

SOFIA JOANA TERLECKI HANKE

**CONJUGAÇÃO E TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO
DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPES Z78, Z152 E ZA95.**

Dissertação apresentada como requisito
parcial à obtenção do grau de Mestre.
Curso de Pós-Graduação em Bioquímica,
Setor de Ciências Biológicas
Universidade Federal do Paraná
Orientadores: Profa. Dra. Liu Un Rigo e
Prof. Dr. Fábio de O. Pedrosa

Curitiba

1995

HANKE, Sofia Joana Terlecki. Conjugação e Transformação por Eletroporação de *H. seropedicae* estirpes Z78, Z152 e ZA95. Curitiba, 1995 [Tese (mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências Biológicas - Departamento de Bioquímica]

Descritores: Conjugação - Transformação - Eletroporação - *Herbaspirillum seropedicae*

Preferi a ciência ao fino ouro, pois a sabedoria vale mais que as pérolas e jóia alguma a poderá igualar.

Prov. 8:11

A meus pais que me ensinaram a extensão destas
palavras.

Ao Lauro, André, Arthur e Mônica que souberam
entender minhas prioridades e apoiaram a busca deste meu ideal.

AGRADECIMENTOS

À Dra. Liu Un Rigo e ao Dr. Fábio de Oliveira Pedrosa, orientadores desta tese, pela liberdade e confiança depositada, além da oportunidade em trabalhar no Laboratório de Fixação de Nitrogênio e Biologia Molecular do Depto. de Bioquímica da U.F.PR.

À Profa. Dra. Glaci T. Zancan pelo aprendizado, orientação firme e segura, apoio, sugestões, incentivo, amizade demonstrados e sempre presentes durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Dr. Shigehiro Funayama pelo acompanhamento das atividades desenvolvidas.

À Coordenação da Pós Graduação, professores, colegas, amigos e funcionários, em especial à Marilza e Roseli, que de uma forma ou de outra participaram na elaboração deste trabalho.

À equipe da Biblioteca do Setor de Ciências Biológicas, especialmente à Telma T. S. de Assis e Mariza Kampfert, pela colaboração prestada.

Aos meus colegas de turma de Pós Graduação Eliana, Eneida, Giseli, Janice, Marcos e Marisa pelo companheirismo nos muitos momentos.

À Berenice, um especial obrigado pelo repartir o "tudo" durante o período de realização deste trabalho. À Ange e Jacque pela amizade demonstrada e pela colaboração de sempre. Aos demais colegas de Laboratório pelo compartilhar.

Ao Prof. Rogério Luiz Koop, Chefe do Departamento de Patologia Clínica da U.F.PR, amigo e colega de disciplina, pelo incentivo e apoio sem os quais este trabalho não teria se realizado.

Ao Prof. Dr. Francisco Miguel Roberto Moraes Silva, D.D. Diretor do Instituto Médico Legal - SESP Pr.- pelo apoio, incentivo e compreensão demonstrados durante a realização deste trabalho, tornando-o viável.

Aos amigos especiais que fiz durante o período de Pós Graduação, Gisele, Regina, Marlene, Marcelo e Rosimery, pela solidariedade, alegria e carinho.

À Roseli Hauer pela presença constante e solidária.

Ao Dr. Antonio Leite Oliva Filho, pela atenção e cooperação inestimáveis em todas as etapas de realização deste trabalho. Obrigada pela editoração final.

A todos os meus familiares que acompanharam, pacientemente, mais esta etapa de minha vida profissional. À minha irmã, ao Sérgio e ao Dani uma deferência especial, pela ajuda sempre pronta.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE ABREVIATURAS	IX
RESUMO.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE RECOMBINAÇÃO GÊNICA.....	2
1.2 RECOMBINAÇÃO GÊNICA EM MICRORGANISMO.....	5
1.3 TRANSFORMAÇÃO.....	7
1.4 CONJUGAÇÃO	13
1.5 <i>Herbaspirillum seropedicae</i>	19
2. OBJETIVOS.....	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3. 1 REAGENTES QUÍMICOS	25
3. 2 MÉTODOS GERAIS.....	25
3. 3 MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS	25
3. 4 ANTIBIÓTICOS.....	28
3. 5 CONDIÇÕES DE CULTIVO.....	29
3. 6 CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS.....	35
3. 7 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i>	35
3. 8 DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO.....	36
3. 9 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	36
3.10 RELAÇÃO ENTRE A D.O. DAS CULTURAS DE DIFERENTES ESTIRPES DE <i>H. seropedicae</i> E O NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS.....	37
3.11 CONJUGAÇÃO BACTERIANA.....	37
3.12 CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES	46
3.13 TRANSFORMAÇÃO DE <i>H. seropedicae</i> POR ELE- TROPORAÇÃO	46

3.14 MODIFICAÇÕES DA METODOLOGIA PARA ELETROPORAÇÃO DE <i>H. seropedicae</i>	49
3.15 PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS	54
3.16 QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA....	58
3.17 ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE	58
4. RESULTADOS	60
4. 1 CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>H. seripedicae</i> Z78.....	61
4. 2 RELAÇÃO ENTRE IDADE DAS CULTURAS E A VIABILIDADE CELULAR	62
4. 3 EFEITOS DE METODOLOGIAS DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES	62
4. 4 EFEITOS DAS CONDIÇÕES DO PREPARO DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA	63
4. 5 TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO.....	76
5. DISCUSSÃO	85
6. CONCLUSÕES	92
7. ANEXOS	94
7. 1 TAMPÕES E SOLUÇÕES.....	95
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	99

LISTA DE QUADROS E TABELAS

QUADROS

I - BACTÉRIAS.....	26
II - PLASMÍDEOS	27
III - COMPOSIÇÃO DO MEIO LB.....	30
IV - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHPN.....	31
V - COMPOSIÇÃO DO MEIO S.O.B.	32
VI - ESQUEMA GERAL DE CONJUGAÇÃO	42

TABELAS

I - RELAÇÃO ENTRE IDADE DA CULTURA E VIABILIDADE.....	64
II - COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE CONJUGAÇÃO ENTRE ROTEIRO TÉCNICO BÁSICO E MODIFICADO	65
III - TRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDEO R68.45	72
IV - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CONJUGAÇÃO.....	73
V - TRANSFERÊNCIA DE DIFERENTES PLASMÍDEOS	74
VI - EFEITO DE DIFERENTES CAMPOS ELÉTRICOS.....	78
VII- EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO DA MISTURA DE ELETROPORAÇÃO	79
VIII-EFEITO DO TEMPO NA REGENERAÇÃO.....	83
IX -EFICIÊNCIA DE ELETROTRANSFORMAÇÃO DE DIFERENTES PLASMÍDEOS	84

LISTA DE FIGURAS

1 - INTRODUÇÃO DE PLASMÍDEOS EM CÉLS. HOSPEDEIRAS	4
2 - MECANISMO DE TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA.....	8
3 - TRANSFORMAÇÃO BACTERIANA POR ELETROPORAÇÃO ..	12
4 - EVENTOS DA CONJUGAÇÃO BACTERIANA	15
5 - MECANISMOS DE TRANSFERÊNCIA DE DNA DURANTE A CONJUGAÇÃO.....	17
6 - CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>H. seropedicae</i>	61
7 - EFEITO DA ETAPA DE LAVAGEM DAS CÉLULAS	65
8 - EFEITO DO CLORETO DE MAGNÉSIO.....	66
9 - EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO	67
10 - EFEITO DA FASE DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE <i>H. seropedicae</i> Z78.....	68
11 - EFEITO DA FASE DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE <i>H. seropedicae</i> Z152.....	69
12 - EFEITO DA FASE DE CRESCIMENTO DAS CULTURAS DE <i>H. seropedicae</i> ZA95.....	69
13 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> Z78 (R68.45).....	70
14 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> Z152 (R68.45)....	71
15 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> ZA95 (R68.45)...	71
16 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> Z78 (pBMR5)	73
17 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> ZA95 (pCK3).....	75
18 - PERFIL DE SOBREVIVÊNCIA <i>H. seropedicae</i> Z152 EM DIFERENTES INTENSIDADES DE CAMPO ELÉTRICO.....	76

19 - PERFIL DE SOBREVIVÊNCIA <i>H. seropedicae</i> ZA95 EM DIFERENTES INTENSIDADES DE CAMPO ELÉTRICO.....	77
20 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE pVK102.....	80
21 - EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE pCK3.....	80
22 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> ZA95 (pCK3).....	81
23 - PERFIL ELETROFORÉTICO DE <i>H. seropedicae</i> Z152 (pVK102)..	82

LISTA DE ABREVIATURAS

D.O. _{550nm}	= densidade óptica a 550 nanômetros
DNA	= Ácido desoxirribonucleico
EDTA	= ácido etilenodiaminotetracético
kb	= 1000 pares de base de DNA
Km	= canamicina
Km ^R	= fenótipo de resistência à canamicina
kV.cm ⁻¹	= quilovolt por centímetro
ms	= milisegundo
Nal	= ácido nalidíxico
Nal ^R	= fenótipo de resistência ao ácido nalidíxico
NFbHP	= <i>Nitrogen Fixing broth Hight Phosphate</i>
nm	= nanômetros
rpm	= rotações por minuto
Sm	= estreptomicina
Sm ^R	= fenótipo de resistência à estreptomicina
T.A.	= temperatura ambiente
Tc	= tetraciclina
Tc ^R	= fenótipo de resistência à tetraciclina
td	= tempo de duplicação
Tris	= Tris (hidroximetil) -aminometano)
v/v	= volume / volume
W.B.	= glicerol 10% em água
x g	= força centrífuga

RESUMO

Eletroporação e conjugação foram utilizadas para a transferência dos plasmídeos R68.45, pCK3, pVK102 e pBMR5 para *Herbaspirillum seropedicae* estirpes Z78, Z152 e ZA95. Vários parâmetros que afetam estas transferências foram investigados utilizando culturas na fase exponencial de crescimento (D.O. $_{550\text{nm}}=1,0$). Foi estabelecido um protocolo que permitiu a obtenção de freqüências de conjugação da ordem de 10^{-5} a 10^{-7} . A eletrotransformação, como técnica alternativa resultou em eficiências da ordem de 10^3 transformantes/ μg de DNA. As condições de eletroporação estabelecidas mostraram maiores números de transformantes/mL quando da utilização de campo elétrico de $8 \text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ e pulso de 6ms. Intensidades menores de campo elétrico resultaram em maior número de células viáveis, porém reduziram a eficiência das eletrotransformações.

INTRODUÇÃO

1.1 ASPECTOS GERAIS SOBRE RECOMBINAÇÕES GÊNICAS.

A variabilidade genética desenvolvida pelos seres vivos ao longo da evolução, provém de reorganizações de DNA através de mutações e recombinações. A expressão final da variabilidade genética é resultado de mutações durante as gerações acumuladas por muito tempo dentro de uma mesma população (SOUZA & COSTA, 1987).

Historicamente, foram os organismos superiores os primeiros a serem estudados sob este prisma. Neles, esta reorganização processa-se através da reprodução sexual, onde ocorre ampla possibilidade de reordenação genética, propiciada pela combinação dos genes paternos com os genes maternos, assegurando a variabilidade genética.

Mutações criam primeiramente novas informações gênicas, através de modificações paulatinas e sucessivas no código genético. Apesar de serem a fonte primária de variabilidade genética são eventos relativamente raros, acrescentando pouco ao grande estoque da variabilidade pré-existente em uma população. A variabilidade genética depende de novas mutações que aparecem a cada geração.

Recombinações levam a novas ordenações físicas de genes, amplificando sobremaneira a diversidade. São suficientes, por si só, para permitir que a variabilidade armazenada expresse-se durante várias gerações, sem a necessidade de novas mutações (SOUZA & COSTA, 1987).

As recombinações, homólogas e sítio específicas, diferem entre si pelo tipo de DNA que lhes servem de substrato, pelas proteínas de recombinação e pelos mecanismos envolvidos em cada tipo de evento (MESELSON & RADDING, 1975; SODERGREN & FOX, 1979; SMITH, 1985).

Nas recombinações homólogas, o DNA substrato apresenta regiões de alta homologia entre os segmentos participantes. A incorporação do DNA ocorre

quando o gene que entra, encontra seu parceiro no DNA do receptor. As trocas podem ocorrer entre qualquer ponto destas regiões, ainda que seqüências nucleotídicas particulares possam vir a influenciar na freqüência do evento de recombinação (HOLLIDAY, 1964; COX & LEHMAN, 1987; SMITH, 1988; RADDING, 1991).

As recombinações sítio específicas, por sua vez, são mediadas por sistemas protéicos altamente específicos e utilizam-se de pequenas regiões do DNA envolvido na troca de informação (CRAIG, 1988). Algumas vezes as seqüências específicas de DNA envolvidas nas trocas genéticas são as responsáveis pela regulação da expressão gênica e também pelas vias envolvidas neste processo celular (PABO, 1984).

Mutação e recombinação pareciam ser os únicos mecanismos que poderiam proporcionar a diversidade biológica, porém tornou-se evidente que outros processos poderiam estar envolvidos. A transposição envolvendo os transposons (Mc CLINTOCK, 1965) e os plasmídeos são exemplos. Transposons, elementos transferíveis, são entidades genéticas com capacidade de inserir-se em segmentos de DNA não permutáveis em vários sítios do genoma procarioto. Promovem rearranjos no DNA, descritos sob a denominação de transposição (KLECKNER, 1981). Plasmídeos bacterianos (Figura 1), definidos como elementos genéticos covalentemente fechados que se reproduzem de forma autônoma e tem existência extracromossomal, carregam genes que normalmente não são essenciais ao funcionamento celular porém, podem conferir, sob certas condições, características seletivas ao microrganismo que o hospeda (HARDY, 1981). Podem carrear genes que estimulam a produção de toxinas ou compostos inibitórios, genes que conferem resistência a metais pesados ou resistência à antibióticos. Muitos plasmídeos carregam genes que controlam o processos de conjugação (ACHTMAN *et al.*, 1971; ACHTMAN, 1973)

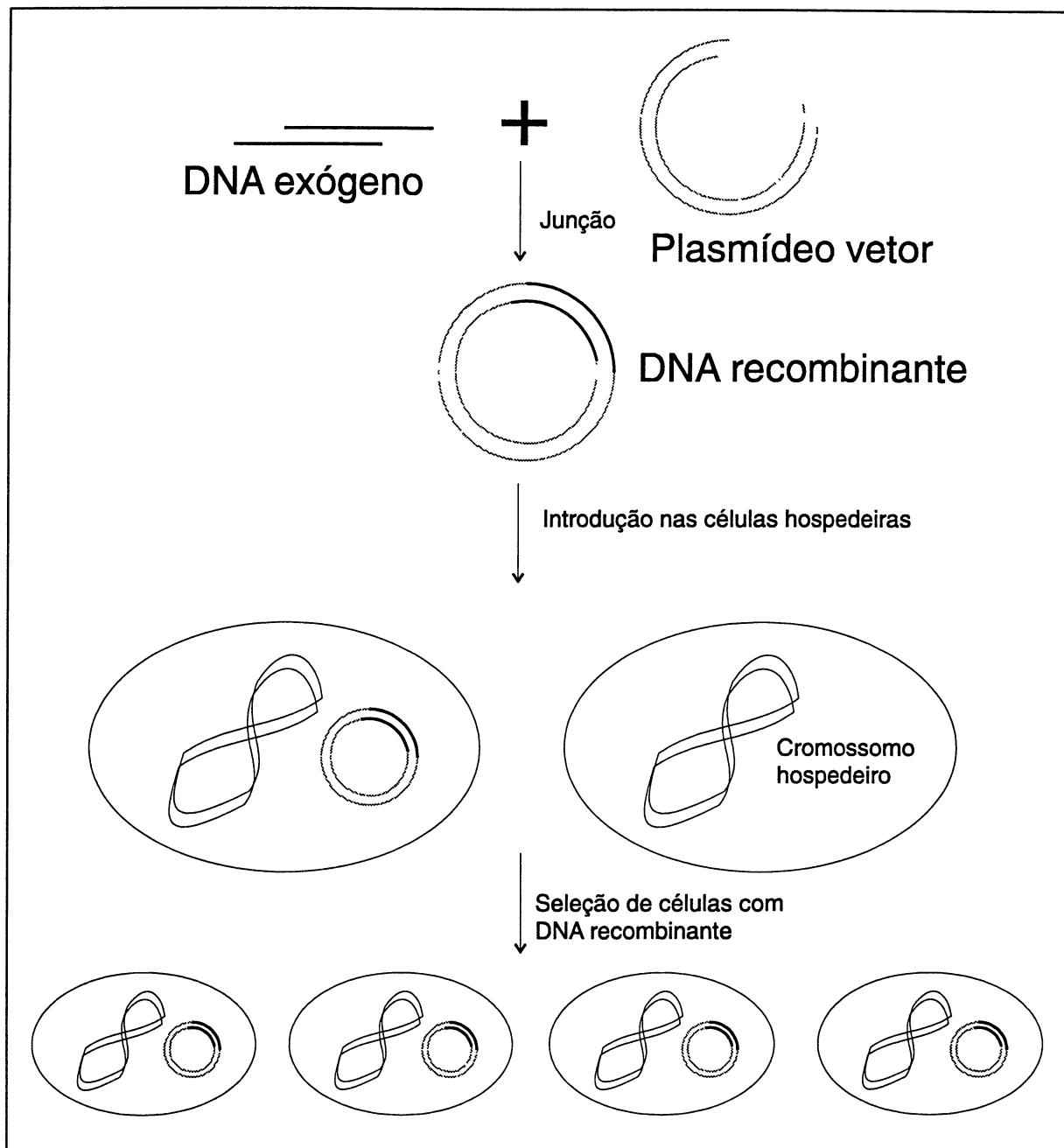


FIGURA 1 - Introdução de plasmídeos em células hospedeiras (STRYER, 1992)

1.2. RECOMBINAÇÃO GÊNICA EM MICRORGANISMOS:

Nos seres vivos em geral e, particularmente em microrganismos, processos de recombinação gênica são bastante conhecidos. Embora já fossem largamente utilizados em pesquisa básica, vem sendo atualmente considerados como fonte de variabilidade no melhoramento genético de espécies de interesse econômico (SOUZA & COSTA, 1987).

A informação genética de bactérias está estocada em um único cromossomo principal, que carrega aproximadamente mil genes e vários plasmídeos (BROCK & MADIGAN, 1991). Cada cromossomo bacteriano caracteriza-se por conter uma única molécula circular de DNA que se encontra em uma conformação altamente condensada *in vivo*. O evento da recombinação gênica associada à reprodução sexuada nos organismos superiores não constitui parte integrante do ciclo vital das bactérias. Bactérias dividem-se por fissão simples, com uma distribuição equitativa do seu material genético para as duas células descendentes.

Embora as bactérias não sejam dotadas dos mecanismos sexuais de reprodução, elas também apresentam grande variabilidade genética devido principalmente à acumulação de mutantes nas enormes populações alcançadas rapidamente através dos ciclos vitais curtos. Muitos grupos bacterianos apresentam mecanismos alternativos que levam à recombinação gênica, para compensarem a ausência de reprodução sexuada.

Há diferentes mecanismos que podem facultar a entrada do DNA exógeno. Quando a informação genética é introduzida em uma célula bacteriana deve primeiramente ser incorporada ao conjunto hereditário, depois poderá ser propagada como parte do mesmo, quando da divisão celular. Como acontece nos organismos superiores, esta incorporação é comumente acompanhada pela troca de DNA

homólogo, sendo que o gene que entra deve ter o seu parceiro no DNA receptor (HOLLIDAY, 1964; DRESSLER & POTTER, 1982; TAYLOR, 1992).

A descoberta de técnicas para transferir o material genético entre diferentes estirpes de *Escherichia coli* e entre *Escherichia coli* e outros gêneros de bactérias *in vitro*, como conjugação, transformação e transdução permitiu uma significativa expansão para o entendimento da Fisiologia e da Biologia Molecular destes organismos.

A expansão de conhecimentos sobre hospedeiros possibilitou estudos e construções de híbridos intergêneros que anteriormente não seriam disponíveis. Estes híbridos puderam ser utilizados para estudos fisiológicos e também para aprofundar o conhecimento dos mecanismos genéticos (GOLDENBERG, 1974).

Para a pesquisa aplicada, a engenharia genética, permitiu o desenvolvimento de culturas microbianas capazes de produzir substâncias como insulina humana, hormônios humanos de crescimento, “interferon”, vacinas e enzimas industriais. Além de tornar a Genética Molecular o campo mais dinâmico da Biologia, transformou-se na base da moderna biotecnologia.

1.3. TRANSFORMAÇÃO

A transformação foi o primeiro processo de transferência gênica descoberto em bactérias. Em 1926, CANTACUZE & BONCIU, descreveram-na ao trabalhar com o *Streptococcus* causador da escarlatina. Em 1928 foi publicado o clássico trabalho de Griffith sobre as transformações do *Streptococcus pneumoniae*. Desde então a transformação tem sido extensivamente estudada em vários microrganismos, dada sua importância como via de mudança genética, comparável à conjugação e à transdução.

A transformação é um fenômeno onde o DNA de uma linhagem bacteriana é liberado no meio ambiente e penetra nas células receptoras, podendo ser definida como um processo através do qual uma célula absorve DNA do meio (figura 2). Pode ser natural, que ocorre em apenas algumas bactérias (SMITH *et al.*, 1981), ou pode ser realizada com técnicas artificiais específicas. Quando a transformação é artificial pode ser provocada por agentes químicos, primeiramente descrita por MANDEL & HIGA, 1970, estudada e modificada posteriormente por BERGMANS *et al.*, 1981, JONES *et al.*, 1981, COURTOIS, 1988, MALLONEE & SPECKMAN, 1989, dentre outros. Atualmente emprega-se também um método físico, a eletroporação descrita primeiramente por ZIMMERMANN, 1982, e adaptada e/ou modificada por POTTER, 1988; DOWER *et al.*, 1988; MILLER *et al.*, 1988; VEHMAANPERÄ, 1989, dentre outros.

Em ambos os casos a transformação provocada depende do desenvolvimento de competência — tornar uma bactéria capaz de absorver e incorporar DNA livre em seu genoma significa torná-la competente. Aparentemente representa uma maneira de induzir ou desreprimir a síntese de proteínas necessárias ao processo de transformação (SMITH *et al.* 1981; AZEVEDO *et al.*, 1985).

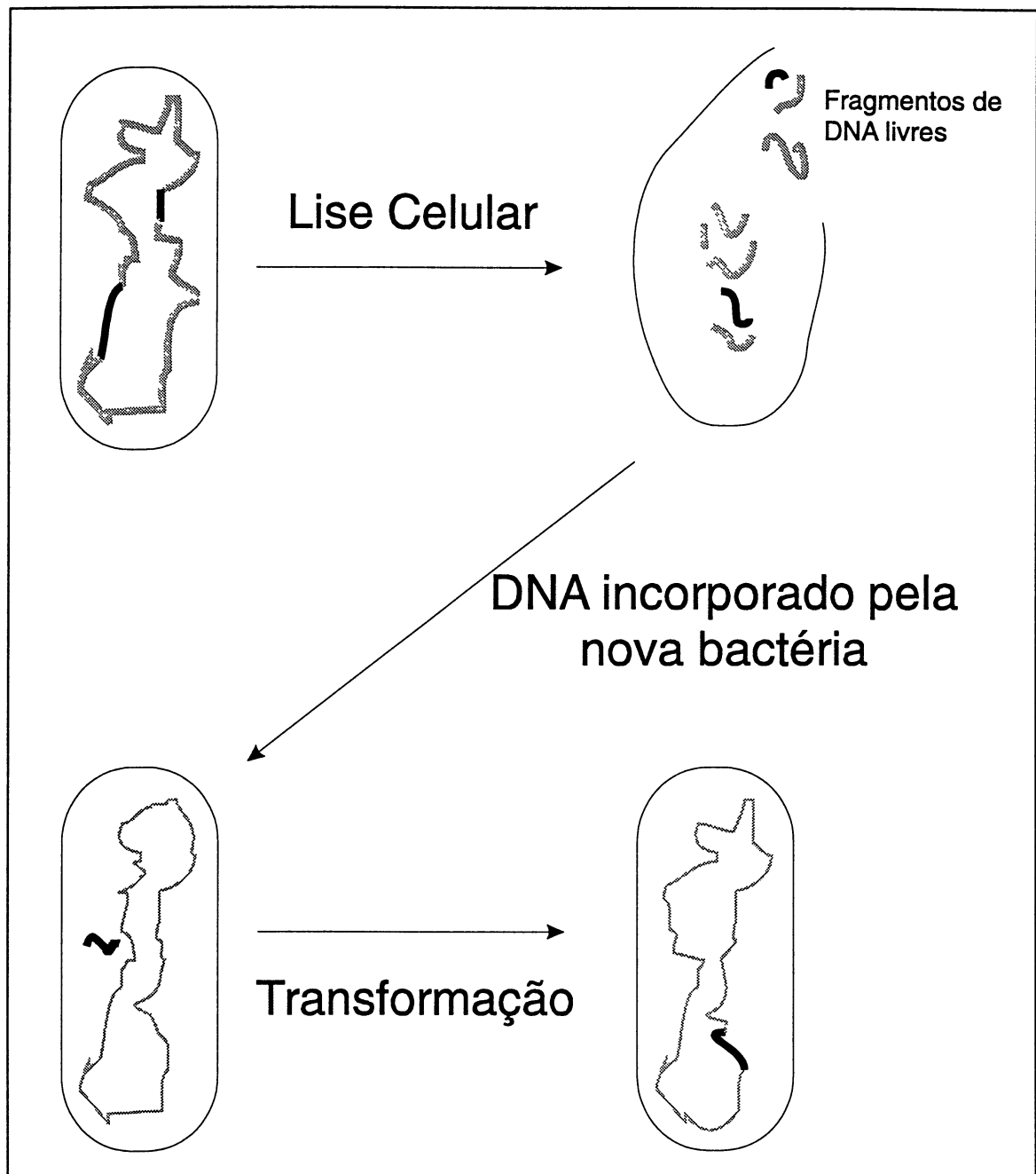


FIGURA 2 - Mecanismo de transformação bacteriana (COHEN & SPIRO, 1980)

Algumas bactérias são altamente competentes durante uma ou mais fases de crescimento, sob condições de laboratório, enquanto outras requerem tratamento especial para tanto. Existem ainda aquelas que parecem ser totalmente refratárias à transformação. SMITH *et al.* 1981; STEWARD & CARLSON, 1986 descreveram como portadoras naturais de competência um pequeno grupo de espécies bacterianas, como *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Bacillus subtilis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Azotobacter vinelandii*. No entanto muitas espécies não podem ser transformadas, por não serem conhecidos e estabelecidos os métodos pelos quais podem ser induzidas à competência (WIRTH *et al.*, 1989; IWASAKI, 1994). Estudos desenvolvidos com *Haemophilus* e *Neisseria* por Schaefer e por Jyssum, respectivamente enfocam a especificidade do mecanismo de reconhecimento, na superfície celular das bactérias, do seu próprio DNA (SMITH *et al.*, 1981). Desenvolver competência envolve proteínas que, provavelmente, estão comprometidas no reconhecimento de seqüências específicas de DNA. A indução de competência envolve mudanças na superfície celular onde um número de proteínas de membranas interna e externa são induzidas e onde normalmente também ocorre um estímulo à atividade de recombinação. Entretanto foi observado que apenas DNA homólogo é absorvido pelas células de *Haemophilus* e *Neisseria*, demonstrando portanto o alto grau de especificidade. O DNA estranho é pouco absorvido pela célula e não compete com o DNA homólogo na absorção (SMITH *et al.* 1981).

