

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E DE
ELETROCOMPETÊNCIA PARA A TRANSFORMAÇÃO DE
***BACILLUS MEGATERIUM* ATCC 14945**

DÉBORA FARIA FONSECA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

ESTUDO DAS CONDIÇÕES DE CULTIVO E DE
ELETROCOMPETÊNCIA PARA A TRANSFORMAÇÃO DE
***BACILLUS MEGATERIUM* ATCC 14945**

Débora Faria Fonseca

Orientadores: Prof^a. Dr^a. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo

Prof^a. Dr^a. Raquel de Lima Camargo Giordano

Dissertação de Mestrado
apresentada ao Programa
de Pós-Graduação em
Biotecnologia da
Universidade Federal de
São Carlos como parte
dos requisitos para
obtenção do título de
Mestre em Biotecnologia

São Carlos
2008

**Ficha catalográfica elaborada pelo DePT da
Biblioteca Comunitária da UFSCar**

F676ec

Fonseca, Débora Faria.

Estudo das condições de cultivo e de eletrocompetência para a transformação de *Bacillus megaterium* ATCC 14945/ Débora Faria Fonseca. -- São Carlos : UFSCar, 2008.
99 f.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal de São Carlos, 2008.

1. Biologia molecular. 2. Bactérias - transformação. 3. Eletroporação. 4. *Bacillus megaterium*. I. Título.

CDD: 574.873223 (20^a)

Débora Faria Fonseca

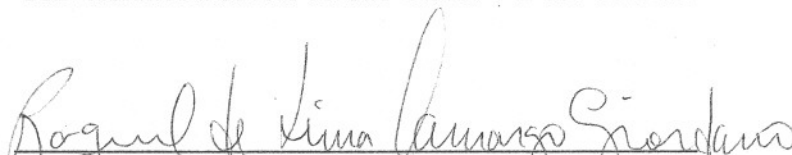
Dissertação de Mestrado submetida
à Coordenação do Programa de
Pós-Graduação em Biotecnologia,
da Universidade Federal de São
Carlos, como requisito parcial para
a obtenção do título de Mestre em
Biotecnologia

Aprovado em: 28/03/2008

BANCA EXAMINADORA



Profa. Dra. Heloisa Sobreiro Selistre de Araújo (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos – DCF/UFSCar



Profa. Dra. Raquel de Lima Giordano (Orientadora)
Universidade Federal de São Carlos - DEQ/UFSCar



Profa. Dra. Dulce Helena Ferreira de Souza
Universidade Federal de São Carlos – DQ/UFSCar



Dr. Oscar Henrique Pereira Ramos
Instituto Butantan

*“A leitura não é suficiente sem a compunção,
o conhecimento sem a devoção,
a investigação sem o arrebatamento do enlevo,
a prudência sem a capacidade de abandonar-se à alegria,
a atividade separada da religiosidade,
o saber separado da caridade,
a inteligência sem a humildade,
o estudo sem o suporte da graça divina,
a reflexão sem a sabedoria inspirada por Deus.”*

(São Boaventura)

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela história que tem escrito para mim

À minha família, tão grande quanto o amor que tenho por ela: Olair e Maria Izabel, meus pais, e meus irmãos Sara, Raquel, Filipe, Pedro, Paulo, André, Tiago, João Marcos e Mirian.

Aos meus padrinhos, João Sérgio e Cleusa, sempre presentes e muito queridos

Aos irmãos na fé, pelo sustento nos momentos mais difíceis e pela alegria das conquistas compartilhadas. A todos e especialmente a: Giovana e Ricardo, Regina e Lou, Sebastião e Maria, Milene e Gilberto, Amanda, Paula, Thiago Carreri, Kai Lin e Kiko, Thiago Prenholato, Agnaldo e Edilez, Gerson e Nádia, Andrilene, Fernanda e Marta.

Aos amigos, pelo simples privilégio de poder chamá-los desse modo. Em especial: Júlio César, Gianni, Danilo, Jeane, Jac, Fabiane, Mari Benassi, Fabiano, Paulo Victor, Carminha, Nelson Viana, Sani, Murilo, Everton, Dani, Gêssia, Andréa Romano, Ana Letícia, Rodrigo Camilo, Cássia, Carlinha, Marina Telles, Karina, Flávia, Kelly, Milena, Karina Espartosa, Cassiana, Grazi Deriggi, Wlademir, Wanderley, Keke, Sérgio e Piter Gargarella, Vadinho, Aldo, Samuel, Verônica, Wagner e Barboza.

