagramas foi realizada por um microdensitômetro da Rigaku Denki e as intensidades obtidas no traçado microdensitômetro foram dadas em unidades arbitrárias.

O ângulo da difração  $\theta$  foi calculado a partir da relação trigonométrica entre o raio dos anéis de difração no filme, causado pelo material em estudo e a distância da amostra ao filme.

Sabendo-se que quando os raios X, são difratados numa certa direção do espaço por um cristal, arranjo de átomos ou estruturas orientadas, apresentando máximos de intensidade

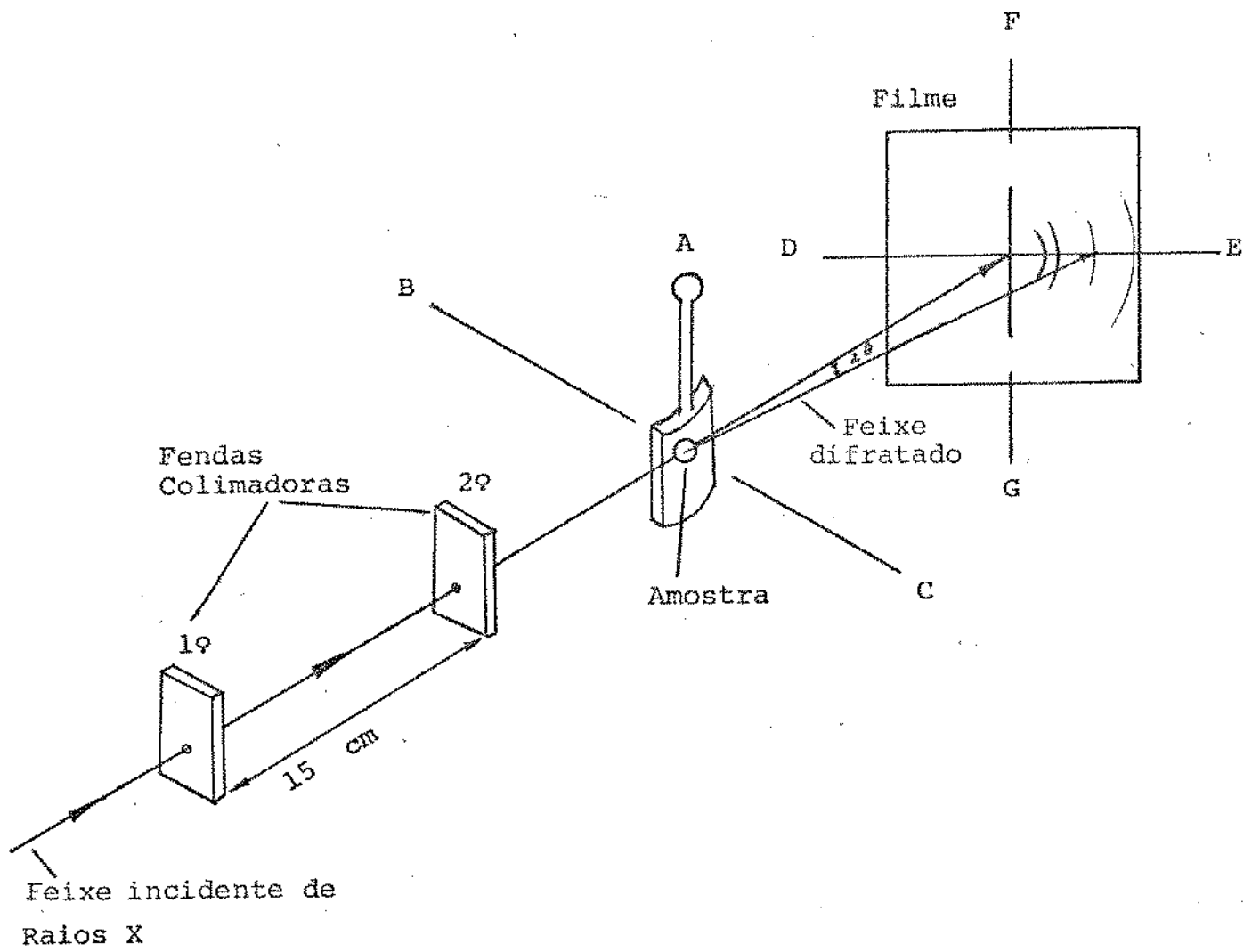


Figura 3 - Esquema da montagem experimental para difração de raios X.

( figura 4 ), as condições de Laue, e portanto a condição de Bragg, devem ser satisfeitas nessa direção ( 93 ).

A lei de Bragg ( 6 ) é descrita como:

$$2 d \operatorname{sen} \theta = n \lambda$$

onde  $n$  é um número inteiro e define a ordem da reflexão,  $\theta$  é o ângulo formado pelos feixes incidentes e difratados com o plano difratante ( ângulo de Bragg ),  $\lambda$  é o comprimento de onda dos raios X (  $\lambda = 1,5418 \text{ \AA}$ , linha  $K_{\alpha}$ , do cobre ) e  $d$  é o espaçamento interplanar.

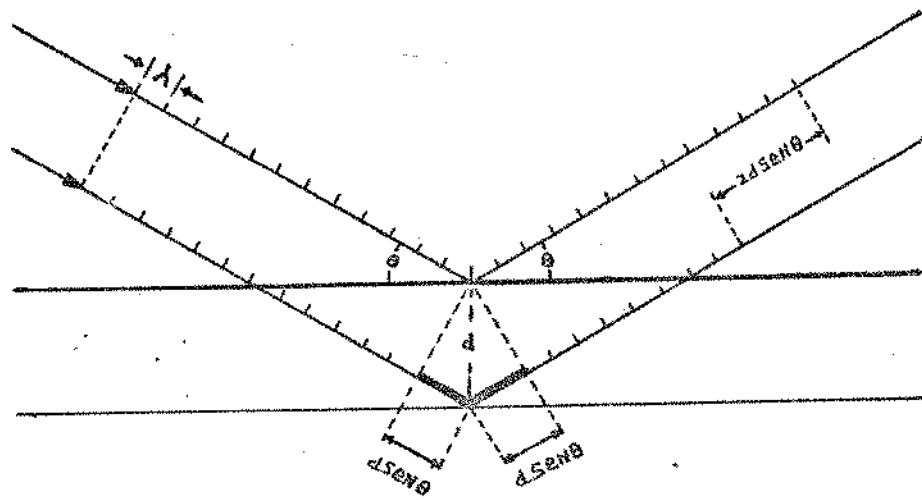


Figura 4 - Representação esquemática da lei de Bragg.



#### 4 - RESULTADOS

4.1 - Efeito de magnésio no desenvolvimento e secreção de proteí-  
nas extracelulares em *S. aureus* S-6.

4.1.1 - Desenvolvimento do microrganismo

Quando o comportamento da linhagem *S. aureus* S-6 foi comparado no meio NAK e no mesmo meio tratado com alumina ( meio NAKSA contendo 0,1 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> ), observou-se que no meio tratado houve uma diminuição no número de microrganismos e alteração na morfologia celular, de 0,75µ de diâmetro nas células desenvolvidas em meio NAK ( figura 5 ), para 0,95 a 3,25µ em meio NAKSA ( figura 6 ). Esta alteração correspondeu ao aparecimento de células maiores e bastante heterogêneas, observadas após a coloração de Gram ( tabela 1, figura 6 ). Algumas células apresentaram coloração Gram negativa, correspondendo em algumas preparações, a aproximadamente 10% do total da população. Entretanto, as células que se tingiram como Gram positivas, apresentaram coloração azul mais intensa do que as células normais. (figura 6 ).

A mesma tabela também mostra que a concentração ótima de magnésio no meio NAKSA está em torno de 1,1 µg/mL, quando se comparam os valores de peso seco obtidos nos meios NAKSA e NAK. Porém a adição desta quantidade de magnésio não restabeleceu nem o tamanho ( células com 0,95µ de diâmetro ), nem o aspecto normal ( tabela 1, figura 7 ). Aumentando a concentra

TABELA 1 - Efeito de magnésio sobre o crescimento e a morfologia de *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Peso seco (mg/mL) | Morfologia (Coloração de Gram)  |
|-----------------|--------------------------|-------------------|---|
| NAK             | 2,50                     | 1,23 ± 0,60       | CG(+) <sup>a</sup> pequenos normais de 0,75µ de diâmetro.   |
| NAKSA           | 0,10                     | 0,36 ± 0,27       | CG(+) <sup>b</sup> heterogêneos, grandes, sendo alguns CG(-) <sup>b</sup> , com 0,95 a 3,25µ de diâmetro. |
| NAKSA           | 0,15                     | 0,33 ± 0,21       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 0,20                     | 0,55 ± 0,10       | CG(+) <sup>b</sup> grandes, porém mais homogêneos do que com 0,10 µg/mL de Mg <sup>2+</sup> .             |
| NAKSA           | 0,26                     | 0,59 ± 0,21       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 0,30                     | 0,63 ± 0,23       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 0,50                     | 0,69 ± 0,29       | CG(+) <sup>b</sup> mais homogêneos do que nos meios anteriormente citados.                                |
| NAKSA           | 0,71                     | 0,76 ± 0,26       | CG(+) <sup>b</sup> homogêneos, tamanho tendendo à normalização.   |
| NAKSA           | 0,91                     | 0,96 ± 0,36       | CG(+) <sup>b</sup> homogêneos.  |
| NAKSA           | 1,11                     | 1,16 ± 0,41       | CG(+) <sup>b</sup> homogêneos, porém maiores do que os normais (meio NAK), com 0,95µ de diâmetro.         |
| NAKSA           | 1,51                     | 1,20 ± 0,05       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 2,12                     | 1,31 ± 0,17       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 5,10                     | 1,29 ± 0,07       | Idem acima.   |
| NAKSA           | 10,10                    | 0,88 ± 0,10       | CG(+) <sup>b</sup> heterogêneos, com 0,50 a 1,25µ de diâmetro.  |

<sup>a</sup> - CG(+): Cocos Gram positivos

<sup>b</sup> - CG(-): Cocos Gram negativos

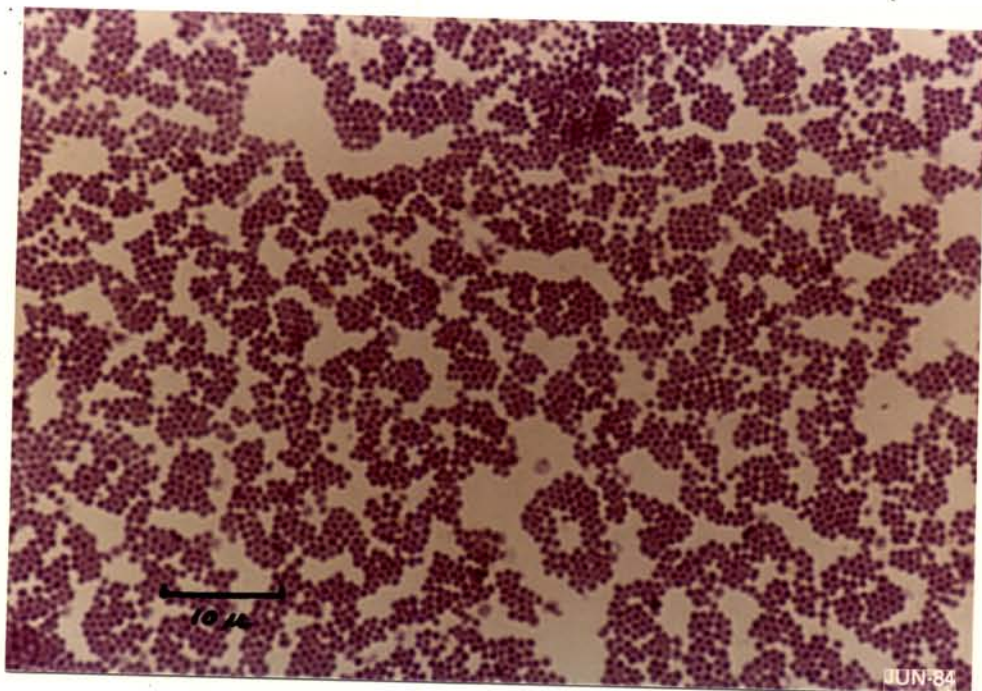


Figura 5 - *S. aureus* S-6 desenvolvido em meio NAK.

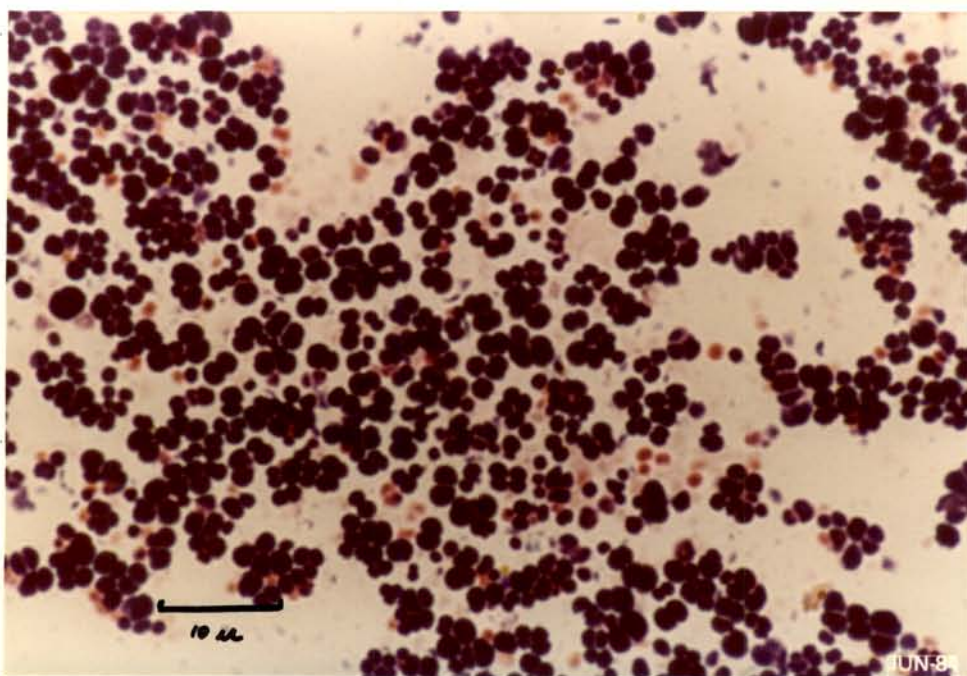


Figura 6 - *S. aureus* S-6 desenvolvido em meio NAKSA.

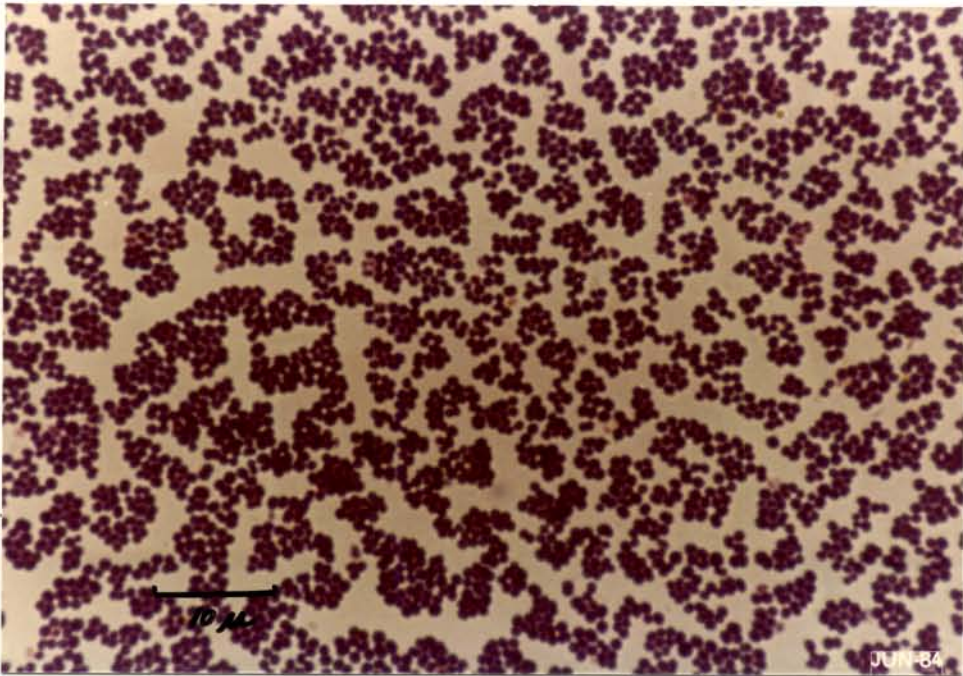


Figura 7 - Efeito de 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  sobre  
*S. aureus* S-6 em meio NAKSA.



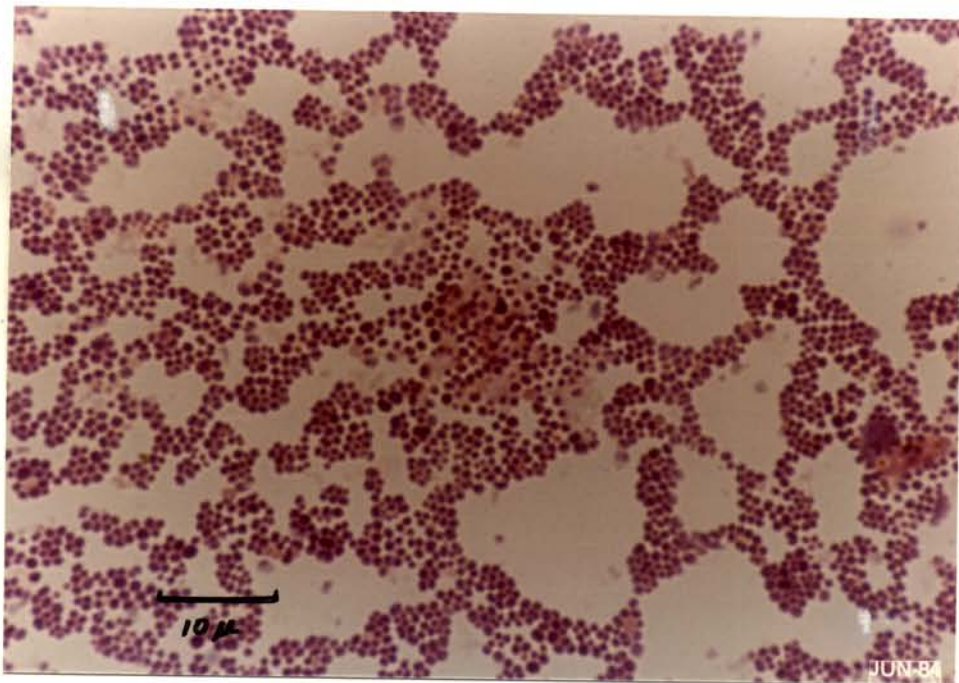


Figura 8 - Efeito de 10,10 µg/mL de  $Mg^{2+}$  sobre  
*S. aureus* S-6 em meio NAKSA.

ção de magnésio para 10,10 µg/mL, houve inclusive uma alteração da morfologia celular ( 0,50 a 1,25µ de diâmetro ) e diminuição do peso seco ( tabela 1, figura 8 ).

Em algumas culturas desenvolvidas em meio NAKSA e centrifugadas a 10.000 rpm, as células se desprendiam mais facilmente da parede do tubo de centrifugação. Em alguns casos, a ressuspensão das células era dificultada devido à formação de grumos que prejudicavam a homogeneização e conseqüentemente a determinação de peso seco. Esta alteração foi observada principalmente quando o peso seco era menor, para a mesma concentração de magnésio no meio. Esta aglutinação desapareceu com o aumento da concentração do cátion, sendo que a concentrações de 0,20 µg/mL, não se observou mais este efeito.

#### 4.1.2 - Liberação de proteínas extracelulares no meio de cultura

##### 4.1.2.1 - Enterotoxinas

Os resultados descritos na tabela 2 indicam que a produção de EEB foi bastante afetada, se comparada a EEA, pela concentração de magnésio no meio de cultura. Comparando a quantidade destas toxinas no meio NAK e NAKSA, observou-se que a produção de EEB foi 18,4 vezes superior no primeiro, enquanto que a produção de EEA foi de apenas 1,3 vezes.

A produção de EEB aumentou gradativamente com o aumento da concentração de magnésio, atingindo o valor 63,0 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, e decrescendo até um valor de 40,0 µg/mL, para 10,10 µg/mL do cátion.

A EEA atingiu o nível de máxima produção em

TABELA 2 - Efeito de magnésio na produção de EEA e EEB em *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | EEA <sup>a</sup> (µg/mL) | EEB <sup>b</sup> (µg/mL) |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| NAK             | 2,50                     | 0,643                    | 80,0                     |
| NAKSA           | 0,10                     | 0,489                    | 4,4                      |
| NAKSA           | 0,15                     | 0,362                    | 4,3                      |
| NAKSA           | 0,20                     | 0,354                    | 6,0                      |
| NAKSA           | 0,26                     | 0,548                    | 9,6                      |
| NAKSA           | 0,30                     | 0,542                    | 12,8                     |
| NAKSA           | 0,50                     | 0,513                    | 17,6                     |
| NAKSA           | 0,71                     | 0,616                    | 43,2                     |
| NAKSA           | 0,91                     | 0,575                    | 51,0                     |
| NAKSA           | 1,11                     | 0,628                    | 63,0                     |
| NAKSA           | 1,51                     | 0,603                    | 60,0                     |
| NAKSA           | 2,12                     | 0,590                    | 62,0                     |
| NAKSA           | 5,10                     | ND <sup>c</sup>          | ND                       |
| NAKSA           | 10,10                    | ND                       | 40,0                     |

*a* - EEA: Enterotoxina estafilocócica A

*b* - EEB: Enterotoxina estafilocócica B

*c* - ND: Não determinado.

meio NAKSA com magnésio a partir de 0,26 µg/mL deste íon, que se manteve constante para concentrações crescentes de magnésio, até 2,12 µg/mL.