A ligação do DNA na superfície da membrana ocorre com grande rapidez e pode ser reversível ou irreversível. A ligação do DNA doador, quando de grande peso molecular, leva à sua fragmentação. Segundo SOUZA & COSTA, 1987, nesta fase as bactérias Gram negativas exigem alta especificidade, isto é, apenas DNA homólogos ligam-se assim.

Nesta etapa ocorre a conversão do DNA em uma forma resistente à nucleases e alguns autores a definem como "a fase de absorção do DNA". Esta

absorção é um processo absolutamente dependente de cálcio e da atividade da endonuclease I (AZEVEDO *et al.*, 1985).

MORRISON, 1979, sugere em seus estudos, que o DNA exógeno encontra-se protegido das nucleases por dois tipos de mecanismo, um deles similar ao existente em *Pneumococcus*, um complexo protetor como um periplasma e o outro, um isolante físico numa estrutura celular especial, formando como que vesículas inseridas nas estruturas da superfície da membrana. A integração e duplicação é efetuada pela recombinação entre o cromossomo da célula receptora e o fragmento de DNA recém chegado. Durante a integração uma das fitas do DNA do doador é incorporada ao cromossomo do hospedeiro, enquanto a outra é degradada e liberada ao meio (STEINNHART *et al.*, 1968). A segregação dos alelos doadores e receptores produz clones transformados com novos fenótipos.

Estes passos básicos podem apresentar variações entre as diferentes bactérias, devido aparentemente à utilização de diferentes mecanismos para a transformação, provavelmente, em função das diferenças fundamentais existentes nas estruturas celulares de membrana (STEINNHART *et al.*, 1968). Bactérias Gram negativas apresentam três camadas de membrana, uma membrana citoplasmática, uma fina parede celular composta por glicopeptídeos e uma outra membrana de composição única. Ainda não se encontra totalmente elucidado o fenômeno de penetração do DNA nestas paredes (STEINNHART *et al.*, 1968).

COHEN *et al.*, 1983, observaram em estudos realizados com *E. coli*, que transformações provocadas com DNA plasmidial, apresentam maior eficiência que as transformações provocadas utilizando-se de DNA cromossomal. Tratamentos químicos, com cálcio chegam a apresentar taxas de transformação próximas de 100%, o que sugere que os plasmídeos não são inativados na presença deste íon (OISHI *et al.*, 1972). Além disso, os plasmídeos possuem replicons, que os tornam auto-suficientes na fase de duplicação, anterior à sua propagação na população bacteriana modificada (OISHI *et al.*, 1972).

A eletroporação é um método de indução à competência, simplificado e de manuseio menos demorado, se comparado à competência induzida quimicamente. Também apresenta maior eficiência, frequências mais altas e alto grau de reprodutividade, possibilitando rápidas avaliações das condições variáveis impostas aos experimentos (POTTER, 1988; WIRTH *et al.*, 1987). Este processo vem sendo largamente utilizado para induzir competência e transformar várias espécies bacterianas que mostram-se refratárias aos métodos tradicionais de recombinação, sendo utilizada com sucesso para as bactérias Gram negativas (MAC NEIL, 1987).

ZIMMERMANN, 1982, desenvolveu o método experimental que gera poros na membrana celular através de pulsos elétricos, quando trabalhava com protoplastos de células de eucariotos. MAC NEIL, 1987, descreveu a introdução de DNA plasmidial em protoplastos de *Streptomyces lividans* por eletroporação. POTTER, 1988, modificou a metodologia utilizando-se de poucos pulsos de menor voltagem. NEUMANN *et al.*, 1988, também descreveu a utilização desta metodologia para experimentos com procariotos (POTTER, 1988). Estudos mostraram que a organização e as propriedades das membranas celulares podem ser alteradas por meio de diferença de potencial impostas às células (FIEDLER & WIRTH, 1988). Outras adaptações foram efetuadas dentre elas aquelas efetuadas por WIRTH *et al.*, 1989, HERMANS *et al.*, 1990, que permitem sugerir a eletroporação como metodologia alternativa para a transformação bacteriana sendo atualmente, uma técnica altamente promissora.

A técnica de eletroporação propriamente dita, utiliza descargas de alta voltagem de corrente elétrica para gerar alterações na membrana, desestabilizando-a, ionizando-a e tornando-a permeável de forma reversível (KNUTSON & YEE, 1987) induzindo um processo de ancoramento do DNA na superfície celular (Figura 3). As alterações transitórias da estrutura da parede celular e de suas membranas, que favorecem o ancoramento do DNA e sua transferência, ainda não encontram-se totalmente elucidados, mas supõe-se que a penetração ocorra por difusão livre através

dos poros, exercendo o controle sobre o rendimento da transformação (EYNARD *et al.*, 1992).

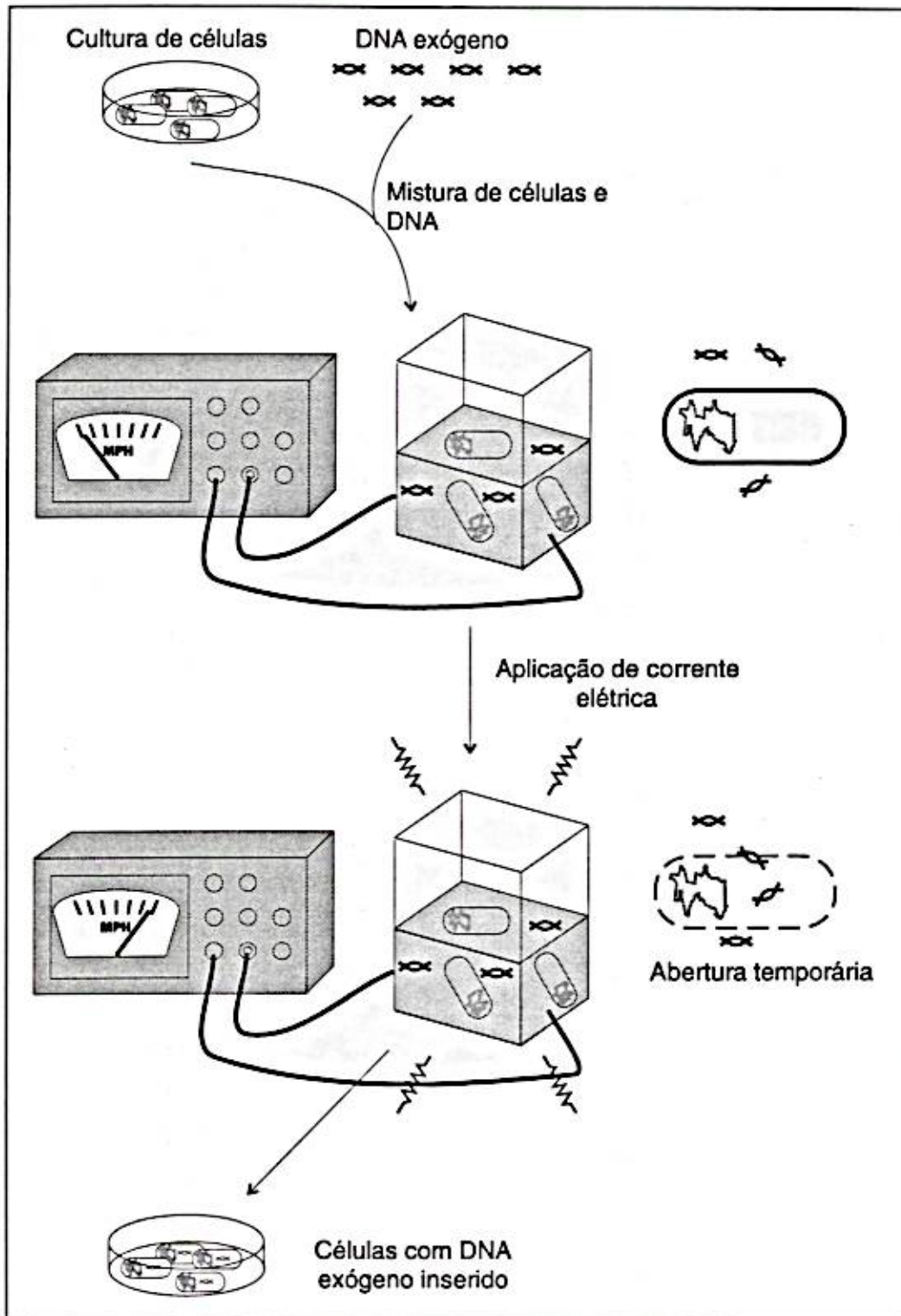


FIGURA 3 - Transformação bacteriana por eletroporação (Adaptado de WATSON, 1993, e STRYER, 1992)

1.4. CONJUGAÇÃO

Até o final da década de 30 não se conhecia a diferenciação sexual entre as bactérias. Em 1946, LEDERBERG & TANTUM, em trabalho com *Escherichia coli*, descobriram a conjugação bacteriana (SOUZA & COSTA, 1987). Desta data até a atualidade os estudos de conjugação vem sendo extensivamente aprofundados e revisados LOW, 1965; CURTISS, 1968 e 1969; ACHTMAN *et al.*, 1971 e 1977; EISENSTARK, 1977; WILLETS, 1980, SMITH *et al.* 1981.

Este processo envolve o contato físico entre as células que participam da troca de material genético através da conjugação e são classificadas em doadoras e receptoras. A diferenciação entre ambas está na presença ou na ausência do chamado Fator Fertilidade, ou Fator F, primeiramente estudado por HAYES em 1956, (ACHTMAN *et al.*, 1971). Uma bactéria é considerada doadora quando possui o Fator F, (F⁺), já as células que não possuem o Fator F, (F⁻), são reconhecidas como receptoras. O Fator F, que promove a transferência de DNA durante a conjugação (ACHTMAN *et al.*, 1971), é uma molécula de DNA com aproximadamente 100 kb, normalmente configurada como um círculo covalentemente fechado e com capacidade de se auto transferir, além de poder participar de transferências de DNA cromossomal (LOW, 1972). Pode ser transferido sob a forma de um plasmídeo livre ou como uma parte integrante do cromossoma bacteriano, um processo que converte células receptoras (F negativas) em células doadoras (F positivas). A troca de material genético ocorre apenas em um sentido, da célula doadora para a célula receptora (IPPEN-IHLER & MINKLEY, 1986).

O Fator F de *E. coli K12* é o mais bem estudado, tendo aproximadamente 60 dos seus genes mapeados e identificados. Com base nestes estudos WILLETS, 1972, afirma que este fator é portador de uma região, de aproximadamente 33 kb, denominada região de transferência ou região **tra**, a qual é

requerida durante os processos de conjugação (WILLETS, 1972; ACHTMAN, 1973). Com o advento da microscopia eletrônica foi evidenciado que bactérias com o Fator F (F⁺) possuem em sua superfície estruturas denominadas *pili*, que são codificadas por este Fator. De acordo com FROST (1984) *pili* são finos apêndices filamentosos que se originam em corpúsculos basais localizados na membrana citoplasmática, constituídos por uma proteína rígida, altamente hidrofóbica, cujo peso molecular está estimado entre 11.000 e 12.500, isenta de prolina, cisteína, arginina e histidina, acetilada em sua terminação amino (IPPEN-IHLER & MINKLEY, 1986). O gene *traA*, da região *tra*, é que codifica a maior subunidade protéica (*pillin*) dos F-*pili*, a qual ao ser polimerizada forma o *pilus* (IPPEN- IHLER & MINKLEY, 1986; ACHTMAN, 1973).

As bases moleculares da conjugação não estão totalmente elucidadas, porém é bastante claro que os F-*pili* são de absoluta necessidade para que ocorra troca genética por conjugação (CURTISS *et al.*, 1969). Como a maioria do DNA bacteriano encontra-se sob a forma circular, especula-se que uma endonuclease, a mesma que corta o círculo de DNA, é a responsável direta sobre o sinal de conjugação gerando o contato entre as células doadoras e receptoras (WILLETS, 1972).

A conjugação é iniciada quando a extremidade do F-*pilus* toca a superfície da célula receptora formando um canal através do qual ocorre a troca de material genético (WILLETS & SKURRAY, 1980). Presume-se que este canal seja formado pela justaposição de membranas de células doadoras e receptoras. O canal possui um poro que é capaz de acomodar o DNA que está sendo transferido. A extremidade do *pilus* aparentemente interage com um sítio específico de reconhecimento na superfície da célula receptora (EISENSTARK, 1977) (Figura 4) alguns autores sugerem que este processo parece iniciar por colisão ao acaso entre as duas células. Entretanto, AZEVEDO *et al.*, 1985, sugere a existência de uma quimiotaxia entre as células receptoras e doadoras, quando se encontram em baixas

concentrações na mistura de conjugação. Estudos anteriores sugerem que a membrana interna das células receptoras está envolvida neste processo, através da proteína TraS (ACHTMAN *et al.*, 1977).

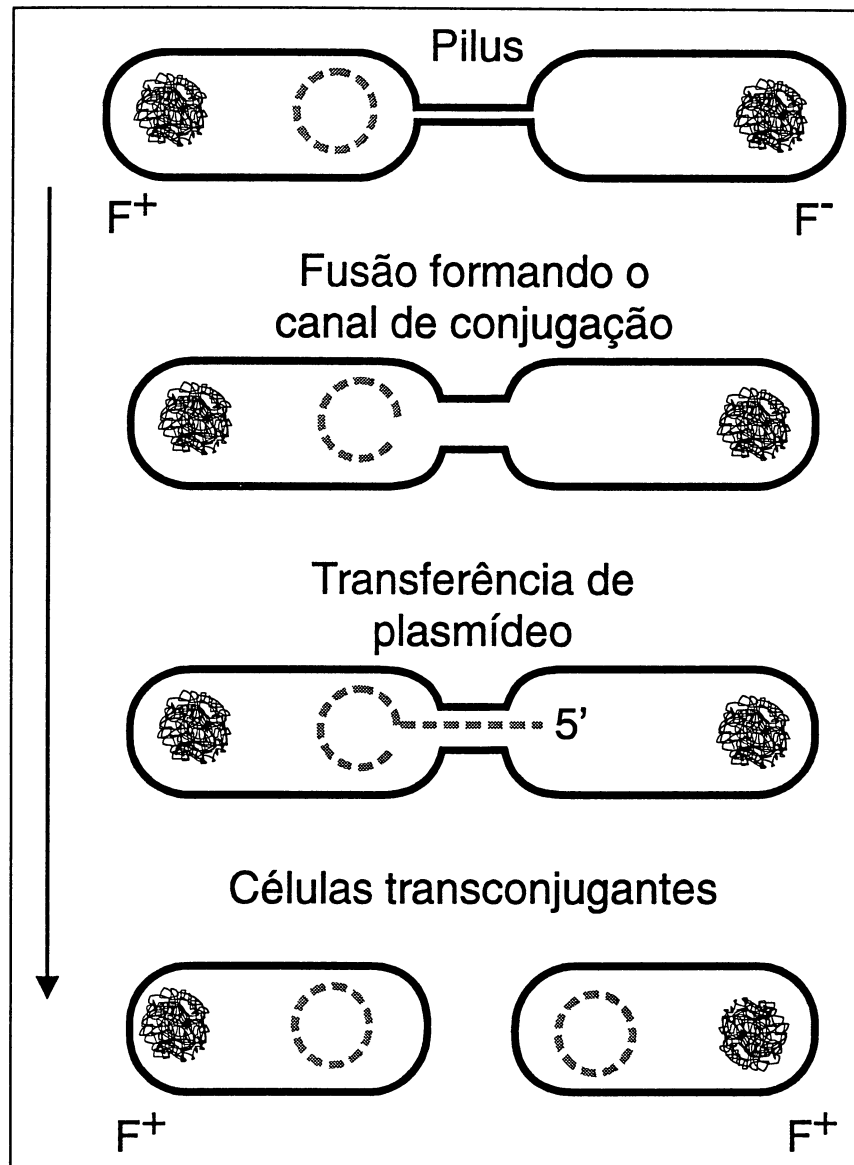


FIGURA 4 - Modelo dos prováveis eventos que ocorrem no contato célula-célula durante a conjugação bacteriana (Adaptado de BROCK & MADIGAN, 1991)

Segundo WILLETS, 1972, e FOLKHARD *et al.*, 1979, o mecanismo de transferência de DNA durante a conjugação ocorre com apenas uma das fitas, sendo a transferência iniciada pela extremidade 5' (WILLETS & WILKINS, 1984). Esta fita é transferida sob a forma de molécula linear e vai sendo replicada pela célula receptora (Figura 5).

Em caso de transferência de DNA plasmidial, esta se inicia em um local específico da molécula de DNA denominado *oriT* (WILLETS & WILKINS, 1984). A fita simples vai sendo duplicada, por complementaridade, na célula receptora. O mecanismo de recircularização do DNA plasmidial sugerido é de que as extremidades 5' e 3' ligam-se covalentemente pela ação da endonuclease Tra YZ, que também tem atividade de ligase, provocando a recircularização (WILLETS & WILKINS, 1984).

Plasmídeos que possuem o gene *tra*, como o plasmídeo R68.45 (HAAS & HOLLOWAY, 1976) são auto-transmissíveis entre as bactérias Gram negativas (THOMAS & SMITH, 1987; SMITH, 1991), apresentando altas frequências e participando das chamadas conjugações biparentais (HASS & HOLLOWAY, 1976). Os plasmídeos IncP-1, ou plasmídeos de incompatibilidade, são considerados ferramentas importantíssimas na genética bacteriana, por revelar habilidade de promover recombinações gênicas em bactérias Gram negativas, tendo sido utilizados em recombinações com *Pseudomonas* e *Azospirillum*, em trabalhos realizados por HASS & HOLLOWAY, 1976; FRANCHE *et al.*, 1981 respectivamente, em conjugações bem sucedidas.

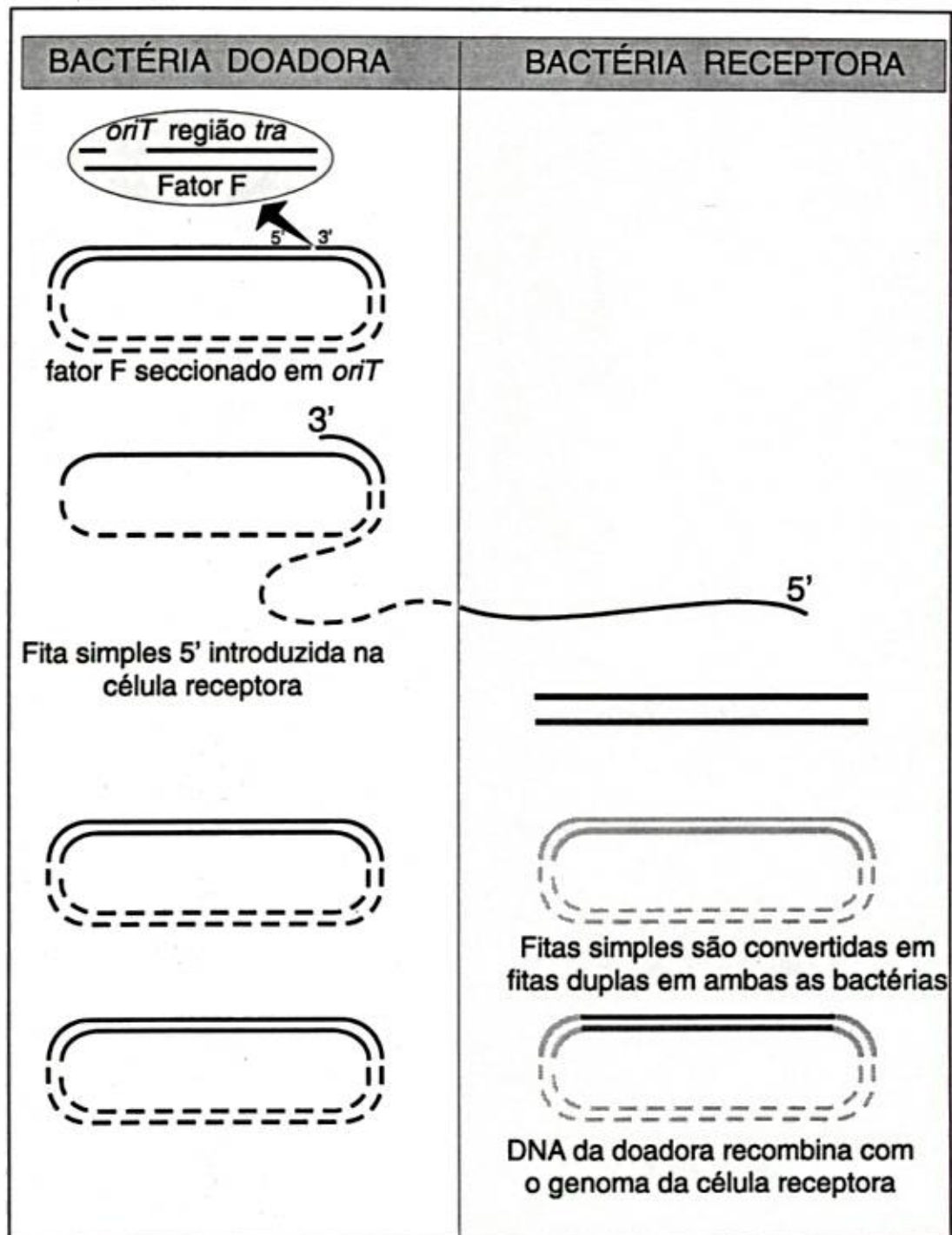


FIGURA 5 - Mecanismo de transferência de DNA durante a conjugação
(Adaptado de LEWIN, 1994)

Entretanto, alguns plasmídeos podem não ter a capacidade de promover a conjugação, mas serão transferidos por outro que possua esta capacidade e coabite com eles a mesma célula. É o que ocorre com os plasmídeos que não possuem o gene *tra*, como o plasmídeo pCK3 (KENNEDY & DRUMMOND, 1985), pLAFR3 (STASKAWICZ *et al.*, 1987) e pVK102 (KNAUF & NESTER, 1982) os quais necessitam da complementaridade de um plasmídeo mobilizador, como o pRK2013 (FIGURSKI & HELINSKI, 1979), para participarem de eventos de conjugação. Por este motivo, tais eventos são denominados conjugações triparentais ou conjugações de plasmídeos mobilizáveis (DITTA *et al.*, 1980; HARDY, 1981; WINNACKER, 1987; DURLAND, 1990; YEO & LIVERMORE, 1994).

De acordo com BERG, 1975, *in vitro* várias barreiras físicas, químicas ou biológicas podem impedir, ou diminuir, a transferência gênica, ou também diminuir sua eficiência:

- condições de cultivo das bactérias participantes.
- distância evolutiva.
- distância taxonômica.
- incompatibilidade.

Estes fatores têm levado diversos autores (DE LUCIA & CAIRNS, 1969; BOTSTEIN & SHORTLE, 1985; SMITH, 1985 dentre outros), a estudar e modificar as condições técnicas destes processos de transferência de material genético entre diversas espécies bacterianas com a finalidade de torná-las mais eficientes.

1.5. *Herbaspirillum seropedicae*

As bactérias do gênero *Herbaspirillum* foram inicialmente descritas como uma nova espécie de *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1984) dentro da família *Spirillaceae* no gênero *Azospirillum*. Esta classificação baseou-se no conteúdo de 67% de G+C, em seu DNA, que é pouco menor que o do *Azospirillum* (BALDANI *et al.*, 1986). Entretanto estudos de hibridização rRNA/DNA revelaram menos que 25% de homologia entre *Herbaspirillum* e *Azospirillum* (FALK *et al.*, 1986). Novos estudos de hibridização rRNA/DNA e DNA/DNA apontaram para um alto grau de homologia entre *Herbaspirillum* e *Pseudomonas rubrisubalbicans* (GILLIS *et al.*, 1991). Com os avanços dos estudos de taxonomia *Pseudomonas rubrisubalbicans* foi incluída no gênero *Herbaspirillum*, sob a denominação de *Herbaspirillum rubrisubalbicans* — ATCC 19308 — (GOOR *et al.*, 1986) e também a distribuição ecológica do *Herbaspirillum* foi revisada (BALDANI *et al.*, 1992).

Segundo BALDANI *et al.*, 1986, bactérias do gênero *Herbaspirillum* são Gram negativas, geralmente vibrióides, algumas vezes helicoidais, que apresentam de um a três flagelos distribuídos em um dos polos, ou divididos entre ambos. As células apresentam um diâmetro 0,6 - 0,7 μm e o tamanho celular, variando com o meio de crescimento, de 1,5 a 5,0 μm . São móveis e crescem com formação de película, em meio semi sólido isento de nitrogênio fixado, demonstrando atividade de nitrogenase. É uma bactéria diazotrófica, ou seja, capaz de utilizar N_2 atmosférico como única fonte de nitrogênio sob condições de microaerobicidade (BALDANI *et al.* 1986).

Este microrganismo foi inicialmente isolado da rizosfera e da superfície de raízes de arroz, milho e sorgo (BALDANI *et al.*, 1984) e posteriormente encontradas em colmos e folhas de arroz e cana de açúcar, além de raízes de plantas daninhas que acompanham a cultura da cana de açúcar (PIMENTEL, 1991). Estudos

recentes mostraram que *H. seropedicae* se encontra em diversas regiões do Brasil (BALDANI, 1994) e que o microrganismo não sobrevive em solos mantidos sem cultivo e livres de raízes, (BALDANI *et al.*, 1992; DÖBEREINER, 1992). Análises de sementes de arroz sob a microscopia eletrônica acusaram a presença de *H. seropedicae* como agente endofítico. A bactéria forma inúmeras microfibrilas na superfície da raiz e infecta o tecido vascular. Em folíolos de sorgo, o *H. seropedicae* incide no metaxilema e proxilema (OLIVARES *et al.*, 1993; DÖBEREINER, 1992).

A importância atribuída ao gênero *Herbaspirillum* deve-se ao seu potencial como bactéria fixadora de nitrogênio, capaz de se associar a raízes de gramíneas de interesse agrícola (DÖBEREINER & PEDROSA, 1987; DÖBEREINER 1991) o que torna a bactéria um biofertilizante em potencial. Por este motivo, estudos detalhados da fisiologia e da genética de fixação de nitrogênio em *Herbaspirillum* tem sido desenvolvidos. Neste sentido PEREIRA *et al.*, 1989, observaram que a inoculação de *H. seropedicae* em cultivos de sorgo e arroz não produz qualquer efeito sobre o crescimento das plantas, entretanto puderam comprovar o aumento da taxa de germinação das sementes. MATHIAS *et al.*, 1989, determinaram em *H. seropedicae* a via metabólica da L-arabinose a qual é convertida a α -cetoglutarato. Foram então encontradas as enzimas chaves deste metabolismo nas estirpes Z78, Z67, ZA69, ZA95, ZM136 e Z152.