Aos amigos e colegas de laboratório, pela contribuição valiosa que ofereceram à minha formação profissional e pessoal: Dasci, Daniela, Adilson, Adriano, Aline, Luana, Éliton, André, Douglas, Mabel, Bruna, Nickeli, Eduardo, Camilo, Geisa, Audrey, Carol, Wellington, Edson, Renata, Clóvis, Ana María, Vanessa, Maritza, Luís, Silvia, Alexandre e Tânia.

Aos colegas do Laboratório de Biologia Molecular (LBM/DGE): Raquel, Andréia, Vivi, Déia, César e Darlan.

Às Dra. Isara H. Cruz, Dra. Maria Teresa Marques Novo, Dra. Teresa Zangirolami, Dra. Dulce Ferreira, Dra. Mônica R. C. Iemma e ao Dr. Oscar Ramos, pela construtiva avaliação deste trabalho.

Ao Dr. Flávio H. Silva, pela gentil concessão de seu laboratório e equipamentos, bem como pelos esclarecimentos.

À Dra. Heloísa Sobreiro Selistre de Araújo e à Dra. Raquel de Lima Camargo Giordano, pelo apoio e orientação que conduziram à conclusão deste trabalho.

À CAPES, FAPESP e FINEP, pelo apoio financeiro.

RESUMO

Bacillus são bactérias Gram-positivas de grande importância biotecnológica. Sua habilidade para secretar enzimas eficientemente durante a fermentação é utilizada para a produção de enzimas extracelulares como penicilina G acilase (PGA). *Bacillus megaterium* revelou-se excelente hospedeiro alternativo à *Escherichia coli* para a expressão de genes heterólogos. Diferentemente de outras linhagens de bacilos, a degradação proteolítica por alcalino-proteases não é verificada. Além disso, não são encontradas endotoxinas em sua parede celular. Conseqüentemente, os rendimentos de produção de proteínas são excepcionalmente elevados, ainda que substratos econômicos sejam utilizados.

Neste trabalho, foram estudadas as condições de crescimento de células de *B. megaterium* e sua preparação para transformação por eletroporação com DNA plasmidial. Foram utilizadas células vegetativas e protoplastos de *B. megaterium* ATCC 14945 e as linhagens de *E. coli* DH5 α e BL21 (para amplificação e manutenção dos plasmídeos pET-32, pETduet-1, pBR322 e pHis 1522).

Os meios de crescimento empregados foram Nutriente, Luria-Bertani (LB) e LBS (LB contendo 0,5 M sorbitol). Para as eletroporações, foram utilizados os Meios 25% PEG 6000/0,1 M Sorbitol (Moro et al., 1995), 0,625 M Sacarose/1,0 mM MgCl₂, pH 5,5 (Dunny et al., 1991), HEPES 10 mM, pH 7,0 (Belliveau & Trevors, 1989) e SMG (0,5 M de sorbitol, 0,5 M de manitol e 10% de glicerol) (Xue et al., 1999). Como Meios de Recuperação pós-pulso elétrico, foram utilizados os Meios LB e LBSM (LB contendo 0,5 M de sorbitol e 0,38 M de manitol).

Foram realizadas extrações de DNA genômico de *B. megaterium* e de DNA plasmidial de *E. coli*; ensaios de viabilidade das células de *B. megaterium* antes e após tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação, pelo Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC); quantificação de biomassa produzida (Cx) nos cultivos de *B. megaterium* nos diferentes Meios, pelo Método da Massa Seca, e acompanhamento por leitura espectrofotométrica (DO 600 nm); análise morfológica e de pureza dos cultivos por meio de preparações permanentes e a fresco e do crescimento de *B. megaterium* selvagem em diferentes meios seletivos; testes preliminares de eletroporação para estabelecimento das melhores condições elétricas; ensaios de eletroporação segundo os protocolos de Moro et al. (1995), Dunny et al. (1991), Belliveau & Trevors (1989), Xue et al. (1999) e Romero et al. (2006).

Foram obtidas as curvas de crescimento de *B. megaterium* para os Meios de Cultivo Nutriente, LB e LBS. Tais curvas permitiram a identificação da fase de crescimento das culturas e o respectivo ajuste das condições elétricas para os protocolos de eletroporação. As medidas de concentração celular (massa seca) encontradas para 16 horas de cultivo, para culturas crescidas em Meio Nutriente, LB e LBS foram 1,900 g/L, 2,649 g/L e 2,320 g/L, respectivamente.