#### 4.1.2.2 - Enzimas extracelulares

O estudo da influência de magnésio na presença de enzimas extracelulares foi baseado na determinação de exoenzimas DNase e coagulase.

##### 4.1.2.2.1 - DNase

Quanto à produção de DNase, determinada pelo método semi-quantitativo de LACHICA et alii ( 52 ), observou-se que a atividade enzimática a partir de 0,26 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> foi similar ao valor obtido utilizando uma cultura desenvolvida em meio NAK ( 2,5 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> ) ( tabela 3 ).

Entretanto, quando a produção de enzima foi determinada pelo método quantitativo turbidimétrico de ERICKSON e DEIBEL ( 22 ), observou-se que pequenas variações nas concentrações de magnésio produziam alterações significativas na produção de DNase ( tabela 3 ).

De acordo com os resultados, a adição de magnésio estimulou a produção da enzima. Para uma concentração de íon magnésio de 0,15 µg/mL, já se observou um aumento da atividade, que atingiu valores máximos em torno de 1,11 µg/mL.

Uma comprovação indireta de que o aumento da concentração de enzima no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, não era devido à injúria celular, foi obtida através da determinação de desidrogenase lática ( LDH ) no sobrenadante da cultura. A ausência de LDH foi constatada em todos os sobrenadantes ( tabela 3 ).

TABELA 3 - Efeito de magnésio na produção de DNase e na liberação de desidrogenase lática em *S. aureus* S-6.

| Meio<br>de<br>Cultura | Mg <sup>2+</sup><br>(µg/mL) | DNase                    |                               |                             |
|-----------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
|                       |                             | TDA <sup>a</sup><br>(mm) | Turbidimetria<br>(µg/mL/min.) | LDH <sup>b</sup><br>(µU/mL) |
| NAK                   | 2,50                        | 4,64                     | 28,45                         | NDe <sup>c</sup>            |
| NAKSA                 | 0,10                        | 3,0                      | 2,75                          | NDe                         |
| NAKSA                 | 0,15                        | 3,9                      | 5,92                          | ND <sup>d</sup>             |
| NAKSA                 | 0,20                        | 4,5                      | 9,55                          | ND                          |
| NAKSA                 | 0,26                        | 5,0                      | 26,44                         | ND                          |
| NAKSA                 | 0,30                        | 4,0                      | 19,40                         | ND                          |
| NAKSA                 | 0,50                        | 5,0                      | 35,33                         | NDe                         |
| NAKSA                 | 0,71                        | 5,2                      | 49,55                         | ND                          |
| NAKSA                 | 0,91                        | 5,3                      | 48,55                         | ND                          |
| NAKSA                 | 1,11                        | 5,2                      | 89,33                         | NDe                         |
| NAKSA                 | 1,51                        | 5,0                      | 85,56                         | ND                          |
| NAKSA                 | 2,12                        | 5,0                      | 87,03                         | NDe                         |
| NAKSA                 | 5,10                        | ND                       | 85,38                         | NDe                         |
| NAKSA                 | 10,10                       | ND                       | 82,22                         | ND                          |

<sup>a</sup> - TDA: ágar azul de ortotoluidina - DNA

<sup>b</sup> - LDH: desidrogenase lática

<sup>c</sup> - NDe: não detectado

<sup>d</sup> - ND : não determinado.

TABELA 4 - Efeito de magnésio na produção de coagulase em *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Coagulase |                         |
|-----------------|--------------------------|-----------|-------------------------|
|                 |                          | (em tubo) | (µg de fibrinogênio/mL) |
| NAK             | 2,5                      | 4+        | 1.610                   |
| NAKSA           | 0,1                      | 2+        | 365                     |
| NAKSA           | 0,4                      | 3+        | 890                     |
| NAKSA           | 0,6                      | 3+        | 960                     |
| NAKSA           | 1,1                      | 4+        | 1.440                   |
| NAKSA           | 2,1                      | 4+        | 1.150                   |
| NAKSA           | 5,1                      | 4+        | 1.440                   |
| NAKSA           | 10,1                     | 3+        | 770                     |

#### 4.1.2.2.2 - Coagulase

Os resultados obtidos pelo método em tubo não permitem observar variações na produção de enzima para as diferentes concentrações de íon magnésio ( tabela 4 ). Porém utilizando o método quantitativo, foi observado que a atividade de coagulase foi afetada pelas variações na concentração de magnésio, sendo que no meio NAKSA com apenas 0,1 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, a atividade da enzima foi 4,5 vezes menor que no meio NAK ( tabela 4 ). A atividade no meio NAKSA foi aumentando gradativamente com o

aumento na concentração de íon, sendo que para 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , o valor obtido foi bastante próximo ao valor apresentado no meio NAK ( 2,5 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ). Este valor permaneceu constante até 5,1 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , a partir do qual a atividade enzimática foi decrescendo com o aumento de magnésio, obtendo-se uma diminuição de 50% na atividade, para 10,10 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ( tabela 4 ).

#### 4.1.3 - Efeito da concentração de magnésio no meio NAK

Quantidades crescentes de magnésio foram adicionadas ao meio NAK ( tabela 5 ), para constatar se o aumento da atividade enzimática com a concentração crescente de magnésio no meio NAKSA ( tabela 3 ) era devido a apenas um efeito do íon, ou a um efeito combinado de íon em presença de células alteradas.

Pelos resultados obtidos na tabela 5, observa-se que concentrações crescentes de 3,0 a 10,10 µg/mL de  $Mg^{2+}$  não afetaram nenhuma das características analisadas.

TABELA 5 - Efeito da adição de magnésio em meio NAK, no crescimento, morfologia e produção de DNase pelo *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Peso seco (mg/mL) | DNase                 |                            | Morfologia (coloração de Gram)                |
|-----------------|--------------------------|-------------------|-----------------------|----------------------------|---|
|                 |                          |                   | TDA <sup>a</sup> (mm) | Turbidimetria (µg/mL/min.) |   |
| NAK             | 2,50                     | 1,23±0,6          | 5,0                   | 28,45                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 3,02                     | 1,25±0,21         | 5,0                   | 35,11                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 3,43                     | 1,36±0,1          | 5,0                   | 39,56                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 4,04                     | 1,37±0,05         | 5,0                   | 33,33                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 5,02                     | 1,21±0,04         | 5,0                   | 32,00                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 6,04                     | 1,53±0,07         | 5,0                   | 37,78                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |
| NAK             | 10,10                    | 1,30±0,05         | 5,0                   | 33,00                      | CG(+) <sup>b</sup> pequenos, nor <u>ma</u> is |

*a* - TDA: ágar azul de ortotoluidina - DNA

*b* - CG(+): cocos Gram positivos

#### 4.2 - Efeito de ferro no desenvolvimento e secreção de proteínas extracelulares em *S. aureus* S-6.

O íon ferro foi adicionado em quantidades crescentes ao meio NAKSA, cuja concentração de magnésio foi fixada em 1,11 µg/mL. As mesmas quantidades de ferro foram também adicionadas ao meio NAKSA sem adição de magnésio.

##### 4.2.1 - Desenvolvimento de *S. aureus* S-6.

Os resultados apresentados na tabela 6 indicam que a adição de ferro ao meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , em quantidades superiores a 1,2 µg/mL, teve um efeito adverso ao desenvolvimento do microrganismo, o que pode ser observado pelos valores de peso seco. Quanto à morfologia celular, tornou-se progressivamente alterada, em concentrações crescentes de ferro, sendo que com 18,78 µg/mL de  $Fe^{2+}$ , o tamanho celular foi de 0,44 a 1,60µ ( figura 9 ).

É interessante notar que no meio NAK, que contém quantidades iguais de ferro e magnésio ( 2,5 µg/mL ), obteve-se um bom desenvolvimento celular ( 1,23 mg/mL de peso seco ). Entretanto, a adição de 1,19 µg/mL de  $Fe^{2+}$  ao meio NAKSA contendo 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , diminuiu o crescimento para 0,89 mg/mL, quando comparado com o valor 1,16 mg/mL obtido em meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  e 0,4 µg/mL de  $Fe^{2+}$  ( tabela 6 ). A atividade nucleásica no mesmo meio contendo 1,19 µg/mL de  $Fe^{2+}$  ( 39,78 µg/mL/min ), apresentou-se bastante diminuída no meio NAKSA com 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  sem adição de ferro ( 89,33 µg/mL/

TABELA 6 - Efeito combinado de ferro e magnésio no crescimento de *S. aureus* S-6

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Fe <sup>2+</sup> (µg/mL) | Relação Fe <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> | Peso seco (mg/mL) | Morfologia (Coloração de Gram)  |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--|-------------------|---|
| 1. NAK          | 2,50                     | 2,50                     | 1,0  | 1,23±0,60         | CG(+) <sup>a</sup> pequenos, normais.                                 |
| 2. NAKSA        | 0,10                     | 0,40                     | 4,0  | 0,36±0,27         | CG(+) heterogêneos, grandes, alguns CG(-) <sup>b</sup> .              |
| 3. NAKSA        | 1,11                     | 0,40                     | 0,4  | 1,16±0,41         | CG(+) pequenos e homogêneos, maiores que os normais (meio NAK).       |
| 4. NAKSA        | 1,11                     | 1,19                     | 1,1  | 0,89±0,31         | Idem acima.   |
| 5. NAKSA        | 1,11                     | 2,13                     | 1,9  | 0,89±0,36         | CG(+) um pouco maiores e mais deformados que 4.                       |
| 6. NAKSA        | 1,11                     | 4,00                     | 3,6  | 0,77±0,34         | CG(+) um pouco mais deformados que 5.                                 |
| 7. NAKSA        | 1,11                     | 18,78                    | 16,9                                       | 0,92±0,26         | CG(+) mais heterogêneos que 6.  |
| 8. NAKSA        | 0,10                     | 1,19                     | 11,9                                       | 0,32±0,07         | CG(+) semelhantes aos desenvolvidos em 2.                             |
| 9. NAKSA        | 0,10                     | 2,13                     | 21,3                                       | 0,20±0,06         | Idem acima.   |
| 10. NAKSA       | 0,10                     | 4,00                     | 40,0                                       | 0,28±0,04         | Idem acima.   |
| 11. NAKSA       | 0,10                     | 18,78                    | 187,8                                      | 0,40±0,08         | CG(+) mais heterogêneos e com maior número de CG(-), de 0,44 a 1,60µ. |

a - CG(+): cocos Gram positivos.

b - CG(-): cocos Gram negativos.

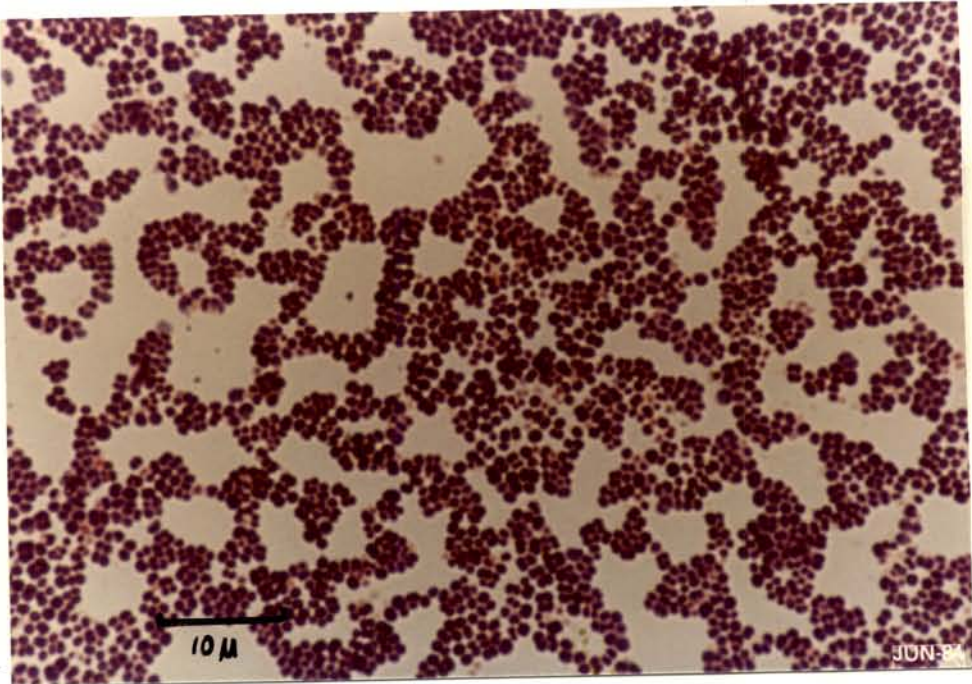


Figura 9 - Efeito de 18,78 µg/mL de  $\text{Fe}^{2+}$  sobre *S. aureus* S-6 em meio NAKSA contendo 1,11 µg/mL de  $\text{Mg}^{2+}$ .



min ), mas ainda assim, maior do que no meio NAK ( 28,45 µg/mL/min ), tabela 7.

Quando as mesmas quantidades crescentes de ferro foram adicionadas ao meio NAKSA, não houve alteração no crescimento das células ( tabela 6 ). A morfologia celular já bastante alterada no meio NAKSA, foi ainda mais afetada no meio NAKSA contendo 18,78 µg/mL de  $Fe^{2+}$ . Neste meio, as células se apresentaram bastante heterogêneas, soltas e a proporção de células Gram negativas foi maior.

#### 4.2.2 - Liberação de proteínas extracelulares no meio de cultura

##### 4.2.2.1 - Enterotoxinas

Os resultados apresentados na tabela 7 mostram que a concentração de EEB no sobrenadante de cultura em meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  adicionado de  $Fe^{2+}$ , foi gradativamente diminuindo, à medida que aumentava a concentração de ferro.

No que se refere a EEA, o ferro estimulou ligeiramente ou não afetou a produção desta toxina até a concentração de 4,0 µg/mL, ou seja, na relação  $Fe^{2+} / Mg^{2+}$  de 3,6. Porém um efeito inibitório foi observado a 18,78 µg/mL de  $Fe^{2+}$ , quando a mesma relação foi de 16,9.

Por outro lado, a adição das mesmas quantidades de ferro ao meio NAKSA teve um efeito inibitório, igual para todas as concentrações adicionadas, na produção de EEA, cuja concentração foi aproximadamente 50% menor do que no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ .

TABELA 7 - Efeito combinado de ferro e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por *S. aureus* S-6.

| Meio de<br>Cultura | Mg <sup>2+</sup><br>(µg/mL) | Fe <sup>2+</sup><br>(µg/mL) | Relação<br>Fe <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> | Enterotoxinas               |                             | DNase                    |                               |
|--------------------|-----------------------------|-----------------------------|---|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------------|
|                    |                             |                             |   | EFA <sup>a</sup><br>(µg/mL) | EEB <sup>b</sup><br>(µg/mL) | TDA <sup>c</sup><br>(mm) | Turbidimetria<br>(µg/mL/min.) |
| NAK                | 2,50                        | 2,50                        | 1,0   | 0,643                       | 80,0                        | 4,6                      | 28,45                         |
| NAKSA              | 0,10                        | 0,40                        | 4,0   | 0,489                       | 4,4                         | 3,0                      | 2,75                          |
| NAKSA              | 1,11                        | 0,40                        | 0,4   | 0,628                       | 63,0                        | 5,2                      | 89,33                         |
| NAKSA              | 1,11                        | 1,19                        | 1,1   | 0,643                       | 60,0                        | 4,5                      | 39,78                         |
| NAKSA              | 1,11                        | 2,13                        | 1,9   | 0,721                       | 56,0                        | 4,0                      | 24,55                         |
| NAKSA              | 1,11                        | 4,00                        | 3,6   | 0,755                       | 48,0                        | 3,5                      | 21,32                         |
| NAKSA              | 1,11                        | 18,78                       | 16,9  | 0,562                       | 39,0                        | 3,0                      | 8,75                          |
| NAKSA              | 0,10                        | 1,19                        | 11,9  | 0,236                       | ND <sup>d</sup>             | 2,8                      | 0,52                          |
| NAKSA              | 0,10                        | 2,13                        | 21,3  | 0,298                       | ND                          | 2,6                      | 0,41                          |
| NAKSA              | 0,10                        | 4,00                        | 40,0  | 0,281                       | ND                          | 2,5                      | 0,46                          |
| NAKSA              | 0,10                        | 18,78                       | 187,8   | 0,244                       | ND                          | 2,0                      | 0,46                          |

a - EFA: enterotoxina A

b - EEB: enterotoxina B

c - TDA: ágar azul de ortotoluidina - DNA

d - ND: não determinado

#### 4.2.2.2 - Enzimas extracelulares

Os resultados apresentados na tabela 7 mostram uma diminuição na atividade nucleásica à medida que aumenta a proporção de ferro no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ . Para um teor de ferro de 2,13 µg/mL, a atividade obtida foi a do meio NAK ( 28,45 µg/mL/min ), atingindo o valor de 8,75 µg/mL/min no meio contendo 18,78 µg/mL de  $Fe^{2+}$ .

Por outro lado, a adição das mesmas quantidades de ferro ao meio NAKSA teve um efeito inibitório, igual para todas as concentrações adicionadas, na produção de DNase, cuja concentração foi 20% do valor obtido no meio NAKSA.

Em relação à produção de coagulase pelo método quantitativo, tabela 8, observa-se que para concentrações de ferro entre 0,4 e 16,0 µg/mL ao meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  não se observou qualquer efeito, seja inibição ou ativação, e os resultados são comparáveis ao valor obtido no meio NAK.

#### 4.3 - Efeito da conalbumina no desenvolvimento e secreção de proteínas extracelulares em *S. aureus* S-6.

Para o estudo do efeito da conalbumina, 0,6 mL da solução desta proteína a 5,0 mg/mL foram adicionados a um volume final de 10,0 mL de meio. Segundo PAGNOCCA e SALZBERG (80) esta quantidade seria o suficiente para quelar todos os íons ferro presente no meio.

Embora a adição de conalbumina no meio NAKSA

TABELA 8 - Coagulase no sobrenadante de culturas de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em meios contendo diferentes concentrações de ferro.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Fe <sup>2+</sup> (µg/mL) | Relação Fe <sup>2+</sup> /Mg <sup>2+</sup> | Coagulase (µg fibrinogênio/mL) |
|-----------------|--------------------------|--------------------------|--|--------------------------------|
| NAK             | 2,50                     | 2,5                      | 1,0  | 1,610                          |
| NAKSA           | 0,10                     | 0,4                      | 4,0  | 365                            |
| NAKSA           | 1,11                     | 0,4                      | 0,4  | 1.440                          |
| NAKSA           | 1,11                     | 1,1                      | 1,0  | 1.700                          |
| NAKSA           | 1,11                     | 2,0                      | 1,8  | 1.440                          |
| NAKSA           | 1,11                     | 4,0                      | 3,6  | 1.230                          |
| NAKSA           | 1,11                     | 8,0                      | 7,2  | 1.540                          |
| NAKSA           | 1,11                     | 16,0                     | 14,4                                       | 1.360                          |

+ 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> não tenha alterado significativamente a morfologia celular ( tabela 9 ), houve uma ligeira diminuição na atividade de DNase ( tabela 10 ). Entretanto, esta diminuição de atividade não foi suficientemente acentuada para afirmar que a conalbumina apresenta um efeito inibitório na atividade desta enzima.

Em relação à coagulase, verificou-se um ligei-

TABELA 9 - Efeito combinado de conalbumina e magnésio no crescimento de *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Mg <sup>2+</sup> (µg/mL) | Conalbumina (mL solução 5 mg/mL) | Peso seco (mg/mL) | Morfologia (Coloração de Gram)  |
|-----------------|--------------------------|----------------------------------|-------------------|---|
| NAK             | 2,50                     | -                                | 1,23±0,60         | CG(+) <sup>a</sup> pequenos, normais.                                     |
| NAKSA           | 0,10                     | -                                | 0,36±0,27         | CG(+) heterogêneos, grandes, alguns CG(-) <sup>b</sup>                    |
| NAKSA           | 1,11                     | -                                | 1,16±0,41         | CG(+) pequenos e homogêneos, maiores que normais (meio NAK)               |
| NAKSA           | 0,10                     | 0,6                              | 0,35±0,23         | CG(+) heterogêneos e grandes, alguns CG(-).                               |
| NAKSA           | 1,11                     | 0,6                              | 0,91±0,10         | CG(+) semelhantes aos de desenvolvidos em 1,11µg/mL de Mg <sup>2+</sup> . |

a - CG(+): cocos Gram positivos.

b - CG(-): cocos Gram negativos.

ro aumento na produção, quando comparado ao mesmo meio sem adição de conalbumina: NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> ( tabela 10 ). Segundo os resultados apresentados na tabela 10, a conalbumina não afeta a produção de EEA, nem de EEB, quando adicionada ao meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> .

No meio NAKSA ( sem adição de Mg<sup>2+</sup> ), embora a conalbumina não afetasse o crescimento ( tabela 9 ), ocorreu um aumento na produção de todas as proteínas extracelulares em estudo ( tabela 10 ).