Além destes, estudos dos genes reguladores da fixação de nitrogênio vem sendo desenvolvidos, como os de PEDROSA *et al.*, 1989 que através de complementação da estirpe *nifA*⁻ (FP10) de *Azospirillum brasilense* com um plasmídeo recombinante contendo um fragmento de DNA de *H. seropedicae* Z78 obtiveram resultados que permitiram sugerir a presença do gene *nifA* neste microrganismo. Posteriormente, SOUZA, 1990 demonstrou que este gene era estrutural, funcionalmente semelhante ao gene *nifA* de *Klebsiella pneumoniae* e *Azospirillum brasilense* respectivamente. TEIXEIRA, 1992 clonou e caracterizou os genes *glnA* e *ntrBC* desta mesma estirpe de *H. seropedicae*, revelando que a

organização destes genes é contígua, como observado em *Klebsiella pneumoniae* e *Azotobacter vinelandii*. Estudos utilizando promotores dos genes *nifA* e *nifB* tem revelado que a proteína NifA de *H. seropedicae* é estável a temperatura de 37°C, ao contrário do observado em *Klebsiella pneumoniae* (SOUZA *et al.*, 1994). Os genes *nifHDK* de *Herbaspirillum seropedicae* Z78 foram isolados por hibridização utilizando como sondas os genes *nifHDK* de *Azospirillum brasilense*, (MACHADO *et al.*, 1994). Seguindo-se a caracterização e seqüenciamento destes genes (MACHADO *et al.*, 1995). Foi isolado e caracterizado um gene estruturalmente homólogo ao gene *recA* de *E. coli* em *H. seropedicae* além de ter sido caracterizado um sistema de reparo e recombinação, neste microrganismo (STEFFENS, 1994). KLASSEN, 1994 determinou as condições ideais para a expressão da atividade da nitrogenase em *H. seropedicae*, em meio líquido e com fontes alternativas de carbono e nitrogênio.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo estabelecer condições adequadas para a conjugação e eletrotransformação de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78, Z152 e ZA95.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3. MATERIAIS E MÉTODOS:

3.1. REAGENTES QUÍMICOS:

Agarose foi adquirida de Pharmacia. Fenol e etanol foram adquiridos de E. Merck. SDS, antibióticos, Ficoll, Tris base e RNase foram adquiridos de Sigma Chemical Company. Os demais reagentes utilizados foram provenientes de diversas fontes, apresentavam padrão pró-análise ou eram da mais alta qualidade disponível.

3.2. MÉTODOS GERAIS:

As leituras espectrofotométricas foram realizadas em espectrofotômetro "Ultrospec III" GNA 100 ¹. O manuseio do material esterilizado e dos microrganismos foi procedido em fluxo laminar. Todas as soluções foram preparadas com água destilada, ou ultrapura. Quando possível as soluções eram esterilizadas por autoclavação (1 atmosfera, 20 minutos) e quando a autoclavação não era indicada a esterilização processou-se por filtração em filtro Millipore HAWP 0,45 μ . As centrifugações de pequenos volumes foram procedidas em microcentrífuga Spin I (7.245 x g); os grandes volumes foram centrifugados em centrífuga HITACHI, rotor R-24A.

3.3. MICRORGANISMOS E PLASMÍDEOS:

As estirpes bacterianas e os plasmídeos utilizados neste trabalho estão listados nos Quadros I e II, respectivamente, juntamente com a fonte de origem ou referência.

¹ Pharmacia LKB

As amostras originais eram da bacterioteca do Laboratório de Fixação de Nitrogênio e Biologia Molecular do Departamento de Bioquímica da UFPR. Estas amostras encontravam-se estocadas em solução de glicerol 50%, a -20 °C.

QUADRO I - BACTÉRIAS

Estirpes	Genótipo / Fenótipo revelante	Fonte, Referência
<i>Herbaspirillum seropedicae</i>		
Z78, ATCC 35893	Nif ⁺ NaI ^R	Baldani, 1986; Scarpim, 1994
ZA95	Nif ⁺ NaI ^R	Baldani, 1986
Z152, ATCC 35894	Nif ⁺ NaI ^R	Baldani, 1986; Scarpim, 1994
<i>Escherichia coli</i>		
HB 101	Sm ^R F ⁻ <u>recA</u> ₁₃ <u>proA</u> ₂ <u>pro met hsd520</u>	Boyer & Roullard-Dussoix, 1969
S 17.1	<u>tra</u> ⁺ Sm ^R <u>recA</u> ⁻ Km:: <u>Tn7</u>	Simon <i>et al.</i> , 1983
MC 1061	Sm ^R <u>tra</u> ⁻ <u>mob</u> ⁻ <u>recA</u> ⁺	Casadaban & Cohen, 1980
1230	<u>pro met recA</u> ⁻	Johnston, 1977

QUADRO II - PLASMÍDEOS

Plasmídeos	Genótipo/Fenótipo relevante	Fonte, Referência
pCK3	<i>Klebsiella pneumoniae</i> nif A IncP-1 Tc ^R Km ^R 27 kb	Kennedy & Drummond, 1985
pLAFR3	IncP-1 Tc ^R cos 22kb	Staskawicz et al., 1987
R68.45	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁺ IncP-1 Km ^R Tc ^R Cb ^R 60kb	Haas & Holloway, 1978
pRK2013	<i>tra</i> ⁺ <i>mob</i> ⁺ Km ^R	Figurski & Helinski, 1982
pBMR5	IncP-1 pLAFR3:: <i>recA</i> de <i>H.seropedicae</i> Z78 Tc ^R 47,4kb	Steffens, 1994
pVK102	IncP-1 Tc ^R Km ^R 23kb	Knauf & Nester, 1982

3.4. ANTIBIÓTICOS:

As soluções estoque dos antibióticos utilizados foram preparadas conforme descrito por SAMBROOK e colaboradores, 1989. A solução estoque de Ácido nalidíxico - Nal - (10mg. mL^{-1}) foi preparada em água destilada, neutralizada com NaOH 1N, obtendo-se desta forma sua completa solubilização. As soluções de Canamicina - Km - (50mg.mL^{-1}) e estreptomicina - Sm - (50 mg.mL^{-1}) foram preparadas em água destilada. As soluções dos antibióticos Nal, Sm, e Km foram previamente esterilizadas por filtração, com a utilização de filtro Millipore HAWP $0,45\ \mu$. A solução estoque de tetraciclina - Tc - (10mg.mL^{-1}) foi preparada em álcool 95%. Os antibióticos e suas respectivas soluções foram conservadas à $-20\ ^\circ\text{C}$.

Os antibióticos foram adicionados aos meios de cultura nas seguintes concentrações:

- Ácido Nalidíxico ($10\mu\text{g. mL}^{-1}$), para *H. seropedicae*.
 - Estreptomicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$), para *E. coli* HB101, MC1061, S17.1 quando hospedavam os plasmídeos pBMR5.
 - Tetraciclina ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) para bactérias hospedeiras dos plasmídeos pLAFR3, pCK3.
 - Tetraciclina ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) associada a Canamicina ($50\mu\text{g.mL}^{-1}$), para bactérias hospedeiras dos plasmídeos R68.45 e pVK102.
-

3.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO:

3.5.1 CONDIÇÕES GERAIS:

O crescimento dos microrganismos em meio líquido apropriado ocorreu usualmente à 30°C, em frascos tipo penicilina, com incubação em agitador rotatório a 120 rpm por períodos de tempo indicados em cada ensaio. Em todas os cultivos foi mantida a relação de 1:5 entre o volume de meio e o volume total do frasco empregado, visando com isto garantir a mesma aeração durante o crescimento dos microrganismos.

As culturas em meios sólidos foram realizadas em placas de Petri, com 20 mL de meio, incubadas estaticamente em estufa à temperatura de 30°C por períodos de tempo indicados em cada ensaio.

3.5.2. MEIOS DE CULTURA:

Os meios de cultura utilizados neste trabalho foram:

- **Luria Bertani (LB)** (SAMBROOK *et al.*, 1989)
- **Luria Agar (LA)** (SAMBROOK *et al.*, 1989)
- **Nitrogen Fixation broth High Phosphate (NFbHP)**, adicionado de NH_4Cl_2 como fonte de nitrogênio, e lactato como fonte de carbono (PEDROSA & YATES, 1984).
- **S.O.B.** (SAMBROOK *et al.*, 1989)
- **S.O.C.** (HANAHAN, 1983)

Os meios de cultura acima listados apresentam suas composições definidas nos quadros III, IV, e V respectivamente.

O meio **LB** utilizado no crescimento de *Escherichia coli* apresenta a composição descrita no quadro III.

QUADRO III - COMPOSIÇÃO DO MEIO LB

Componente	Quantidade (g.L ⁻¹)
Triptona	10
Extrato de levedura	5
NaCl	10
Água destilada qsp 1 L.	

O pH do meio foi ajustado com NaOH 2N para 7,5 .

O meio **LA** (SAMBROOK *et al.*, 1989) tem em sua composição os componentes do meio **LB** (quadro III), porém é acrescido de ágar (12g.L⁻¹).

O meio **NFbHP** (PEDROSA & YATES, 1984) para o crescimento de *H. seropedicae*, apresenta a composição descrita no quadro IV.

QUADRO IV - COMPOSIÇÃO DO MEIO NFbHPN

Componente	Quantidade (g.L ⁻¹)
KH ₂ PO ₄ *	4,0
K ₂ HPO ₄ *	6,0
MgSO ₄ .7H ₂ O	0,2
NaCl	0,1
CaCl ₂	2,0.10 ⁻²
Ácido nitrilo triacético	5,6.10 ⁻²
FeSO ₄ .7H ₂ O	2,0.10 ⁻²
Biotina	1,0.10 ⁻⁴
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	2,0.10 ⁻³
MnSO ₄ .H ₂ O	2,4.10 ⁻³
H ₃ BO ₃	2,8.10 ⁻³
CuSO ₄ .5H ₂ O	8,0.10 ⁻⁵
ZnSO ₄ .7 H ₂ O	2,4.10 ⁻⁴
Lactato de sódio	5,0
Água ultrapura qsp 1L	

Como fonte de nitrogênio foram utilizados usualmente 20 mM de NH₄Cl adicionados à composição acima. As soluções de fosfatos (*) e cloreto de amônio foram preparadas separadamente e adicionadas ao meio, no momento de uso, passando o meio a ser denominado meio NFbHPN. O meio apresenta um pH final de 6,8 .

O meio NFbHPN sólido tem a mesma composição, porém é acrescido de ágar na concentração de 12g.L^{-1} .

Meio S.O.B. (SAMBROOK *et al*, 1989) para o crescimento de microrganismos utilizados em experimentos de transformação por eletroporação, apresenta a composição descrita no quadro V.

QUADRO V - COMPOSIÇÃO DO MEIO S.O.B.

Componente	Quantidade (g.L^{-1})
Triptona	20,0
Extrato de levedura	5,0
Cloreto de Sódio	0,584
Cloreto de Potássio	0,186
Água destilada ou deionizada qsp 1 L.	

O pH final do meio é ajustado para o valor 7,0 com solução de NaOH 2N.

O meio de expressão para bactérias eletroporadas, S.O.C. (HANAHAN, 1983), é obtido pela adição de 1 mL de solução 2M de Cloreto de Magnésio e de 1 mL de solução 2M de Glucose, à 98 mL de meio S.O.B.

Todos os meios foram esterilizados em autoclave à 120°C e a 1 atmosfera de pressão, por 20 minutos.

3.5.3. PREPARO DO PRÉ-INÓCULO:

Uma alíquota (entre 100 e 150 μL) da suspensão de bactérias estocadas em solução de glicerol 50%, foi inoculada em 10 mL de meio de cultura líquido. O meio utilizado para o crescimento de cada microrganismo teve sua composição adequada a este, tendo sido utilizados:

Meio NFbHPN, para o crescimento das estirpes de *H. seropedicae*.

Meio LB para o crescimento de culturas de *E. coli*.

As culturas, foram incubadas em 10 mL de meio apropriado contido em frasco tipo penicilina, com capacidade de 50mL, à temperatura de 30°C, em agitador rotatório - 120 rpm - até atingirem a fase de saturação (D.O. 550 nm aproximadamente 2,0), e passaram a constituir o pré-inóculo.

Alíquotas (100 μL) de pré-inóculo (item 3.5.3.) foram transferidas assepticamente para frascos idênticos aos utilizados anteriormente, com 10 mL de meio adequado a cada microrganismo, acrescido do(s) antibiótico(s) apropriado(s) (item 3.4.). Estas culturas foram mantidas sob as condições gerais de cultivo (item 3.5.). A incubação das culturas foi efetuada por períodos de tempo variáveis, segundo a necessidade do experimento.

3.5.4. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES de *H. seropedicae*:

Culturas de *H. seropedicae* foram realizadas em meio líquido ou sólido NFbHPN quando se destinava a experimentos de conjugação. Os cultivos foram mantidos sob condições gerais (item 3.5.) até atingirem as

Densidades Óticas (D.O.) indicadas em cada experimento. Ao meio foi adicionado NaI ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$) quando indicado. O meio de cultura utilizado no cultivo das estirpes de *H. seropedicae*, cultivo em grande escala para preparo das células para experimentos de eletroporação (item 3.13.1) foi o meio S.O.B.. As condições de crescimento encontram-se descritas no item 3.5.. *H. seropedicae* foi incubado em meio S.O.C. (Item 3.5.2.), nos períodos de recuperação pós eletroporação (item 3.13.). As condições de cultivo encontram-se descritas no item 3.5.

3.5.5. CONDIÇÕES DE CULTIVO DAS ESTIRPES DE *E. coli*:

As estirpes de *E. coli* foram cultivadas em meio LB nas condições gerais de cultivo (item 3.5.), adicionados de antibióticos adequados a cada estirpe e plasmídeo em estudo (item 3.4.), até atingirem a fase de saturação ($\text{D.O. } 550_{\text{nm}} \cong 2,0$) salvo indicações contrárias.

3.6. CONSERVAÇÃO DOS MICRORGANISMOS:

Os microrganismos foram cultivados em placas contendo meio sólido, adequado para cada estirpe (item 3.5.2.). As placas foram incubadas em estufa à 30°C por períodos de tempo que variaram segundo as necessidades de cada microrganismo em estudo. A seguir, estas placas foram estocadas em geladeira à 4°C e mantidas viáveis através de transferências bimestrais.

As colônias, identificadas na placa mestra, foram repicadas para o meio líquido adequado a cada microrganismo, incubadas por 16-18 horas sob agitação rotatória (120 rpm), à 30°C. Este material foi então concentrado por centrifugação, e o precipitado foi posteriormente ressuspensão em solução de glicerol 50 % , numa proporção de 2:1 (v/v inóculo: glicerol) para ser estocado à -20°C.

3.7. CURVA DE CRESCIMENTO DE *H. seropedicae*:

Para determinar o crescimento bacteriano em função do tempo, utilizou-se *H. seropedicae* Z78 cultivado em NFbHPN. O experimento foi conduzido segundo MILLER, 1972. As bactérias foram cultivadas em meio líquido NFbHPN até a fase de saturação, (D.O.550 nm \equiv 2,0). Uma alíquota de 2,5 mL desta cultura foi inoculada em 250mL do mesmo meio e homogeneizado manualmente por movimentos rotatórios. Este volume foi fracionado, sendo distribuído em 25 frascos mantendo a proporção necessária para a aeração ideal. Estas culturas foram incubadas à 30°C, em agitador rotatório - 120 rpm - e seu desenvolvimento foi acompanhado pelo aumento de turbidez, monitorado a cada hora, com leituras espectrofotométricas no comprimento de onda de 550 nm.

3.8. DETERMINAÇÃO DO TEMPO DE GERAÇÃO.

Com os dados obtidos na curva de crescimento (item 3.7.) partiu-se para a determinação do tempo de duplicação (t_d) com auxílio da equação (MILLER, 1972):

$$t_d = \frac{0.3 \cdot (t_2 - t_1)}{\log N_2 - \log N_1}$$

onde N_2 e N_1 correspondem ao número de bactérias presentes nos tempos t_2 e t_1 , respectivamente.

Os valores de N_2 e N_1 foram substituídos pelo valor das densidades ópticas a 550 nm das culturas bacterianas nos respectivos tempos t_1 e t_2 .

3.9. CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS:

O número de células bacterianas viáveis nos diversos experimentos, foi determinado através de contagem de colônias nas culturas em meio sólido específico (item 3.5.2.). O inóculo foi previamente diluído (10^{-1} - 10^{-16}), 100 μ L da diluição adequada foram espalhados sobre o meio de cultura sólido apropriado, contendo o antibiótico requerido por cada microrganismo. Estas culturas foram incubadas em estufa à 30°C por 16-72 horas e posteriormente foram submetidas a contagem de colônias. O número de células formadoras de colônias por unidade de volume (mL) foi determinado, multiplicando-se o número de colônias de cada placa pelo fator de diluição (MILLER, 1972).

3.10. RELAÇÃO ENTRE A D.O. DAS CULTURAS DE DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* E O NÚMERO DE CÉLULAS VIÁVEIS:

As diferentes estirpes de *H. seropedicae* foram cultivadas em meio líquido, NFbHPN nas condições gerais de cultivo (item 3.5.4.). Em tempos variados da fase logarítmica de crescimento, foram retiradas alíquotas (1 mL) as quais tiveram sua D.O._{550nm} determinada em espectrofotômetro. Paralelamente, foi determinado o número de células viáveis por mililitro de cultura, através de plaqueamento das diluições adequadas (10^{-1} - 10^{-12}) de cada cultura em meio NFbHPN sólido, adicionado de NaI¹⁰ (item 3.4.). Essas placas foram incubadas em estufa, à 30°C, por um período de 16-18 horas. Após este período foi determinado o número de células viáveis, através da contagem das colônias.

3.11. CONJUGAÇÃO BACTERIANA:

As conjugações biparentais ou triparentais, interespecíficas, para transferência de plasmídeos foram realizadas segundo proposto por PEDROSA & YATES, 1984 - roteiro técnico básico (3.11.1) - ou como proposto nas modificações introduzidas neste trabalho - protocolo alternativo (3.11.2).

3.11.1. ROTEIRO TÉCNICO BÁSICO

H. seropedicae foi cultivado em meio NFbHPN- NaI¹⁰ e *E. coli* em meio L.B. até fase de saturação sob as condições do item 3.5.1., a partir de inóculo apropriado. O meio L.B. foi adicionado dos antibióticos para os quais os plasmídeos de interesse conferem resistência à bactéria hospedeira, visando

selecionar o microrganismo e também intensificar a expressão da marca do plasmídeo.

Um mililitro de cultura de cada microrganismo foi centrifugado em microcentrífuga ($7.245 \times g$), durante 1 minuto e o precipitado foi ressuspensão em igual volume de meio, para lavagem das células e eliminação dos antibióticos presentes nos meios de cultura nesta etapa do ensaio. A partir da suspensão celular assim obtida foram tomadas alíquotas, para compor a mistura de conjugação na proporção de 10 partes de *H. seropedicae* e 1 parte de *E. coli*. A mistura de conjugação foi incubada em placa mista, NFbHPN:L.A. na proporção de 1:1, sob a forma de gota espessa, em estufa à 30°C, durante 18-20 horas. A massa bacteriana assim obtida foi coletada através de raspagens, ressuspensa em 1mL de meio líquido NFbHPN, diluída em série (10^{-1} - 10^{-10}) e alíquotas de 100 μ L foram uniformemente distribuídas sobre placas contendo meio seletivo apropriado:

- Meio seletivo para transconjugantes:
NFbHPN-Nal ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$)
acrescido do antibiótico específico para o plasmídeo testado em cada experimento.
- Meio seletivo para o doador:L.A. com o antibiótico apropriado à seleção do doador e do plasmídeo que hospeda.
- Meio seletivo para receptor: NFbHPN adicionado de Nal ($10\mu\text{g.mL}^{-1}$).

O cultivo bacteriano processou-se sob as condições descritas no item 3.5.1. Colônias resistentes aos dois antibióticos, desenvolvidas no meio dito **seletivo para transconjugantes** foram coletadas, os plasmídeos foram

isolados e purificados (SAMBROOK, 1989; ROBSON 1984; KADO & LIU, 1981) (item 3.16.). Após confirmação da presença do plasmídeo nos transconjugantes, através de análise eletroforética em gel de agarose item 3.18., as culturas foram estocadas em **placa mestra**. Desta placa mestra as colônias foram inoculadas em meio seletivo líquido, cultivadas sob as condições descritas no item 3.5., até a fase estacionária e posteriormente estocadas em glicerol 50% para manutenção a -20°C.

Doador e receptor compuseram a mistura de conjugação em caso de conjugação biparental. Em se tratando de conjugação triparental, doador, mobilizador e receptor foram os componentes da mistura de conjugação nas proporções indicadas.

3.11.2. ROTEIRO TÉCNICO ALTERNATIVO PARA DETERMINAÇÃO DAS CONDIÇÕES ÓTIMAS PARA A CONJUGAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae*.

Nestes experimentos vários parâmetros que podem interferir na conjugação bacteriana de *H. seropedicae* foram investigados, visando o aumento do número de transconjugantes. Com esta finalidade foram realizados ensaios com modificações graduais no roteiro técnico básico. Para a otimização dos parâmetros de conjugação foram utilizadas as estirpes Z78 e Z152 de *H. seropedicae*. *Escherichia coli* 1230 foi a bactéria doadora do plasmídeo R68.45.

As transferências do plasmídeo autotransmissível R68.45 (*tra⁺mob⁺*) foram realizadas misturando-se a cultura de *E. coli* 1230(R68.45) com a cultura do receptor *H. seropedicae* Z78 ou Z152 (conjugação biparental).

Nesta etapa procurou-se adaptar o protocolo básico através de variação dos seguintes parâmetros:

- Condições de preparo da mistura de conjugação sobre a frequência de transconjugantes.
- Tempo de pré-incubação da mistura de conjugação sobre a frequência de transconjugantes.
- Fase de crescimento (D.O.) dos inóculos das bactérias componentes da mistura de conjugação, sobre a frequência de transconjugantes.
- Composição do meio misto de conjugação, sobre a frequência de transconjugantes.
- Proporção de doadores na mistura de conjugação.

Em todos os ensaios, desenvolvidos no sentido de adaptar o protocolo básico ao *H. seropedicae*, foi adotada a utilização de uma membrana de nitrocelulose, como suporte para a mistura de conjugação, sobre o meio misto. Esta membrana com superfície de aproximadamente 1,0 cm², era previamente esterilizada por autoclavação e depositada sobre o meio misto NFbHPN:L.A., servindo de suporte para a conjugação propriamente dita. Foram realizados experimentos de conjugação onde 0,1 mL da mistura de conjugação foi depositada, sob a forma de gota espessa, sobre a membrana de nitrocelulose. Após a incubação em estufa por 16-18 horas, a massa bacteriana desenvolvida sobre esta membrana foi ressuspensa em 1 mL de NFbHPN por agitação manual e em seguida centrifugada (7.245 x g) por um minuto. Culturas de *H. seropedicae* e *E. coli* foram crescidas nas condições descritas no

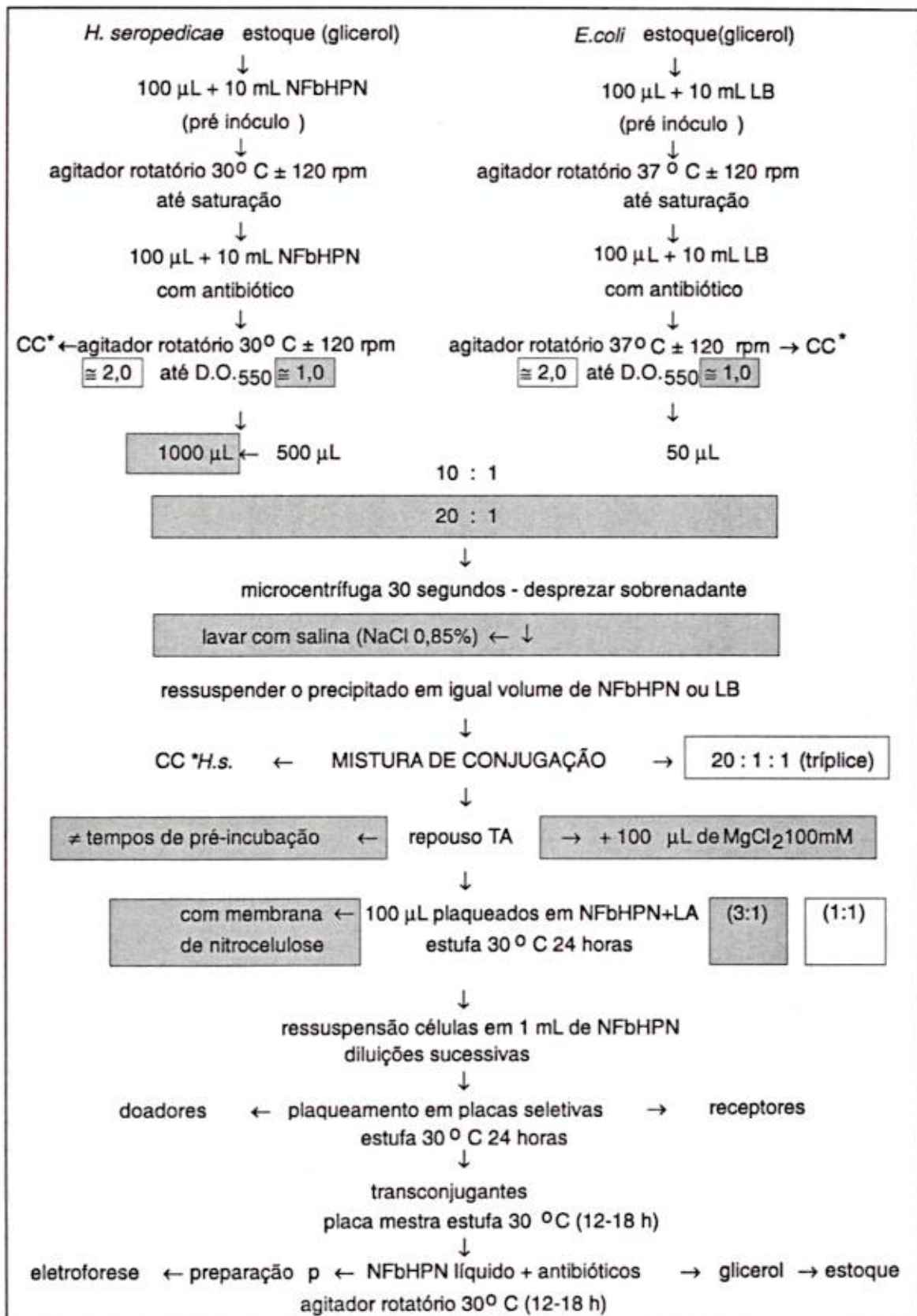
protocolo básico. Um mililitro de cultura de cada microrganismo foi centrifugado em microcentrífuga (7.245 x g), durante 1 minuto e o precipitado foi ressuspenso em igual volume de meio. A partir da suspensão celular assim obtida foram tomadas alíquotas, para compor a **mistura de conjugação**.

Também foram realizadas conjugações bacterianas onde todas as condições acima foram mantidas porém a composição do meio misto foi 3:1 (NFbHPN : LA). Estes experimentos tiveram seus resultados comparados aos anteriores avaliando-se o efeito da proporção dos meios constituintes do meio misto em relação ao número de transconjugantes.

No decorrer dos demais experimentos esta proporção de 3:1 foi mantida. Além disto realizaram-se experimentos, de conjugação simples, com diferentes proporções de microrganismos na mistura de conjugação: 20:1 ou 10:1 (receptor:doador), sendo mantida, nos experimentos posteriores a proporção de 20:1. O efeito da proporção de doadores na mistura de conjugação sobre a conjugação biparental foi determinada através da avaliação das diferentes frequências de transconjugantes. Estas condições passaram a ser designadas **condições de conjugação para o *H. seropedicae***.

Um diagrama completo das modificações propostas sobre o protocolo básico é apresentado no Quadro VI.