As análises de concentração de células viáveis (UFC) forneceram a densidade celular após tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação, de modo a permitir o ajuste das concentrações de DNA plasmidial a serem empregadas e o cálculo das eficiências de transformação. Após o tratamento de células de *B. megaterium*, crescidas em Meio Nutriente, LB e LBS, com o Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol, foram obtidas, respectivamente: $8,8 \times 10^8$; $9,2 \times 10^8$ e $2,3 \times 10^9$ UFC/mL; para o Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl₂, $2,8 \times 10^7$; $4,6 \times 10^8$ e $3,7 \times 10^8$ UFC/mL; para o Meio de Eletroporação HEPES, $5,6 \times 10^8$; $2,93 \times 10^9$ e $1,86 \times 10^8$; para o Meio de Eletroporação SMG, $1,7 \times 10^9$; $9,4 \times 10^9$ e $1,1 \times 10^{10}$ UFC/mL, respectivamente para os Meios de Crescimento Nutriente, LB e LBS.

ABSTRACT

The Gram-positive genus *Bacillus* is of great biotechnological importance. Their ability to secrete enzymes efficiently during fermentation is exploited for the production of extracellular enzymes such as penicillin G acylase (PGA). *Bacillus megaterium* has proven to be an excellent alternative host to *Escherichia coli* for heterologous gene expression. Unlike other bacilli strains, proteolytic degradation by alkaline proteases is avoided. In addition, there are no endotoxins found in the cell wall. As a result, protein yields are exceptionally high even if inexpensive substrates are used.

In this work, the growth conditions of *B. megaterium* ATCC 14945 and its preparation for transformation by electroporation with plasmid DNA had been studied. Vegetative cells and protoplasts of *B. megaterium* had been used. Plasmid DNAs (pET-32, pETduet-1, pBR322 and pHis 1522) were prepared from *E. coli* strains DH5 α and BL21. Bacteria cultures were grown in Luria-Bertani (LB) broth, Nutrient or LBS (LB containing 0,5 M sorbitol) medium.

It had been used the following Electroporation Media: 25% PEG 6000/0.1 M Sorbitol (Moro et al., 1995), 0.625 M Sacarose/1.0 mM MgCl₂, pH 5.5 (Dunny et al., 1991), HEPES 10 mM, pH 7.0 (Belliveau & Trevors, 1989) and SMG (0.5 M sorbitol, 0.5 M manitol and 10% glicerol) (Xue et al., 1999). As Recovery Media after electric pulses, LB and LBSM (LB containing 0,5 M sorbitol and 0.38 M manitol) had been used.

Extractions of genomic DNA of *B. megaterium* and plasmid DNA of *E. coli* had been carried through. The Colonies Forming Units method (CFU) was applied in order to analyze the *B. megaterium* viability before and after treatment with Electroporation Media. The biomass produced (Cx) was analyzed spectrophotometrically and by the Dry Mass method. The morphology and pureness of *B. megaterium* cultures had been studied by optic microscopy preparations and *B. megaterium* growth in liquid selective media. The best electric conditions for electroporation had been established by preliminary tests. *B. megaterium* transformations was performed according to protocols described by Moro et al. (1995), Dunny et al. (1991), Belliveau & Trevors (1989), Xue et al. (1999) and Romero et al. (2006).

The *B. megaterium* growth curves in LB, Nutrient and LBS had allowed the identification of growth phases of cultures and the respective electric conditions adjustment for electroporation protocols.

The cellular concentration (dry mass) found for 16 hours of culture in Nutrient, LB and LBS medium had been 1.900 g/L, 2.649 g/L and 2.320 g/L, respectively.

The viable cells concentration analyses (UFC) had allowed the adjustment of plasmid DNA concentrations employed and transformation efficiencies calculation.

It had been found the following cellular densities of *B. megaterium* grown in Nutrient, LB and LBS medium respectively after PEG/Sorbitol Electroporation Medium treatment: 8.8×10^8 ; $9,2 \times 10^8$ and 2.3×10^9 UFC/mL. For Sacarose/MgCl₂, it had been found $2,8 \times 10^7$; 4.6×10^8 and 3.7×10^8 UFC/mL and for HEPES 5.6×10^8 ; 2.93×10^9 and 1.86×10^8 . For SMG, it had been found $1,7 \times 10^9$; 9.4×10^9 and 1.1×10^{10} UFC/mL for Nutrient, LB and LBS medium, respectively.