TABELA 10 - Efeito combinado de conalbumina e magnésio na liberação de proteínas extracelulares por *S. aureus* S-6.

| Meio de<br>Cultura | Mg <sup>2+</sup><br>(µg/mL) | conalbumina<br>(mL solução 5 mg/mL) | Enterotoxina                |                             | DNase<br>TDA <sup>c</sup> (mm) | Turbidimetria<br>(µg/mL/min.) | Coagulase<br>em tubo | Quantitativo<br>(µg fibr./mL) |
|--------------------|-----------------------------|-------------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|--------------------------------|-------------------------------|----------------------|-------------------------------|
|                    |                             |                                     | EEA <sup>a</sup><br>(µg/mL) | EEB <sup>b</sup><br>(µg/mL) |                                |                               |                      |                               |
| NAK                | 2,50                        | -                                   | 0,643                       | 80,0                        | 4,6                            | 28,45                         | 4+                   | 1,610                         |
| NAKSA              | 0,10                        | -                                   | 0,489                       | 4,4                         | 3,0                            | 2,75                          | 2+                   | 365                           |
| NAKSA              | 1,11                        | -                                   | 0,628                       | 63,0                        | 5,2                            | 89,33                         | 4+                   | 1,440                         |
| NAKSA              | 0,10                        | 0,6                                 | 0,548                       | 13,1                        | 3,0                            | 3,33                          | 4+                   | 420                           |
| NAKSA              | 1,11                        | 0,6                                 | 0,522                       | 61,0                        | 5,0                            | 67,42                         | 4+                   | 1.700                         |

a - EEA: enterotoxina A

b - EEB: enterotoxina B

c - TDA: ágar azul de ortotolidina - DNA

#### 4.4 - Estudo da localização de atividade das enzimas coagulase e nuclease em *S. aureus* S-6

O estudo da localização da atividade das enzimas extracelulares foi realizado, tratando as células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas nos diferentes meios utilizados neste trabalho, com a enzima lisostafina ou pela utilização de ultrassom.

Pelos resultados apresentados na tabela 11, as atividades nucleásicas na fração liberada pela lisostafina e retida no protoplasto foram bastante inferiores, na ordem de 200 vezes, em relação à mesma enzima presente nos respectivos sobrenadantes de culturas ( tabela 3, 7 e 10 ).

Quando se compara a atividade de DNase liberada pela lisostafina e retida nos protoplastos, não se observam diferenças quantitativas na concentração enzimática nas duas frações celulares ( tabela 11 ).

Na mesma tabela, observa-se que nas células desenvolvidas no meio NAKSA ( 0,1 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ), a quantidade de DNase "superficial" foi menor do que a produzida em organismos desenvolvidos na presença de uma concentração ótima de magnésio ( 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ).

As concentrações de DNase "superficial" nas células desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  foram idênticas ( tabela 11 ), se considerar a pequena quantidade produzida e a sensibilidade do método. Isto confirma que a menor atividade de DNase no primeiro meio ( tabela 3 ) não se deve à retenção desta enzima na superfície celular, nas célu -

TABELA 11 - Tratamento das células de *S. aureus* 5-6 com lisostafina: DNase liberada e DNase retida nos protoplastos.

| Meio de Cultura                    | DNase (µg/mL/min.) |                 |        |       |
|------------------------------------|--------------------|-----------------|--------|-------|
|                                    | Liberada           |                 | Retida |       |
|                                    | A <sup>a</sup>     | B <sup>b</sup>  | A      | B     |
| NAK                                | 0,394              | 0,505           | 0,461  | 0,422 |
| NAKSA                              | 0,083              | 0,372           | 0,089  | 0,361 |
| NAKSA + 0,4Mg <sup>c</sup>         | 0,072              | 0,455           | 0,289  | 0,211 |
| NAKSA + 0,6Mg                      | 0,250              | 0,639           | 0,422  | 0,517 |
| NAKSA + 1,1Mg                      | 0,467              | 0,639           | 0,489  | 0,589 |
| NAKSA + 2,1Mg                      | 0,439              | 0,661           | 0,494  | 0,522 |
| NAKSA + 5,1Mg                      | 0,583              | 0,650           | 0,522  | 0,555 |
| NAKSA + 10,1Mg                     | 0,350              | 0,644           | 0,517  | 0,553 |
| NAKSA + conalbumina <sup>d</sup>   | 0,094              | ND <sup>f</sup> | 0,089  | ND    |
| NAKSA + 1,1Mg + conalbumina        | 0,444              | ND              | 0,533  | ND    |
| NAKSA + 1,1Mg + 1,1Fe <sup>e</sup> | 0,344              | 0,467           | 0,433  | 0,539 |
| NAKSA + 1,1Mg + 2,0Fe              | 0,250              | 0,528           | 0,433  | 0,467 |
| NAKSA + 1,1Mg + 4,0Fe              | 0,433              | 0,572           | 0,433  | 0,505 |
| NAKSA + 1,1Mg + 8,0Fe              | 0,156              | 0,667           | 0,399  | 0,483 |
| NAKSA + 1,1Mg + 16,0Fe             | 0,394              | 0,505           | 0,572  | 0,622 |

a-A: culturas mantidas por transferências sucessivas

b-B: cultura mantida refrigerada a 10°C por 8 meses

c- : µg/mL de Mg<sup>2+</sup>

d- : 0,6 mL da solução de conalbumina a 5,0 mg/mL

e- : µg/mL de Fe<sup>2+</sup>

f- : não determinado



las desenvolvidas no meio NAK.

Em relação às células desenvolvidas na presença de ferro, não se observou uma diferença mensurável no nível de DNase superficial, em relação ao mesmo meio sem ferro ( tabela 11 ).

A determinação quantitativa de coagulase foi realizada nas mesmas frações celulares obtidas após tratamento com lisostafina. Entretanto não foi possível detectar nenhuma atividade coagulásica através da metodologia empregada ( 84 ), provavelmente devido à pequena quantidade de coagulase presente na superfície do microrganismo em estudo.

Em relação ao tratamento das células com ultrassom, não se observou a liberação de DNase no intervalo de tempo entre 0 e 20 minutos a 50 W, o que foi constatado através de medidas de absorbância e observação microscópica após a coloração de Gram.

#### 4.5 - Enzimas intracelulares: efeito da concentração iônica do meio de cultura.

A determinação da enzima intracelular desidrogenase lática teve como finalidade comparar a concentração desta na linhagem *S. aureus* S-6, quando desenvolvida nos meios NAK e NAKSA com diferentes concentrações de ferro, magnésio e conalbumina.

Primeiramente construiu-se uma curva padrão contendo  $\mu\text{U}$  de LDH / mL com os dados descritos na tabela 12

TABELA 12 - Atividade de desidrogenase lática expressa em absorbância - Curva padrão.

| Tempo<br>(min.) | LDH<br>( $\mu$ U/mL) | Absorbância a 340 nm |       |       |       |       |       |       |
|-----------------|----------------------|----------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
|                 |                      | 100                  | 200   | 400   | 800   | 1.600 | 3.200 | 6.400 |
| 5               |                      | 0,001                | 0,004 | 0,011 | 0,015 | 0,042 | 0,080 | 0,173 |
| 10              |                      | 0,004                | 0,009 | 0,023 | 0,030 | 0,080 | 0,142 | 0,279 |
| 15              |                      | 0,006                | 0,013 | 0,034 | 0,047 | 0,113 | 0,193 | 0,358 |
| 20              |                      | 0,009                | 0,018 | 0,045 | 0,067 | 0,145 | 0,236 | 0,426 |
| 30              |                      | 0,014                | 0,027 | 0,065 | 0,092 | 0,191 | 0,305 | 0,516 |
| 40              |                      | 0,018                | 0,036 | 0,082 | 0,116 | 0,232 | 0,361 | 0,587 |
| 50              |                      | 0,024                | 0,044 | 0,098 | 0,139 | 0,267 | 0,406 | 0,642 |
| 60              |                      | 0,029                | 0,053 | 0,115 | 0,159 | 0,298 | 0,445 | 0,687 |

( figura 20) a fim de selecionar a faixa que apresentasse linearidade. De acordo com a curva obtida, observa-se que existe uma queda de atividade para concentrações superiores a 400  $\mu\text{U/mL}$  de LDH .

Tendo em vista que a quantidade da enzima na linhagem S-6 não foi superior a 300  $\mu\text{U/mL}$ , considerou-se 30 minutos como tempo ideal para a construção da curva padrão, já que nesta região, o coeficiente angular é constante ( figura 20 ). Para tempos de incubação inferiores a 30 minutos, existe correlação linear entre atividade e absorbância, porém a leitura obtida é bastante baixa, diminuindo a sensibilidade do método.

Os resultados descritos na tabela 13 indicam que a produção de LDH na linhagem S-6 foi afetada em baixas concentrações de magnésio, porém este efeito foi diminuindo para níveis crescentes do íon. A produção de LDH atingiu um valor de 128,9  $\mu\text{U/mL}$  em torno de 1,11  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ , sendo que esta atividade manteve-se constante para todas as concentrações subsequentes de magnésio. Este valor constante foi de aproximadamente 50% do valor observado nas células desenvolvidas em meio NAK, enquanto que em meio NAKSA, a enzima LDH não foi detectada.

A presença de conalbumina tanto no meio NAKSA como em NAKSA + 1,11  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ , não afetou a produção de LDH. Assim como a adição de concentrações crescentes de ferro ao meio NAKSA + 1,11  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ , não mostrou efeitos inibitórios na produção de LDH ( tabela 13 ).

TABELA 13 - Desidrogenase lática em células de *S. aureus*S-6 desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA adicionado de magnésio, ferro e conalbumina.

| Meio de Cultura                    | LDH <sup>a</sup><br>( $\mu$ U/mL) |
|------------------------------------|-----------------------------------|
| NAK                                | 233,3                             |
| NAKSA                              | NDe <sup>b</sup>                  |
| NAKSA + 0,4Mg <sup>c</sup>         | 28,9                              |
| NAKSA + 0,6Mg                      | 100,0                             |
| NAKSA + 1,1Mg                      | 128,9                             |
| NAKSA + 2,1Mg                      | 128,9                             |
| NAKSA + 5,1Mg                      | 106,7                             |
| NAKSA +10,1Mg                      | 126,7                             |
| NAKSA + conalbumina <sup>d</sup>   | NDe                               |
| NAKSA + 1,1Mg + conalbumina        | 104,5                             |
| NAKSA + 1,1Mg + 1,1Fe <sup>e</sup> | 104,5                             |
| NAKSA + 1,1Mg + 2,0Fe              | 153,3                             |
| NAKSA + 1,1Mg + 4,0Fe              | 141,1                             |
| NAKSA + 1,1Mg + 8,0Fe              | 117,8                             |
| NAKSA + 1,1Mg +16,0Fe              | 160,0                             |

a - LDH: desidrogenase lática

b - NDe: não detectado

c - :  $\mu$ g/mL de Mg<sup>2+</sup>

d - : 0,6 mL da solução de conalbumina a 5,0 mg/mL

e - :  $\mu$ g/mL de Fe<sup>2+</sup>

TABELA 14 - Efeito de parede celular na atividade de DNase no sobrenadante dos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,1µg/mL de Mg<sup>2+</sup> em *S.aureus* S-6.

| Meio de Cultura | Sobrenadante (mL) | Parede (mL) | H <sub>2</sub> O (mL) | Diluição | Atividade de DNase (µg/mL/min.) |
|-----------------|-------------------|-------------|-----------------------|----------|---------------------------------|
| NAK             | 1,0               | 0,00        | 0,50                  | 1/80     | 36,44                           |
|                 | 1,0               | 0,02        | 0,48                  | 1/80     | 27,11                           |
|                 | 1,0               | 0,05        | 0,45                  | 1/80     | 27,11                           |
|                 | 1,0               | 0,10        | 0,40                  | 1/80     | 29,15                           |
|                 | 1,0               | 0,20        | 0,30                  | 1/80     | 29,33                           |
|                 | 1,0               | 0,30        | 0,20                  | 1/80     | 29,33                           |
|                 | 1,0               | 0,50        | 0,00                  | 1/80     | 27,56                           |
| NAKSA           | 1,0               | 0,00        | 0,50                  | 1/5      | 3,19                            |
|                 | 1,0               | 0,50        | 0,00                  | 1/5      | 3,19                            |
| NAKSA+<br>1,1Mg | 1,0               | 0,00        | 0,50                  | 1/100    | 30,00                           |
|                 | 1,0               | 0,50        | 0,00                  | 1/100    | 28,90                           |

#### 4.6 - Efeito da parede celular na atividade de DNase

De acordo com os resultados apresentados na tabela 14, a parede celular não afetou a atividade de DNase, uma vez que não se observou variação na atividade enzimática com o aumento gradual da quantidade de parede celular adicionada.

TABELA 15 - Efeito da parede celular na atividade de DNase nos sobrenadantes diluídos dos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,1  $\mu\text{g/mL}$  de  $\text{Mg}^{2+}$ , de *S. aureus* S-6.

| Meio de Cultura                | Diluição | Sobrenadante diluído (mL) | Parede (mL) | Atividade de DNase ( $\mu\text{g/mL/min.}$ ) |
|--------------------------------|----------|---------------------------|-------------|--|
| NAK                            | 1/80     | 1,0                       | 0,0         | 21,33  |
|                                | 1/80     | 1,0                       | 0,1         | 23,99  |
| NAKSA                          | 1/10     | 1,0                       | 0,0         | 2,61   |
|                                | 1/10     | 1,0                       | 0,1         | 2,06   |
| NAKSA+<br>1,1 $\text{Mg}^{2+}$ | 1/100    | 1,0                       | 0,0         | 51,67  |
|                                | 1/100    | 1,0                       | 0,1         | 55,53  |

Este resultado é confirmado pelos valores apresentados na tabela 15, onde a adição da parede celular diretamente ao sobrenadante diluído não afetou a atividade enzimática.

TABELA 16 - Efeito de magnésio na atividade de DNase de *S. aureus* S-6.

| Sobrenadante do Meio | Mg <sup>2+</sup> adicionado (µg/mL) | Atividade de DNase (µg/mL/min.) |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| NAK                  | 0,0                                 | 39,55                           |
| NAK                  | 2,0                                 | 40,00                           |
| NAK                  | 4,0                                 | 30,67                           |
| NAK                  | 8,0                                 | 40,89                           |
| NAK                  | 16,0                                | 40,89                           |

#### 4.7 - Efeito de magnésio e ferro na atividade de DNase

De acordo com os resultados apresentados na tabela 16 e 17, nem o magnésio, nem o ferro, nas concentrações utilizadas, afetaram a atividade de DNase no meio NAK.

TABELA 17 - Efeito de ferro na atividade de DNase de *S. aureus* S-6.

| Sobrenadante do Meio | Fe <sup>2+</sup> adicionado (µg/mL) | Atividade de DNase (µg/mL/min.) |
|----------------------|-------------------------------------|---------------------------------|
| NAK                  | 2,0                                 | 30,25                           |
| NAK                  | 4,0                                 | 35,56                           |
| NAK                  | 8,0                                 | 33,33                           |
| NAK                  | 16,0                                | 44,44                           |

4.8 - Efeito do tempo de armazenamento e do número de transferências da cultura, na produção de exoproteínas.

As características de crescimento e as atividades enzimáticas da linhagem *S. aureus* S-6 foram analisadas em função da história prévia da cultura em estoque. A manutenção da cultura em meio NAK foi realizada de acordo com as seguintes modalidades:

- a - Transferências sucessivas e manutenção das subculturas a 10°C.



b - Subcultura mantida por um período de 8 meses a 10°C.

c - Subcultura mantida a -20°C por 14 meses.

Quando estas subculturas foram semeadas em ágar sangue, aquelas mantidas sob congelamento apresentaram colônias com halo de hemólise, enquanto que, as mantidas sob transferências sucessivas apresentaram tanto colônias hemolíticas como não hemolíticas.

Inoculando as diferentes colônias em caldo NAK, observou-se uma variação no crescimento destas culturas. Assim, as colônias não hemolíticas apresentaram um crescimento maior, em termos de massa celular, quando comparadas com as colônias hemolíticas.

Em relação às atividades enzimáticas descritas na tabela 18, as células mantidas sob constante transferência apresentaram menor atividade nucleásica. Por outro lado, as células que perderam a atividade hemolítica, incrementaram paralelamente a produção de coagulase.

Em relação à subcultura mantida sob congelamento, a recuperação em ágar sangue aparentemente estimulou a produção de DNase, quando comparada com a mesma subcultura recuperada em caldo NAK ( tabela 18 ).

As culturas congeladas não produziram coagulase detectável pelo método quantitativo, enquanto que as subculturas refrigeradas a 10°C, embora apresentassem essa atividade, produziram em quantidade bastante inferior às mantidas sob transferências sucessivas.

A produção de EEA e EEB não foi comparada nas

TABELA 18 - Atividade das enzimas coagulases e DNase em subculturas de *S. aureus* S-6 mantidas sob diferentes condições.

| Subculturas<br>(origem) | Meios para<br>reativação | Hemólise em<br>ágar sangue | Meios de<br>Cultura | Sobrenadante          |                              |
|-------------------------|--------------------------|----------------------------|---------------------|-----------------------|------------------------------|
|                         |                          |                            |                     | DNase<br>(µg/mL/mln.) | Coagulase<br>(µg fibrina/mL) |
| congelada<br>(-20°C)    | NAK                      | ND <sup>a</sup>            | NAK                 | 31,55                 | (-) <sup>d</sup>             |
|                         | AS <sup>b</sup>          | (+) <sup>c</sup>           | NAK                 | 53,33                 | (-)                          |
|                         | AS                       | (+)                        | NAKSA               | 1,89                  | (-)                          |
| refrigerada<br>(10°C)   | AS                       | (+)                        | NAK                 | 53,33                 | 130,0                        |
|                         | AS                       | (+)                        | NAK                 | 14,67                 | (-)                          |
| replicada<br>(10°C)     | AS                       | (-)                        | NAK                 | 18,22                 | 1620,0                       |

- a - ND: não determinada
- b - AS: ágar sangue
- c - positivo
- d - negativo

TABELA 19 - Efeito combinado de transferências sucessivas e do armazenamento a 10°C na produção de EEA e EEB em *S. aureus* S-6.

| Enterotoxina <sup>a</sup> | µg/mL                |                                |
|---------------------------|----------------------|--------------------------------|
|                           | tempo zero<br>(10°C) | 7 meses <sup>d</sup><br>(10°C) |
| EEA <sup>b</sup>          | 0,589                | 0,994                          |
| EEB <sup>c</sup>          | 62,0                 | 46,2                           |

- a* : determinação de enterotoxinas no sobrenadante da cultura em meio NAKSA+2,1µg/mL de Mg<sup>2+</sup>
- b* - EEA: enterotoxina A
- c* - EEB: enterotoxina B
- d* - transferências sucessivas

diferentes modalidades de subcultura. Porém, a determinação destas toxinas foi realizada anteriormente, em meio NAKSA contendo 2,1 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, utilizando-se como inóculo subculturas com diferentes tempos de transferência.

Os resultados descritos na tabela 19 mostram uma diferença na produção destas toxinas em relação ao tempo de armazenamento.

Assim, observa-se que no decorrer do tempo, a linhagem S-6 apresentou uma diminuição na produção de EEB e um aumento na produção de EEA.

#### 4.9 - Estudo da estrutura de parede celular por difração de raios X.

Os resultados apresentados nas figuras 10, 11, 12 e 13 indicam que os diagramas obtidos com a célula integral e com parede celular, tanto de *S. aureus* S-6 desenvolvidos no meio NAK, como em meio NAKSA foram semelhantes.

Os valores "d" dos espaçamentos na estrutura que dão origem às reflexões observadas foram calculados a partir do diagrama obtido com a parede das células da cultura em meio NAK ( figura 11 ), e estão apresentados na tabela 20.

As reflexões orientadas, aparecendo bem nítidas no diagrama foram denominadas pela letra "r", e os halos difusos e desorientados, pela letra "h".

De acordo com a tabela 20 e figura 11, o diagrama obtido com a parede celular da cultura em meio NAK apresenta três reflexões orientadas (  $r_1$ ,  $r_2$  e  $r_3$  ) e três halos difusos e desorientados (  $h_1$ ,  $h_2$  e  $h_3$  ). O esquema destas reflexões e halos obtidos está apresentado na figura 14.

Nos diagramas obtidos de células integrais desenvolvidas em meio NAK ( figura 10 ) e parede celular de cultura em meio NAKSA ( figura 13 ), os halos  $h_2$  e  $h_3$  são difíceis de serem visualizados, inclusive não aparecendo no diagrama das células integrais no meio NAKSA ( figura 12 ).

Estas diferenças observadas podem ser devido ao menor tempo de exposição destas amostras aos raios X, já que os valores de "d" para as outras reflexões, nos diferentes diagramas permaneceram iguais.