QUADRO VI - ESQUEMA GERAL DE CONJUGAÇÃO



* CC = controle de crescimento (Materiais e Métodos, item 3.9)
 Protocolo geral para conjugação de *H. Seropedicae*. As modificações introduzidas no protocolo básico (item 3.11.1) estão destacadas por quadros com fundo cinza. As conjugações triparentais estão destacadas pelo quadro com fundo branco.

3.11.3. EFEITO DAS CONDIÇÕES DE PREPARO DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE O NÚMERO DE TRANSCONJUGANTES.

O efeito das condições de preparo da mistura de conjugação sobre a frequência de transconjugantes na conjugação biparental, foi determinada através da avaliação das diferentes frequências de transconjugantes obtidas em experimentos conduzidos sob as **condições de conjugação para o *H. seropedicae***, com adaptações onde foram avaliados:

3.11.3.1 Efeito da lavagem das células da mistura de conjugação com solução de NaCl 0,85%, sobre o número de transconjugantes.

Realizaram-se experimentos com as misturas de conjugação passando por uma etapa de lavagem das células com solução salina. Utilizando-se solução salina estéril (NaCl 0,85%), processaram-se duas etapas de lavagem, com centrifugação (1 minuto a 7.245 x g) e ressuspensão das bactérias receptoras em meio NFbHPN e doadoras em meio L.B., para posteriormente proceder a mistura de conjugação. As frequências de transconjugantes foram avaliadas e a metodologia que apresentou melhores resultados nos experimentos foi mantida para os demais ensaios. Todas as demais condições foram mantidas idênticas às descritas no protocolo básico.

3.11.3.2 Efeito da adição de solução de Cloreto de Magnésio na mistura de conjugação, sobre o número de transconjugantes.

Realizaram-se experimentos com as misturas de conjugação em presença de solução de MgCl₂, na concentração final de 10 mM. As células da

mistura de conjugação, na proporção de 20:1 (receptor:doador) suspensas em meio NFbHPN (1 mL), foram acrescidas de 100 μ L de solução de $MgCl_2$ 100 mM. A mistura foi acondicionada em frasco tipo penicilina, estéreis, com capacidade para 10 mL, deixada em repouso, à temperatura ambiente. As frequências de transconjugantes foram avaliadas e a metodologia que apresentou melhores resultados nos experimentos foi mantida para os ensaios adiante relacionados.

3.11.4. EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO EM MEIO LÍQUIDO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES:

O efeito do tempo de pré-incubação da mistura de conjugação, em meio líquido, sobre a frequência de transconjugantes na conjugação biparental, foi determinada através da avaliação das diferentes frequências de transconjugantes. Realizaram-se experimentos, de conjugação simples, com as misturas de conjugação passando por uma etapa de pré incubação por períodos de tempo variáveis. A pré incubação processou-se em meio de NFbHPN, contido em frascos tipo penicilina, estéreis, com capacidade para 10 mL, deixados em repouso, à temperatura ambiente, por diferentes intervalos de tempo (zero - 90 minutos). As frequências de transconjugantes foram determinadas e o tempo de pré incubação que apresentou a maior frequência foi utilizado nos demais experimentos.

3.11.5. EFEITO DA FASE DE CRESCIMENTO DAS BACTÉRIAS RECEPTORAS COMPONENTES DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANS-CONJUGANTES.

O efeito da fase de crescimento bacteriano sobre a conjugação biparental foi determinado através da avaliação das diferentes frequências de transconjugantes, obtidas em experimentos conduzidos nas "condições de conjugação para o *H. seropedicae*" porém com misturas de conjugação compostas por culturas em diferentes fases de crescimento. Foram realizados experimentos com culturas cuja D.O._{550nm} variou de 0,7 a 1,5 para o receptor (*H. seropedicae*) e cultura saturada (D.O._{550nm} ≡ 2,0) para o doador (*E. coli* 1230(R6845)). As frequências de transconjugantes foram avaliadas e a fase de crescimento que apresentou melhores resultados no experimento foi mantida para os ensaios de conjugação.

3.11.6. APLICAÇÃO DO PROTOCOLO ALTERNATIVO NA TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS MOBILIZÁVEIS POR CONJUGAÇÃO.

Foram realizados experimentos utilizando-se *H. seropedicae* estirpe ZA95, este microrganismo foi conjugado com *E. coli* HB101(pCK3) e *E. coli* HB101(pRK2013), em conjugações triparentais, nas condições introduzidas por este trabalho para a conjugação simples.

Os experimentos foram efetuados misturando-se culturas de *E. coli* HB101 com culturas de *H. seropedicae*. Inicialmente foram colocadas em contato as duas estirpes de *E. coli*: a que efetivamente contém o plasmídeo em estudo e a estirpe de *E. coli* que contém o pRK2013 (plasmídeo mobilizador), para em seguida adicionar o *H. seropedicae*. A proporção de

1:1:20 - doador:mobilizador:receptor - foi mantida na composição da mistura de conjugação. As demais etapas foram aquelas descritas no protocolo alternativo, já contendo as otimizações.

3.12. CÁLCULO DA FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES:

As colônias de transformantes foram identificadas pela sua habilidade em crescer na presença do antibiótico, marca do plasmídeo que recebeu durante o processo de transferência gênica. A frequência de conjugação por receptor foi calculada dividindo o número colônias de *H. seropedicae* que recebeu o plasmídeo (transconjugantes), pelo número total de colônias de *H. seropedicae* presentes na mistura de conjugação (MILLER, 1972). Estes números por sua vez foram determinados por contagem de colônias em meios seletivos para transconjugantes e receptor respectivamente (item 3.9).

3.13. TRANSFORMAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* POR ELETROPORAÇÃO

Experimentos de eletroporação foram precedidos dos seguintes ensaios: determinação do tempo de cultivo, crescimento das culturas de *H. seropedicae* em meio S.O.B., e expressão do fenótipo dos transformantes em

meio S.O.C. monitorados por leituras espectrofotométricas da turbidez das culturas em 550nm.

3.13.1. PREPARO DAS CÉLULAS DE *H. seropedicae*, COMPETENTES PARA ELETROPORAÇÃO.

As estirpes de *H. seropedicae* Z152 e ZA95 foram tratadas segundo a metodologia proposta para a obtenção de células de *E. coli* competentes para eletroporação (BETHESDA RESEARCH TECH. INC., 1987). Uma colônia do microrganismo, isolada de meio sólido NFbHPN foi inoculada em 50 mL de meio S.O.B. contido num frasco Erlenmeyer com capacidade de 500 mL. As células foram cultivadas sob agitação rotatória (120rpm) à 30°C até saturação, constituindo desta forma o pré-inóculo para preparo de células em grande escala. Uma alíquota deste pré-inóculo, cujo volume variou de acordo com a estirpe, foi transferida assepticamente para frasco Erlenmeyer de 2,0 L contendo 500 mL de meio S.O.B. isento de magnésio e incubadas em agitador rotatório (120 rpm) à 30°C por um período de tempo, adequado para atingir a $D.O.550nm \equiv 0,7$. As células assim obtidas foram coletadas por centrifugação por 10 minutos, à 5000 rpm (centrífuga HITACHI, rotor R-24A). O precipitado foi lavado e ressuspensão em 500 mL de solução de glicerol 10% gelada (W.B.). Esta ressuspensão foi submetida a nova centrifugação por 15 minutos à 5000 rpm (centrífuga HITACHI, rotor R-24A). Lavada uma segunda vez, repetindo-se a operação anterior, ou até a obtenção de solução sobrenadante límpida. Após ter sido decantado o sobrenadante, as células foram ressuspensas em 2 mL de W.B. encontrando-se, desta forma, adequadamente preparadas para o procedimento de eletroporação. Células obtidas por este método foram estocadas à -70°C. Para tanto, alíquotas de 200 μ L da suspensão em W.B. foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL e

mantidas em banho de gelo/etanol por aproximadamente 10 minutos antes de serem acondicionadas. As amostras assim obtidas constituíram as abaixo denominadas **células para eletroporação**.

3.13.2. ELETROPORAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* ESTIRPES Z152 E ZA95.

Células de *H. seropedicae* estirpes Z152 ou ZA95 preparadas de acordo com o item acima foram eletroporados na presença dos plasmídeos pLAFR3, pCK3 ou pVK102.

As transformações por eletroporação foram realizadas no *Cell-Porator Chamber Safe*². Uma alíquota de 200 µL de suspensão de células de *H. seropedicae*, foi descongelada lentamente em banho de gelo e 80 µL desta amostra foram distribuídos em alíquotas de 20 µl entre quatro tubos plásticos de 1,5 mL mantidos em gelo. A cada tubo foi acrescentado DNA plasmidial (2,0-40,0 µg) purificado segundo SAMBROOK *et al.* (1989). O volume célula/DNA de cada tubo foi transferido para uma câmara de eletroporação devidamente identificada. Quatro câmaras foram ajustadas, por vez, na câmara de segurança e as células submetidas à corrente elétrica. A seguir as suspensões foram transferidas para frascos de 10 mL de capacidade, contendo 1 mL de meio S.O.C. e incubadas à 30°C, em agitador rotatório (120rpm). Após a incubação, alíquotas de 100 µL foram espalhadas sobre meios seletivos sólidos (item 3.5.2.). As placas foram incubadas à 30°C, em estufa, durante 16-24 horas. As colônias transformantes foram coletadas e seus plasmídeos isolados pela técnica de lise alcalina descrita por ROBSON *et al.*, 1984, (item 3.16.2.), eletroforizados em gel de agarose e visualizados após tratamento com solução de brometo de etídio (item 3.18.).

² *Gibco BRL*

3.14. MODIFICAÇÕES DA METODOLOGIA PARA A ELETROPORAÇÃO DE *H. seropedicae*:

Nos experimentos de eletroporação, vários parâmetros que podem interferir na transformação foram investigados. Foram estudados os efeitos:

- Das condições pré e pós eletroporação sobre a viabilidade celular das diferentes estirpes.
 - Da intensidade de campo elétrico sobre a sobrevivência das células competentes para eletroporação.
 - Das condições pré e pós eletroporação sobre a eficiência da transformação por eletroporação.
 - Da concentração de DNA plasmidial na eficiência da eletroporação.
 - Da intensidade do campo elétrico sobre a eficiência da transformação.
 - Da utilização de diferentes plasmídeos sobre a eficiência da eletroporação das diferentes estirpes de *H. seropedicae*.
-

3.14.1. EFEITO DAS CONDIÇÕES PRÉ E PÓS ELETROPORAÇÃO SOBRE A VIABILIDADE CELULAR E EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO:

Nesta etapa foram implementadas as seguintes modificações:

- Permanência da mistura de eletroporação - células de *H. seropedicae* e DNA - numa etapa de pré - incubação, em banho de gelo por um período de 30 minutos.
- Tempo de incubação, das células eletroporadas, em meio S.O.C. por 30 minutos ou por 264 minutos.

Para a realização destes experimentos foram utilizadas células de *H. seropedicae* Z152 e ZA95, sob as condições descritas no item 3.13.1. Os procedimentos posteriores foram os descritos no item 3.13.2.

3.14.1.1. Permanência da mistura de eletroporação - células de *H. seropedicae* e DNA - numa etapa de pré-incubação, em banho de gelo por um período de 30 minutos.

As células, preparadas para eletroporação, de *H. seropedicae* Z152, adicionadas de DNA plasmidial, foram deixadas em banho de gelo por 30 minutos, (FIEDLER & WIRTH, 1988) para posteriormente serem submetidas a eletroporação em um campo elétrico de 8 kV.cm⁻¹. As demais condições e os procedimentos posteriores foram aqueles descritos no item 3.13.2 Procurou-se determinar, dessa forma, a influência do contato célula-DNA anterior à eletroporação sobre a eficiência de transformação.

O número de células sobreviventes foi comparado com o número de células obtidas em experimentos controle, onde culturas de células, das mesmas suspensões, foram expostas às mesmas condições experimentais, sem DNA.

3.14.1.2. Variação no tempo de incubação em meio S.O.C. pós eletroporação:

As células preparadas de *H. seropedicae* Z152 e ZA95 após terem sido submetidas a um campo elétrico de 8 kV.cm^{-1} , tiveram suas condições de recuperação em meio S.O.C. modificadas quanto ao tempo de incubação que variou entre 30 e 264 minutos. As demais condições estão descritas no item 3.13.2.

Procurou-se determinar, dessa forma, o melhor tempo para a recuperação das células eletroporadas.

3.14.2. O EFEITO DA INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS

O efeito da intensidade do campo elétrico sobre a sobrevivência das células competentes para eletroporação foi avaliado após experimentos de eletroporação com diferentes intensidades de campo elétrico. Foram desenvolvidos experimentos com células de *H. seropedicae* Z152 e ZA95 preparadas para eletroporação e estocadas à -70°C . As suspensões de células foram descongeladas em banho de gelo, 20 μL foram transferidos para câmaras de eletroporação, as quais foram submetidas a corrente elétrica variável (0,3-

2,4 kV), com resistência de 4 k Ω e tempo constante de 6 ms. As intensidades de campo elétrico variaram de 2 kV.cm⁻¹ a 16 kV.cm⁻¹. Posteriormente as células eletroporadas foram transferidas para um frasco com capacidade para 10 mL, contendo 1 mL de meio S.O.C. e o tratamento subsequente foi o descrito no item 3.13.2.

O número de células sobreviventes foi comparado com o número de células obtidas em experimentos controle, onde culturas de células, das mesmas suspensões, não foram expostas à descargas elétricas.

3.14.3. EFEITO DA INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO SOBRE A EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO:

O efeito da intensidade do campo elétrico sobre a eficiência da transformação por eletroporação foi avaliado através de análise dos resultados obtidos após experimentos de eletroporação com diferentes intensidades de campo elétrico. Foram desenvolvidos ensaios com células de *H. seropedicae* Z152 preparadas para eletroporação e estocadas à -70°C. As suspensões de células foram descongeladas em banho de gelo e acrescidas de DNA plasmidial. Volumes de 20 μ L desta mistura foram transferidos para câmara de eletroporação. A seguir cada câmara foi submetida a uma intensidade de corrente elétrica variável (0,3 - 2,4 kV). Os campos elétricos variaram de 2 kV.cm⁻¹ a 16 kV.cm⁻¹. Posteriormente, as células eletroporadas foram transferidas para um frasco com capacidade para 10 mL, contendo 1 mL de meio S.O.C., incubadas à 30°C, em agitador rotatório (120 rpm) por 30 minutos. Os passos subsequentes foram idênticos ao protocolo básico.

3.14.4. EFEITO DA CONCENTRAÇÃO DE DNA PLASMIDIAL NA EFICIÊNCIA DA ELETROPORAÇÃO

O efeito da concentração de DNA plasmidial na eficiência da eletroporação foi avaliado através de análise dos resultados obtidos após experimentos de eletroporação com diferentes concentrações de DNA plasmidial de pVK102 (6,0-40 µg) e pCK3 (2,0-10 µg). Foram desenvolvidos experimentos com células de *H. seropedicae* Z152 e ZA95 competentes para eletroporação e mantidas à -70°C (item 3.13.1.). As suspensões de células foram descongeladas em banho de gelo e acrescidas de diferentes quantidades de DNA plasmidial. Volumes de 20 µL foram transferidos para câmara de eletroporação, a seguir, cada câmara foi submetida a um campo elétrico de 8 kV.cm⁻¹. As células eletroporadas foram tratadas como descrito no item 3.13.2., exceto que o tempo de incubação no meio S.O.C. foi de 264 minutos.

3.14.5. EFICIÊNCIA DA TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO DE *H. seropedicae* Z152 E ZA95 POR DIFERENTES PLASMÍDEOS

O efeito do uso de diferentes DNAs plasmidiais sobre a eficiência da eletroporação foi avaliado através de análise dos resultados obtidos após experimentos de eletroporação de uma mesma estirpe de *H. seropedicae* com diferentes plasmídeos. Para tanto foram utilizados plasmídeos pCK3, pLAFR3 e pVK102 e desenvolvidos experimentos com células de *H. seropedicae* Z152 e ZA95 preparadas para eletroporação e estocadas à -70°C. Suspensões celulares competentes para eletroporação foram descongeladas em banho de gelo e

acrescidas de DNA plasmidial e submetidas a um campo elétrico de 8 kV.cm^{-1} . As células eletroporadas foram tratadas então como descrito no item 3.13.2.

3.15. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS:

A presença de plasmídeos foi constatada após purificação pelos métodos de:

- mini preparação de plasmídeos descrita por SAMBROOK *et al*, 1989.
- lise alcalina descrita por KADO & LIU, 1981.
- lise alcalina descrita por ROBSON *et al*, 1984.

3.15.1. MINI PREPARAÇÃO DE PLASMÍDEOS SEGUNDO SAMBROOK *et al.*, 1989:

O isolamento de plasmídeos em pequena escala, foi realizado segundo o método da "lise alcalina", no qual foi omitido o uso de lisozima na solução de lise I e a solução de lise II foi substituída por uma solução de NaOH 0,2N contendo 1% de SDS. As células presentes em um mililitro de cultura recente (D.O.550 nm de aproximadamente 2,0) foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL estéreis, coletadas por centrifugação ($7.245 \times g$ e 1 minuto) e ressuspensas em 100 μL de uma solução contendo Tris-HCl 25mM pH 8,0, glucose 50 mM e EDTA 10 mM (G.E.T). Após 5 minutos à temperatura ambiente, foram adicionados 200 μL de NaOH 0,4 M contendo SDS 2% (1:1), o sistema foi homogeneizado por inversão manual através de movimentos

leves. Esta suspensão foi incubada por 5 minutos à temperatura ambiente, para a lise das células. Proteínas, DNA cromossomal desnaturado, restos celulares e o SDS foram precipitados pela adição de 158 μL de solução de acetato de potássio 3M e ácido fórmico 1,8M (KacF), homogeneizados manualmente por agitação vigorosa. Os tubos foram mantidos em repouso, em banho de gelo por 15 minutos a seguir foram acrescidos de 200 μL de clorofórmio. Os sistemas foram misturados em agitador de tubos por breves períodos de tempo, por duas vezes durante um período de 5 minutos de repouso no banho de gelo. Com esse procedimento obteve-se a desproteinização do material. Após centrifugação (8,5 minutos, 7.245 x g, à 4°C.), 350 μL do sobrenadante contendo o DNA plasmidial foram coletados, transferidos para novo tubo já contendo 820 μL de etanol absoluto. O tubo foi mantido a temperatura ambiente por 20 minutos para a precipitação do DNA. O precipitado foi lavado com 1 mL de etanol 80%, secado a vácuo e em seguida dissolvido em 20 μL de água ultra pura contendo 10 μL de RNase ($10 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) ou em 20 μL de T₁₀ E₁. Este material foi mantido em repouso até completa solubilização do DNA aderido às paredes do tubo. Mini-preparações obtidas por este método continham DNA plasmidial para análises eletroforéticas (item 3.17.).

3.15.2. LISE ALCALINA SEGUNDO ROBSON *et al*:

Alíquotas (1,0 -1,5 mL) de culturas de *H. seropedicae* ou *E. coli*, incubadas em meio líquido apropriado até D.O.550 nm \equiv 2,0 foram transferidas para tubos plásticos de 1,5 mL estéreis, as células foram coletadas por centrifugação (7.245 x g) por 1 minuto. Em seguida foram ressuspensas em 50 μL de T₁₀E₁. A essa suspensão foram adicionados 950 μL da mistura de lise (SDS 1%, EDTA 1,77% em NaOH, pH final 12,6). O sistema foi misturado rapidamente por inversão e incubado por 25 minutos à 34°C. A

seguidos foram adicionados 170 μL de uma solução contendo Tris 0,7M (pH 8,0) e NaCl 3,5M o conjunto foi incubado por 30 minutos em banho de gelo. Nesta etapa ocorreu a precipitação de DNA cromossomal desnaturado, proteínas e SDS, além da neutralização do lisado. A preparação foi então centrifugada a 7.245 x g, por 10 minutos e à 4°C. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo plástico de 1,5 mL estéril, contendo 770 μL de uma solução de acetato de sódio 0,3 M, pH 8,0, em etanol 90% (v/v) -ACE- e a mistura foi mantida à -20°C por um período de tempo compreendido entre 16-18 horas, com a finalidade de completar a precipitação do DNA plasmidial. Após a precipitação, a mistura foi centrifugada a 7.245 x g, por 10 minutos, à 4°C e o sobrenadante desprezado. O DNA precipitado ficou aderido às paredes do tubo, como um filme translúcido, que foi cuidadosamente secado por inversão sobre papel absorvente e, em seguida, à vácuo, eliminando-se assim o etanol residual. Para ressuspender o DNA utilizou-se 15 μL de T₁₀ E₁ para a solubilização. As preparações foram tratadas com RNase (concentração final de 10 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), a seguir adicionadas de 5 μL de corante para eletroforese, FSUDS (azul de bromofenol 0,25%, SDS 0,1%, Ficoll 20% em T₁₀E₁). Nesta etapa as preparações encontravam-se prontas para serem aplicadas em gel de agarose e analisadas por eletroforese (item 3.17.).

Todas as soluções e os materiais foram esterilizados por autoclavação, exceto a mistura de lise que é preparada com soluções estéreis e dispensa este processo. Porém, a mesma deve ser preparada imediatamente antes do uso.

3.15.3. PURIFICAÇÃO DE PLASMÍDEOS SEGUNDO KADO & LIU, 1981:

As células de 0,2- 0,5 mL de cultura recente com D.O.550 nm \equiv 2,0 foram coletadas por centrifugação (7.245 x g) por 2 minutos e ressuspensas em 100 μ L de tampão T₁₀ E₁, por agitação em agitador de tubos. Imediatamente após a ressuspensão, foram adicionados à mistura 200-300 μ L de solução de lise (0,5 mL de Tris-base 1 M; 3 mL de SDS 10 %; 0,41 mL de NaOH 2 N e 6,1 mL de H₂O estéril) preparado imediatamente antes do uso. A mistura foi homogeneizada por meio de inversão manual, repetidas vezes a seguir, foi deixada em repouso à temperatura ambiente por 10 minutos. O DNA plasmidial foi extraído com solução fenol:clorofórmio isoamílico (Anexo 1.10.) por movimentos leves de inversão (\equiv 100 vezes) e posteriormente centrifugado em microcentrífuga (7.245 x g) por 8,5 minutos. O sobrenadante foi coletado e transferido para novos tubos contendo 2 volumes de etanol absoluto onde permaneceu em repouso por 16-18 horas à temperatura ambiente. Essa mistura foi centrifugada a 7.245 x g por 10 minutos. Seu sobrenadante foi desprezado e o DNA que se encontrava aderido às paredes do tubo, foi dessecado à vácuo para, em seguida, ser ressuspenso em 20 μ L de H₂O ultra pura, por 20 minutos de repouso à temperatura ambiente. Quando adicionada de corante de eletroforese FSUDS a preparação de DNA plasmidial encontrava-se pronta para ser analisada por eletroforese.

3.16. QUANTIFICAÇÃO DO DNA POR ESPECTROFOTOMETRIA:

A concentração de DNA de fita dupla foi determinada por método espectrofotométrico (BERGER, 1987). A absorvância da solução de DNA foi determinada em 260 nm e 280 nm. Para o cálculo foi empregada a relação $D.O.260 \text{ nm} = 1,0$, que corresponde a uma concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$ de DNA de fita dupla. As preparações eram consideradas puras quando apresentavam uma relação $D.O.260 / D.O.280$ compreendida entre 1,8 e 2,0.

3.17. ELETROFORESE DE DNA EM GEL DE AGAROSE:

A determinação do perfil eletroforético dos plasmídeos contidos nas diversas estirpes bacterianas foi realizada por eletroforese em gel de agarose segundo SAMBROOK *et al*, 1989 ou KADO & LIU, 1981. Todas as eletroforeses foram realizadas com o auxílio da fonte GNA 100³, como geradora de energia. Os géis de agarose foram preparados fundindo-se agarose dissolvida em solução tampão Tris base 89 mM contendo ácido bórico 89 mM e EDTA 2 mM pH 8,0 (TBE) a quente. O gel fundido foi transferido para placas suporte (40 cm²) contendo pentes de eletroforese preparativa. A concentração de agarose variou de 0,6 a 1,0 % de acordo com o tamanho dos fragmentos de DNA a serem separados. O mesmo tampão de preparo do gel foi utilizado também na corrida eletroforética. As amostras foram preparadas segundo item 3.15. e aplicadas com corante FSUDS, na proporção de uma parte de tampão para quatro partes de amostra. As eletroforeses foram desenvolvidas

³ Pharmacia LKB

sob a aplicação de corrente variando de 1,5 a 40 V.cm⁻¹, durante 3-18 horas, à temperatura ambiente (SAMBROOK *et al*, 1989) ou à 4°C (KADO & LIU, 1981). Os ensaios eletroforéticos foram realizados em câmara aberta em alguns experimentos (SAMBROOK *et al*, 1989) e em outros em câmara fechada (KADO & LIU, 1981). O gel de agarose, após corrida, foi corado com solução de brometo de etídio (0,5µg.mL⁻¹) por 30 minutos. O excesso de corante foi removido por sucessivas lavagens em água destilada. A visualização do complexo DNA-brometo de etídio foi feita em transiluminador ultravioleta. Os géis foram fotografados com filme Kodak ISO/ASA 100, com abertura focal de 1.8 e exposição de 1/2 a 1/15 segundos.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 CURVA DE CRESCIMENTO DE *H. seropedicae* ESTIRPE Z78.

O perfil de crescimento da estirpe Z78 de *H. seropedicae* em meio líquido NFbHPN tendo D,L-lactato como fonte de carbono é mostrado na figura 6. Após acentuada fase "lag" (0-6 horas), o *H. seropedicae* entrou em fase exponencial de crescimento. O tempo de duplicação do *H. seropedicae* Z78 nas condições definidas no item 3.7 de Materiais e Métodos, foi de 132 minutos.

O tempo de geração da estirpe Z152 de *H. seropedicae* foi determinado a partir dos dados da fase exponencial de crescimento, tendo sido encontrado valor semelhante ao da estirpe Z78 (Tabela I).

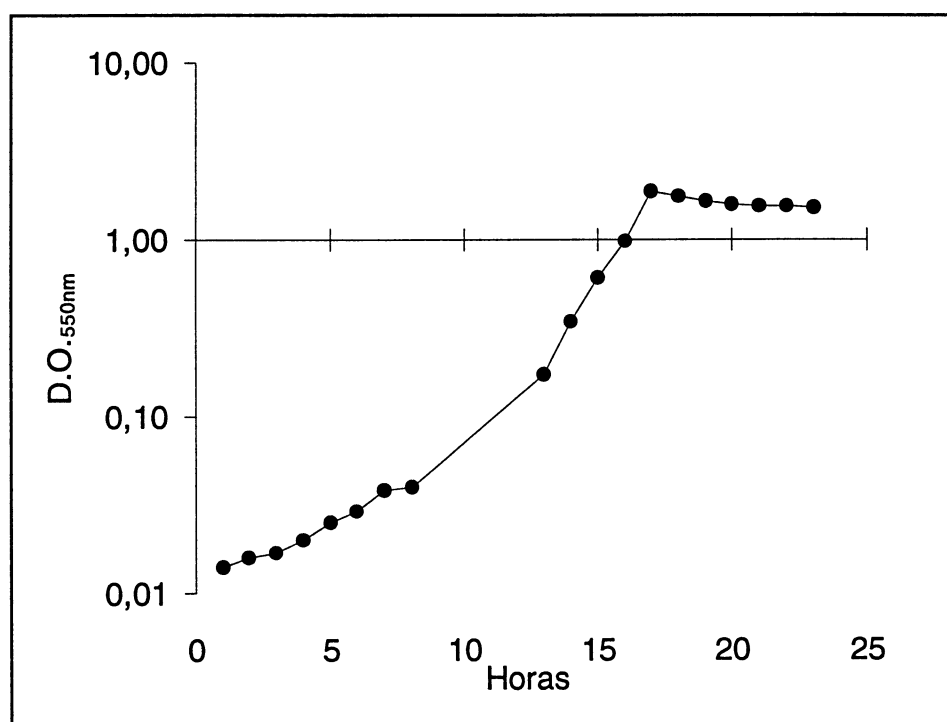


Figura 6. Curva de crescimento do *H. seropedicae* Z78 em função do tempo, com D.O. em escala logarítmica.

Células de *H. seropedicae* Z78 foram inoculadas em meio líquido NFbHPN (Quadro IV), incubadas à 30°C em agitador rotatório (120 rpm) por 24 horas. O crescimento da cultura foi acompanhado por leituras de absorvância em espectrofotômetro, em 550 nm. A concentração celular com $D O_{550nm} = 1,0 = 3,0 \times 10^{11}$. As condições experimentais encontram-se descritas no item 3.7 de Materiais e Métodos.

4.2. RELAÇÃO ENTRE A IDADE DAS CULTURAS DAS DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae* MONITORADAS POR LEITURAS ESPECTROFOTOMÉTRICAS (D.O.550NM) E A VIABILIDADE CELULAR.

As diferentes estirpes do *H. seropedicae* utilizadas neste trabalho apresentam velocidade de crescimento específico diferenciada. Análise do comportamento das estirpes utilizadas neste trabalho foi realizada em ensaios, onde o *H. seropedicae* Z78, Z152 e ZA95 tiveram seu crescimento monitorado por leituras de absorbância em 550nm. A Tabela I mostra a relação entre as diferentes fases de crescimento de culturas das estirpes Z78, Z152 e ZA95 e o número de células viáveis determinado por meio de contagem de colônias. Pode-se sugerir que as estirpes Z78 e Z152 apresentam-se semelhantes no tocante a este parâmetro, o que não ocorre com relação à ZA95, na qual a viabilidade não acompanha a variação de densidade ótica.

4.3. EFEITO DE DIFERENTES METODOLOGIAS DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES:

Experimentos de conjugação biparental onde *H. seropedicae* Z78, foi conjugado com *E.coli* estirpe 1230 que hospedava o plasmídeo R.68.45, segundo o protocolo básico (PEDROSA & YATES, 1984) e o roteiro técnico alternativo (metodologia proposta). O efeito da metodologia empregada nas conjugações sobre a frequência de transconjugantes foi avaliado por meio de comparações entre os números de transconjugantes obtidos com os métodos em estudo. As modificações no protocolo básico estão apresentadas no Quadro VI.

As frequências de transconjugantes de *H. seropedicae* Z78 com *E. coli* 1230(R68.45) obtidas para cada método estão apresentadas na Tabela II. Estes resultados evidenciam que o protocolo alternativo aumentou a frequência de transconjugantes por receptor.

O efeito das proporções de microrganismos na mistura de conjugação foi avaliado, em experimentos de conjugação biparental, com as seguintes proporções de microrganismos compondo a mistura de conjugação: proporção de 20:1 e proporção de 10:1 (receptor:doador). Os melhores resultados foram obtidos utilizando-se a proporção de 20:1.

4.4. EFEITOS DAS CONDIÇÕES NO PREPARO DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES.

4.4.1. EFEITO DA ETAPA DE LAVAGENS DAS CÉLULAS COMPONENTES DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE O NÚMEROS DE TRANSCONJUGANTES.

A introdução de duas etapas de lavagem das células componentes da mistura de conjugação aumentou a frequência de transconjugantes/receptor 1,7 e 6,7 vezes quando as misturas de conjugação foram realizadas com culturas cujas densidades óticas eram 1,0 e 1,2 respectivamente. Nestes experimentos a proporção de meio misto NFbHPN: LA utilizada foi de 3:1, a proporção de receptor:doador foi de 20:1. Estes resultados podem ser visualizados na figura 7. As condições de preparo da mistura de conjugação que apresentou melhores resultados foi mantida para os demais ensaios.

TABELA I - RELAÇÃO ENTRE IDADE DA CULTURA (EXPRESSO EM D.O.) E A VIABILIDADE CELULAR DAS DIFERENTES ESTIRPES DE *Herbaspirillum seropedicae*

D.O.550nm	<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (estirpe)	n° células viáveis por mL de cultura
0,6	Z78	$5,3 \times 10^9$
	Z152	$1,3 \times 10^8$
	ZA95	$1,5 \times 10^6$
1,0	Z78	$3,0 \times 10^{11}$
	Z152	$5,5 \times 10^9$
	ZA95	$1,4 \times 10^7$
1,3	Z78	$3,5 \times 10^{12}$
	Z152	$6,0 \times 10^{10}$
	ZA95	$2,0 \times 10^7$
1,5	Z78	$2,5 \times 10^{13}$
	Z152	$3,9 \times 10^{11}$
	ZA95	$2,9 \times 10^7$

Os dados desta tabela resultam de um mínimo de quatro experimentos. As culturas das diversas estirpes analisadas foram efetuadas em meio líquido NFbHPN (item 3.5.2.), incubado à 30°C em agitador rotatório (120 rpm), seu desenvolvimento foi acompanhado por leituras de absorbância em espectrofotômetro em 550 nm. As condições experimentais encontram-se descritas no item 3.10. de Materiais e Métodos. As contagens de colônias foram realizadas conforme Materiais e Métodos item 3.9.

TABELA II - COMPARAÇÃO DE FREQUÊNCIA DE CONJUGAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* Z78 COM *E.coli* 1230(R68.45) PELO ROTEIRO TÉCNICO BÁSICO E PELO ROTEIRO MODIFICADO.

Metodologia	Frequência *
Metodologia utilizada p/ <i>A. brasilense</i>	$4,5 \times 10^{-11}$
Metodologia proposta p/ <i>H. seropedicae</i>	$3,6 \times 10^{-5}$

* As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes e o número total de células de *H. seropedicae* presentes na mistura de conjugação (Materiais e Métodos , item 3.9)

Os dados desta tabela resultam de um mínimo de três experimentos de conjugação, sendo os resultados acima a média destes experimentos. As conjugações pela metodologia proposta para *A. brasilense* (roteiro básico) foram efetuadas segundo item 3.11.1. de Materiais e Métodos. As conjugações efetuadas segundo a metodologia proposta para *H. seropedicae* tem suas condições experimentais descritas no item 3.11.2. de Materiais e Métodos.

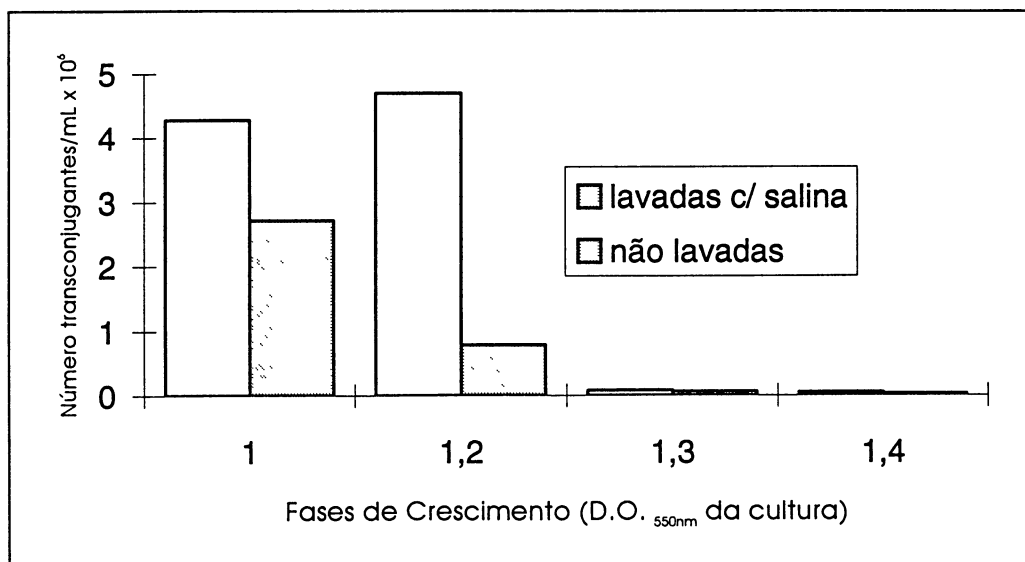


FIGURA 7 - Efeito da etapa de lavagem das células componentes da mistura de conjugação com solução de NaCl 0,85% sobre o número de transconjugantes de *H. seropedicae* Z78(R68.45).

As células componentes da mistura de conjugação foram lavadas com 1000 μ L de solução 0,85% de NaCl e em seguida centrifugadas (7.245 x g) por um minuto. O processo de lavagem das células foi repetido por 2 vezes e as células lavadas foram misturadas nas proporções de 20:1 (receptor:doador), compondo a mistura de conjugação. Os passos subsequentes do experimento de conjugação biparental do *H. seropedicae* Z78 com *E. coli* 1230 (R68 45) encontram-se descritos no item 3.11.2 de Materiais e Métodos

4.4.2. EFEITO DA ADIÇÃO DO CLORETO DE MAGNÉSIO NA MISTURA DE CONJUGAÇÃO, SOBRE O RENDIMENTO DO PROCESSO DE CONJUGAÇÃO:

Adição de $MgCl_2$ na concentração final de 10mM, à mistura de conjugação, *H. seropedicae* Z78 e *E. coli* 1230(R68.45) numa proporção de 20:1, durante o tempo de pré incubação teve seu efeito estudado. Foram realizados experimentos de conjugação simples com o *H. seropedicae* Z78 com e sem a adição de solução de $MgCl_2$. A condição experimental encontra-se descrita no item 3.11.3.2. de Materiais e Métodos. Os resultados obtidos sugerem que a adição de cloreto de magnésio aumenta o número de transconjugantes em 9 vezes quando a D.O._{550nm} da cultura de receptor é de 1,1. A figura 8 ilustra estes dados.

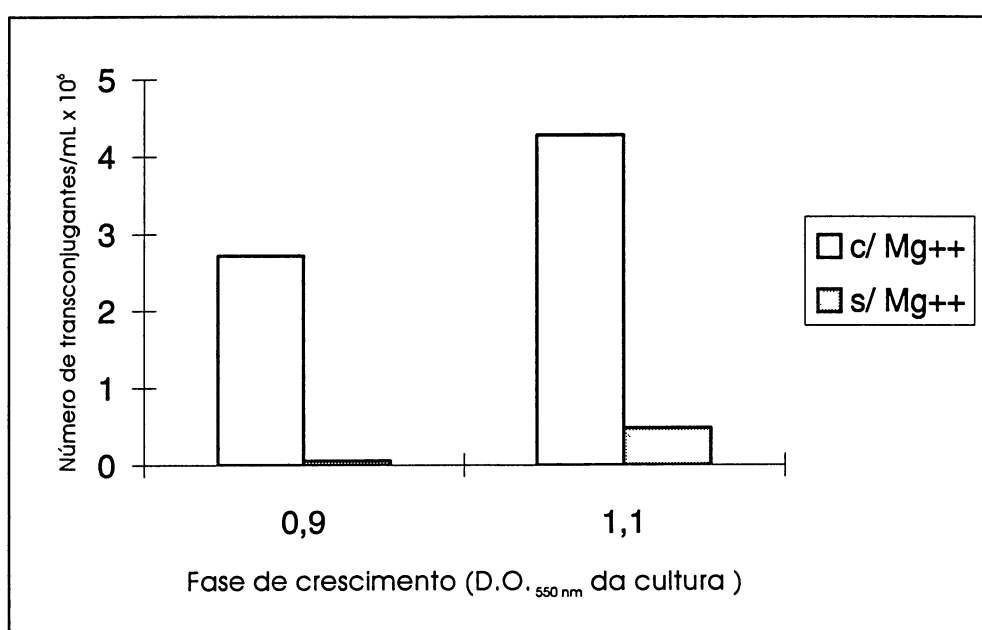


FIGURA 8 - Efeito do cloreto de magnésio no período de pré-incubação da mistura de conjugação sobre o número de transconjugantes de *H. seropedicae* Z78(R68.45).

A mistura de conjugação foi adicionada de solução de $MgCl_2$, numa concentração final de 10mM (item 3.11.3.2). Os passos subsequentes do experimento de conjugação biparental do *H. seropedicae* Z78 encontram-se descritos no item 3.11.2. de Materiais e Métodos.

4.4.3. EFEITO DO TEMPO DE PRÉ-INCUBAÇÃO DA MISTURA DE CONJUGAÇÃO SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES.

A pré incubação da mistura de incubação composta por *H. seropedicae* Z78 e *E. coli* 1230(R68.45), processou-se em meio de NFbHPN, acrescido de $MgCl_2$ 100 mM até uma concentração final de 10mM, deixados em repouso, à temperatura ambiente, por diferentes intervalos de tempo. O efeito do tempo de pré-incubação da mistura de conjugação sobre o número de transconjugantes está mostrado na Figura 9. No tempo de incubação zero foi observada a maior frequência de transconjugantes e a medida que aumentou o tempo de incubação ocorreu uma diminuição da frequência. Por este motivo, esta etapa não foi mantida no Roteiro Técnico Alternativo.

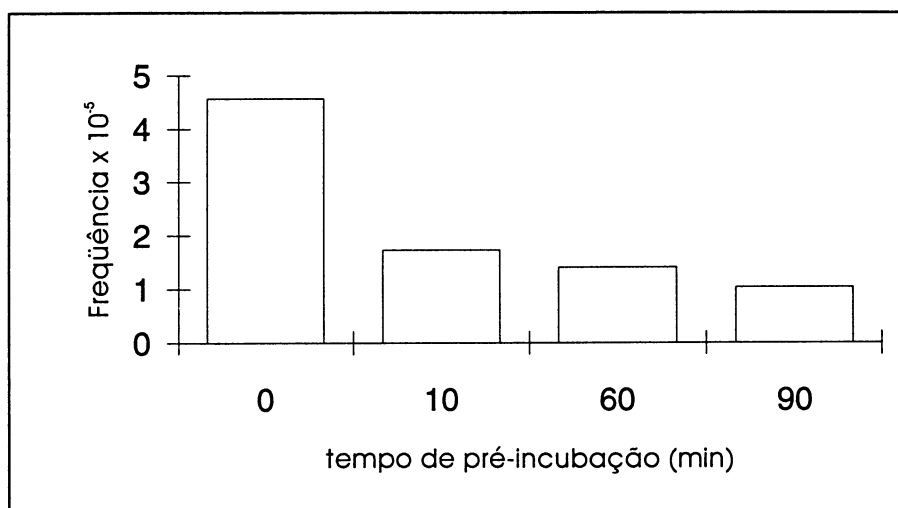


FIGURA 9 - Efeito do tempo de pré-incubação da mistura de conjugação de *H. seropedicae* Z78 e *E. coli* 1230(R68.45) sobre a frequência de transconjugantes.

As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes e o número total de células de *H. seropedicae* Z78 presentes na mistura de conjugação. A pré-incubação foi realizada à temperatura ambiente. As conjugações foram conduzidas sob as condições metodológicas propostas neste trabalho (Roteiro Técnico Alternativo). A D.O._{500nm} do inóculo de *H. seropedicae* Z78 utilizado neste experimento foi igual a 1,1.

4.4.4. EFEITO DA FASE DE CRESCIMENTO (D.O.) DAS CULTURAS DAS BACTÉRIAS SOBRE A FREQUÊNCIA DE TRANSCONJUGANTES.

O efeito da fase de crescimento bacteriano sobre a conjugação biparental foi determinada através da avaliação das diferentes frequências de transconjugantes (item 3.12.), obtidas em experimentos conduzidos nas condições de conjugação para o *H. seropedicae* (item 3.11.) porém com misturas de conjugação compostas por culturas em diferentes fases de crescimento. As frequências de transconjugantes foram avaliadas e a densidade óptica que apresentou melhores resultados neste experimento foi mantida para os demais ensaios. Na determinação da frequência de transconjugantes verificou-se que D.O._{550nm} na faixa de 0,97 e 1,1 para *H. seropedicae* Z78, e 0,8 para *H. seropedicae* Z152, alcança-se o máximo em frequência de transconjugantes/receptor. Para a estirpe ZA95 a maior frequência de transconjugantes é alcançada numa fase de crescimento onde a D.O._{550nm} esteja próxima de 1,3. Além destas concentrações ocorre uma rápida queda deste número. Os resultados estão mostrados nas Figuras 10, 11 e 12 respectivamente para as estirpes Z78, Z152 e ZA95.

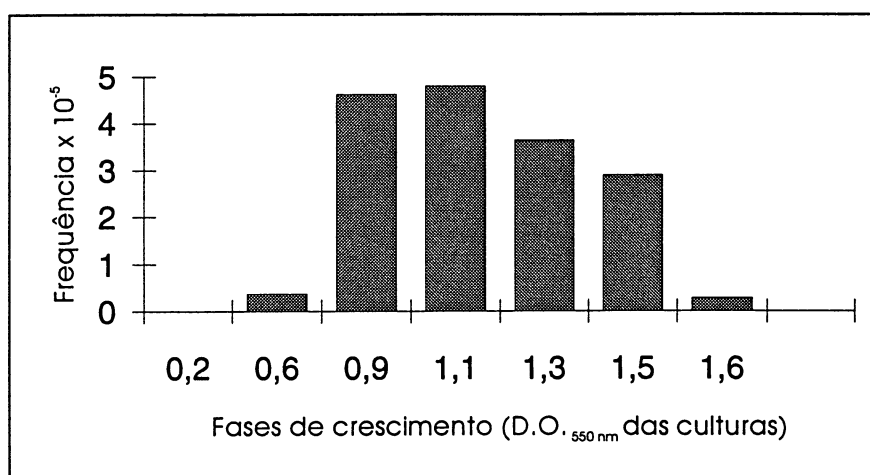


FIGURA 10 - Efeito da fase de crescimento (D.O.) das culturas de *H. seropedicae* Z78 sobre a frequência de transconjugantes.

As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes Z78(R68.45) e o número total de células de *H. seropedicae* Z78 presentes na mistura de conjugação. As conjugações foram conduzidas de acordo com a metodologia proposta neste trabalho (protocolo modificado, item 3.11.2. de Materiais e Métodos).

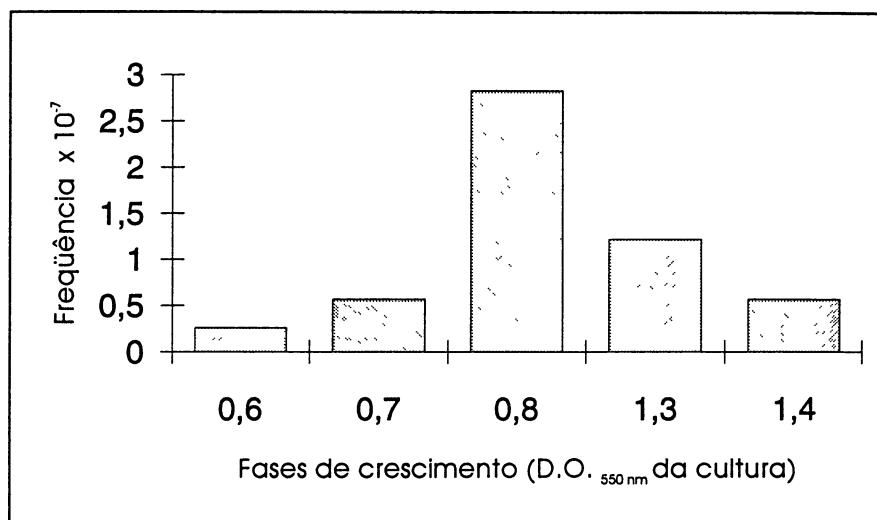


FIGURA 11 - Efeito da fase de crescimento (D.O.) das culturas de *H. seropedicae* Z152 sobre a frequência de transconjugantes.

As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes Z152(R68.45) e o número total de células de *H. seropedicae* Z152 presentes na mistura de conjugação. As conjugações foram conduzidas de acordo com a metodologia proposta neste trabalho (roteiro técnico modificado, item 3.11.2. de Materiais e Métodos).

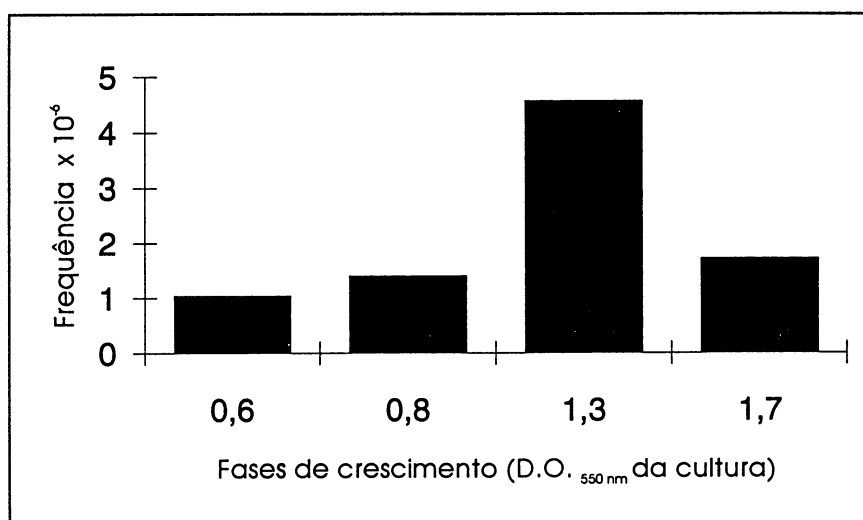


FIGURA 12 - Efeito da fase de crescimento (D.O.) das culturas de *H. seropedicae* ZA95 sobre a frequência de transconjugantes.

As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes ZA95(pCK3) e o número total de células de *H. seropedicae* ZA95 presentes na mistura de conjugação. As conjugações foram conduzidas de acordo com a metodologia proposta neste trabalho (roteiro técnico modificado, item 3.11.2. de Materiais e Métodos).

A presença do DNA plasmidial nas diferentes estirpes de *H. seropedicae* foi demonstrada através da aquisição de resistência aos antibióticos Km e Tc e também por eletroforese em gel de agarose (Figuras 13, 14 e 15)

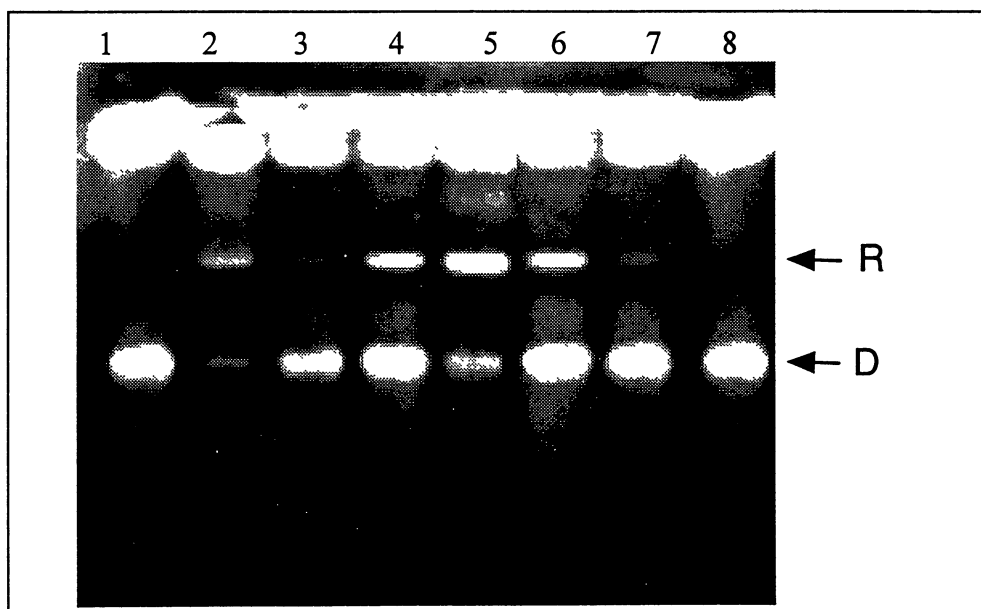


FIGURA 13 - Perfil eletroforético de plasmídeos de alguns transconjugantes obtidos por conjugação de *E. coli* 1230(R6845) e *H. seropedicae* Z78 pelo roteiro técnico alternativo.

R = R68.45; D = DNA Cromossomal

1 e 8: *H. seropedicae* Z78

2: *E. coli* 1230(R68 45)

3, 4, 5, 6, e 7: *H. seropedicae* Z78(R68 45)

Células dos diferentes microrganismos foram cultivadas em meio apropriado até saturação. Os plasmídeos foram isolados pelo método de lise alcalina (item 3.15.1) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% à 40V e 24 mA por 4,5 horas, à temperatura ambiente e em câmara aberta (item 3.17.)

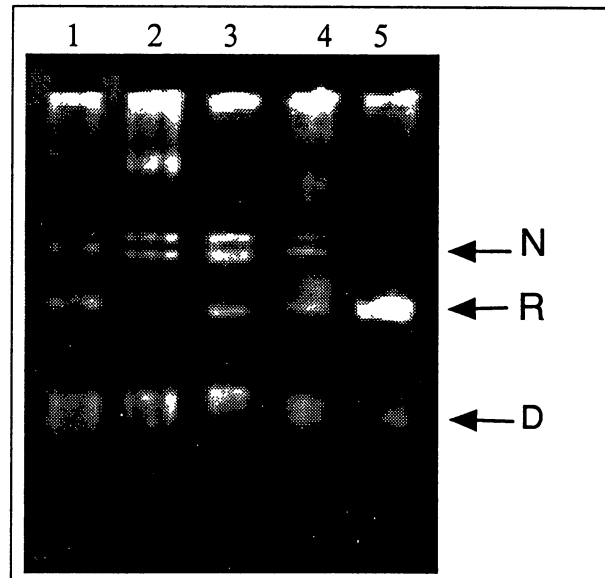


FIGURA 14 - Perfil eletroforético de plasmídeos de alguns transconjugantes obtidos por conjugação de *E. coli* 1230(R68.45) e *H. seropedicae* Z152 pelo roteiro técnico alternativo.

N = Plasmídeo Natural; R = R68 45; D = DNA Cromossomal.

1, 3 e 4: *H. seropedicae* Z152(R68.45)

2: *H. seropedicae* Z152

5: *E. coli* 1230(R68 45)

Células dos diferentes microrganismos foram cultivadas em meio apropriado até saturação. Os plasmídeos foram isolados pelo método de lise alcalina (3.15 1) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% com 40V e 24 mA de corrente com tempo de corrida eletroforética de 4,5 horas, à temperatura ambiente em câmara aberta (3.17.).