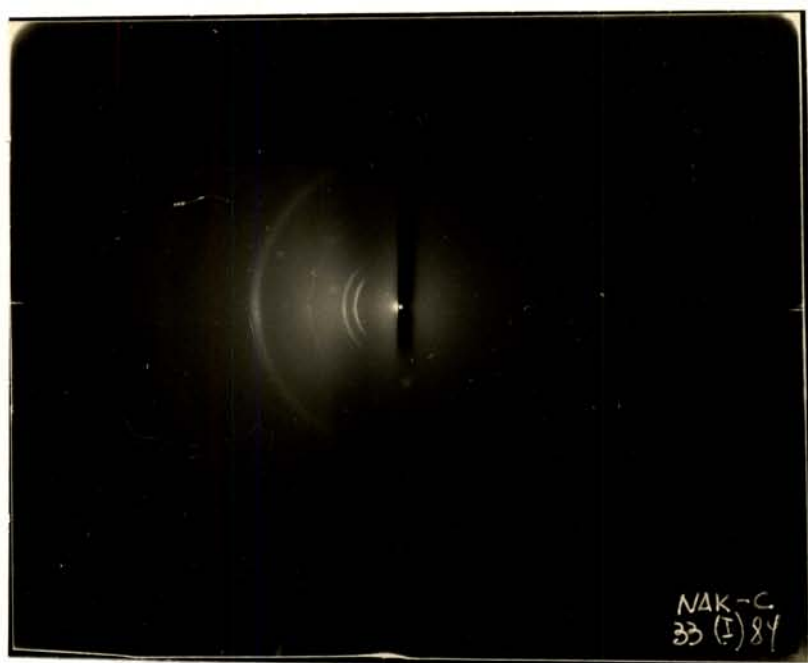


Figura 10 - Diagrama de difração de raios X obtido com células integrais de *S. aureus* S-6 desenvolvido no meio NAK.

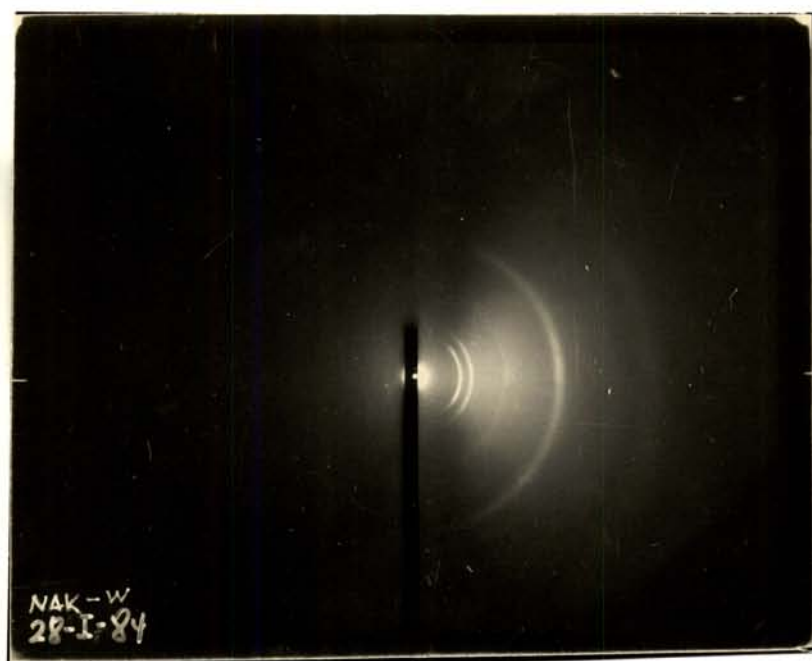


Figura 11 - Diagrama de difração de raios X obtido  
com parede celular de *S. aureus* S-6  
desenvolvido no meio NAK.

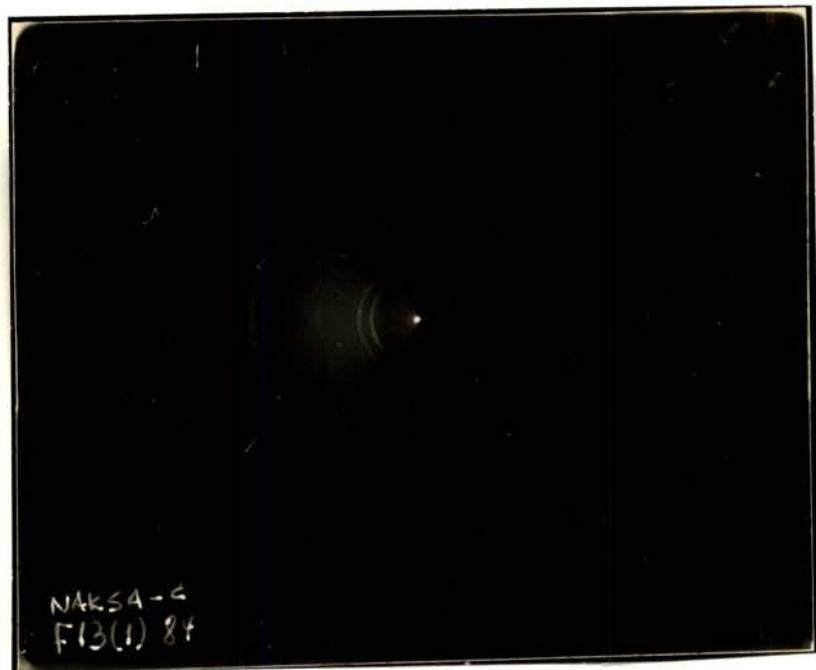


Figura 12 - Diagrama de difração de raios X obtido com células integrais de *S. aureus* S-6 desenvolvido no meio NAKSA.

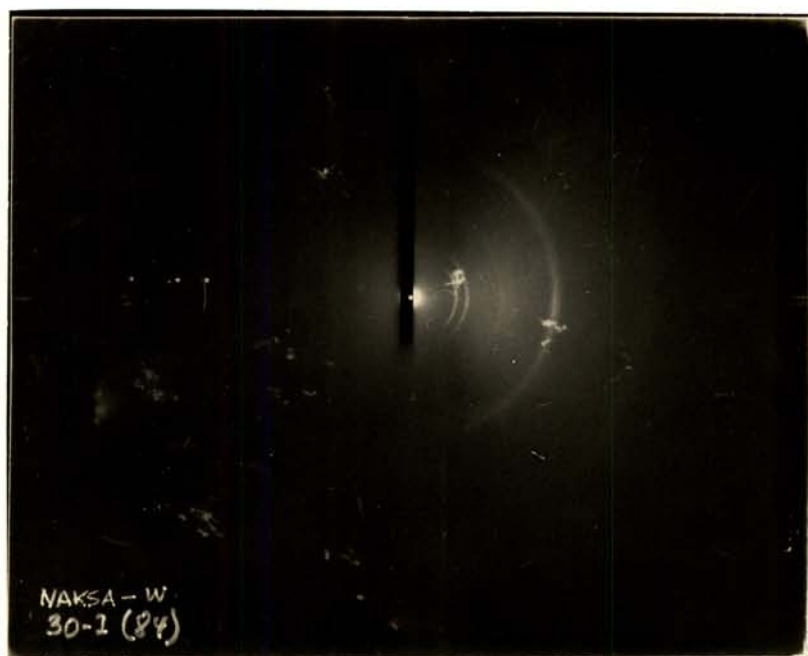


Figura 13 - Diagrama de difração de raios X obtido com parede celular de *S. aureus* S-6 desenvolvido no meio NAKSA.



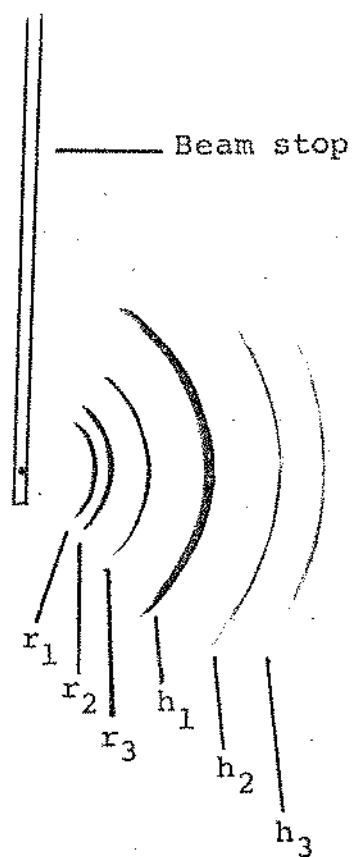


Figura 14 - Representação esquemática do diagrama de difração de raios X obtido com parede celular de *S. aureus* S-6.

TABELA 20 - Diagrama da parede celular de *S. aureus* S-6 desenvolvido em meio NAK, com 13 horas de exposição aos raios X.

| Natureza da reflexão        | Valor de "d"<br>( Å ) | Intensidade | Denominação    |
|-----------------------------|-----------------------|-------------|----------------|
| Reflexão orientada          | 27,68                 | nítida      | r <sub>1</sub> |
| Reflexão orientada          | 22,31                 | nítida      | r <sub>2</sub> |
| Reflexão orientada          | 13,71                 | fraca       | r <sub>3</sub> |
| Halo difuso e não orientado | 8,77                  | forte       | h <sub>1</sub> |
| Halo difuso e não orientado | 5,56                  | muito fraca | h <sub>2</sub> |
| Halo difuso e não orientado | 4,71                  | fraca       | h <sub>3</sub> |

Para o controle das condições experimentais , o substrato de vidro sem a amostra foi exposto aos raios X durante 15 horas. Observou-se um halo fraco, difuso e desorientado com o valor de Bragg de  $7,29 \text{ \AA}$ , muito próximo ao halo com  $8,77 \text{ \AA}$ , obtido com as amostras.

Este halo de  $7,29 \text{ \AA}$  deve-se à reflexão da janela da cela de humidade, composta de um polímero "Mylar" ( Du pont ), mas a sua intensidade é tão baixa que nos diagramas mostrados nas figuras 10, 11, 12 e 13 não pode ser visualizado e consideramos que não afetou a difração produzida pela amostra.

## 5 - DISCUSSÃO

Diferentes propriedades da linhagem *S. aureus* S-6, tais como crescimento, morfologia celular e produção de proteínas extracelulares foram estudadas, utilizando os meios NAK, NAKSA e diversas modificações do meio NAKSA.

Com esta finalidade, o meio NAK, um hidrolizado de caseína foi tratado com alumina, obtendo-se assim, o meio NAKSA, cuja característica principal é a deficiência em íons presentes no meio NAK.

O meio NAKSA foi modificado através da adição de diferentes concentrações de magnésio, ferro e conalbumina, para o estudo do efeito destes componentes nas propriedades acima descritas.

### 5.1 - Efeito de magnésio

De acordo com os resultados apresentados na tabela 1 e figuras 5, 6, 7 e 8, a deficiência de magnésio provocou alterações na morfologia e na coloração de Gram. A massa celular ( peso seco ) também foi afetada, apresentando uma diminuição de 3,4 vezes em relação ao meio sem tratamento ( meio normal ), e as células em alguns casos, apresentaram aglomeradas e de difícil dispersão.

WEBB ( 112 ) em 1948 já relatou a importância

do íon magnésio na divisão celular dos bacilos. O autor observou uma inibição na divisão celular, com a formação de células filamentosas decorrente da deficiência do íon no meio de cultura. Recentemente WALKER e DUFFS ( 109 ) trabalhando com leveduras observaram que a incubação destes microrganismos em meios deficientes em magnésio é responsável pelo aparecimento de células gigantes e de formas aberrantes de viabilidade reduzida. Estas observações estão de acordo com o comportamento observado em nossas culturas deficientes em magnésio, onde entre outras alterações, houve a formação de aglomerados celulares de difícil dispersão e o aparecimento de aproximadamente 10% da população com a coloração de Gram alterada ( Gram negativas ).

Uma concentração de magnésio de 1,11 µg/mL adicionada ao meio NAKSA foi considerada adequada ou "ótima", já que propiciou o restabelecimento de propriedades observadas no meio sem tratamento, NAK, e parcialmente inibidas no meio NAKSA, tais como o nível de produção das exoproteínas coagulase, nuclease e enterotoxinas. Porém nesta concentração de magnésio, não houve restabelecimento do tamanho celular observado no meio NAK. Uma possível explicação seria que durante o tratamento do meio NAK com alumina para a obtenção do meio NAKSA, ocorre a eliminação de outros íons juntamente com o íon magnésio, os quais seriam necessários para o crescimento normal dos microrganismos ( tabela 21 ).

A formação de aglomerados em algumas de nossas culturas da linhagem S-6 em meio NAKSA e NAKSA modificado, foi provavelmente devido à produção de substâncias aderentes, a glicocálice observada por CAPUTY e COSTERTON ( 11 ). Este efeito

foi também observado por KAMEKURA e ONISHI ( 41 ) em *Micrococcus varians* , quando adicionaram 81 mM de  $MgSO_4$  ao meio de cultura. Este comportamento anormal era acompanhado por diminuição na taxa de crescimento da cultura e um decréscimo na produção de nuclease. De acordo com CAPUTY e COSTERTON ( 11 ), uma camada difusa e polianiónica de glicocálice circunda as células de *S. aureus* tanto na forma capsulada como não capsulada, sendo a sua produção induzida não somente por excesso, como também por deficiência de nutrientes. Embora a finalidade protetora da glicocálice ainda não seja bem definida, a sua principal função parece ser a retenção de algumas enzimas extracelulares mais próximas à superfície celular.

As variações por nós observadas no tamanho , aspecto celular e outras propriedades são consequências diretas das condições de cultura. Estas características revertem à normalidade assim que as células afetadas são incubadas no meio NAK ou qualquer meio adequado ao desenvolvimento de estafilococos , o que é uma demonstração inequívoca de que tais mudanças não estão relacionadas a modificações genéticas.

Em relação às enterotoxinas, a produção de EEB foi bastante afetada por variações na concentração de magnésio, enquanto que a concentração de EEA permaneceu constante ( tabela 2 ). Comparando a quantidade destas toxinas no meio NAK e NAKSA, a produção de EEB foi 18,4 vezes maior no meio NAK, enquanto que a EEA variou somente num fator de 1,31 vezes.

Esta observação está de acordo com os resultados obtidos por vários autores ( 60,68,83 ), onde sempre a

produção de EEA foi menos afetada pelas condições de cultura . Este comportamento explicaria a maior incidência de intoxicação causada por EEA, como também o maior número de linhagens produtoras destas toxinas em relação a EEB ( 29,73 ).

Devido à baixa concentração de enterotoxinas presentes nos alimentos contaminados por linhagens de estafilococos produtores de toxina, o método de escolha para a detecção direta de enterotoxina no alimento são o método imunoenzimático ( ELISA ) e o radioimunoensaio ( RIA ) ( 3,25, 50, 75,94,99 ). O método imunoenzimático é bastante sensível, sendo o seu limite de detecção a nível de ng de toxina por mL ( 25 , 75,94,99 ). Tendo em vista que na linhagem *S. aureus* S-6, a produção de EEA é baixa, o método imunoenzimático de alta sensibilidade foi selecionado para a quantificação direta da toxina no sobrenadante de cultura.

Porém, a desvantagem do método de imunoensaio em relação ao radioimunoensaio é a possibilidade da ocorrência de uma reação cruzada com a proteína A, produzida por *S. aureus*, principalmente quando se utiliza a imunoglobulina G obtida de coelho ( 25 ), como foi no caso desta pesquisa. Para superar este problema, KOPER et alii ( 49 ) tem utilizado fragmentos  $F(ab')_2$  de imunoglobulina em vez de IgG integral. Entretanto esta solução seria muito laboriosa, além da perda parcial de atividade.

Uma opção recomendada por FREED et alii ( 25 ) é a diluição de 10 a 50 vezes do sobrenadante a ser analisado, o que foi realizado na determinação de EEA neste trabalho. Assim, os sobrenadantes de diferentes culturas foram diluí

dos de 1/50 a 1/250 para a detecção de EEA. Mesmo assim, não se pode descartar alguma interferência de proteína A na quantificação de EEA descrita nas tabelas 2, 7 e 10.

O efeito do íon magnésio na produção de enzimas extracelulares, DNase e coagulase estão apresentados nas tabelas 3 e 4.

De acordo com os resultados, a produção de coagulase nos meios NAKSA e NAKSA modificados sempre foi inferior à produzida no meio NAK. No entanto, a produção de DNase no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> apresentou-se aumentada em três vezes, quando comparada à produzida no meio NAK. A eliminação de íons através de tratamento com alumina também afetou mais a liberação de DNase, já que a relação da atividade enzimática nos meios NAK / NAKSA foi de 10,35 para esta enzima, enquanto que a de coagulase foi de apenas 4,41.

No meio NAKSA, com uma concentração de 0,15 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, já se observou um aumento da atividade de DNase, que atingiu o nível máximo, aproximadamente 3,5 vezes ao valor obtido no meio NAK ( 2,5 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> ), em torno de 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> ( tabela 3 ). A recuperação da atividade nesta baixa concentração é condizente com as observações de outros pesquisadores, já que segundo HURST et alii ( 37 ), as células danificadas pelo calor recuperaram o seu conteúdo de magnésio a concentrações tão baixas como  $3 \times 10^{-6}$  M ( 0,15 µg/mL ).

No meio NAK, a adição de quantidades crescentes de magnésio, não afetou a atividade de DNase, nem o desenvolvimento celular ( tabela 5 ), o que está de acordo com os resultados obtidos por MORITA et alii ( 69 ), onde 58 µg/mL de



$Mg^{2+}$  não causou efeito tóxico nos estafilococos. Isto pode ser explicado pelo fato que o meio por eles utilizado não foi submetido a um tratamento prévio de extração de íons.

Estes dados sugerem que a atividade da enzima no meio NAKSA adicionado de magnésio foi incrementada devido a uma alteração ao nível de parede celular causada pelo desequilíbrio iônico, que de alguma maneira facilitou a liberação enzimática.

De acordo com os resultados apresentados na tabela 13, observa-se que em meios contendo concentrações baixas de magnésio, meio NAK tratado, há uma diminuição não só das proteínas extracelulares ( coagulase, DNase e enterotoxinas), como também da enzima intracelular desidrogenase lática. Assim, pode-se inferir que além de modificação da permeabilidade das estruturas externas do microrganismo, existe também um efeito ao nível de síntese proteica. O íon magnésio é importante na estabilidade da estrutura dos ribossomos, ocorrendo degradação proteica na deficiência deste íon ( 40 ).

Concentrações de íons ferro e magnésio, superiores às encontradas no meio NAK, inibiu parcialmente a produção das proteínas extracelulares em estudo ( tabela 7 ), porém não houve qualquer efeito sobre a enzima intracelular LDH ( tabela 13 ), provavelmente devido à mediação do sistema de transporte ao nível da membrana celular. Isto leva à manutenção da condição intracelular o mais constante possível, enquanto que as enzimas extracelulares, devido à sua localização na camada externa durante a síntese, seriam mais afetadas por qualquer alteração das condições externas.

A maior liberação de DNase no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, comparada ao meio NAK ( tabela 3 ), não pode ser explicada como injúria ao nível da membrana celular, já que todos os sobrenadantes analisados apresentaram resultados negativos para atividade de enzima intracelular LDH ( tabela 3 ).

A presença de magnésio estabiliza a membrana citoplasmática. SCHERRER e GERHARDT ( 95 ) trabalhando com MgCl<sub>2</sub> na concentração de 0,01 M, observaram uma redução relativamente pequena, mas significativa na porosidade da membrana citoplasmática.

O aumento da atividade em nosso caso, deve estar relacionado com a maior produção e liberação das proteínas extracelulares em estudo, e não a uma ação direta de magnésio ou da parede celular na atividade enzimática. A adição de magnésio e componentes da parede celular ao sobrenadante da cultura nos meios NAK, NAKSA e NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> não afetou a atividade de DNase ( tabela 14, 15 e 16 ).

TULLIS et alii ( 105 ) provaram que o íon Ca<sup>2+</sup> estabiliza a conformação de DNase aumentando a sua atividade, o que justifica a adição deste íon ao método de determinação enzimática de ERICKSON e DEIBEL ( 22 ). Por outro lado, nas nossas experiências, a parede polianiónica do microrganismo, queladora de cátions, não teve qualquer efeito na atividade de DNase ( tabela 14 e 15 ).

Outro aspecto a ser considerado no efeito dos íons cálcio e magnésio na atividade enzimática, são as observações de KIM et alii ( 45 ), onde grande número de vesículas mesossômicas começam a aparecer em presença destes íons. Este

efeito poderia ser causado pela síntese de membranas envolvidas na produção e liberação de exoenzimas e explicaria o aumento de nível enzimático observado em nosso trabalho.

Os mesmos autores ( 45 ) trabalhando com penicilinase extraída de estafilococos, observaram que um aumento da força iônica do meio até um valor ótimo, parece estimular a conversão desta enzima à forma extracelular. De acordo com KIM et alii ( 45 ), uma explicação de ação estimulante dos íons cálcio e magnésio na liberação de penicilinase pode estar baseada na estabilização e conseqüente ativação de proteases responsáveis pela produção de exoenzimas. Segundo ICHIHARA et alii ( 38 ), o rompimento da proteína com o peptídeo "signal " não é necessário para o transporte através da membrana citoplasmática, porém é indispensável para a liberação desta através da membrana.

## 5.2 - Efeito de ferro

Os resultados referentes ao efeito do íon ferro nas propriedades estudadas estão apresentados nas tabelas 6, 7, 8 e 11.

Apesar do íon ferro ter sido adicionado aos meios de cultura na forma de  $Fe^{2+}$ , a oxigenação produzida pela agitação das culturas deve ter oxidado total ou parcialmente este íon. *S. aureus* S-6 foi incubado sob agitação ( 200 rpm ), já que a aeração favorece não só o desenvolvimento celular, como também a produção de exoproteínas ( 83 ). De acordo com EMERY

( 18 ), é praticamente impossível manter o ferro no estado divalente na presença de oxigênio dissolvido no meio e substâncias quelantes do tipo trihidroxamato, o mais abundante e conhecido entre os quelantes da natureza.

Assim, nas condições desta pesquisa, a aeração deve ter oxidado total ou parcialmente o  $Fe^{2+}$  para  $Fe^{3+}$ , o que favorece a captação do íon pelo microrganismo, já que os íons ferrícos, diferente dos íons ferrosos, são fortemente quelados pelos siderocromos.