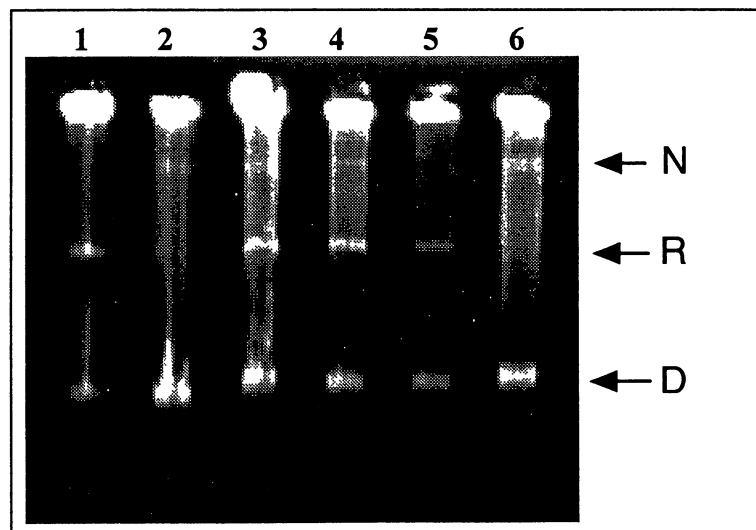


FIGURA 15 - Perfil eletroforético de plasmídeos de alguns transconjugantes obtidos por conjugação de *E. coli* 1230(R68.45) com *H. seropedicae* ZA95.

N = Plasmídeo Natural; R = R68 45; D = DNA Cromossomal

1: *E. coli* 1230(R68 45)

2 e 6: *H. seropedicae* ZA95

3, 4 e 5: *H. seropedicae* ZA95(R68 45)

Células dos diferentes microrganismos foram cultivadas em meio apropriado até saturação. Os plasmídeos foram isolados segundo Kado e Liu (item 3 15 3) A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 0,6%, com tempo de corrida de 18 horas, a 4°C, 10V, 7,0 mA e em câmara fechada (item 3 17)

A tabela III apresenta as frequências máximas de transconjugantes das diferentes estirpes que foram obtidas com culturas onde as D.O. foram as adequadas a cada microrganismo.

TABELA III - TRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDEO R68.45 DE *E coli* 1230 PARA DIFERENTES ESTIRPES DE *H. seropedicae*

<i>Herbaspirillum seropedicae</i> estirpe	Frequência*
Z78	$4,7 \times 10^{-5}$
Z152	$4,8 \times 10^{-7}$
ZA95	$6,8 \times 10^{-6}$

* As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes e o número total de células de *H. seropedicae* presentes na mistura de conjugação (Materiais e Métodos , item 3.9)

Todos os experimentos de conjugação foram realizados pela metodologia proposta no roteiro técnico alternativo.

Os experimentos de conjugação foram repetidos por seis vezes para as estirpes Z78 e Z152, por quatro vezes para *H. seropedicae* ZA95, sendo os resultados acima a média destes experimentos.

Foram realizados experimentos de conjugação biparental onde *H. seropedicae* Z78, foi conjugado com *E. coli* estirpe S17.1 que hospedava o plasmídeos pBMR5, segundo o Protocolo Básico ou segundo o Protocolo Modificado. O efeito da metodologia empregada nas conjugações sobre a frequência de transconjugantes foi avaliado por comparação entre os números de transconjugantes obtidos em cada método. Em ambos os casos modificações de composição do meio misto NFbHPN:LA, foram testadas. O meio misto na proporção de 3:1 apresentou-se como o mais apropriado para o crescimento dos transconjugantes de *H. seropedicae*. As frequências de transconjugantes de *H. seropedicae* Z78(pBMR5) foram $4,3 \times 10^{-9}$ pelo protocolo básico e $1,8 \times 10^{-5}$ pelo protocolo alternativo (Tabela IV), e o perfil eletroforético dos plasmídeos isolados de alguns transconjugantes está mostrado na Figura 16. Os resultados desse experimento mostraram que a frequência de transconjugantes de *H. seropedicae* (pBMR5) com o protocolo alternativo foi 4×10^3 vezes maior que aquela obtida pelo protocolo básico (Tabela IV).

TABELA IV - COMPARAÇÃO DAS FREQUÊNCIAS DE CONJUGAÇÃO DE *H. seropedicae* Z78 COM *E. coli* S17.1(pBMR5) PELO ROTEIRO TÉCNICO BÁSICO E PELO ROTEIRO MODIFICADO.

Metodologia	Frequência*
Protocolo Básico	$4,3 \times 10^{-9}$
Protocolo Alternativo para <i>H. seropedicae</i>	$1,8 \times 10^{-5}$

* As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes e o número total de células de *H. seropedicae* presentes na mistura de conjugação (Materiais e Métodos , item 3.9)

Todos os experimentos de conjugação foram repetidos por três vezes, sendo os resultados acima a média destes experimentos. As conjugações foram efetuadas segundo os roteiros técnicos básico (item 3.11.1) ou alternativo (item 3.11.2)

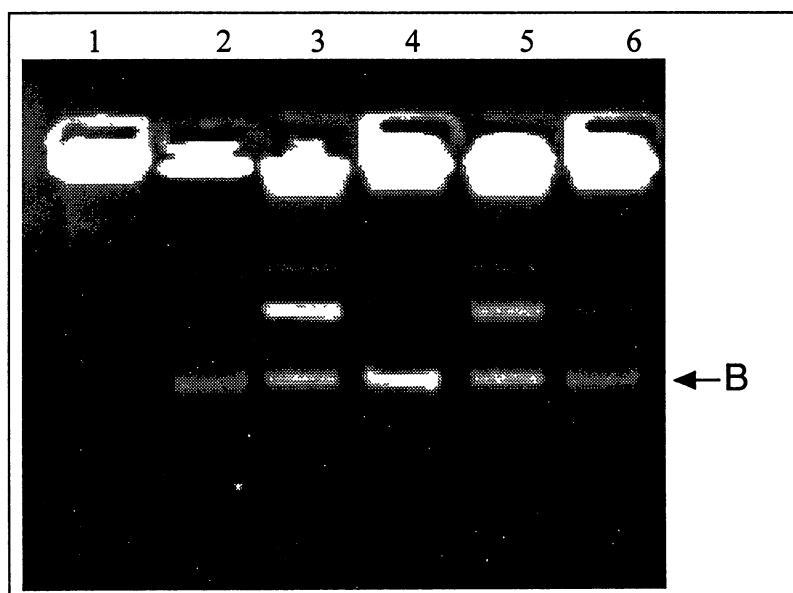


FIGURA 16 - Perfil eletroforético de plasmídeos de alguns transconjugantes obtidos por conjugação de *E. coli* S17.1(pBMR5) e *H. seropedicae* Z78 pelo roteiro técnico alternativo.

B = pBMR5

1: *H. seropedicae* Z78 ,

2: *E. coli* S17.1(pBMR5);

3, 4, 5 e 6: *H. seropedicae* Z78(pBMR5)

Células dos diferentes microrganismos foram cultivadas em meio apropriado até saturação. Os plasmídeos foram isolados pelo método de lise alcalina (3.15.1) e eletroforisados em gel de agarose 0,7% a 40V e 24 mA por 4,5 horas, à temperatura ambiente em câmara aberta (item 3.17)

Quando o plasmídeo R68.45 foi transferido para *H. seropedicae* Z78 pela mesma metodologia (Tabela IV), pode-se observar uma frequência de transconjugantes da mesma ordem que aquela obtida para o pBMR5.

Conjugação triparental foi usada para a transferência do plasmídeo pCK3 para o *H. seropedicae* ZA95. A frequência de transconjugantes está mostrada na Tabela V e foi menor que aquela observada para a conjugação biparental envolvendo a mesma estirpe de *H. seropedicae*. Os perfis eletroforéticos dos plasmídeos isolados de dois transconjugantes *H. seropedicae* (pCK3) podem ser vistos na figura 17.

TABELA V: TRANSFERÊNCIA DE DIFERENTES PLASMÍDEOS DE *E. coli* PARA *H. seropedicae* ZA95 POR CONJUGAÇÃO PELO ROTEIRO TÉCNICO MODIFICADO.

Plasmídeo	Frequência*
pCK3**	$6,2 \times 10^{-7}$
R68.45***	$6,8 \times 10^{-6}$

* As frequências de conjugação foram calculadas pela relação entre o número de transconjugantes e o número total de células de *H. seropedicae* presentes na mistura de conjugação (Materiais e Métodos, item 3.9)

** As condições experimentais das conjugações triparentais, envolvendo plasmídeo mobilizador, encontram-se descritas no item 3.11.6 de Materiais e Métodos.

***As condições experimentais das conjugações envolvendo plasmídeos auto-transmissíveis, conjugações biparentais, encontram-se descritas no item 3.11.2. de Materiais e Métodos.

Escherichia coli HB101(pCK3) ou *Escherichia coli* 1230(R68.45) foi conjugada com *Herbaspirillum seropedicae* ZA95 nas condições propostas no roteiro técnico modificado. Os resultados representam a média de três experimentos para o plasmídeo pCK3 e de quatro experimentos para o R68.45.

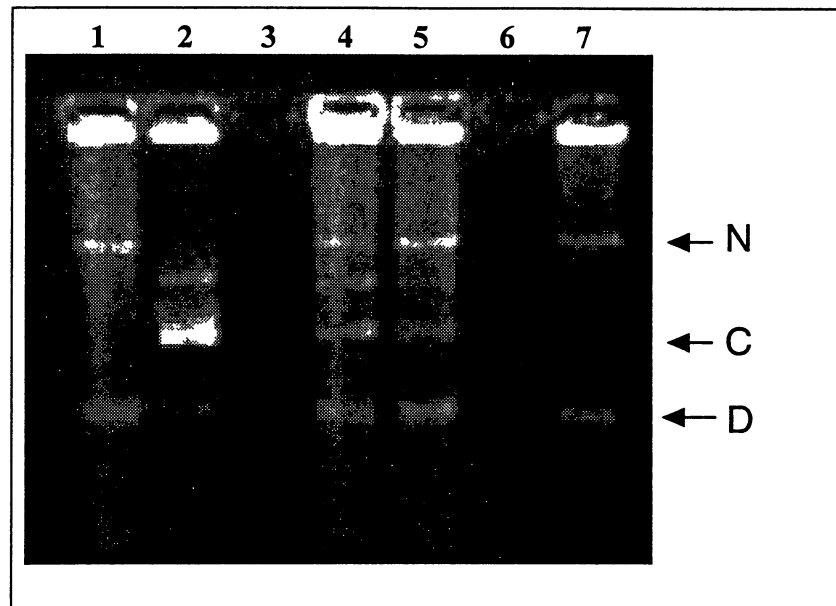


FIGURA 17 - Perfil eletroforético de plasmídeos de dois transconjugantes obtidos por conjugação triparental de *E. coli* HB101(pCK3) e *H. seropedicae* ZA95

N = Plasmídeo natural; C = pCK3; D = DNA Cromossomal

1 e 7: *H. seropedicae* ZA95

2: *E. coli* HB101 (pCK3)

3 e 6: vazios

4 e 5: *H. seropedicae* ZA95 (pCK3)

Células dos diferentes microrganismos foram cultivadas em meio apropriado até saturação. Os plasmídeos foram isolados segundo item 3.15.2. A eletroforese foi conduzida em gel de agarose 0,6%, com tempo de corrida de 6 horas, 10V e 7,0 mA, em câmara aberta e à temperatura ambiente (item 3.17)

4.5. TRANSFORMAÇÃO POR ELETROPORAÇÃO

4.5.1. EFEITO DA INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO SOBRE A SOBREVIVÊNCIA DAS CÉLULAS DO *H. seropedicae* Z152 E ZA95:

O efeito da intensidade do campo elétrico sobre as células do *H. seropedicae* Z152 e ZA95 foi determinado após exposição a campos elétricos de diferentes intensidades - $2\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $16\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ - (figuras 18 e 19). A estirpe Z152 mostrou-se mais sensível, apresentando uma taxa máxima de sobrevivência de 5,3 (figura 18). No caso da estirpe ZA95, o número máximo de sobreviventes foi de 35%, (figura 19).

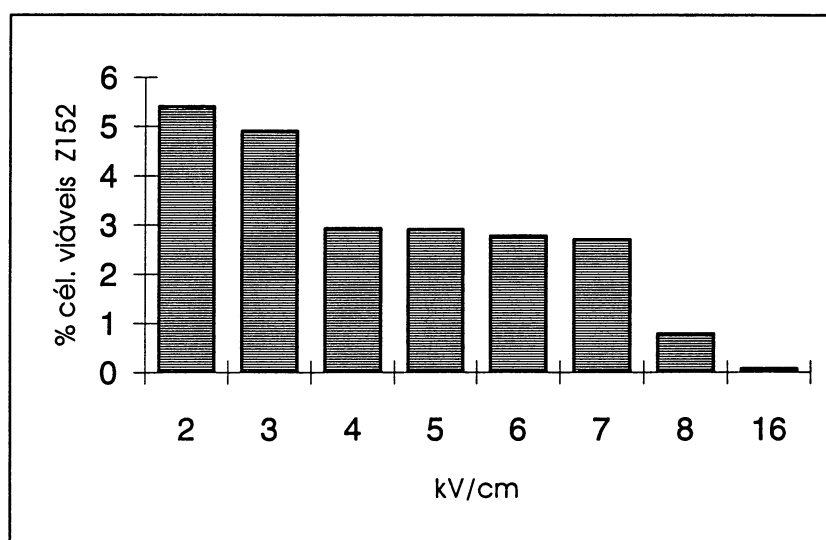


FIGURA 18 Perfil de sobrevivência do *H. seropedicae* Z152 após eletroporação sob diferentes intensidades de campo elétrico.

As células de *H. seropedicae* Z152 preparadas para eletroporação (item 3.13.1.), foram submetidas à eletroporação em Cell Porator - Gibco BRL, segundo a metodologia descrita em Materiais e Métodos (item 3.13.), com as intensidade de campo elétrico variando de $2\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $16\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$. Estas células passaram por um período de 30 minutos de incubação em meio SOC (Quadro V.) nas condições propostas no item 3.13. Posteriormente foram incubadas em meio sólido NFbHPN (Quadro IV), por 16-18 horas em estufa à 30°C e seu desenvolvimento foi avaliado através de contagem de células viáveis (item 3.9.).

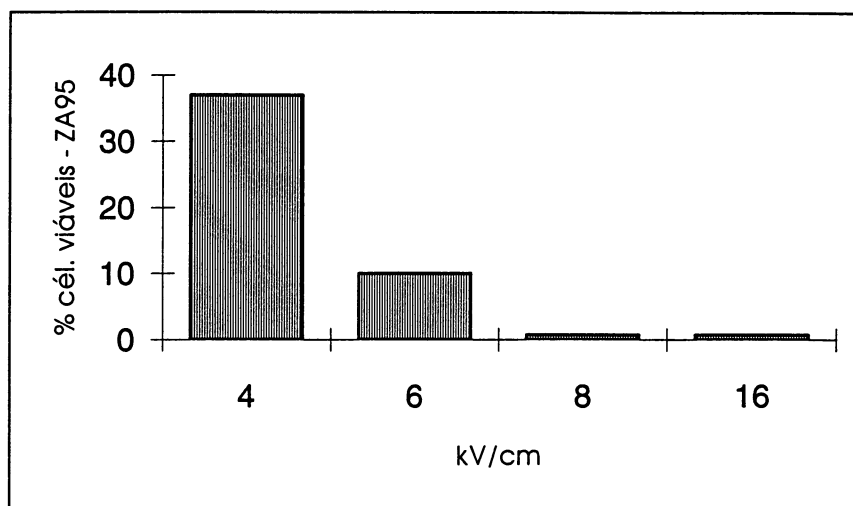


FIGURA 19 - Perfil de sobrevivência do *H. seropedicae* ZA95 após eletroporação sob diferentes intensidades de campo elétrico.

As células de *H. seropedicae* ZA95 preparadas para eletroporação (item 3.13.1.), foram submetidas à eletroporação em Cell Porator - Gibco BRL, segundo a metodologia descrita em Materiais e Métodos (item 3.13.), com as intensidade de campo elétrico variando de $2\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ à $16\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$. Estas células passaram por um período de 30 minutos de incubação em meio SOC (Quadro V.) nas condições propostas no item 3.13. Posteriormente foram incubadas em meio sólido NFbHPN (Quadro IV), por 16-18 horas em estufa à 30°C e seu desenvolvimento foi avaliado através de contagem de células viáveis (item 3.9.).

4.5.2. EFEITO DA INTENSIDADE DO CAMPO ELÉTRICO SOBRE O NÚMERO DE TRANSFORMANTES DE *H. seropedicae* Z152.

A eletroporação, segundo item 3.14.3, da estirpe Z152 com DNA plasmidial de pVK102 em diferentes intensidades de campo elétrico está mostrada na tabela VI. Como se pode observar, somente em $8\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ e em $16\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ foram obtidas colônias de *H. seropedicae* (pVK102). Embora o percentual de sobreviventes na intensidade de campo de $8\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ tenha sido de 1% (figura 18), foi esta a intensidade que favoreceu o processo de transformação, apresentando maior índice de transformantes. Este motivo levou a manter o valor da intensidade de campo elétrico em $8\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ em todos os demais experimentos de eletroporação. O plasmídeo pVK102 utilizado neste experimento foi preparado segundo item 3.15.2.

TABELA VI: EFEITO DE DIFERENTES CAMPOS ELÉTRICOS SOBRE O NÚMERO DE CÉLULAS DE *H. seropedicae* Z152 TRANSFORMADAS COM pVK102.

Campo Elétrico (kV.cm ⁻¹)	Número de transformantes por mL (Eficiência) *
2	—
4	—
6	—
8	6 x 10 ⁴
16	8 x 10 ²

* O número de células transformantes por mL foi determinado por contagem de colônias segundo item 3.9 de Materiais e Métodos.

Células de *H. seropedicae* Z152, preparadas para eletroporação, foram submetidas a campos elétricos cuja intensidade variou de 2 a 16 kV.cm⁻¹, incubadas durante 264 min em meio SOC. Após este período, as células foram repicadas para meio sólido NFbHPN adicionado de NaI¹⁰, Tc¹⁰ e Km⁵⁰ por 48 horas em estufa a 30°C. Os resultados representam a média de quatro experimentos.

4.5.3. EFEITO DA PRÉ-INCUBAÇÃO, EM BANHO DE GELO, SOBRE O NÚMERO DE TRANSFORMANTES

Em uma etapa preliminar ao choque elétrico, 20 µL de células de *H. seropedicae* Z152 foram incubadas com 1µL do plasmídeo pKV102 por um período de 30 minutos. A pré-incubação resultou em um aumento de aproximadamente 200 vezes em relação ao ensaio controle sem pré-incubação (Tabela VII).

TABELA VII - EFEITO DA PRÉ INCUBAÇÃO DA MISTURA DE ELETROPORAÇÃO, EM BANHO DE GELO, SOBRE O NÚMERO DE TRANSFORMANTES DE *Herbaspirillum seropedicae* Z152 (pVK102).

Tempo de Incubação	Número de transformantes por mL (Eficiência) *
sem pré incubação	$3,4 \times 10^4$
30 minutos	$7,2 \times 10^6$

*O número de células foi determinado segundo o item 3.9. de Materiais e Métodos.

A intensidade do campo elétrico utilizada nestes experimentos foi de 8kV/cm^1 .

As células eletroporadas foram regeneradas por 264 minutos em meio S.O.C. segundo o item 3.14.1.1. de Materiais e Métodos.

As células pós regeneração foram cultivadas em meio NFbHPN adicionadas de NaI^{10} , Tc^{10} Km^{50} conforme as condições descritas no item 3.5.4. de Materiais e Métodos.

4.5.4. EFEITO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE DNA SOBRE O NÚMERO DE TRANSFORMANTES DE *H. seropedicae*, ESTIRPES Z152 E ZA95

As figuras 20 e 21 mostram os efeitos das concentrações de DNA plasmidiais sobre o número de eletrotransformantes. O número de colônias transformantes de *H. seropedicae* Z152 foi máximo na concentração de $26 \mu\text{g/mL}$ do plasmídeo pVK102 (Figura 20), enquanto a eficiência foi de $3,8.10^3$ transformantes/ μgDNA à concentração de $2,5 \mu\text{gDNA/mL}$. Para a estirpe ZA95 o número máximo de transformantes foi obtido na concentração de $8\mu\text{g/mL}$ do plasmídeo pCK3 (Figura 21). A presença dos plasmídeos pVK102 e pCK3 nos transformantes foi confirmada em eletroforeses em gel de agarose e os perfis eletroforéticos podem ser visualizados nas figuras 22 e 23 respectivamente.

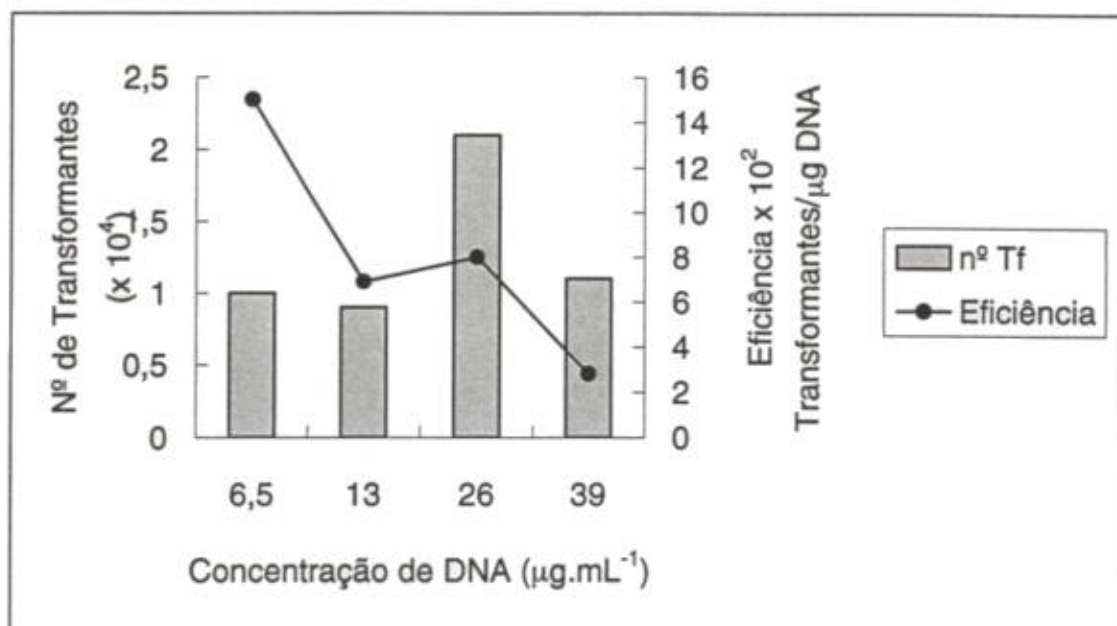


FIGURA 20 - Efeito da Concentração de pVK102 sobre a frequência de transformantes de *H. seropedicae* Z152.

As células de *H. seropedicae* Z152 preparadas para eletroporação (item 3.13.1), adicionadas de quantidades crescentes de DNA de pVK102 (6,0-40,0 μg), foram submetidas a campo elétrico de intensidade = 8 kV.cm^{-1} em Cell Porator - Gibco BRL -, segundo a metodologia descrita em Materiais e Métodos (item 3.13.). Estas células passaram por um período de 264 minutos de incubação em meio SOC. Posteriormente foram incubadas em meio sólido NFbHPN adicionado de NaI^{10} , Tc^{10} , Km^{50} e incubadas por 48 horas em estufa à 30°C. O número de transformantes foi avaliado através de contagem de colônias de acordo com o item 3.9.

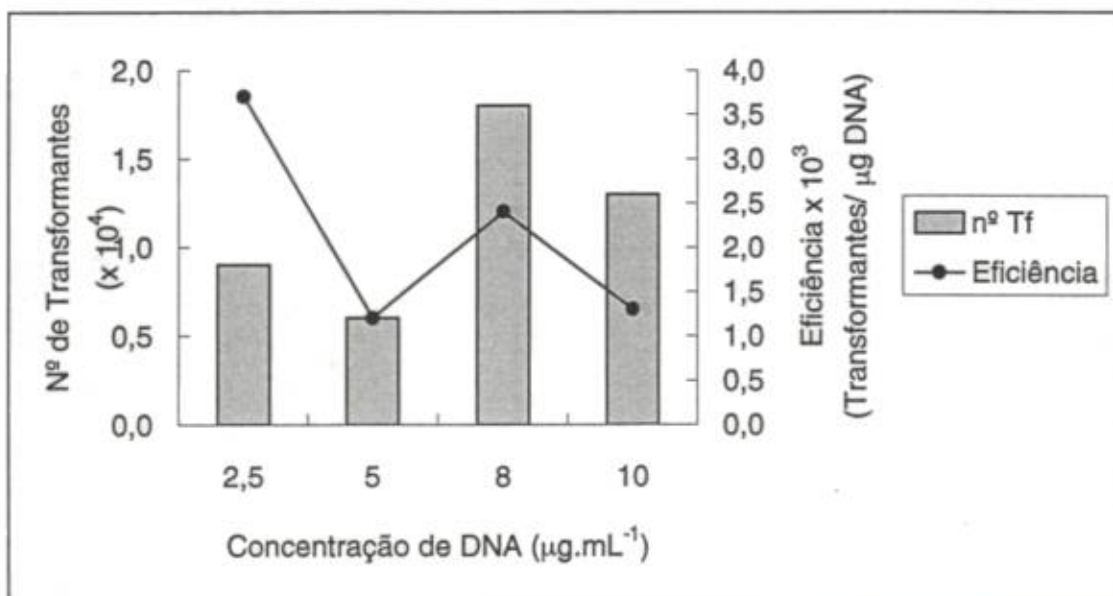


FIGURA 21 - Efeito da Concentração de pCK3 sobre a frequência de transformantes de *H. seropedicae* ZA95.

As células de *H. seropedicae* ZA95 preparadas para eletroporação (item 3.13.1), adicionadas de quantidades crescentes de pCK3 (2,0-10,0 μg), foram submetidas a campo elétrico de intensidade = 8 kV.cm^{-1} em Cell Porator - Gibco BRL -, segundo a metodologia descrita em Materiais e Métodos (item 3.13.). Estas células passaram por um período de 264 minutos de incubação em meio SOC. Posteriormente foram incubadas em meio sólido NFbHPN adicionado de NaI^{10} , Tc^{10} e incubadas por 48 horas em estufa à 30°C. O número de transformantes foi avaliado através de contagem de colônias de acordo com o item 3.9.

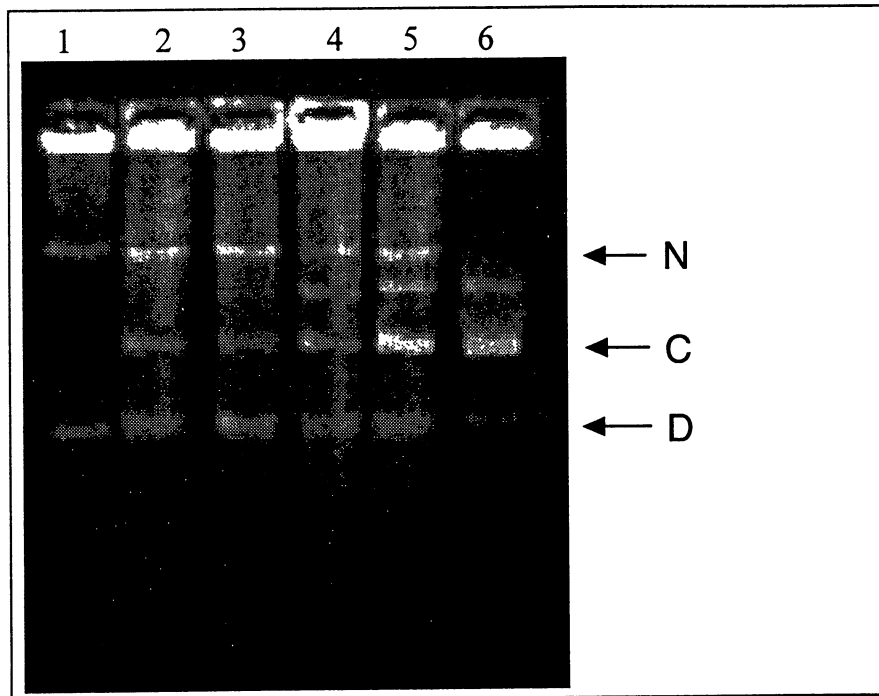


FIGURA 22 - Perfil eletroforético de plasmídeos dos padrões *H. seropedicae* ZA95, *E. coli* HB101(pCK3) e dos transformantes obtidos por Transformação por eletroporação.