Entretanto, o íon ferro na forma divalente é um agente redutor moderadamente ativo ( 57 ). A adição de ferro no meio NAKSA + 1,11  $\mu\text{g/mL}$  de  $Mg^{2+}$  teve um efeito inibitório no desenvolvimento de *S. aureus* S-6, com consequente diminuição no peso seco e alteração na morfologia celular ( tabela 6 e figura 9 ), e produção de exoproteínas ( tabela 7 ).

Uma possível explicação para a ação inibitória do íon  $Fe^{2+}$  estaria baseada nos trabalhos de REPINE et alii ( 90 ). Estes autores estudaram o efeito combinado de  $FeSO_4$  e água oxigenada sobre a linhagem *S. aureus* 502 A. Estes compostos reagem entre si formando um radical hidroxila tóxico, de acordo com o mecanismo proposto por FENTON:



Dado que os estafilococos produzem  $H_2O_2$  como subproduto de seu metabolismo respiratório, este mecanismo poderia estar envolvido no efeito observado em *S. aureus* S-6.

De acordo com os resultados obtidos na tabe

la 7, concentrações de ferro compreendidas entre 1,19 e 18,78 µg/mL produziram um decréscimo de 10,2 vezes na DNase liberada, em relação ao meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  contendo 0,4 µg/mL de ferro residual.

Assim, pode-se inferir que existe uma relação ótima entre as concentrações de magnésio e ferro, tanto para o desenvolvimento da cultura, como para a produção de exoenzimas, já que no meio NAK com 2,5 µg/mL de  $Fe^{2+}$  e  $Mg^{2+}$ , ocorre maior produção de DNase. Quando este equilíbrio iônico é alterado, os efeitos se refletem na produção e/ou liberação das mesmas.

Esta inibição não parece ser devida a uma ação direta do ferro na atividade enzimática, já que a adição de ferro em concentrações crescentes ao sobrenadante da cultura em meio NAK, não diminuiu a atividade enzimática ( tabela 17 ).

O efeito inibitório foi constante para as concentrações compreendidas entre 1,19 e 18,78 µg/mL de  $Fe^{2+}$  no meio NAKSA ( sem adição de  $Mg^{2+}$  ), tabela 7.

Para verificar se o efeito inibitório era a nível de produção ou de secreção, estudou-se a ação de ferro em excesso, sobre a DNase ligada à superfície celular. Com esta finalidade, utilizou-se a lisostafina, uma glicilglicina endopeptidase que atua ao nível da pentaglicina do peptidoglicano da parede celular.

Desta forma, obtiveram-se duas frações: parte da enzima foi liberada ao meio externo após a ruptura da parede celular e parte permaneceu ligada ao protoplasto.

Os resultados apresentados na tabela 11 mos

tra que não houve alteração detectável nas atividades de DNase, tanto na fração liberada como retida no protoplasto, quando comparadas com as mesmas frações celulares obtidas de culturas desenvolvidas em meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> sem adição de ferro. Estes resultados, aparentemente discordantes com o efeito observado com íon ferro sobre a nuclease extracelular ( tabela 3 ), poderia ser explicado pela pequena quantidade de DNase superficial na linhagem de *S. aureus* S-6, que é aproximadamente 200 vezes inferior à DNase secretada no meio de cultura. Entretanto, já que a fração retida na célula é 200 vezes inferior à quantidade de enzima total produzida, confirma que a ação do íon ferro na DNase secretada está a nível de produção enzimática, e não de retenção da mesma na superfície celular.

Concentrações de ferro em torno de 1,11 µg / mL são necessárias para a produção ótima de coagulase ( tabela 7 ). Entretanto, o excesso do íon é prejudicial à produção de enzima, embora não seja tão drasticamente inibida pelo ferro, como o é a DNase.

Um fato interessante observado foi o estímulo da produção de EEA pela adição de concentrações de ferro até 4,0 µg/mL no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup>, enquanto que para a EEB ocorreu inibição para todas as concentrações adicionadas ( tabela 7 ).

A importância de uma concentração mínima de ferro na produção de enterotoxina foi analisada por MORITA et alii ( 69 ), que verificaram uma produção máxima de enterotoxina após a adição de 5,0 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> e 0,5 µg/mL de ferro. Em

nosso caso, 0,4 µg/mL de ferro presente no meio NAKSA, adicionado de 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> foi o suficiente para a produção ótima de EEB.

O tratamento prévio com alumina para a remoção de íons, deve produzir um desequilíbrio iônico que torna crítica a relação interiônica entre os íons mais importantes no desenvolvimento da cultura. Deve-se levar em conta que o meio NAKSA contendo 0,4 µg/mL de ferro residual, propicia o crescimento de estafilococos neste meio, e esta quantidade de ferro seria suficiente para o desenvolvimento da cultura, quando o íon magnésio estiver presente na concentração de 1,11 µg/mL. Assim, a adição de ferro nas concentrações compreendidas entre 1,19 e 18,78 µg/mL ao meio NAKSA + Mg<sup>2+</sup> inibiu parcialmente a produção de EEB. A EEA foi afetada apenas na concentração de 18,78 µg/mL, o que está de acordo com as observações anteriores, em que esta toxina é menos afetada por variações nas condições de cultura.

Para cada microrganismo existe uma concentração ótima de ferro para seu metabolismo particular, o que se traduz numa produção ótima de enzimas e outros metabólitos ( 69, 97 ).

Deste modo, a produção de hemolisina por *Listeria monocytogenes* é inibida por uma concentração de ferro de 2 µM ( 15 ). Porém concentrações ótimas de ferro são necessárias para a produção de diversas toxinas ( 69,97 ), embora um excesso deste íon afete negativamente a produção de metabólitos extracelulares, como foi observado nesta pesquisa.

Por outro lado, SIEGEL ( 97 ) observou que

a toxina botulínica tipo A pela linhagem HALL, não é afetada por concentrações de ferro de 0,1 a 10,1 µg/mL, o que corresponde a uma variação de 100 vezes no nível do íon.

Em resumo, em forma geral pode-se dizer que uma quantidade adequada de ferro é necessária para a produção de EEA e coagulase, enquanto que a adição de qualquer quantidade de ferro foi prejudicial à produção de EEB e DNase. Isto significa que o ferro residual presente no meio NAKSA é suficiente para a produção destas duas proteínas.

### 5.3 - Efeito da conalbumina

De acordo com EMERY ( 18 ) e BULLEN et alii ( 8 ), as transferrinas, proteínas transportadoras de íon ferro, desempenham papéis de destaque como barreiras na infecção bacteriana, impossibilitando a utilização de ferro pelos microrganismos. Esta mesma barreira é realizada pela conalbumina do ovo, que apresenta propriedades idênticas às transferrinas do sangue.

Quando o meio NAKSA adicionado de 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$  foi comparado ao mesmo meio adicionado de 3,0 mg/mL de conalbumina, observou-se que não existe nenhum efeito deste quelante no que se refere à produção das proteínas extracelulares ( tabela 10 ).

Entretanto, comparando-se o desenvolvimento da cultura e produção de proteínas extracelulares no meio NAKSA ( contendo apenas 0,1 µg/mL de  $Mg^{2+}$  ) e o mesmo meio adiciona-



do de conalbumina, observou-se que neste meio houve maior produção de proteínas extracelulares ( tabela 10 ).

Uma possível explicação para este resultado seria que num meio tão carente como o meio NAKSA, o microrganismo desenvolve a capacidade ( indução enzimática ) de utilizar a conalbumina. Por outro lado, poderia também ocorrer a introdução de pequenas quantidades de contaminantes iônicos, que seriam imprescindíveis ao desenvolvimento do microrganismo. Outra possível explicação seria que o sistema quelante do íon ferro em *S. aureus* apresenta uma constante de quelação maior do que a conalbumina. Desta forma, o ferro remanescente no meio NAKSA ( 0,4 µg/mL ) seria captado preferencialmente pelo microrganismo. Estes acontecimentos poderiam estar ocorrendo separadamente, ou ainda poderia acontecer uma combinação das hipóteses apresentadas.

Deste modo, na existência de íons contaminantes introduzidos juntamente com a conalbumina, estes podem ser preferencialmente captados pelos siderocromos de *S. aureus*.

Considerando esta capacidade de crescimento de *S. aureus* na presença de conalbumina, SAFONOVA et alii ( 92 ) propõem a utilização desta proteína para diferenciar *S. aureus* de estafilococos coagulase negativos, já que os últimos são inibidos pela conalbumina.

Entretanto, de acordo com VALENTI et alii ( 108 ), nem todos os estafilococos coagulase negativos são inibidos pela conalbumina, e os resultados obtidos não foram conclusivos a respeito. Estes autores analisaram a sensibilidade à conalbumina de 150 linhagens de estafilococos obtidos de

isolados clínicos. Todas as linhagens de *S. aureus* apresenta - ram-se resistentes, enquanto que os estafilococos não classi - ficados como *S. aureus* apresentaram resistências variáveis.

Os sistemas quelantes de íons de *S. aureus* são pouco estudados, porém pesquisas realizadas por MASKELL(62) indicam que o mecanismo de assimilação de ferro entre enterobac térias e estafilococos seja semelhante, já que a enteroquelina produzida pelas enterobactérias é utilizada pelos estafiloco - cos. Entretanto, para afirmar que os estafilococos produzem a - gentes quelantes de estrutura semelhante a enteroquelina são necessários provas mais conclusivas.

#### 5.4 - Enzimas extracelulares associadas à superfície celular

As enzimas coagulase e nuclease foram estuda das em função de sua associação à superfície celular.

Estas enzimas foram liberadas das estrutu - ras externas do microrganismo com o auxílio de lisostafina e ultra-som.

A lisostafina apresenta três atividades enzi máticas diferentes: uma endopeptidase ( glicilglicina endopepti dase ), que é a fração mais ativa; uma endo  $\beta$ -glucosaminidase, e uma amidase ( ácido acetil murâmico-L-alanina amidase ) ( 12, 97 ).

Segundo CIZANI et alii ( 12 ), a concentra ção mínima inibitória de lisostafina para *S. aureus* está em torno de 2,5  $\mu\text{g/mL}$ . Baseado nestes dados, a concentra ção utili

zada foi de 5,0 µg/mL de lisostafina, para o rompimento da parede celular.

Pelos resultados apresentados na tabela 11, a quantidade de nuclease presente na superfície celular ( tanto na parede como a ligada ao protoplasto ), é muito inferior, em torno de 200 vezes, à quantidade presente no sobrenadante ( tabela 3 ), o que difere dos dados obtidos por OKABAYASHI e MIZUNO ( 77 ). Segundo estes autores, um quarto da atividade de nuclease em *S. aureus* 209 P apresentou-se como nuclease ligada às células. Quando estas células foram convertidas em protoplastos através da enzima L-11 de *Flavobacterium* sp, a nuclease ligada foi liberada ao meio sem que ocorresse lise dos protoplastos. A diferença na quantidade encontrada por OKABAYASHI e MIZUNO ( 77 ) e nesta pesquisa pode ser devida à diferença nas linhagens utilizadas.

A nuclease ligada provavelmente seja uma forma intermediária na formação de nuclease extracelular expressa pelo mesmo cistron, e que esteja ligada a certos componentes da superfície celular, possivelmente açúcares ( 78 ). A conversão da enzima ligada para extracelular poderia ocorrer pela remoção de certos componentes da molécula.

Quando se compara a DNase superficial presente na superfície de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em meio NAK e no meio NAKSA + 1,11 µg/mL de  $Mg^{2+}$ , não se observaram diferenças quantitativas, indicando que a produção global de DNase é maior no segundo meio ( tabelas 3 e 11 ).

A quantidade de nuclease liberada pela lisostafina equivale aproximadamente à quantidade presente nos proto

plastos, em todas as culturas analisadas. A diferença entre a concentração de enzima no sobrenadante e nas duas frações, indica que esta enzima, uma vez produzida, logo atinge o meio exterior, sem ter a possibilidade de se acumular na parede celular. Estas enzimas superficiais devem estar firmemente associadas à parede celular, já que não foram liberadas pela ação de ultra-som.

Em relação à coagulase, não se detectou nenhuma atividade enzimática nas células tratadas com lisostafina, o que está de acordo com os resultados obtidos por ENGELS et alii ( 21 ). Entretanto estudos posteriores realizados por ENGELS e KAMPS ( 20 ) relatam que 81% da coagulase da linhagem *S. aureus* 104 estava ligada ao protoplasto, podendo ser liberada por Triton X-100. O restante estava localizado no espaço "periplásmico", e era liberado durante a formação de protoplastos. De acordo com os autores ( 20 ), a não demonstração da coagulase ligada nos trabalhos anteriores deve-se por um lado, ao uso de células que não produziam grande quantidade desta enzima, e por outro porque o método utilizado não apresentava suficiente sensibilidade. Provavelmente ambas seriam as explicações para os resultados negativos nesta pesquisa, já que *S. aureus* S-6 produz pouca coagulase, quando comparada com outras linhagens, e o método utilizado é menos sensível que o utilizado por ENGELS e KAMPS ( 20 ).

De acordo com pesquisas realizadas por vários autores ( 20,45,98 ), a interação hidrofóbica ou hidrófila entre a superfície celular e as proteínas extracelulares parece desempenhar um papel importante na retenção des -

tas proteínas, sendo que cada proteína apresenta características peculiares na sua interação com a superfície celular.

Assim, de acordo com COLES e GROSS ( citado por KIM et alii, 45 ), uma porção da penicilinase de *S. aureus* está iônicamente ligada à superfície da parede celular e pode ser instantaneamente liberada por certos ânions.

A ligação iônica também deve ser o tipo de associação que apresenta a fosfatase alcalina com a membrana de *B. licheniformis* MC 14, já que aproximadamente 80% desta enzima foi extraída com 1,0 M de  $Mg^{2+}$ , sendo a enzima remanescente, extraída por detergente catiônico, indicando uma interação hidrofóbica ( 98 ).

Segundo SPENCER et alii ( 98 ), todas as fosfatases alcalinas, tanto as liberadas como as associadas à superfície celular, apresentavam o mesmo peso molecular, e sugere que a conformação da enzima extraída por detergente expõe mais resíduos hidrofóbicos do que a extraída por sal. A hipótese de que a mesma proteína possa ser solúvel ou expor seus resíduos apolares e se integrar com a bicamada da membrana, tem sido observado com a proteína-1 solúvel da membrana externa de *E. coli*, que pode integrar-se espontaneamente à membrana e formar poros ( BENZ et alii, citado por SPENCER et alii, 98 ).

Assim, na fração de DNase liberada pela listofina, a interação da enzima com a superfície celular provavelmente seja uma interação do tipo iônico.

Desta forma, a maior produção de DNase no meio NAKSA contendo magnésio poderia ser devido a uma maior solubilização desta enzima no meio externo, como acontece com a

fosfatase alcalina de *B. licheniformis* .

Em relação à DNase presente nos protoplastos, provavelmente esta ainda esteja associada à membrana citoplasmática, através de uma interação hidrofóbica. Esta interação poderia ser devida à presença da região "signal" de proteína extracelular, ou através de uma exposição de regiões apolares da enzima.

Como já foi discutido, nesta pesquisa não foi possível detectar coagulase associada às células de *S. aureus* S-6. Estudos feitos por ENGELS e KAMPS ( 20 ) indicam que a maior parte da coagulase na linhagem *S. aureus* 104 está ligada hidrofobicamente à membrana celular, sendo liberada por de-soxicolato de sódio e Triton X-100.

De acordo com os autores ( 20 ), a adição de 2% de NaCl não influe na produção de coagulase livre, em contraste com a coagulase ligada, que diminui 16 vezes. Um aumento na concentração salina geralmente aumenta a ligação hidrofóbica à membrana, e assim, provavelmente diminuem os locais hidrofóbicos. Consequentemente, quando se considera a forma ligada como precursora da forma extracelular, o "turnover" deste precursor tem de aumentar consideravelmente, resultando numa diminuição da enzima ligada à membrana.

Outra possível explicação para o aumento de coagulase livre seria o aumento da atividade das proteases pelo sal, como já foi discutido por KIM et alii ( 45 ), em que pode ocorrer ativação de serina proteases na presença de certos cátions.

Um possível mecanismo para a ação inibitória do íon ferro seria a inibição da serina protease, uma enzima im

portante na liberação de produtos extracelulares retidos na membrana. Entretanto, não se podem tirar conclusões, devido à pequena quantidade de DNase superficial na linhagem estudada ( tabela 11 ).

Por outro lado, a nível de superfície celular, o ferro poderia competir com outros cátions pelo sítio receptor, por exemplo, magnésio, o qual é necessário para o microrganismo em quantidades relativamente altas. Se o ferro interferisse na entrada de magnésio à célula, concomitantemente afetaria a síntese proteica.

#### 5.5 - Efeito do tempo de armazenamento e do número de transferências da cultura na produção de proteínas extracelulares

Comparando o comportamento da linhagem *S. aureus* S-6 mantido sob congelamento, refrigeração a 10°C e transferências sucessivas, observa-se uma diferença quantitativa na produção de diferentes proteínas extracelulares ( tabela 18 ).

A produção de coagulase foi a característica que apresentou mais variações em função destas condições. A produção de nuclease foi menos sensível às diferentes condições de armazenamento, motivo pelo qual foi selecionada para o nosso estudo.

Este comportamento da coagulase foi observado por outros pesquisadores, como ENGELS et alii ( 21 ) trabalhando com a linhagem *S. aureus* 104. De acordo com estes autores, o controle da produção desta enzima é complexo, sendo a

perda da capacidade de produção, dependente das condições de cultura.

As culturas não hemolíticas, quando inoculadas em caldo NAK, apresentaram melhor desenvolvimento e formação de aglomerados celulares. Isto pode ser explicado pela liberação de componentes aderentes do tipo glicocálice na superfície celular, que mantêm a coesão das células. Consequentemente, as enzimas extracelulares, importantes na aquisição de nutrientes são mantidas próximas à superfície, o que propiciaria um maior desenvolvimento de massa celular.

Segundo CAPUTY e COSTERTON ( 11 ), a formação de microcolônias por *S. aureus* é de muita importância para a sobrevivência do microrganismo, devido à natureza puramente extracelular de muitos processos bacterianos em organismos Gram positivos, que devem liberar um grande número de enzimas para o meio exterior. Obviamente, seria de grande valor metabólico, a capacidade de reter estas proteínas próximas às células produtoras, para obter metabólitos assimiláveis com o mínimo de esforço metabólico.

Todas estas alterações são possíveis de ocorrer durante transferências sucessivas, não só na produção de enzimas extracelulares, como também em relação à variação antigênica ( 82 ).

A maior liberação de certos exoproteínas com a simultânea diminuição de outras, de acordo com os dados apresentados na tabela 18 e 19, pode ser explicada pelo mecanismo de compensação pleiotrófica proposto por COLEMAN ( 13 ). Este autor, estudando variantes da linhagem de *S. aureus* Wood



46, observou que a formação de proteína extracelular total permanecia constante, porém ocorria variações quantitativas entre as diferentes exoproteínas.

Deste modo, existindo um mecanismo compensador para saturar a capacidade produtora das proteínas extracelulares, não é de se estranhar esta variação, com o aumento de alguns componentes e a simultânea diminuição de outros. Segundo COLEMAN et alii (citado por COLEMAN, 13), se uma mutação causa perda de um produto extracelular principal, a capacidade biossintética estaria disponível para produzir quantidades adicionais de outras proteínas extracelulares.

#### 5.6 - Estudo da estrutura de parede celular por difração de raios X.

De acordo com os resultados apresentados nas figuras 10, 11, 12 e 13, os diagramas da parede celular e da célula integral de *S. aureus* S-6, assim como os diagramas obtidos das células desenvolvidas no meio NAK e NAKSA foram bastante semelhantes, não se observando diferenças no espaçamento da difração orientada. Portanto, apesar de ter observado uma alteração marcante na coloração de Gram entre as células desenvolvidas no meio NAK e NAKSA (figuras 6 e 7), a maior retenção de corante neste último provavelmente não se deve à alteração na estrutura da parede celular. Porém, a espessura da parede celular deve estar aumentada em *S. aureus* S-6 desenvolvido em meio NAKSA, devido à menor quantidade de autolisinas. Isto é

esperado, já que a produção geral de proteínas, tanto extracelulares como intracelulares está diminuída no meio NAKSA ( tabelas 2, 3, 4, 13 ).

Além da importância do magnésio no controle da divisão celular, como foi discutido por WALKER e DUFFS ( 109 ), esta diminuição de autolisinas deve ter dificultado ainda mais a multiplicação celular no meio NAKSA, impossibilitando a localização de componentes da parede recém-sintetizados no septo intercelular. Conseqüentemente, deve ter ocorrido um empilhamento dos componentes da parede à medida que eram sintetizados, aumentando a espessura da mesma.

A semelhança obtida nos diagramas de difração de raios X das células desenvolvidas nos meios NAK e NAKSA é condizente com os resultados apresentados por LABISCHINSKI et alii ( 51 ), onde os diagramas de difração, tanto de bactérias Gram positivas ( *S. aureus*, *M. luteus* ), como de Gram negativas ( *E. coli* ) foram quase idênticas. Segundo BURGE et alii ( 9 ), os peptidoglicanos de diferentes espécies bacterianas parecem apresentar a mesma estrutura geral.

Deve-se considerar também a grande quantidade de ácidos teicóico ou teicurônico presente na parede celular destas bactérias Gram positivas.