N = Plasmídeo Natural, C = pCK3; D = DNA Cromossomal

1 = *H. seropedicae* ZA95

2, 3, 4 e 5 = *H. seropedicae* ZA95 (pCK3)

6 = *E. coli* HB101 (pCK3)

Os perfis eletroforéticos foram determinados após lise alcalina (item 3.15.3). A eletroforese foi conduzida segundo o item 3.17, em gel de agarose na concentração de 0,6%, volume de amostra 20 μ L, com tempo de corrida eletroforética de 18 horas, em temperatura de 4 $^{\circ}$ C, câmara fechada, com voltagem de 10V e 7,0 mA.

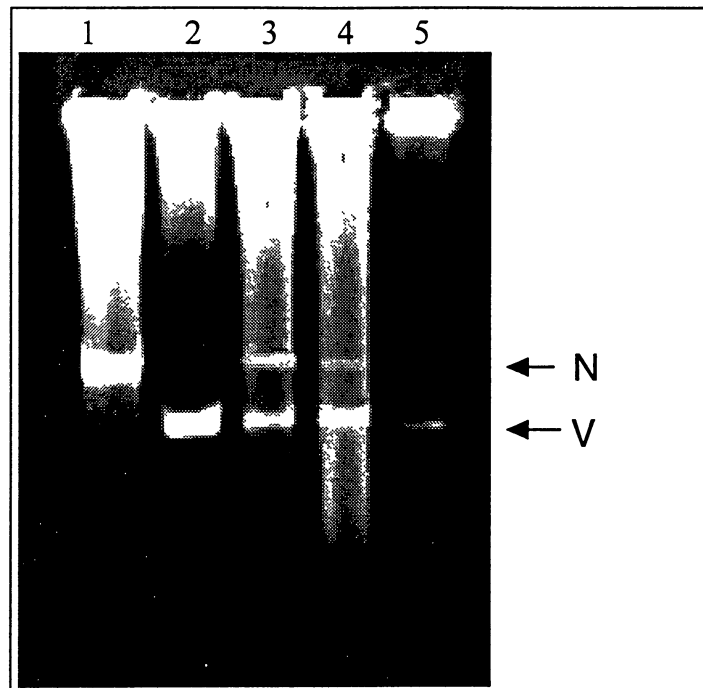


FIGURA 23 - Perfil eletroforético de plasmídeos de padrão *H. seropedicae* Z152 (pVK102) e dos transformantes obtidos por Transformação com células tornadas competentes por Eletroporação à $8\text{kV}/\text{cm}^{-1}$.

N = Plasmídeo Natural, V = pVK102

1 *H. seropedicae* Z152.

4 pVK102.

2, 3 e 5 *H. seropedicae* Z152(pVK102).

Os perfis eletroforéticos foram determinados após lise alcalina (item 3.15.2). A eletroforese foi conduzida segundo o item 3.17., em gel de agarose 0,6% , por 18 horas, à 4°C , em câmara fechada, com voltagem de 12,5V e 8 mA.

4.5.5. EFEITO DO TEMPO NA REGENERAÇÃO DE CÉLULAS ELETROPORADAS EM MEIO S.O.C.

A Tabela VIII mostra o efeito do tempo na regeneração das células submetidas a choque elétrico na ausência de DNA plasmidial. No tempo de regeneração de 30 min., recomendado para células eletroporadas de *E. coli*, foram obtidas 1×10^{11} colônias de *H. seropedicae* Z152. No tempo de regeneração de 264 min., o número de células viáveis aumentou significativamente. Por este motivo, este período de recuperação foi mantido nos demais experimentos de eletroporação.

TABELA VIII - EFEITO DO TEMPO DE REGENERAÇÃO DE CÉLULAS DE *Herbaspirillum seropedicae* Z152 ELETROPORADAS EM MEIO S.O.C.

Tempo de regeneração em S.O.C.(minutos)	Número de células viáveis por mL*
30	$1,0 \times 10^{11}$
264	$2,6 \times 10^{14}$

*O número de células foi determinado segundo o item 3.9 de Materiais e Métodos.

A amplitude do pulso utilizada nestes experimentos foi de 8kV/cm^{-1} .

As células eletroporadas foram cultivadas em S. O.C. segundo o item 3.14.1.1 de Materiais e Métodos.

As células pós regeneração foram cultivadas em meio NFbHPN adicionadas de NaI^{10} , conforme as condições descritas em Materiais e Métodos, item 3.5.4.

4.5.6. EFICIÊNCIA DA ELETROTRANSFORMAÇÃO DE *H. seropedicae* ZA95 E Z152 COM DIFERENTES PLASMÍDEOS

As estirpes ZA95 e Z152 foram submetidas a eletroporação segundo item 3.14.3 na presença dos plasmídeos pCK3, pVK102 e pLAFR3. Pode-se observar na Tabela IX que para a estirpe ZA95 foram obtidos transformantes com o plasmídeo pCK3 cuja eficiência foi de $3,7 \times 10^3$ transformantes/ μgDNA . No caso da estirpe Z152 foram obtidos transformantes somente na presença do plasmídeo pVK102 com uma eficiência de $1,5 \times 10^3$ transformantes/ μgDNA . Nenhum transformante foi obtido na eletroporação de ambas as estirpes com o plasmídeo pLAFR3. Os plasmídeos foram purificados conforme item 3.15.1 de Materiais e Métodos, tendo sido utilizados $1\mu\text{L}$ de DNA para cada experimento de eletroporação.

TABELA IX - EFICIÊNCIA DE TRANSFORMAÇÃO DE *Herbaspirillum seropedicae* ZA95 E Z152 COM DIFERENTES PLASMÍDEOS.

<i>Herbaspirillum seropedicae</i> (estirpe)	Eficiência de Transformação (transformantes/ $\mu\text{g DNA}$)		
	pCK3	pVK102	pLAFR3
ZA95	$3,7 \times 10^3$	—	—
Z152	—	$1,5 \times 10^3$	—

As misturas de DNA plasmidial e células preparadas para eletroporação foram submetidas a choque em campo elétrico de intensidade de 8 kV.cm^{-1} . Posteriormente, foram regeneradas em meio S.O.C. por 264 min. A seguir, foram plaqueadas em meio seletivo NFbHPN adicionado dos antibióticos apropriados (item 3.4.). Os resultados acima representam a média de três experimentos.

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

A análise genética de bactérias depende de métodos de transferência de genes como conjugação e transformação. Perspectivas de utilização e aproveitamento do *Herbaspirillum seropedicae* na agricultura motivaram estudos sobre a genética e fisiologia deste microrganismo (SOUZA *et al.*, 1990; TEIXEIRA, 1991; MACHADO *et al.*, 1994; STEFFENS, 1994; KLASSEN, 1994). O uso de protocolos existentes para transformação e conjugação de bactérias Gram-negativas não foram bem sucedidos. Houve necessidade de introduzir modificações em roteiros já existentes para a manipulação genética desta bactéria. Duas técnicas para a introdução de DNA plasmidial em *H. seropedicae* foram gradualmente modificadas: conjugação e eletroporação.

A conjugação intergenérica de bactérias foi realizada inicialmente usando o roteiro descrito por PEDROSA & YATES (1984) para *Azospirillum brasilense*. Algumas modificações foram introduzidas permitindo melhores resultados na obtenção de transconjugantes de *H. seropedicae*. Uma condição importante na realização das conjugações foi a determinação do tempo de geração da estirpe Z78 (Fig. 6) e da relação entre a idade da cultura das estirpes Z78, Z152 e ZA95 e a viabilidade celular (Tabela I). Os resultados mostrados sugerem que as estirpes Z78 e Z152 apresentam um aumento de células viáveis a medida que aumenta a turbidez da cultura. Já para a estirpe ZA95 o aumento da turbidez da cultura não corresponde a um aumento do número de células viáveis. Este fato pode ser atribuído à presença de metabólitos secundários como o poli- β -hidroxibutirato já observado em outras culturas bacterianas (STEWART & CARLSON, 1986).

Conjugação biparental da estirpe Z78 de *H. seropedicae* com *Escherichia coli* 1230(R68.45) pela metodologia utilizada para *A. brasilense* (protocolo básico) forneceu uma baixa frequência de transconjugantes (Tabela II). A introdução de modificações (Quadro VI) levou a um aumento da frequência de transconjugantes. A formulação do protocolo modificado ou alternativo baseou-se no estudo de alguns parâmetros capazes de proporcionar o aumento da frequência de transconjugantes. Foram investigadas as condições de preparo da mistura de conjugação onde as células foram lavadas previamente com solução salina (Fig. 7), e também os efeitos da adição de $MgCl_2$ na mistura de conjugação (Fig. 8). Em ambos os casos houve aumento do número de transconjugantes. A introdução da etapa de lavagem de células resultou números maiores de transconjugantes por mililitro em culturas com densidades óticas de 1,0 e 1,2 quando comparados com os resultados dos controles (Fig. 7). Aparentemente possíveis interferentes do processo de conjugação são removidos. A presença de ions Mg^{2+} na mistura de conjugação estimulou também o processo de conjugação bacteriana. A função deste cátion divalente poderia ser devida à alteração dos componentes da membrana, melhorando, desta maneira, o contato entre as células de *E. coli* e de *H. seropedicae*.

A pré-incubação da mistura de conjugação composta por *H. seropedicae* Z78 e *E. coli* 1230(R6845) não favoreceu o aumento da frequência de transconjugantes, sendo portanto dispensável (Fig. 9). Estabelecidas e introduzidas as etapas de lavagem com NaCl e adição de $MgCl_2$ foi investigado, a seguir o efeito da fase de crescimento das culturas das estirpes Z78, Z152 e ZA95 sobre a frequência de transconjugantes (Fig. 10, 11 e 12). Em face desses resultados foi estabelecida a utilização de culturas com DO_{550nm} em torno de 1,0, o que corresponde a uma fase do crescimento exponencial das bactérias (Fig. 6). A presença do plasmídeo R68.45 nos transconjugantes foi evidenciada em eletroforeses, onde uma banda adicional aos plasmídeos naturais de Z152 e ZA95 confirma a obtenção de transconjugantes (Figs 14

e 15). Os transconjugantes *H. seropedicae* Z78 (R68.45), que não contém plasmídeos naturais, apresentaram uma única banda de DNA plasmidial (Fig. 13). A aplicação do protocolo modificado na conjugação biparental de *H. seropedicae* Z78 com *E. coli* S17.1(pBMR5) resultou numa frequência de transconjugantes na ordem 10^{-5} que é similar à observada para o plasmídeo R68.45 com relação à estirpe Z78 (Tabelas III e IV) e menor que a obtida para a transferência deste mesmo plasmídeo para *A. brasilense* (10^{-3}) por BAZZICALUPO & GALLORI, 1983. A conjugação triparental com a estirpe ZA95 envolvendo o plasmídeo pCK3 não teve o mesmo resultado das conjugações biparentais com uma frequência na ordem de 10^{-7} (Tabela V). As frequências de *A. brasilense* (pCK3) obtidas pelo protocolo básico por outros autores, são semelhantes aos obtidos pelo protocolo modificado neste trabalho. O protocolo modificado mostrou ser adequado à transferência dos plasmídeos Inc-P1 utilizados neste trabalho.

A utilização de membrana de nitrocelulose para a incubação da mistura de células doadoras e receptoras em meio NFbHPN:LA (Quadro VI), favoreceu o melhor contato entre as células e a obtenção de transconjugantes. Por outro lado a proporção dos meios NFbHPN:LA onde ocorre a conjugação era de 1:1 no protocolo básico e foi modificado para 3:1, pois o tempo de geração das estirpes de *E. coli* é muito menor que o das estirpes de *H. seropedicae*, ocorrendo portanto, um crescimento exagerado das células doadoras, o que poderia estar diminuindo o número de transconjugantes por receptor.

A grande maioria das espécies bacterianas não apresenta a habilidade natural de captar DNA (cromossomal, plasmidial ou de fago) isto é, não apresenta competência. Este fato motivou uma intensa busca por métodos para induzir competência. Hoje, os métodos mais utilizados são o tratamento com CaCl_2 para *E. coli* de MANDEL & HIGA (1970) e transformação de protoplastos bacterianos induzida por polietilenoglicol (PEG) de CHANG & COHEN (1979). Um método

alternativo para transformação é o do uso da corrente elétrica para gerar poros na membrana, o que permite a captação de DNA. A eletroporação foi desenvolvida inicialmente para células eucarióticas por ZIMMERMANN (1983). E em bactérias, foi introduzida a eletroporação por SHIVAROVA *et al.*, 1983, para protoplastos de *Bacillus cereus* (FIEDLER & WIRTH, 1988). Porém, o uso do campo elétrico como meio para a introdução do DNA em células, sem tratamento químico prévio, ocorreu em trabalhos desenvolvidos com *Streptomyces lactis* por HARLANDER, 1987. A otimização dos protocolos de eletroporação é muito importante, uma vez que para cada gênero de bactéria deverá ter investigado vários parâmetros, para que resultem efeitos na eficiência e reprodutibilidade da técnica.

Definiram-se alguns parâmetros para a eletroporação das estirpes Z152 e ZA95 da bactéria Gram-negativa, *H. seropedicae*, sem tratamento químico prévio. Em todas as preparações foram utilizadas células na fase logarítmica de crescimento, sendo esta a fase que resultou o máximo de eficiência na eletrotransformação de outras bactérias Gram-negativas (FIEDLER & WIRTH, 1988). A sobrevivência das células, quando submetidas a diferentes campos elétricos é um parâmetro importante (Figs. 18 e 19). Existe correlação entre sobrevivência ao choque elétrico e a eficiência de eletrotransformação que varia de acordo com o tipo de célula e de como são preparadas para o eletrochoque. Para ter níveis altos de transformação foi necessário optar por baixa taxa de sobrevivência em choque elétrico de maior intensidade. O campo elétrico de 8 kV.cm^{-1} foi o que resultou melhor eficiência de transformação para *H. seropedicae*, estirpe Z152, com o plasmídeo pVK102 (Tabela VI), embora a taxa de sobreviventes ao choque tenha sido menor que 1%, dados compatíveis aos apresentados por MILLER *et al.*, 1988, trabalhando com *Campylobacter jejuni*. Uma etapa de pré-incubação em gelo por 30 minutos antes do choque melhorou a eficiência em 200 vezes o número de transformantes por mL (Tabela VII), mas não foi utilizada nos outros experimentos. Este mesmo comportamento foi citado por TAKETO, 1988,

ao trabalhar com *E. coli* e por LIN, 1994, quando desenvolveu trabalhos de eletroporação com *A. tumefaciens*.

Observamos que ocorre um aumento do número de transformantes até uma determinada concentração de DNA plasmidial, após a qual o número de transformantes decresce. Por outro lado, a eficiência é maior quando a concentração de DNA é menor (Fig. 20 e 21). Algumas explicações são mencionados por SHIGEKAWA & DOWER, 1988, como a presença de fenol, de dodecilsulfato de sódio e outros compostos nas preparações de DNA que possivelmente afetam a eficiência da eletroporação. As minipreparações de plasmídeos utilizadas nas eletroporações do *H. seropedicae* poderiam conter esses contaminantes, daí a queda mais evidente na eficiência.

A recuperação ou regeneração das células, após serem submetidas a campo elétrico, foi realizada em sistemas descritos para outras bactérias (HATTERMANN & STACEY, 1990; GLENN *et al.*, 1982). O tempo de 264 minutos para a incubação no meio S.O.C. mostrou maior viabilidade celular pós choque (Tabela VIII). Em experimentos controles, células foram eletroporadas na ausência de DNA plasmidial ou misturadas com o plasmídeo, sem serem submetidas a choque elétrico. Posteriormente foram plaqueadas em meio seletivo. Nenhum transformante foi observado nesses tratamentos.

A confirmação da presença dos plasmídeos nos transformantes (Figs. 22 e 23) mostra que a eletrotransformação ocorreu com êxito. Embora as eficiências em torno de 10^3 transformantes/ μg DNA sejam bem menores que as eficiências para *E. coli* na ordem de 10^9 e 10^{10} transformantes/ μg DNA (ZABAROVSKI & WINBERG, 1990), e próximas das obtidas para outras bactérias como *Pseudomonas putida* na ordem de 10^4 transformantes/ μg DNA (IWASAKI *et al.*, 1994), são suficientes para permitir estudos genéticos das diferentes estirpes de *H. seropedicae*.

Comparando as técnicas, transformação e conjugação, esta última parece ser um método mais simples. Entretanto, requer *oriT* que deve estar presente nos plasmídeos e genes *tra* nas células doadoras. A eletroporação, por sua vez, elimina o requerimento de células doadoras, assim como funções mobilizadoras nos vetores utilizados.

Os protocolos sugeridos podem, ainda, não apresentar a máxima eficiência do potencial de transformação do *H. seropedicae*, porém, mostraram-se eficazes na obtenção de transformantes.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

1. A conjugação de *Herbaspirillum seropedicae* das estirpes Z78, Z152 e ZA95 foi possibilitada após modificações de um protocolo adequado para *Azospirillum brasilense*. Permitindo a obtenção de frequências de transconjugantes da ordem de 10^{-5} a 10^{-7} .

2. A eletroporação de *Herbaspirillum seropedicae* das estirpes Z152 e ZA95 empregando intensidade de campo elétrico de $8\text{kV}\cdot\text{cm}^{-1}$ permitiu a obtenção de 10^2 e 10^3 transformantes/ μg DNA com os plasmídeos pVK102 e pCK3 respectivamente.

7. ANEXOS

7. ANEXOS

7.1. TAMPÕES E SOLUÇÕES:

Os tampões e as soluções comumente utilizados estão listados a seguir, tendo sido preparados de acordo com MANIATIS *et al.*, 1982 e SAMBROOK *et al.*, 1989.

7.1.1. SOLUÇÃO ESTOQUE 2M DE Mg^{++} É COMPOSTA POR:

Componente	Quantidade (g.100mL ⁻¹)
MgCl ₂ .6H ₂ O	20,33g
MgSO ₄ .7H ₂ O	24,65g
Água destilada qsp 100 mL	

Esta solução deve ser autoclavada ou esterilizada por filtração.

7.1.2. SOLUÇÃO ESTOQUE DE RNASE:

A solução estoque (10 mg.mL⁻¹) de RNase (Sigma) foi preparada em tampão Tris.HCl 10 mM pH 7,5, contendo 15 mM de NaCl, fervida durante 10 minutos para inativação das DNases contaminantes e mantida a -20°C.

7.1.3. MISTURAS DE LISE CELULAR:

SDS 1% em NaOH 0,2N.

SDS 1% e EDTA 1,77% em NaOH 80 mN, pH 12,6

7.1.4. SOLUÇÕES DE NEUTRALIZAÇÃO PARA O PREPARO DE DNA:

KAcF: Acetato de Potássio 3M em Ácido fórmico 1,8M
pH 4,8.

Tris -salt:Tris - HCl 0,7M pH 8,0 contendo NaCl 3,45mM.

7.1.5. TAMPÃO DE RESSUSPENSÃO CELULAR:

GET: Tris -HCl 25mM pH 8,0, contendo glucose 50 mM
e EDTA 10 mM.

T₁₀ E₁: 10 mM de Tris - HCl pH 8,0 e 1 mM de EDTA.

7.1.6. TAMPÃO ELETROFORÉTICO:

TBE: Tris -base 89 mM pH8,0 contendo ácido bórico 89mM
e EDTA 2,5mM.

7.1.7. SOLUÇÃO CORANTE ELETROFORÉTICO:

FSUDS: Azul de bromofenol 0,25 %, SDS 0,1 %, Ficoll 20 %
em T₁₀ E₁

7.1.8. SOLUÇÃO PARA PRECIPITAÇÃO DE DNA

KacF: Acetato de potássio 5M	60 mL
Ác. acético glacial	11,5 mL
H ₂ O	28,5 mL

ACE: Acetato de Sódio 0,3M pH8,0 em etanol 90% v/v.

NH₄⁺Ac O: Acetato de Anônio 0,83M pH 7,3 em etanol 80% v/v.

7.1.9. SOLUÇÃO TAMPÃO DE SOLUBILIZAÇÃO DE DNA

T₁₀ E₁: Tris - HCl 10mM pH 8,0 contendo EDTA 1mM.

7.1.10. PREPARO DAS SOLUÇÕES DE FENOL, CLORO-FÓRMIO-ÁLCOOL ISOAMÍLICO E FENOL-CLOROFÓRMIO: ÁLCOOL ISOAMÍLICO:

O fenol foi equilibrado com tampão Tris-HCl seguindo procedimento descrito por MANIATIS *et al.*, 1982, acrescido de 8-hidroxiquinoleína (0,1%) e 1 volume de Tris base 0,5M. A fase fenólica foi extraída com tampão Tris-HCl 0,1M pH 8,0, contendo 0,2% de β-mercapto-

etanol, até que o pH da fase aquosa fosse igual ou superior a 7,5. A solução de clorofórmio-álcool isoamílico foi preparada misturando-se 24 partes de clorofórmio e uma parte de álcool isoamílico. A solução de fenol-clorofórmio: álcool isoamílico foi preparada misturando-se uma parte de fenol tamponado e uma parte de clorofórmio- álcool isoamílico (24:1).

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ACHTMAN, M.; WILLETS, N.; CLARK, A.J. - Beginning a Genetic Analysis of Conjugational Transfer Determined by the F Factor in *E. coli* by isolation and carcterization of transfer-deficient Mutants. **J. Bacteriol.** , Washington, v. **106** n.2 p.529-538, 1971.
 2. ACHTMAN, M.; KENNEDY, N.; SKURRAY, R. - Cell-cell interactions in conjugating *E. coli* : Role of tra T protein in surface exclusion. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, Washington, v. **74**, p. 5104- 5108, 1977.
 3. ACHTMAN, M. - Genetics of the F Sex Factor in Enterobacteriaceae. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, Berlin, v. **60** p. 79-124, 1973.
 4. AMERICAN ASSOCIATION FOR THE ADVANCEMENT OF SCIENCE
- The new harvest: genetically engineered species. **Science**, Washington, v. **244**, n. 4910, p. 1225-1412, 1989.
 5. AUGUSTIN, J.; FRIEDRICH, G. - Transformation of *S. epidermidis* and other staphylococcal species with plasmid DNA by electroporation. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdan, v. **66**, p. 203-207, 1990. [Letter]
-

6. AZEVEDO, J.L.; AZEVEDO, M.O.; ASTOLFI FILHO, S. - **Genética de microrganismos em biotecnologia e engenharia genética.** São Paulo, Fealq, 1985.
 7. BALDANI, J.I.; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; DÖBEREINER, J. - Characterization of *Herbaspirillum seropedicae* gen. nov. , sp. nov. , a root associated nitrogen fixing bacterium. **Int. J. Syst. Bacteriol.** , Washington, v. **36**, p. 86-93, 1986.
 8. BALDANI, J.I. ; BALDANI, V.L.D.; SELDIN, L.; SAMPAIO, M.J.A.M.; DÖBEREINER, J. - A fourth *Azospirillum* species from cereal roots. **An. Acad. Bras. Cienc.** , Rio de Janeiro, v. **56**, p.365, 1984.
 9. BALDANI, V.L.D.; BALDANI, J.I.; OLIVARES, F.; DÖBEREINER, J. - Identification and ecology of *Herbaspirillum seropedicae* and the closely related *Pseudomonas rubrisubalbicans*. **Symbiosis**, Rehovot, v.13 , p. 65-73, 1992.
 10. BAZZICALUPO, M.; GALLORI, E. - Genetic analysis in *Azospirillum*. *In*: KLINGMULLER, W., ed. - **AZOSPIRILLUM II : Genetics, Physiology, Ecology.** Basel, Birkhäuser- Verlag, p. 24-28, 1983. [Experientia Supplementum v.48]
 11. BELLIVEAU, B. H. ; TREVORS, J. T. - Transformation of *B. cereus* vegetative cells by Electroporation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v.55, n.6, p. 1649-1652, 1989.
-

12. BERG, P.; BALTIMORE, D.; BRENNER, S.; ROBLIN III, R.O.;
SINGER, M.F. Asilomar Conference on Recombinant DNA
molecules. **Science**, Washigton D.C., v. **188**, p. 991-994, 1975.
 13. BERGER, S.L. - Quantifying 32p-labeled and unlabeled nucleic acids.
Methods Enzimol., San Diego, v.**152**, p. 49-54, 1987.
 14. BERGMANS, H.E.N.; VAN DIE, I.M.; HOEKSTRA, W.P.M. -
Transformation in *E. coli*: Stages in the process. **J. Bacteriol.**,
Washington, v.**146**, n. 2, p. 564-570, 1981.
 15. BETHESDA RESEARCH TECHNOLOGIES, INC. - **Cell - Poration
Electroporation System** , Galthersburg, 1987, 27p.
 16. BOTSTEIN, D.; SHORTLE, D. - Strategies and Aplications of in Vitro
Mutagenesis. **Science**, (Washigton D.C.), v. **229**, n.4719, p. 1193-
1201, 1985.
 17. BOYER, H. W.; ROULLARD - DUSOIX, D. - A complementation
analysis of restriction and modification of DNA in *E. coli* . **J. Mol.
Biol.**, London, v.**41**, p. 459- 472, 1969.
 18. BRADLEY, D.E.; TAYLOR, D.E.; COHEN, D.R. - Specification of
surface mating Systems Among Conjugative Drug Resistance
Plasmids in *E. coli* K-12. **J. Bacteriol.** , Washington, v.**143**, n. 3, p.
1466-1470, 1980.
-

-
19. BROCK, T.D.; MADIGAN, M. T. - **Biology of Microorganisms**, 6.ed.
Prentice-Hall International, 1991. 874p.
20. CASADABAN, M.; COHEN, S.N. - Analysis of gene control signals by
DNA fusion and cloning in *E. coli*. **J. Mol. Biol.**, London, v. **138**, p.
179- 207, 1979/1980.
21. CHANG, S. ; COHEN, S.N. - High frequency transformation of *B. subtilis*
protoplast by plasmid DNA. **Mol.Gen. Genet.**, Berlin, v.**168**, p. 111-
115, 1979.
22. COHEN, A.; LABAN, A. - Plasmidic recombination in *Escherichia coli*
K-12: role of rec F gene function. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v.**198**,
p. 471-474, 1983.
23. COHEN, S.N.; CHANG, A.C.Y.; HSU, L. - Nonchromosomal Antibiotic
Resistance in Bacteria: Genetic Transformation of *E. coli* by R- Factor
DNA. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Washington, v. **69**, n. 8, p. 2110 -
2114, 1972.
24. COURTOIS, J.; COURTOIS, B.; GUILLAUME, J. - High frequency
transformation of *Rhizobium meliloti*. **J. Bacteriol.** Washington, v.
170, n. 12, p. 5925-5927, 1988
25. COX, M.M.; LEHMAN, I.R. - Enzymes of general recombination. **Annu.**
Rev. Biochem., Palo Alto, v.**56**, p. 229-262, 1987.
-

-
26. CRAIG, N.L. - The mechanism of conservative Site-specific recombination. **Annu. Rev. Genet.**, , Palo Alto, v.22, p.77-105, 1988.
27. CURTISS III, R.; CARO, L.G.; ALLISON, D.P.; STALLIONS, D.R. Early Stages of Conjugation in *Escherichia coli*. **J. Bacteriol.** , Washington, v. 100, n.2, p. 1091-1104, 1969.
28. CURTISS III, R.; CHARAMELLA, L.R.; STALLIONS, D.R.; MAYS, J.A. - Parental Functions during conjugation in *E. coli* K-12. **Bacteriol. Rev.** , Washington, v.32, n. 4, p. 320-348, 1968.
29. DAVIS, B.D. - Isolation of biochemically deficient mutants of bacteria by penicillin. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, Washington, v.70, p. 4267, 1948.
30. DE LUCIA, P.; CAIRNS, J. - Isolation of an *E. coli* strain with a mutation affecting DNA polymerase. **Nature**, London, v.224, p. 1164-1166, 1969.
31. DITTA, G.; STANFIELD, S.; CORBIN, D. HELINSKI, D. R. - Broad host range DNA cloning system for G.N. bacteria: Construction of a gene bank of *Rh. meliloti*. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 27, p. 7347-7351, 1980.
32. DÖBEREINER, J. - The genera *Azospirillum* and *Herbaspirillum*. In: BALLOWS, A.; TRIIPER, H.G.; DWORKIN, M.; HARDER, W., eds. **The Prokariotes** Berlin: Springer Ferlag, 1991. p.2236-2253.
-

-
33. DÖBEREINER, J. - History and new perspectives of diazotrops in association with non-leguminous plants. **Symbiosis**, Rehovot, v. **13**, p. 1-13, 1992.
34. DÖBEREINER, J.; PEDROSA, F.O. - **Nitrogen Fixing bacteria in nonleguminous crop plants**. Madison, Science Tech. Publishers, 1987. 155p.
35. DOWER, J.W.; MILLER, J.F.; RAGSDALE, C.W. - High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v. **16**, n.13, p. 6127 - 6145, 1988.
36. DRESSLER, D.; POTTER, H. - Molecular mechanisms in genetic recombination. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v.**51**, p.727-761, 1982.
37. DURLAND, R.H. Mutations in the *trfA* Replicon Gene of Broad- Host Range pRK2 Result in Elevated plasmid Copy Numbers. **J. Bacteriol.**, Washington, v. **172**, n.7, p. 3859- 3867, 1990.
38. EISENSTARK, A. - Genetic Recombination in Bacteria. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.**11**, p. 369-396, 1977.
39. EYNARD, N.; SIXON, S.; DURAN, N.; TEISSIE, J. - Fast kinetic studies of *E. coli* electrotransformation. **FEBS (Fed. Eur. Biochem. Soc.)**, Amsterdam, v. **209**, p.431-436, 1992. [Letter]
40. FALK, E.C.; JOHNSON, J. L.; BALDANI, V.L.D.; DÖBEREINER, J. - Deoxiribonucleic and ribonucleic acid homology studies of the genera
-

Azospirillum and *Conglomeromonas*. **Int. J. Syst. Bacteriol.** ,

Washington, v. 36, p. 80 - 85, 1986.