A quantidade relativa de ácido teicóico e/ou teicurônico depende do meio de crescimento ( 9,96,110 ), principalmente no que se refere ao desvio da concentração de fosfato. Esta situação deve ter ocorrido no meio NAKSA, já que a alumina remove os diferentes íons, indiscriminadamente. Assim, o desvio de fosfato no meio NAKSA provavelmente conduz simul -

taneamente a mudanças na quantidade relativa de ácido teicóico e teicurônico incorporado na parede celular.

Entretanto segundo SCHOCKMAN e BARRETT ( 96 ), as bactérias organizam a parede celular mantendo uma composição química constante, existindo inclusive uma relação constante entre os polímeros de peptidoglicano e não peptidoglicano. Esta relação é válida mesmo na deficiência de fósforo, o que poderia explicar a constância nos diagramas de raios X entre as células desenvolvidas no meio NAK e NAKSA.

De acordo com BURGE et alii ( 9 ), os ácidos teicóico e teicurônico são importantes como moléculas ligantes flexíveis, já que mantêm as cadeias de glicano da parede integral numa forma menos distorcida, estabilizando assim a rede de peptidoglicano. Estas moléculas resistem a atritos entre as camadas adjacentes de peptidoglicano, assim como permitem a expansão ou contração da rede do polímero. Deste modo, a remoção dos ácidos teicóico e teicurônico da parede resulta em uma redução da estrutura ordenada do peptidoglicano ( 10 ).

Nas experiências com raios X, houve muita dificuldade em obter reflexões orientadas, ocorrendo em muitos casos, a não obtenção de resultados.

De acordo com FORMANEK ( 23 ), a ocorrência de uma estrutura cristalina ideal é praticamente impossível em polímeros biológicos e sintéticos. Assim, estes polímeros sempre levam à formação de estruturas paracristalinas, onde existem poucas regiões ordenadas. A estrutura paracristalina confere a estabilidade e a flexibilidade, porém dificulta a obtenção de reflexões orientadas nos diagramas de difração de raios X.

Por outro lado, esta flexibilidade confere à parede celular, maior permeabilidade para as várias macromoléculas que atravessam livremente esta estrutura, já que segundo SHOCKMAN e BARRETT ( 96 ), teoricamente a parede deveria impedir a passagem de moléculas com peso molecular superior a 1.200 , o que não é válido biologicamente.

Além disso, segundo LAPIDOT e IRVING ( 55 , 56 ), existe uma considerável mobilidade nas regiões da interligação de pentaglicina em *S. aureus* , sendo esta dependente do grau de empacotamento das cadeias de glicano.

Todas estas propriedades da parede celular, favoráveis à sobrevivência do microrganismo, devem ter dificultado a obtenção de reflexões orientadas no estudo da estrutura por difração de raios X.

Tendo em vista a semelhança dos diagramas de difração de raios X obtidos com as células de *S. aureus* S-6 desenvolvidas em diferentes meios, escolheu-se o diagrama da parede celular em meio NAK ( figura 11 ), como referência para os estudos comparativos e discussão da estrutura de parede celular em *S. aureus* .

Quando se analisam as várias reflexões obtidas neste diagrama, apresentadas na tabela 20 e esquematizadas na figura 14, verifica-se que as reflexões obtidas neste trabalho são muito mais orientadas e em maior número, em relação aos resultados obtidos por FORMANEK et alii ( 24 ), BURGE et alii ( 9 ) e LABISCHINSKI et alii ( 51 ).

A experiência com parede celular de *S. aureus* S-6 resultou em reflexões com periodicidade de 4,71; 5,56;

8,77; 13,71; 22,31 e 27,68 Å ( tabela 20 ) .

Entretanto apenas duas reflexões com periodicidade de aproximadamente 9,4 Å e 4,5 Å coincidem em todas as referências citadas, o que deve corresponder aos halos difusos  $h_1$  e  $h_3$  em 8,77 Å e 4,71 Å obtidos nesta pesquisa.

Deve-se ressaltar porém, que o nosso método de preparação de amostra difere daquele usado pelos autores citados. Eles utilizaram camadas secas de células ou parede celular. No nosso caso, a dispersão de células e parede celular foi parcialmente desidratada em ambiente úmido e mantida nestas condições durante a exposição. Isto pode ter preservado a ordem dos biopolímeros na parede celular, dando origem a mais reflexões nos diagramas de difração.

Com referência à relação entre reflexões presentes nos diagramas de raios X e as periodicidades existentes na estrutura molecular da parede celular, não existe concordância entre os autores na literatura atual.

FORMANEK et alii ( 24 ) cita que de acordo com WEIDEL e PELZER, a distância entre as cadeias de peptidoglicano seja de 4,4 Å. Porém, segundo LABISCHINSKI et alii ( 51 ), a distância de 3,0 a 4,0 Å é muito pequena para o empacotamento das cadeias de glicano. Nossos diagramas da parede celular de *S. aureus* S-6 também apresentaram um halo difuso e não orientado (  $h_3$  ) em 4,71 Å ( tabela 20 ). Entretanto, esta periodicidade também pode ser devida à presença de componentes lipídicos na parede\*. O *S. aureus* é uma bactéria pigmentada, sendo este pigmento de natureza carotenóide, e já

\* - Comunicação pessoal de Dra I. L. Torriani.

que nenhum tratamento foi realizado para a remoção de lipídios, pode ser que estes sejam responsáveis pela reflexão nesta periodicidade.

A periodicidade em torno de  $9,4 \text{ \AA}$  é importante, uma vez que esta reflexão tem sido utilizado por FORMANEK et alii ( 24 ) como argumento para o modelo tipo quitina, na porção glicano da mureína. Porém as publicações recentes rejeitam esta conformação para o peptidoglicano ( 9,10,51,72 ) . Deste modo, LABISCHINSKI et alii ( 51 ) argumentam que a difração de raios X de proteína A, um componente da parede de *S. aureus* também apresenta reflexões bastante semelhante à quitina, embora não apresentasse nenhuma relação estrutural com a quitina.

Estudos conclusivos rejeitando o modelo baseado em quitina tem sido apresentado por NAUMAN et alii ( 72 ), utilizando espectroscopia de infravermelho.

Em relação à conformação da cadeia de glicano nas camadas de parede celular, as propostas são bastante diversificadas. Enquanto que BURGE et alii ( 9,10 ) propõem a existência de regiões tridimensionais semelhantes a cristal (embora bastante desordenadas) , LABISCHINSKI et alii ( 51 ) sugerem uma estrutura em camadas sem grandes distorções, com deslocamentos ao acaso das camadas sucessivas. Os resultados obtidos nesta pesquisa indicam que existem regiões bastante orientadas na parede celular, o que leva a reflexões nítidas e orientadas nos diagramas obtidos.

A estrutura tridimensional do glicano foi proposta por LABISCHINSKI et alii ( 51 ), BURGE et alii ( 9,

10 ) e FORMANEK et alii ( 24 ). Porém nenhum trabalho ainda tem conclusões definitivas sobre a conformação do peptidoglicano, permanecendo a necessidade de novas investigações para sua elucidação.

As reflexões de baixo ângulo obtidas neste trabalho ( 13,71; 22,31 e 27,68 Å ) certamente estão relacionadas com a estrutura e organização de vários componentes da parede celular, tendo inclusive maior importância do que as reflexões de ângulo maior. Entretanto, apenas com estes resultados, não se pode concluir qual estrutura seja responsável por estas reflexões orientadas e nítidas nos diagramas.

A elucidação completa da parede celular ainda requer muitos estudos. Na bacteriologia, ela desempenha um papel de destaque, já que o alvo de vários antibióticos é a parede celular, assim como todos os nutrientes, ou enzimas extracelulares, toxinas, proteínas receptoras e outros metabólitos devem atravessar esta camada de peptidoglicano para atingir o seu objetivo.

## 6 - CONCLUSÕES

Baseado nos resultados obtidos, pode-se concluir que :

- O equilíbrio iônico é fundamental para o desenvolvimento normal das células de *S. aureus* S-6. Desta forma, o tratamento do meio de cultura com alumina, produz um desequilíbrio, tornando crítica a relação entre os íons importantes para o desenvolvimento do microrganismo, principalmente de magnésio.
- O desenvolvimento anormal de *S. aureus* S-6 em meio NAKSA foi observado através do estudo de algumas propriedades, constata-se:
  - Diminuição de peso seco.
  - Alteração na morfologia celular com desenvolvimento de células gigantes e aberrantes, que apresentam alteração na coloração de Gram.
  - Diminuição na produção de proteínas extracelulares como DNase, coagulase, enterotoxinas A e B, assim como a enzima intracelular desidrogenase lática.
- A produção de coagulase, enterotoxina B e a enzima intracelular LDH foi incrementada com a adição de magnésio ao meio NAKSA, porém não atingiu os níveis obtidos no meio NAK. O aumento da atividade de DNase não se deve à injúria celular a nível de membrana, já que todos os sobrenadantes analisados apresentaram resultados negativos para a atividade de LDH.



- A adição de íon ferro ao meio NAKSA + 1,11 µg/mL de Mg<sup>2+</sup> teve efeitos adversos para o desenvolvimento de *S. aureus* S-6, produzindo uma diminuição tanto no peso seco, como na produção de DNase e enterotoxina B.
- A diminuição da atividade de DNase não se deve ao efeito direto do ferro na enzima, já que a adição deste íon no sobrenadante da cultura em meio NAK, nas concentrações estudadas, não alterou a atividade enzimática.
- A produção de LDH não foi afetada pela adição de ferro, provavelmente devido à manutenção das condições intracelulares, através de uma ação do sistema de transporte a nível de membrana celular.
- A adição de conalbumina ao meio NAKSA estimulou a produção de proteínas extracelulares. Uma possível explicação para este fato seria a introdução de contaminantes iônicos juntamente com a conalbumina, o que propiciaria um maior desenvolvimento do microrganismo.
- As enzimas extracelulares coagulase e DNase foram analisadas quanto à associação com a superfície celular, podendo-se concluir a partir dos resultados que:
  - A quantidade de nuclease presente na superfície celular é aproximadamente 200 vezes inferior à mesma enzima presente no sobrenadante de cultura.
  - A quantidade de DNase liberada pela lisostafina equivale aproximadamente à presente nos protoplastos, indicando que esta enzima, uma vez produzida, logo atinge o meio exterior, sem se acumular na

parede celular.

- As enzimas superficiais devem estar firmemente associadas à parede celular, já que não foram liberadas pelo ultra-som.
  
- A análise de parede celular e de células integrais de *S. aureus* S-6 por difração de raios X indica que o desenvolvimento do microrganismo em meio NAKSA não alterou a estrutura tridimensional da parede, embora tenham sido observadas alterações morfológicas marcantes na microscopia ótica.

7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 - AMAKO, K.; UMEDA, A.; MURATA, K. Arrangement of peptidoglycan in the cell wall of *Staphylococcus* spp. J.Bacteriol. 150 ( 2 ): 844-50, 1982.
- 2 - BERGDOLL, M.S. Enterotoxins. In: MONTIE, T.C.; KADIS, S.; AJL, S.J. Microbial toxins. New York, Academic Press, 1970. v.3, p. 265-326.
- 3 - ——— & REISER, R. Application of radioimmunoassay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. J. Food Protect., 43 ( 1 ): 68-72, 1980.
- 4 - ——— & ——— ; SPITZ, J. Staphylococcal enterotoxins. Detection in food. Food Technol., 30 ( 5 ): 80-4, 1976.
- 5 - BJORKLIND, A. & ARVIDSON, S. Mutants of *Staphylococcus aureus* affected in the regulation of exoprotein synthesis. FEMS Microbiol.Lett., 7 ( 3 ): 203-6, 1980.
- 6 - BRAGG, L. X-ray cristalography. Sci.American, 219 ( 1 ) : 58-70, 1968.
- 7 - BUCHANAN, R.E. & GIBBONS, N.E. Bergey's manual of determinative bacteriology. 8.ed. Baltimore, William & Wilkins, 1974. 1246p.
- 8 - BULLEN, J.J.; ROGERS, H.J.; GRIFFITHS, E. Bacterial iron metabolism in infection and immunity. In: NEILANDS, J. B. Microbial iron metabolism - a comprehensive treatise. New York, Academic Press, 1974. Cap. 20, p. 517-51.
- 9 - BURGE, R.E.; ADAMS, R.; BALLYUZI, H.H.M.; REAVELEY, D.A. Structure of the peptidoglycan of bacterial cell walls. II. J. Mol.Biol., 117: 955-74, 1977.

- 10 - ———; FOWLER, A.G.; REAVELEY, D.A. Structure of bacterial cell walls. I. J.Mol.Biol., 117: 927-53, 1977.
- 11 - CAPUTY, G.G. & COSTERTON, J.W. Morphological examination of the glycocalyxes of *Staphylococcus aureus* strains Wiley and Smith. Infect.Immun., 36 ( 2 ): 750-67, 1982.
- 12 - CISANI, G.; VARALDO, P.E.; GRAZI, G.; SORO, O. High level potentiation of lysostaphin anti-staphylococcal activity by lysozyme. Antimicrobiol.Ag.Chem., 21 ( 4 ): 531.5 , 1982.
- 13 - COLEMAN, G. Pleiotropic compensation in the regulation of extracellular protein formation by a low  $\alpha$ -toxin producing variant of *Staphylococcus aureus* ( Wood 46 ). J.Gen.Microbiol., 122 ( 1 ): 11-5, 1981.
- 14 - COLTON, J.W. The ferrichrome-iron receptor of *E.coli* K-12: antigenicity of the fhu A protein. Biochim.Biophys.Acta, 717 ( 1 ): 154-62, 1982.
- 15 - COWART, R.E. & FOSTER, B.G. The role of iron in the production of hemolysin by *Listeria monocytogenes* . Curr. Microbiol., 6 ( 5 ): 287-90, 1981.
- 16 - CUTINELLI, C. & GALDIERO, F. Iron-binding properties of the wall of *Staphylococcus aureus* . J.Bacteriol., 93 ( 6 ): 2022-3, 1967.
- 17 - DONALD, C.; PASSEY, B.I.; SWABY, R.J. A comparison of methods for removing trace metals from microbiological media. J.Gen.Microbiol., 7: 211-20, 1952.
- 18 - EMERY, T. The storage and transport of iron. In: SIGEL, H. Metal ions in biological systems. New York, Marcel Dekker Inc., 1978. v.7, p.77-121.
- 19 - EMSWILER-ROSE, B.S.; JOHNSTOW, R.W.; HARRIS, M.E.; LEE, W. H. Rapid detection of staphylococcal thermonuclease on

casings of naturally contaminated fermented sausages .  
Appl. Environ. Microbiol., 40 ( 1 ): 13-8, 1980.

- 20 - ENGELS, W & KAMPS, M.A.F. Secretion of staphylocoagulase by *Staphylococcus aureus* : the role of a cell-bound intermediate. Ant. van Leeuwenhoek, 47: 509-24, 1981.
- 21 - ————; ————; VAN BOVEN, C.P.A. Influence of cultivation conditions on the production of staphylocoagulase by *Staphylococcus aureus* 104. J. Gen. Microbiol., 109 ( 2 ): 237-43, 1978.
- 22 - ERICKSON, A & DEIBEL, R.H. Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. Appl. Microbiol., 25 ( 3 ): 337-41, 1973.
- 23 - FORMANEK, H. A three dimensional model of the digestion of peptidoglycan by lysozyme. Biophys. Struct. Mechanism, 4: 1-14, 1978.
- 24 - ———— ; FORMANEK, S.; WAWRA, H. A three dimensional atomic model of the murein layer of bacteria. Eur. J. Biochem., 46 : 279-94, 1974.
- 25 - FREED, R.C.; EVENSON; M.L.; REISER, R.F.; BERGDOLL, M.S. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. Appl. Environ. Microbiol., 44 ( 6 ): 1349-55, 1982.
- 26 - GOEL, V.K. & JOSHI, B.C. Immunological behavior of some major proteins of fowl's egg white in double gel diffusion patterns. J. Food Sci. Technol., 15 ( 3 ): 108-110. 1978.
- 27 - GREWAL, K.K.; WARNER, P.J.; WILLIAMS, P.H. An inducible outer membrane protein involved in aerobactin-mediated iron transport by Col V strain of *E. coli*. FEBS Lett., 140 ( 1 ): 27-30, 1982.

- 28 - HARDER; W & DIJKHUIZEN, L. Physiological responses to nutrient limitation. Ann.Rev.Microbiol., 37 : 1-23, 1983.
- 29 - HIROOKA, E.Y. Bacterimetria e identificação de estafilococos enterotoxigênicos em embutidos comercializados em Londrina-PR. Fundação Universidade Estadual de Londrina. 1981. 105p. Tese ( Mestrado ) - FUEL.
- 30 - HOOVER, D.G.; TATINI, S.R.; MALTAIS, J.B. Characterization of staphylococci. Appl.Environ.Microbiol., 46 ( 3 ) : 649-60, 1983.
- 31 - HOVING, H.; KONING, J.H.; ROBILLAND, G.T. *Escherichia coli* phosphoenolpyruvate-dependent phosphotransferase system: role of divalent metals in the dimerization and phosphorylation of Enzyme I. Biochem.(Wash.), 21 ( 13 ) : 3128-36, 1982.
- 32 - HOYLE, B. & BEVERIDGE, T.J. Binding of metallic ions to the outer membrane of *Escherichia coli* . Appl.Environ.Microbiol., 46 ( 3 ) : 749-52, 1983.
- 33 - HUGHES, A & HURST, A. Magnesium requirement of *Staphylococcus aureus* for repair from sublethal injury. Can.J.Microbiol., 22 ( 8 ) : 1202-5, 1976.
- 34 - ——— ; HANCOCK, I.C.; BADDILEY, J. The function of theicic acids in cation control in bacterial membranes. Biochem.J., 132 : 83-93, 1973.
- 35 - HURST, A. & HUGHES, A. Repair of salt tolerance and recovery of lost D-alanine and magnesium following sublethal heating of *Staphylococcus aureus* are independent events. Can.J.Microbiol., 27 ( 6 ) : 627-32, 1981.
- 36 - ——— ; ——— ; COLLINS-THOMPSON, D.L.; SHAH, B.G. Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*.

Can.J.Microbiol., 20 ( 8 ): 153-8, 1974.

- 37 - \_\_\_\_\_ ; \_\_\_\_\_ ; DUCKWORTH, M.; BADDILEY, J. Loss of D-alanine during sublethal heating of *Staphylococcus aureus* S-6 and magnesium binding during repair. J.Gen. Microbiol., 89 ( 2 ): 277-84, 1975.
- 38 - ICHIHARA, S.; HUSSAIN, M.; MIZUSHIMA, S. Mechanism of export of outer membrane lipoproteins through the cytoplasmic membrane in *E. coli* . Binding of lipoprotein precursors to the peptidoglycan layer. J.Biol.Chem. , 257 ( 1 ): 495-500, 1982.
- 39 - JAY, J.M. Use of a plating method to estimate extracellular protein production by staphylococci. Infect.Immun., 3 ( 4 ): 544-7, 1971.
- 40 - JOHN, A.C. & GOLDBERG, A.L. Effects of starvation for potassium and other inorganic ions on protein degradation and ribonucleic acid synthesis in *E. coli*. J. Bacteriol., 143 ( 3 ): 1223-33, 1980.
- 41 - KAMEKURA, M. & ONISHI, H. Effect of magnesium and some nutrients on the growth and nuclease formation of a moderate halophile, *Micrococcus varians* var. halophilus. Can.J.Microbiol., 22 ( 10 ): 1567-76, 1976.
- 42 - KANDALA, J.C.; VERMA, J.; SHARMA, D.; GARG, G.K. Relationship between ion uptake and aconitase activity on *Bacillus cereus* T. J.Food Sci.Technol.(Mysore), 18 ( 2 ): 50-5, 1981.
- 43 - KATSUNO, S. & KONDO, M. Regulation of staphylococcal enterotoxin B synthesis and its relation to other extracellular proteins. Jap.J.Med.Sci. & Biol., 26 ( 1 ): 26-9 , 1973.
- 44 - KELEMEN, M.V. & ROGERS, H.J. Three-dimensional molecular models of bacterial cell wall mucopeptides ( peptidogly-

- cans) . Proc.Nat.Acad.Sci. USA, 68 ( 5 ): 992-6, 1971.
- 45 - KIM, T.K.; HAMMOND, J.B.; CHIPLEL, J.R. Chemical and electron microscopic studies of factors associated with penicillinase from *Staphylococcus aureus* . Ant.van Leeuwenhoek, 45 ( 4 ): 581-93, 1979.
- 46 - KING, B.F.; BIEL, M.L.; WILKINSON, B.J. Facile penetration of the *Staphylococcus aureus* capsule by lysostaphin . Inf.Immun., 29 ( 3 ): 892-6, 1980.
- 47 - KLEBBA, P.E.; NEILANDS, J.B.; McINTOSH, M.A. Kinetics of biosynthesis of iron-regulated membrane proteins in *Escherichia coli* . J.Bacteriol., 149 ( 3 ): 880-8, 1982.
- 48 - KLOOS; W.E. Natural populations of the genus *Staphylococcus* . Ann.Rev.Microbiol., 34 : 559-92, 1980.
- 49 - KOPER, J.W.; HAGENAARS, A.M.; NOTERMANS, S. Prevention of cross-reactions in the enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ) for detection of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B in culture filtrates and foods. J. Food Saf., 2 ( 1 ): 35-45, 1980.
- 50 - KUO, J.K.S. & SILVERMAN, G.J. Application of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in food. J.Food Protect., 43 ( 5 ): 404 - 407, 1980.
- 51 - LABISCHINSKI; H.; BARNICKEL, G.; BRADACZEK, H.; GIESBRECHT, P. On the secondary and tertiary structure of murein. Low and medium angle X-ray evidence against chitin-based conformations of bacterial peptidoglycan. Eur.J.Biochem. 95 ( 1 ): 147-55, 1979.
- 52 - LACHICA, R.V.F.; GENIGEORGIS, C.; HOEPRICH, P.D. Metachromatic agar diffusion methods for detecting staphylococcal nuclease activity. Appl.Microbiol., 21 : 585 - 7, 1971.



- 53 - LAMBERT, P.A.; HANCOCK, I.C.; BADDILEY, J. Influence of alanyl ester residues on the binding of magnesium ions to teichoic acids. Biochem.J., 151 ( 3 ): 671-6, 1975.
- 54 - LAPIDOT, A. & IRVING, C.S. Dynamic structure of whole cells probed by nuclease overhauser enhanced nitrogen-15 nuclear magnetic resonance spectroscopy. Proc.Natl. Acad.Sci. USA, 74 ( 5 ): 1988-92, 1977.
- 55 - ——— & ——— Comparative in vivo Nitrogen-15 nuclear magnetic resonance study of the cell wall components of five Gram-positive bacteria. Biochem., 18 ( 4 ): 704-14, 1979.
- 56 - ——— & ——— Nitrogen-15 and carbon-13 dynamic nuclear magnetic resonance study of chain segmental motion of the peptidoglycan pentaglycine chain of <sup>15</sup>N - gly and <sup>13</sup>C<sub>2</sub> - gly - labelled *Staphylococcus aureus* cells and isolated cell walls. Biochem. (Wash.), 18 ( 9 ): 1788-96, 1979.
- 57 - LEE, K. & CLYDESDALE, F.M. Quantitative determination of the elemental, ferrous, ferric, soluble, and complex iron in foods. J.Food Sci., 44 ( 2 ): 549-54, 1979.
- 58 - MAH, R.A.; FUNG, D.Y.C.; MORSE, S.A. Nutritional requirements of *Staphylococcus aureus*S-6. Appl.Microbiol., 15 ( 4 ): 866-70, 1967.
- 59 - MARBACH, E.P. & WEIL, M.H. Rapid enzymatic measurement of blood lactate and pyruvate. Clin.Chem., 13 : 314, 1967.
- 60 - MARKUS, Z.H. & SILVERMAN, G.J. Factors affecting the secretion of staphylococcal enterotoxin A. Appl.Microbiol., 20 ( 3 ): 492-6, 1970.
- 61 - MARQUIS, R.E. Salt-induced contraction of bacterial cell walls. J.Bacteriol., 95 : 775-81, 1968.

- 62 - MASKELL, J.P. The functional interchangeability of enterobacterial and staphylococcal iron chelators. Ant.van Leeuw., 46 ( 4 ): 343-51, 1980.
- 63 - MEDWID, R.D. & GRANT, D.W. Inactivation of staphylococcal thermonuclease by an enzyme-like factor produced by *Streptococcus faecalis* subsp. liquefaciens. J. Food Protect., 43 ( 3 ): 201-2, 204, 1980.
- 64 - MESSENGER, A.J.M. & RATLEDGE, C. Iron transport in *Mycobacterium smegmatis* : uptake of iron from ferric citrate. J.Bacteriol., 149 ( 1 ): 131-5, 1982.
- 65 - MEYER, W. "Über die brauchbarkeit des koagulasetestes mit verschiedenen plasmaarten zur differenzierung von *Staphylococcus aureus* - stämmen. Zbl.Bakt.I.Abt.Orig. , 209 : 465-81, 1966.
- 66 - MICHAELIS, S. & BECKWITH, J. Mechanism of incorporation of cell envelope proteins in *Escherichia coli* . Ann. Rev. Microbiol., 36 : 435-65, 1982.
- 67 - MILLER, R.D. & FUNG, D.Y.C. Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. Appl.Microbiol., 25 ( 5 ): 800-6, 1973.
- 68 - MINOR, T.E. & MARTH, E.H. Staphylococci and their significance in foods. Amsterdam, Elsevier, 1976. 297p.
- 69 - MORITA, T.N.; PATTERSON, J.E.; WOODBURN, M.J. Magnesium and iron addition to casein hydrolysate medium for production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C . Appl.Environ.Microbiol., 38 ( 1 ): 39-42, 1979.
- 70 - MORSE, S.A. & BALDWIN, J.N. Regulation of staphylococcal enterotoxin B: effect of thiamine starvation. Appl. Microbiol., 22 ( 2 ): 242-9, 1971.

- 71 - MUSER, D.M.; VERBRUGH, H.A.; VERHOEF, J. Expression of phagocytosis and chemotaxis by cell wall compounds of *Staphylococcus aureus*. J.Immunol., 127 ( 1 ): 84-8, 1981.
- 72 - NAUMANN, D.; BARNICKEL, G.; BRADACZEK, H.; LABISCHINSKI, H. GIESBRECHT, P. Infrared spectroscopy, a tool for probing bacterial peptidoglycan. Potentialities of infrared spectroscopy for cell wall analytical studies and rejection of models based on crystalline chitin. Eur. J. Biochem., 125 : 505-15, 1982.
- 73 - NISKANEN, A. Staphylococcal enterotoxins and food poisoning. Production / properties and detection of enterotoxins. Finland, Technical Centre of Finland, 1977, 83 p.
- 74 - ——— & KOIRANEN, L. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strain isolated from different sources. J.Food Protect., 40 : 543-548, 1977.
- 75 - NOTERMANS, S.; VERJANS, H.L.; BOL, J.; VAN SCHOTHORST, M. Enzyme linked immunosorbent assay ( ELISA ) for determination of *Staphylococcus aureus* enterotoxin type B. Health Lab. Sci., 15 ( 1 ): 28-31, 1978.
- 76 - OFEK, I.; SIMPSON, W.A.; BEACHEY, E.H. Formation of molecular complexes between a structurally defined M-Protein and acylated or deacylated lipoteichoic acid of *Streptococcus pyogenes*. J.Bacteriol., 149 ( 2 ): 426-33, 1982.
- 77 - OKABAYASHI, K. & MIZUNO, D. Surface-bound nuclease of *Staphylococcus aureus*: localization of the enzyme. J. Bacteriol., 117 ( 1 ): 215-21, 1974.
- 78 - ——— & ——— . Surface-bound nuclease of *Staphylo -*

- coccus aureus* : purification and properties of the enzyme. J.Bacteriol., 117 ( 1 ): 222-6, 1974.
- 79 - OUDIN, J. Specific precipitation in gels. Methods Med. Res., 5 : 335-78, 1952.
- 80 - PAGNOCCA, F.C. & SALZBERG, S.P.C. Effect of the ions  $Fe^{2+}$ ,  $Zn^{3+}$ ,  $Cu^{2+}$  and of conalbumin in the development of the strain *Staphylococcus aureus* S-6. Naturalia, São Paulo, 6 : 15-9, 1981.
- 81 - ——— & ——— . Effect of iron and magnesium in casein hydrolysate medium for growth, coagulase, nuclease and enterotoxin B production of strain *Staphylococcus aureus* S-6. A ser publicado.
- 82 - PEREIRA, A.T. Further studies on antigen variation in *Staphylococcus aureus* . J.Clin.Microbiol., 13 ( 2 ): 245-7, 1981.
- 83 - PEREIRA, J.L. Estudo de parâmetros reguladores da produção de enterotoxinas estafilocócicas tipo A e B pela linhagem Staphylococcus aureus S-6. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos e Agrícola, 1978, 95p. Tese ( Mestrado ) - UNICAMP.
- 84 - ——— & SALZBERG, S.P.C. Dosagem da enzima estafilocogulase através da coagulação de fibrinogênio. Congresso Brasileiro de Microbiologia, 9. S.P. Jul. 1983. São Paulo. Sociedade Brasileira de Microbiologia.1983.
- 85 - PERLMANN, G.E. & LORAND, L. Methods in Enzymology: proteolytic enzymes. New York, Academic Press, 1970. v.XIX . 1042.
- 86 - RÄSÄNEN, L. & ARVILOMMI, H. Cell walls, peptidoglycans and teichoic acids of Gram-positive bacteria as polyclonal inducers and immunomodulators of proliferative and lymphokine responses of human B and T lymphocytes .

Infect.Immun., 35 ( 2 ): 523-7, 1982.

- 87 - RATNOFF, O.D. & MENZIE, C. A new method for the determination of fibrinogen in small samples of plasma. J. Lab.Clin.Med., 37 : 316-20, 1951.
- 88 - REEVES, M.W.; DRUMMOND, M.C.; TAGER, M. Partial purification and characterization of the multiple molecular forms of staphylococcal clotting activity ( coagulase). J.Bacteriol., 148 ( 3 ): 861-8, 1981.
- 89 - REISER, R.F. & WEISS, K.F. Production of staphylococcal enterotoxins A, B and C in various media. Appl.Microbiol., 18 ( 6 ): 1041-3, 1969.
- 90 - REPINE, J.E.; FOX, R.B.; BERGER, E.M.; HARADA, R.N. Effect of staphylococcal iron content on the killing of *Staphylococcus aureus* by polymorphonuclear leukocytes. Infect.Immun., 32 ( 1 ): 407-10, 1981.
- 91 - ROBINSON, J.M.; KEATING, M.S.; SLOAN, G.L. The characteristics of extracellular protein secretion by *Staphylococcus staphylolyticus*. J.Gen.Microbiol., 118 ( 2 ): 529-33, 1980.
- 92 - SAFONOVA, T.B.; AFANASIEVA, T.I.; SOBOLEV, V.R. Inhibitory effect of egg albumin on growth of coagulase-negative species of staphylococci. Antibiotiki, 24 ( 6 ): 440-4, 1979.
- 93 - SANTOS, R.M.Z. Cálculo da distribuição de densidade eletrônica de membranas modelo com hidrocarbonetos aromáticos cancerígenos incorporados. Campinas. Instituto de Física "Gleb Wataghin", 1981, 105p. Tese ( Mestrado ) - UNICAMP.
- 94 - SAUNDERS, G.C.; BARTLETT, M.L. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. Appl.Environ.Microbiol., 34 ( 5 ): 518-22, 1977.

- 95 - SCHERRER, R. & GERHARDT, P. Influence of magnesium ions on porosity of the *Bacillus megaterium* cell wall and membrane. J.Bacteriol., 114 ( 2 ): 888-90, 1973.
- 96 - SHOCKMAN, G.D. & BARRETT, J.F. Structure, function, and assembly of cell walls of Gram-positive bacteria. Ann. Rev. Microbiol., 37 : 501-27, 1983.
- 97 - SIEGEL, L.S. Effect of iron on growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type A. Curr.Microbiol., 6 ( 2 ) : 127-30, 1981.
- 98 - SPENCER, D.B.; HANSA, J.G.; STUCKMANN, K.V.; HULETT, F.M.; Membrane-associated alkaline phosphatase from *Bacillus licheniformis* that requires detergent for solubilization: lactoperoxidase I<sup>125</sup> localization and molecular weight determination. J.Bacteriol., 150 ( 2 ): 826-34, 1982.
- 99 - STIFFLER-ROSEMBERG, G. & FEY, H. Simple assay for staphylococcal enterotoxins A, B, and C: modification of enzyme-linked immunosorbent assay. J.Clin.Microbiol., 8 ( 5 ): 473-9, 1978.
- 100 - TAKAHASHI, T.; TADOKORO, I.; ADACHI, S. An L form of *Staphylococcus aureus* adapted to a brain heart infusion medium without osmotic stabilizers. Microbiol.Immunol., 25 ( 9 ): 871-86, 1981.
- 101 - TATINI, S.R.; CORDS, B.R.; GRAMOLI, J. Screening for staphylococcal enterotoxins in food. Food Technol., 30 ( 4 ): 64-74, 1976.
- 102 - TEMPEST, D.W.; DICKS, J.W.; MEERS, J.L. Magnesium limited growth of *Bacillus subtilis*, in pure and mixed cultures, in a chemostat. J.Gen.Microbiol., 49 : 139-47, 1967.
- 103 - THEODORE, T.S. & SCHADE, A.L. Carbohydrate metabolism of

iron-rich and iron-poor *Staphylococcus aureus* . J.Gen. Microbiol., 40 : 385-95, 1965.

- 104 - THIBONDEAU, S.N.; LEE, D.C.; PALMITER, R.D. Identical precursors for serum transferrin and eggwhite conalbumin . J.Biol.Chem., 253 ( 11 ): 3771-4, 1978.
- 105 - TULLIS, R.H.; DILL, K.A.; PRICE, P. A. Fluorescence and kinetic studies on the divalent metal ion induced conformational changes in DNase. J.Biol.Chem., 256 ( 11 ): 5656-61, 1981.
- 106 - TWENTEN, R.K. & IANDOLO, J.J. Purification and partial characterization of a putative precursor to staphylococcal enterotoxin B. Infect.Immunol., 34 ( 3 ): 900-907, 1981.
- 107 - UMEDA, A.; IKEBUCHI, T.; AMAKO, K. Localization of bacteriophage receptor, clumping factor, and protein A on the cell surface of *Staphylococcus aureus* . J.Bacteriol., 141 ( 2 ): 838-44, 1980.
- 108 - VALENTI, P.; De STASIO, A.; SEGANTI, L.; MASTROMARINO, P.; SINIBALDI, L.; ORSI, N. Capacity of staphylococci to grow in the presence of ovotransferrin or CrCl<sub>3</sub> as a character of potential patogenicity. J.Clin.Microbiol., 11 ( 5 ): 445-7, 1980.
- 109 - WALKER, G.M. & DUFFUS, J.H. Magnesium ions and the control of the cell cycle in yeast. J.Cell Sci., 42: 329-356, 1980.
- 110 - WARD, J.B. Teichoic and teichuronic acids: biosynthesis, assembly, and location. Microbiol.Review, 45 : 211-43, 1981.
- 111 - WARNER, R.C. & WEBER, I. The metal combining properties of conalbumin. J.Am.Chem.Soc., 75 ( 20 ): 5094-101 , 1953.

- 112 - WEBB, B. The influence of magnesium on cell division. 1. The growth of *Clostridium welchii* in complex media deficient in magnesium. J.Gen.Microbiol., 2 : 275-87 , 1948.
- 113 - ————. The influence of magnesium on cell division. 2. The effect of magnesium on the growth and cell division of various bacterial species in complex media. J.Gen. Microbiol., 3 ( 3 ): 410-17, 1949.
- 114 - ————. The utilization of magnesium by certain Gram - positive and Gram-negative bacteria. J.Gen.Microbiol., 43 : 401-9, 1966.
- 115 - WEBLEY, D.M.; DUFF, R.B.; ANDERSON, G. The metabolism of iron, zinc and manganese deficient *Nocardia opaca* . J.Gen.Microbiol., 29 : 179-87, 1962.
- 116 - ZWEIER, J.L. Electron paramagnetic resonance studies of the binding of copper to conalbumin. Probes of the structure and properties of the metal and anion binding sites. J.Biol.Chem., 255 ( 7 ): 2782-9, 1980.



## 8 - APÊNDICE

TABELA 21 - Composição iônica do meio NAK e NAKSA.  
( retirado da referência 81 )

| Cátions | Concentração de cátion em meio<br>( $\mu\text{g/mL}$ ) |        | Fator de redução<br>( NAK : NAKSA ) |
|---------|--|--------|-------------------------------------|
|         | NAK  | NAKSA  |                                     |
| Mn      | 0,2  | 0,1    | 2,0                                 |
| Co      | 0,2  | 0,05   | 4,0                                 |
| Fe      | 2,5  | 0,4    | 6,2                                 |
| Ca      | 9,0  | 0,9    | 10                                  |
| Mg      | 2,5  | 0,1    | 25                                  |
| Zn      | 3,0  | 0,1    | 30                                  |
| Cu      | 0,5  | < 0,01 | 50                                  |

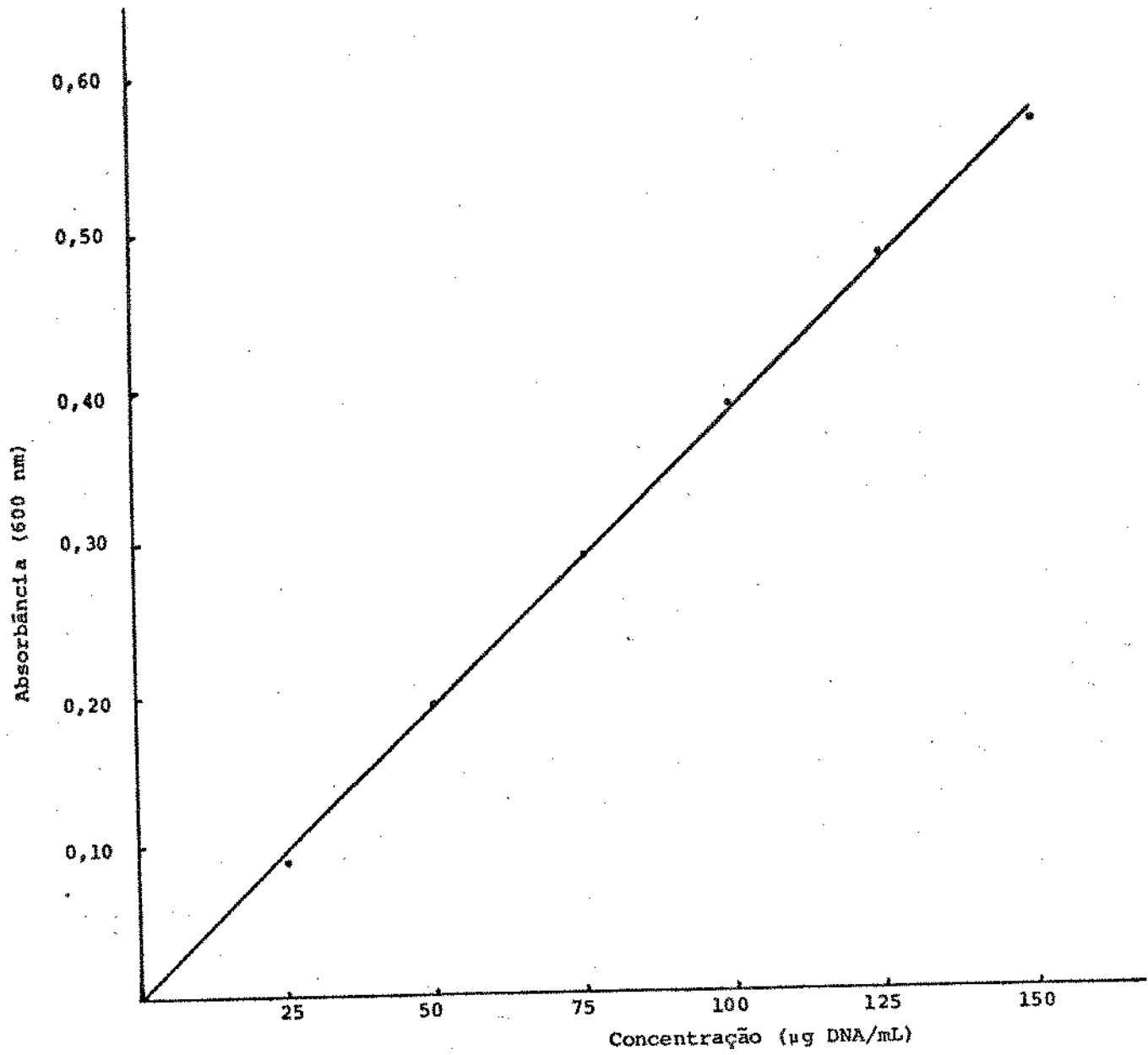


Figura 15 - Curva padrão para a determinação de DNase pelo método turbidimétrico.