41. FIEDLER, S.; WIRTH, R. - Transformation of Bacteria with Plasmid DNA by Electroporation. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. 170, p. 38 - 44, 1988.
42. FIGURSKI, D. H.; HELINSKI, D.R. - Replication of an origin-containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washigton, v. 76, n. 4, p. 1648 - 1652, 1979.
43. FOLKHARD, W.; LEONARD, K.R.; MALSEY, S.; MARVIN, D.A.; DUBOCHET, A.; ENGEL, A.; ACHTMAN, M.; HELMUTH, R. - X-ray diffraction and electron microscope studies on the structure of bacterial F pili. **J. Mol. Biol.**, London, v.130, p. 145- 160, 1979.
44. FRANCHE, C.; CORRELO, E.; GOUTHIER, D. - Mobilization of the chromosome of *A. brasilense* by plasmid R68.45. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdam, v. 10, p. 199-202, 1981. [Letter]
45. FRANCHE, C.; ELMERICH, C. Physiological properties and plasmid content of several strains of *A. brasilense* and *A. lipoferum*.
In: _____ **Physiology and Plasmids of *Azospirillum***, v. 132A, n. 1, 1981.
-

46. GERHARDT, P.; MURRAY, R. G. E.; WOOD, W. A.; KRIEG, N.R. - **Methods for general and molecular bacteriology**. Washington, American Society for Microbiology, 1994. p. 297- 385.
47. GILLIS, M.; DÖBEREINER, J.; POT, B.; GOOR, M.; FALSEN, E.; HOSTE, B.; REINHOLD, B. ; KERSTERS, K. - Taxonomic relationships between [*Pseudomonas*] *rubrisubalbicans* , some clinical isolates (EF group 1), *Herbaspirillum seropedicae* and [*Aquaspirillum*] *autotrophicum*. In: POLSINELLI, M.; MATERASSI, R.; VINCENZINI, M. **Nitrogen Fixation**. Dordrecht, Kluwer Acad. Publish., 1990. p. 293-294.
48. GLENN, A.W.; ROBERTO, F.F.; WARD, T.B. - Transformation of *Acidiphilium* by electroporation and conjugation. **Can. J. Microbiol.** , Ottawa, v. **38**, p. 387- 392, 1992.
49. GOLDBERG, R.B. - Direct Selection for P-sensitive Mutants of Enteric Bacteria **J. Bacteriol.** , Washington, v.**118**, n. 3, p. 810-814, 1974.
50. GOOR, M.; FALSEN, E.; POT, B.; GILLIS, M.; KERSTERS, K.; DE-LEWY, J. - Taxonomic position of the phytopathogen *Pseudomonas rubrisubalbicans* and related clinical isolates. In: XIV INTERNATIONAL CONGRESS OF MICROBIOLOGY, Wanchester, England, 1986. **Abstracts**. Wanchester [Abstracts]
-

-
51. HAAS, D.; HOLLOWAY, B.W. R. - Factor Variants with Enhanced Sex Factor Activity in *P. aeruginosa*. **Mol. Gen. Genet.**, Berlin, v. **144**, p. 243-251, 1976.
52. HANAHAN, D. "S.O.C. medium for competent cells". **J. Mol. Biol.**, London, v. **166**, p. 557, 1983.
53. HARDY, K. **Bacterial plasmids**. Nairobi, Thomas Nelson, 1981. 104p.
54. HARLANDER, S.; In: FERRETTI, J.J. AND CURTISS, R. III (eds.) - ***Streptococcal Genetics Amer. Soc. Microbiol.*** Washington, D.C., 1987.
55. HATTERMANN, D.R.; STACEY, G. - Efficient DNA transformation of *Bradyrhizobium japonicum* by electroporation. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. **56**, n. 4, p. 833- 836, 1990.
56. HERMANS, J.; BOSCHLOO, J.G. ; BONT, J.A.M. - Transformation of *M. aurum* by electroporation: the use of glycine, lysozyme and isonicotinic acid hidrazide in enchancing transformation efficiency. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdan, v. **72**, p. 221-224, 1990. [Letter]
57. HOLLIDAY, R. - A mechanism for gene conversion in fungi. **Genet. Res.**, Cambridge, v. **5**, p. 282-304, 1964.
58. HOLLOWAY, B.W. - Plasmids that mobilize bacterial chromosome **Plasmid**, Duluth, v. **2**, p. 45-54, 1978.
-

59. INGRAM, L.C.; RICHMOND, M.H.; SYKES, R.B. - Molecular Characterization of R Factor Implicated in Carbenicillin Resistance of a Sequence of *Pseudomonas aeruginosa* Strain Isolated from Burns. **Antimicrob. Agents Chemother.**, Washington, v. 3, n.2, p. 279 - 288, 1973.
60. IPPEN - IHLER, K.A.; MINKLEY JR., E.G. - The conjugation system of F, the fertility Factor of *E. coli* **Annu. Rev. Genet.** , Palo Alto, v. 20, p. 593 -624, 1986.
61. IWASAKI, K. et al. - Transformation of *Pseudomonas putida* by Electroporation. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. 58, n. 5, p. 851-854, 1994.
62. JOHNSTON, A.W.B.; BERINGER, J.E. - Chromosomal recombination between *Rhizobium* species. **Nature**, London, v. 267, p. 611- 613, 1977.
63. JONES, I.M.; PRIMROSE, S.B.; ROBINSON, A.; ELLWOOD, D.C. - Effect of Growth Rate and Nutrient Limitation on the Transformability of *E. coli* with Plasmid DNA. **J. Bacteriol.** , Washington, v. 146, n. 3, p. 841- 846, 1981.
64. KADO, C.I. & LIU, S.T. - Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. **J. Bacteriol.** , Washington, v. 145, n. 3, p. 1365-1373, 1981.
-

65. KAO, A. S. T.; LIN, J. J. - Transformation of *A. tumefaciens* with T-DNA Vector Using High-Voltage Electroporation. **Focus**, Idaho, v. 15, n. 3, p. 84-87, 1993.
66. KENNEDY, C. & DRUMMOND, M.H. The use of cloned *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii* **J. Gen. Bacteriol.**, v.131, p. 1787 - 95, 1985.
67. KLASSEN, G. - **Contribuição à fisiologia da fixação de nitrogênio em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1994. [Tese - Mestrado em Ciências - Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná]
68. KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; FUNAYAMA, S.; RIGOLU. Nitrogen fixation by *Herbaspirillum seropedicae* strains under different physiological conditions. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 23, Caxambú SP, 1994. **Resumo**. Caxambu, 1994. p.58 (Resumos,23)
69. KLECKNER, N. - Transposable elements in prokaryotes. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.15, p. 341 - 404, 1981.
70. KNAUF, V. C.; NESTER, E.W. - Wide Host Range Cloning Vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. **Plasmid**, Duluth, v. 8, p. 45-54, 1982.
-

65. KAO, A. S. T.; LIN, J. J. - Transformation of *A. tumefaciens* with T-DNA Vector Using High-Voltage Electroporation. **Focus**, Idaho, v. 15, n. 3, p. 84-87, 1993.
66. KENNEDY, C. & DRUMMOND, M.H. The use of cloned *nif* regulatory elements from *Klebsiella pneumoniae* to examine *nif* regulation in *Azotobacter vinelandii* **J. Gen. Bacteriol.**, v.131, p. 1787 - 95, 1985.
67. KLASSEN, G. - **Contribuição à fisiologia da fixação de nitrogênio em estirpes de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1994. [Tese - Mestrado em Ciências - Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná]
68. KLASSEN, G.; PEDROSA, F.O.; FUNAYAMA, S.; RIGOLU. Nitrogen fixation by *Herbaspirillum seropedicae* strains under different physiological conditions. *In*: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 23, Caxambú SP, 1994. **Resumo**. Caxambu, 1994. p.58 (Resumos,23)
69. KLECKNER, N. - Transposable elements in prokaryotes. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v.15, p. 341 - 404, 1981.
70. KNAUF, V. C.; NESTER, E.W. - Wide Host Range Cloning Vectors: A cosmid clone bank of an *Agrobacterium* Ti plasmid. **Plasmid**, Duluth, v. 8, p. 45-54, 1982.
-

79. MACHADO, H.B. - **Isolamento e caracterização de mutantes de *Azospirillum brasilense* constitutivos para fixação de nitrogênio.**
Curitiba, 1988. [Tese - Mestrado em Ciências - Bioquímica Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].
80. MACHADO, I. M. P.; YATES, M.G. ; SOUZA, E.M.; MACHADO, H.B.; FUNAYAMA, S.; RIGO, L.U.; PEDROSA, F.O. - Cloning and characterization of nifHDK genes from *Herbaspirillum seropedicae* strain SMR1. *In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR*, 23, Caxambú-SP, 1994. **Resumos.** Caxambu, 1994. p.57. (Resumo, 23)
81. MALLONEE, H.D.; SPECKMAN, R.A. - Transformation of *Bacillus polymyxa* with Plasmid DNA. **Appl. Environ. Microbiol.**, Washington, v. **55**, n. 10, p. 2517- 2521, 1989.
82. MANDEL, M. & HIGA, A. - Calcium- dependent Bacteriophage DNA Infection **J. Mol. Biol.**, London, v. **53**, p. 159-162, 1970.
83. MANIATIS, T.; FRISCH, E.F.; SAMBROOK, J. - **Molecular cloning: a laboratory manual.** New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1982. 545p.
-

84. MATHIAS, A.L.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F.O. -
L-arabinose metabolism in *Herbaspirillum seropedicae*. **J. Bacteriol.**
Washington, v. 171, n. 9, p. 5206- 5209, 1989.
85. MATHIAS, A.L. - **Metabolismo da L- arabinose em *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1988. [Tese -Mestrado em Ciências -
Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do
Paraná].
86. MC CLINTOCK, B. - Chromosome organization and genetic expression.
Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., New York, v. 21, p. 197-
216, 1951.
87. MC CLINTOCK, B. - The control of gene action in Maize **Brookhaven Symp. Biol.** v. 8, p. 162- 184, 1965.
88. MERRICK, M.J. - Hibridization and selection for penicillin production in
Aspergillus nidulans - a biometrical approach for strain improvement.
*In: GENETIC SYMPOSIUM OF INDUSTRIAL
MICROORGANISM.* New York. 1976. **Abstracts.** New York, 1976,
Academic Press. p.229 [Abstracts]
89. MESELSON, M.S.; RADDING, C.M. - A general model for genetic
recombination **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, Washington, v. 72, p.
358-361, 1975.
-

90. MEYERS, J.A.; DAVID, S.; ELWELL, L.P.; FALKOW, S. - Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. **J. Bacteriol.**, Washington, v.127, n.3, p. 1529 - 1537, 1976.
91. MICKEL, S.; ARENA, V.; BAUER, W. - Physical properties and gel electrophoresis behavior of R-12-derived plasmids DNAs. **Nucleic Acids Res.**, Oxon, p. 1465- 1483, 1977.
92. MILLER, J.F.; DOWERR, W.J.; TOMPKINS, L.S. - High- voltage electroporation of bacteria: Genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA. **Proc. Natl. Acad. Sci. - USA**, Washington, v. 85, p. 856 - 860, 1988.
93. MILLER, J.H. Determination of viable cell counts: bacterial growth curves. *In:* _____ - **Experimentes in molecular genetics**. 2 ed. New York, Cold Spring Harbour Laboratory, 1972. p.31- 36.
94. MILLER, J.H.; *A Short Course in Bacterial Genetics*.
In: _____ - **A laboratory manual and handbook for *Escherichia coli* and related bacteria**. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. , 1992. 456p.
95. MORRISON, D. A. - Transformation and Preservation of Competent Bacterial Cells by Freezing. **Methods Enzymol.**, San Diego, v. 68, p. 326-331, 1979.
-

96. NEIL, D.J.M. - Introduction of plasmid DNA into *Streptomyces lividans* by electroporation. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdam, v. 42, p. 239-244, 1987. [Letter]
97. NEUMANN, E.; SHAEFER-RIDDER, M.; WANG, Y.; HOFSCHEIDER, P.H. - Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. **EMBO JOURNAL**, v.1, p.841-845, 1982.
98. NORGARD, M.V.; KEEM, K.; MONAHAN, J.J. - Factors affecting the transformation of *E. coli* strain χ 1776 by pBR322 plasmid DNA **Gene**, New York, v. 3, p. 279-292, 1978.
99. OISHI, M. & COSLOY, S.D. - The Genetic and Biochemical Basis of the Transformability of *E. coli* K-12. **Biochem. Biophys. Res. Comm.** v. 49, n. 6, p. 1568-1572, 1972.
100. OLIVARES, F. L.; BALDANI, V.L.D.; REIS, V.; BALDANI, J. I. ; DÖBEREINER, J. - Ecology of the endophytic diazotrophs *Herbaspirillum* spp. **Fitopatol. Bras.**, Brasília, v. 18, p. 313, 1993.
101. PABO, C.O. - Protein -DNA- recognition. **Annu. Rev. Biochem.** , Palo Alto, v. 53, p. 293-321, 1984.
-

102. PEDROSA, F.O.; YATES, M.G. - Regulation of nitrogen fixation (nif) genes of *Azospirillum brasilense* by nifA and ntr (gln) type gene products. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdam, v. 23, p. 95-101, 1984. [Letter]
103. PEDROSA, F.O. - Physiology, biochemistry, and genetics of *Azospirillum* and other root -associated nitrogen fixing bacteria. **Crit. Rev. Plant Sci.**, Boca Raton, v. 6, p. 345- 384, 1988.
104. PEMBERTON, J.M.; COOKE, S.; BOWER, A.R.St.G. - Gene transfer mechanisms among members of genus *Rhodopseudomonas*. **Annu. Microbiol.**, Paris, v. 134 B., p.195-204, 1983.
105. PEREIRA, J.A.R. ; CAVALCANTE, V.A. ; BALDANI, J. I. ; DÖBEREINER, J. - Field inoculation of sorghum and rice with *Azospirillum* spp. and *Herbaspirillum seropedicae*. In: SKINNER, F. A. ; BADDLEY, R.M. ; FENDRIK, I., eds. - **Nitrogen Fixation with non-legumes**. Doedrech, Kluwer Academic Publishers, 1989, p. 219-224.
106. PIMENTEL, J.P. & OLIVARES, F. - Dinitrogen fixation and infection of grass leaves by *P. rubrisubalbicans* and *Herbaspirillum seropedicae*. **Plant and Soil**, v. 137, p 61-65, 1991.
-

107. PLAZINSKI, J.; DART, P.J.; ROLFE, B.G. - Plasmid visualization and *nif* gene location in nitrogen-fixing *Azospirillum* strains. **J. Bacteriol.**, Washington, v. **155**, n. 3, p. 1429-1433, 1983.
108. POTTER, H. - Review - Electroporation in Biology: Methods, Applications, and Instrumentation. **Anal. Biochem.**, Duluth, v. **174**, p. 361-373, 1988.
109. RADDING, C.M. - Helical Interaction in Homologous Pairing and Strand Exchange Driven by Rec A Protein. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v.**266**, n. 9, p. 5355-5358, 1991.
110. ROBSON, R.; CHESSYRE, J.A.; WHEELER, C.; JONES, R.; WOODLEY, P.R.; POSTGATE, J.R. - Genome Size and Complexity in *Azotobacter chroococum*. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.**130**, p. 1603-1612, 1984.
111. RODRIGUEZ, R.L.; TAIT, R.C. - **Recombinant DNA Techniques: an introduction**. Menlo Park, USA, The Benjamin/ Cummings Publishing Company, 1983.
112. ROSADO, A.; DUARTE, G.F.; SELDIN, L. - Optimization of electroporation procedure to transform *B. polymyxa* SCE 2 and other nitrogen-fixing *Bacillus*. **J. Microbiol. Methods**, Amsterdam, v. **19**, p. 1-11, 1994.
-

113. SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning a laboratory manual** 2 ed. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press. , 1989.
114. SCARPIM, A.R.; RIGO, L.U.; FUNAYAMA, S.; PEDROSA, F.O.
Análise de resistência a diferentes antibióticos das estirpes Z78, ZA95 e Z152 de *H. seropedicae*. In: EVENTO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFPR, 2, Curitiba, 1994. **Anais**. Curitiba, 1994. p. 69
115. SHIGEKAWA, K.; DOWER, W.J. - Electroporation of eucaryotes and procaryotes: a general approach to the introduction of macromolecules into cells. **Biotechniques**, Natick, U.S.A., v. 6, p. 742- 751, 1988.
116. SHIVAROVA, N.; FÖRSTER, W.; JACOB, H.E. and GRIGIRIVA, R. - Microbiological implications of electric fields effects. VII. Stimulation of plasmid transformation of *Bacillus cereus* protoplasts by electric field pulses. **Z. Allg. Mikrobiol.**, v.23, p.595-599, 1983.
117. SIMON, R.; PRIEFER, U.; PÜHLER, A. - A broad host range mobilization system for “*in vivo*” genetic engineering: transposon mutagenesis in Gram- negative bacteria. **Bio - technology**, New York, v. 1, p. 784 - 791, 1983.
-

118. SIROVER, M.A.; LOEB, L.A. - On the fidelity of DNA replication- effect of Metal activators during synthesis with avian myeloblastosis virus DNA polymerase. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. **252**, n.11, p. 3605- 3610, 1977.
119. SIROVER, M.A.; DUBE, D.K.; LOEB, L.A. - On the fidelity of DNA replication metal activation of *E. coli* DNA Polymerase I. **J. Biol. Chem.**, Baltimore, v. **254**, n. 1, p. 107 - 111, 1979.
120. SMITH, G.R. - Conjugal Recombination in *E. coli*: Methods and Mechanisms. **Cell**, Cambridge, v. **64**, p. 19-27, 1991.
121. SMITH, G.R. - Homogous recombination in procaryotes. **Microbiol. Rev.** Washington, v. **52**, p.1-28, 1988.
122. SMITH, H.O.; DANNER, D.B.; DEICH, R.A. - Genetic Transformation. **Annu. Rev. Biochem.**, Palo Alto, v. **50**, p. 41-68, 1981.
123. SMITH, M. - In vitro mutagenesis. **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. **19**, p. 423-462, 1985.
124. SODERGREN, E. J.; FOX, M.S. - Effects of DNA sequence non-homology on formation of bacteriophage lambda recombinants. **J. Mol. Biol.**, London, v. **130**, p. 357-377, 1979.
-

125. SOUZA, E. C. ; COSTA, S.O.P. - Recombinação em Bactérias.
In: _____ - **GENÉTICA MOLECULAR DE
MICRORGANISMOS. Os fundamentos da Engenharia Genética.**
São Paulo: Manole, 1987. p. 250-272.
126. SOUZA, E. M. - **Clonagem, caracterização e sequenciamento dos genes
nifA e nifB de *Herbaspirillum seropedicae*.** Curitiba, 1990. [Tese
- Doutorado em Ciências - Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas,
Universidade Federal do Paraná].
127. SOUZA, E. M. ; FUNAYAMA, S. ; RIGO, L. U. ; YATES, M. G. ;
PEDROSA, F.O. - Sequence and structural organization of a nifA-
like gene and part of a nifB-like gene of *Herbaspirillum*
seropedicae strain Z78. **J. Gen. Microbiol.**, Reading, v.137, p.
1511-1522, 1991.
128. SOUZA, E.M. ; YATES, M.G.; FUNAYAMA, S. ; RIGO, L.U.;
MACHADO, H.B.; STEFFENS, M.B.R.; PEDROSA, F.O. Effects
of oxigen and ammonium on the expression of nifA and nifB genes
of *Herbaspirillum seropedicae*. *In:* REUNIÃO DA SOCIEDADE
BRASILEIRA DE BIOQUÍMICA E BIOLOGIA MOLECULAR, 23,
Caxambú, 1994. **Resumos.** Caxambú, 1994. p. 57. (Resumo).
-

129. STASKAWICZ, B.; DAHLBECK, D.; KEEN, N.; NAPOLI, C.
Molecular Characterization of Cloned Avirulence Gene from Race 0
and Race 1 of *P.syringae* pv *glycinea*. **J. Bacteriol.** , Washington, v.
169, n.12, p. 5789-5794, 1987.
130. STEFFENS, M. B. R. - **Clonagem, isolamento e caracterização do
gene rec A de *Herbaspirillum seropedicae* estirpe Z78.** Curitiba,
1994. [Tese - Doutorado em Ciências - Bioquímica - Setor de
Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].
131. STEINHART, W.L.; HERRIOT, R.M. - Genetic integration in the
heterospecific- transformation of *H. influenzae* cells by *H.*
parainfluenzae Deoxy -R- Acid. **J. Bacteriol.** , Washington, v. **96**, p.
1725-31, 1968.
132. STEWART, G.J.; CARLSON, C.A. - The biology of natural
transformation. **Annu. Rev. Microbiol.**, v. **40**, p. 211-235, 1986.
133. STRYER, L. **Bioquímica.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.
p.96-114; p. 657-693.
134. TAKETO, A. - DNA transfection of *E. coli* by electroporation.
Biochim. Biophys. Acta, Amsterdam, v. **949**, p. 318-324, 1988.
-

-
135. TAYAMA, K.; FUKAYA, M.; OKUMURA, H.; KAWAMURA, Y.; HORINANCHI, S.; BEPPU, T. - Transformation of *A. polyoxogenes* with plasmid DNA by electroporation. **Biosci. Biotech. Biochem.**, Tokyo, v. **58**, n. 5, 974-975, 1994.
136. TAYLOR, A.F. - Movement and Resolution of Holliday Junctions by Enzymes from *E. coli*. Mini-review. **Cell.**, Cambridge, v. **69**, p. 1063 - 1065, 1992.
137. TEIXEIRA, K. R. S. - **Isolamento e caracterização do operon *glnAntrBC* de *Herbaspirillum seropedicae***. Curitiba, 1992. [Tese -Mestrado em Ciências - Bioquímica - Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].
138. THOMAS, C.M.; SMITH, C.A. - Incompatibility Group P plasmids: Genetic, Evolution and Use in Genetic Manipulation. **Annu. Rev. Microbiol.** v. **41**, p.77 -101, 1987.
139. TYLER, B. - Direct Selection for P-1-Sensitive Hybrid strains of *E.coli* carrying *Klebsiela aerogenes* genes. **J. Bacteriol.**, Washington, v. **118**, n.3, p. 810-814, 1974.
140. VEHEMAANPERÄ, J. - Transformation of *B. amyloliquefaciens* by electroporation. **FEMS (Fed. Eur. Microbiol. Soc.)**, Amsterdam, v. **61**, p. 165- 170, 1989. [Letter]
-

141. WILLETS, N.; SKURRAY, R. - The conjugation system of F-like plasmids **Annu. Rev. Genet.**, Palo Alto, v. 14, p. 41-76, 1980.
142. WILLETS, N.S.; WILKINS, B. - Processing of Plasmid DNA During Bacterial Conjugation. **Microbiol. Rev.**, Washington, v. 48, n.1, p. 24 - 41, Mar. 1984.
143. WILLETS, N.S. Location of the Origin of Transfer of the Sex Factor F. **J. Bacteriol.**, Washington, v. 112, n. 2, p. 773-778, 1972.
144. WINNACKER, E.L. **From Genes to Clones - Introduction to Gene Technology**. New York. 1987.
145. WIRTH, R.; FRIESENEGGER, A.; FIEDLER, S. - Transformation of various species of gram negatives bacteria belonging to 11 different genera by electroporation. **Mol. & Gen. Genet.**, Berlin, v. 216, p. 175-177, 1989.
146. YEO, S.F.; LIVERMORE, D.M. - Effect of inoculum size on the *in vitro* susceptibility to β - lactam antibiotics of *Moraxella catarrhalis* isolates of different β - lactamase types. **J. Med. Microbiol.**, Edinburgh, v. 40, p. 252-255, 1994.
147. ZABAROVSKY, E.R.; WINBERG, G. - **Nucleic Acids Res.**, Oxon, v. 18, p. 5912, 1990.
-

148. ZIMMERMANN, U. - Electric Field- Mediated Fusion and Related Electrical Phenomena. **Biochim. Biophys. Acta** , Amsterdam, v. **684**, p. 227-277, 1982.