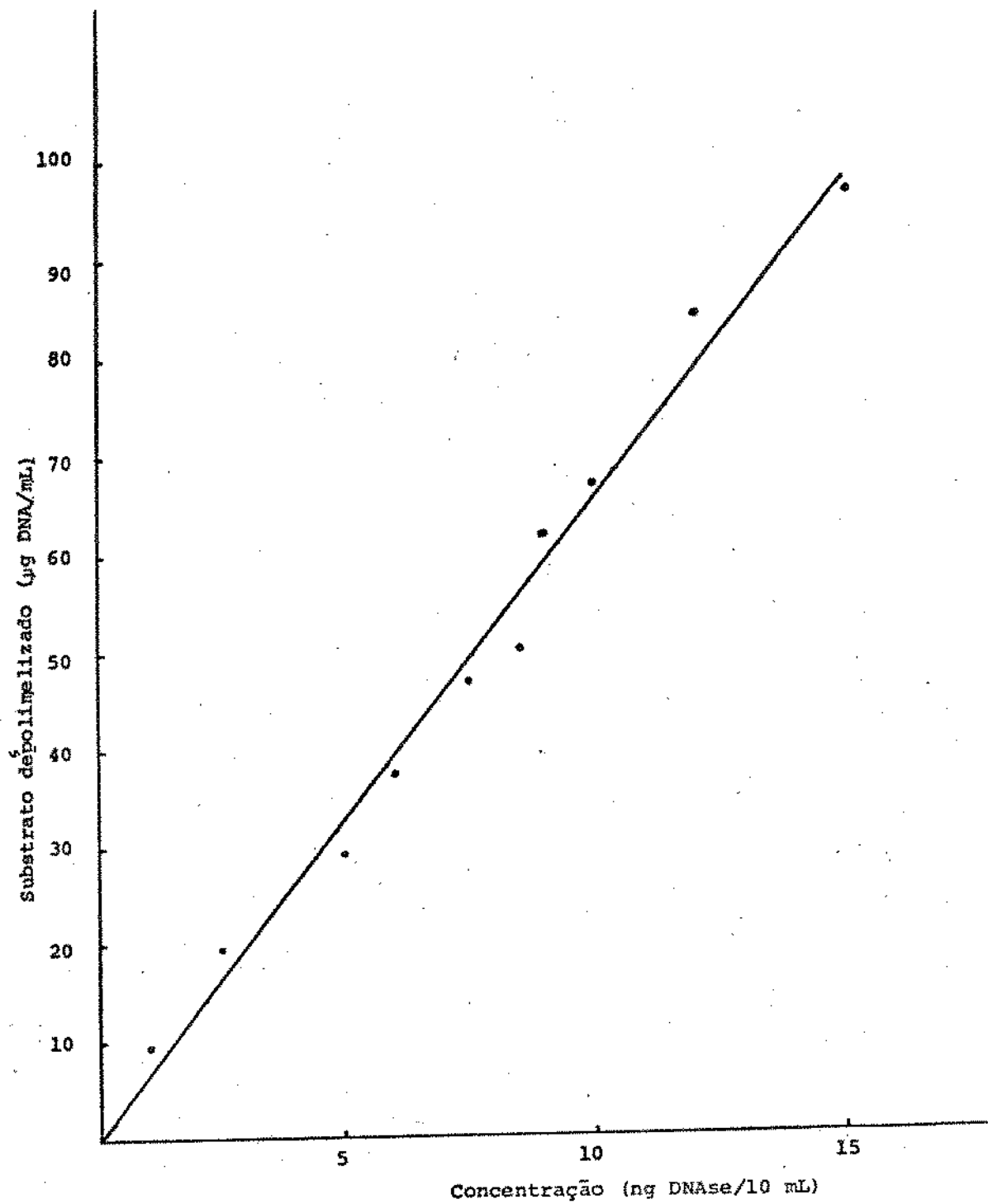


Figura 16 - Relação entre concentração de DNase e substrato despolimerizado

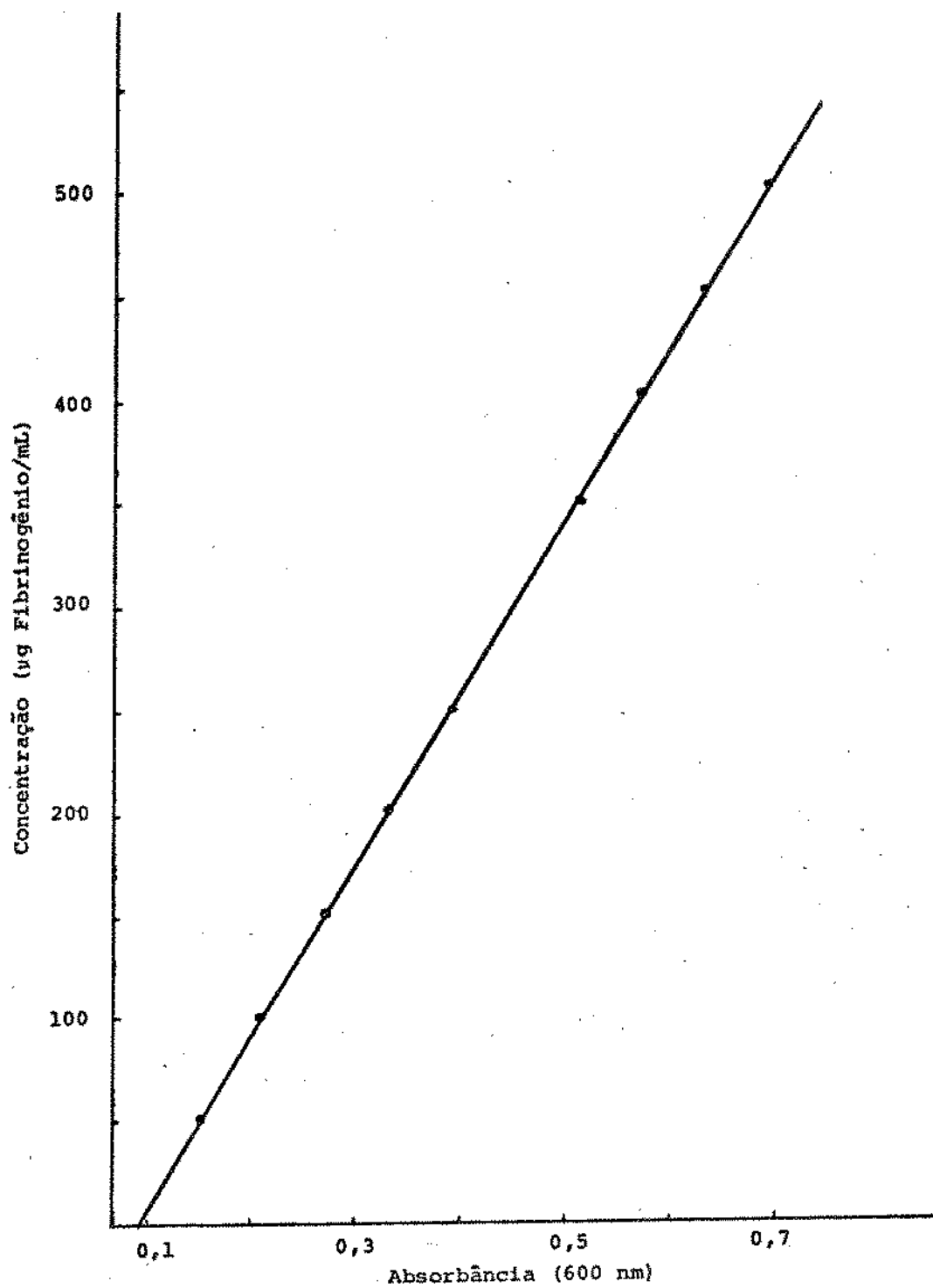


Figura 17 - Curva padrão para determinação de coagulase pelo método quantitativo ( retirado da referência 84 ).

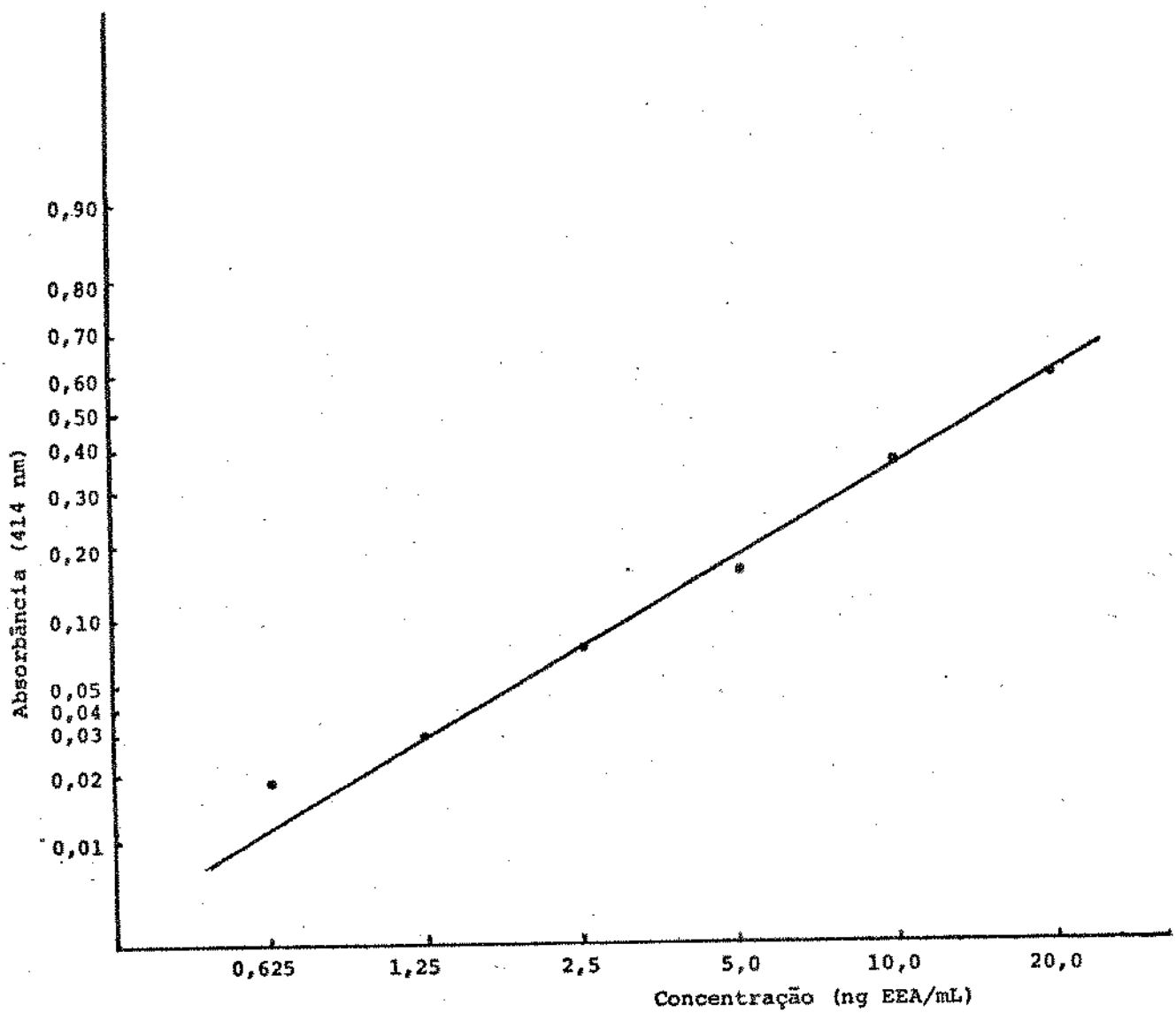


Figura 18 - Curva padrão para a determinação de enterotoxina A pelo método imunoenzimático.

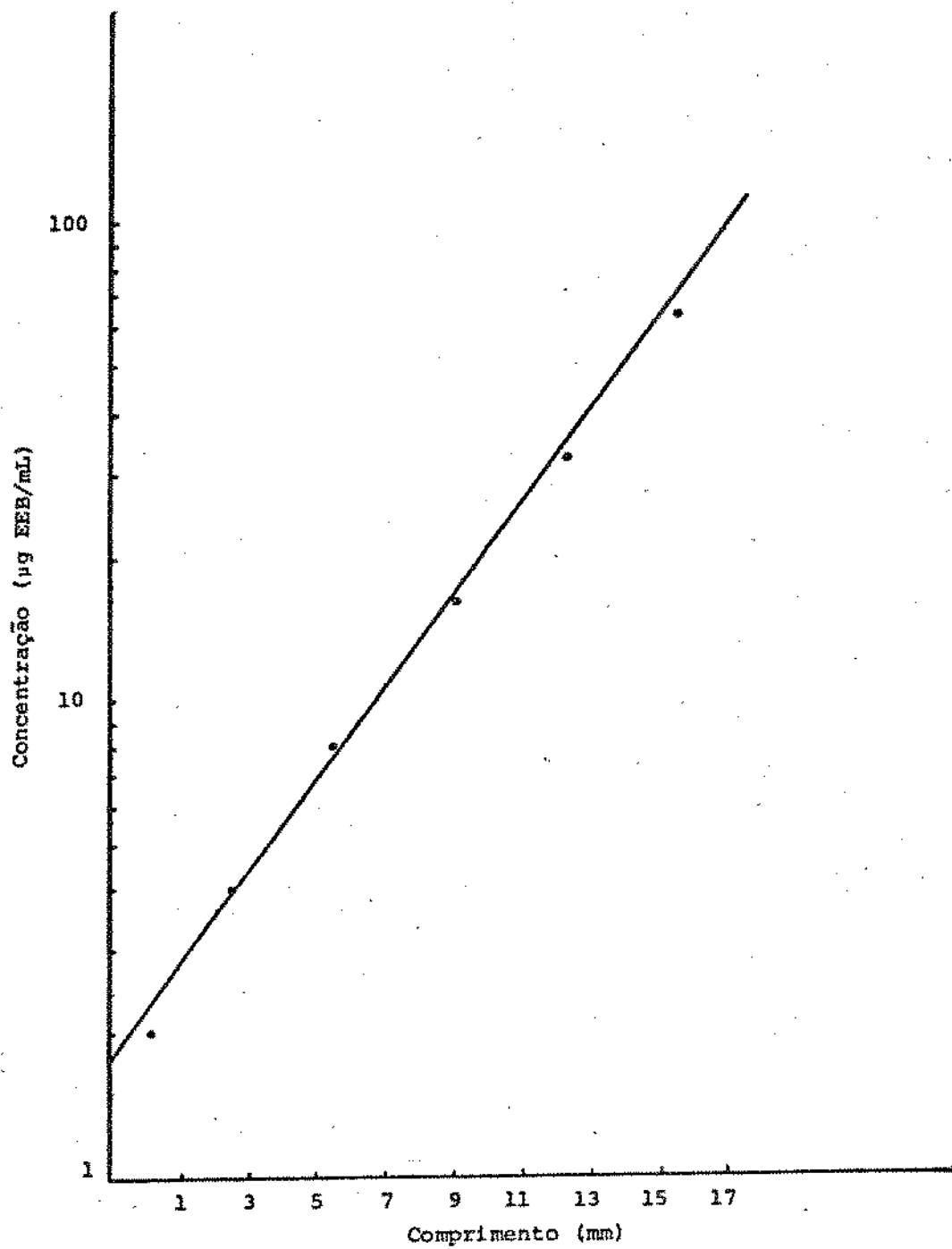


Figura 19 - Curva padrão para a determinação de enterotoxina B pelo método de OUDIN.

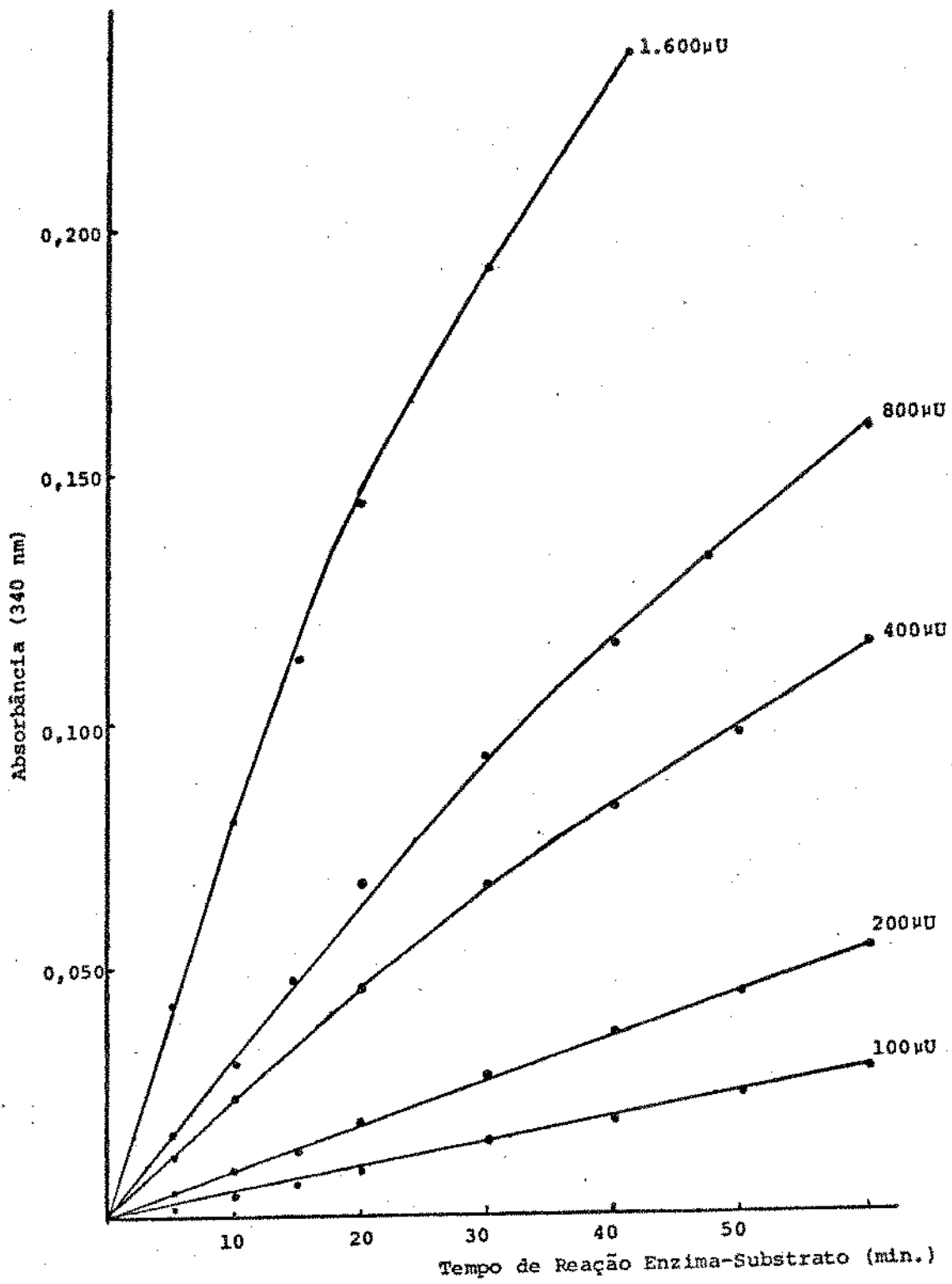


Figura 20 - Determinação do tempo de reação enzima - substrato para desidrogenase lática.

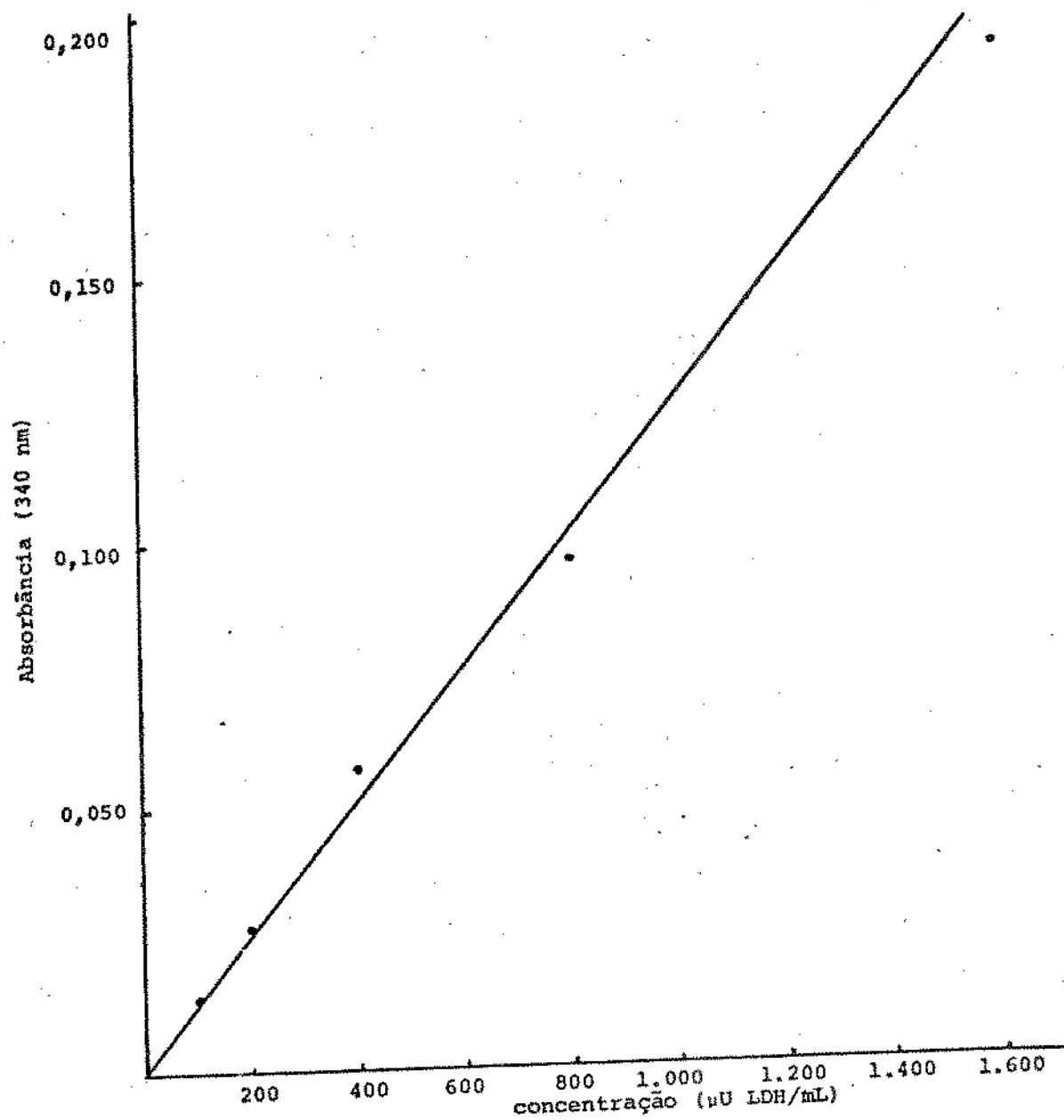


Figura 21 - Curva padrão para a determinação de desidrogenase lática.