SUMÁRIO

LISTA DE QUADROS E TABELAS

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1 <i>Bacillus megaterium</i>	3
2.2 Recombinação Genética em Bactérias.....	8
2.3 Transformação.....	11
2.4 Transformação de protoplastos bacterianos.....	12
2.5 Transformação por Eletroporação.....	15
2.5.1 Condições elétricas requeridas para eletroporação.....	18
2.6 Transformação de células bacterianas intactas por Eletroporação.....	20
2.7 Eficiência de transformação	22
2.8 Plasmídeos nativos de <i>Bacillus megaterium</i>	24
2.9 Penicilina G Acilase (PGA).....	26
2.9.1 Produção de PGA por microorganismos geneticamente modificados....	32
2.10 Objetivos.....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Material.....	35
3.1.1 Microorganismos	35
3.1.2 Meios de Cultivo.....	35
3.1.3 Meios de Eletroporação e Recuperação pós-pulso elétrico.....	36
3.1.4 Plasmídeos.....	37
3.1.4.1 Vetor pET 32 (pET 32 “PGA”).....	37
3.1.4.2 Vetor pETduet 1 (Novagen ®).....	38
3.1.4.3 Vetor pBR 322.....	39
3.1.4.4 Vetor pHis 1522 (MoBiTec®).....	40
3.2 Métodos Analíticos.....	41
3.2.1 Leitura espectrofotométrica.....	41
3.2.2 Microscopia e Análise de imagens.....	41
3.3 Procedimentos.....	41
3.3.1 Extração de DNA.....	41

3.3.1.1	Extração de DNA genômico de <i>B. megaterium</i>	42
3.3.1.2	Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina.....	43
3.3.2	Preparação de células para ensaios de Viabilidade Celular e Quantificação de Biomassa produzida.....	44
3.3.2.1	Método de Contagem de Colônias Formadas (UFC).....	45
3.3.2.2	Análise da Produção de Biomassa pelo Método da Massa Seca.....	47
3.3.3	Análise morfológica e pureza do cultivo.....	48
3.3.4	Eletroporações.....	49
3.3.4.1	Testes para determinação da Duração do Pulso.....	49
3.3.4.2	Protocolos para Eletroporação ou Eletrotransformação.....	50
3.3.4.3	Preparação de células de <i>B. megaterium</i> para Eletroporação.....	50
3.3.4.4	Eletroporações com Meio Sacarose/MgCl ₂ e Meio PEG/Sorbitol.....	53
3.3.4.5	Eletroporações com Meio HEPES 10 Mm.....	58
3.3.4.6	Protocolo de Eletroporação de Alta Osmolaridade.....	61
3.3.4.7	Eletroporação em Meio LBS contendo MgCl ₂	62
3.3.4.8	Eletroporação de protoplastos de <i>B. megaterium</i>	63
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO		
4.1	Extração de DNA genômico de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945.....	64
4.2	Curvas de crescimento de células vegetativas de <i>B. megaterium</i> (Curvas de Calibração).....	65
4.2.1	Crescimento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 em Meio LB.....	65
4.2.2	Crescimento de <i>B. megaterium</i> em Meio Nutriente.....	66
4.2.3	Crescimento de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 em Meio LBS.....	68
4.3	Análise da Concentração de Células Viáveis.....	70
4.3.1	Protocolos para Eletroporação com Meio PEG/Sorbitol.....	70
4.3.2	Protocolos para Eletroporação com Meio Sacarose/MgCl ₂	72
4.3.3	Protocolos para Eletroporação com Meio HEPES.....	74
4.3.4	Protocolos para Eletroporação com Meio SMG.....	76
4.4	Análise da Produção de Biomassa pelo Método da Massa Seca.....	77
4.5	Análise morfológica e de pureza do cultivo.....	78
4.6	Testes para determinação da Duração dos Pulsos Elétricos.....	80

4.7	Protocolos para Eletroporação ou Eletrotransformação.....	83
4.7.1	Eletroporações com Meio Sacarose/MgCl ₂ e Meio PEG/Sorbitol.....	83
4.7.2	Eletroporações com Meio HEPES 10 mM.....	85
4.7.3	Eletroporações com Meio de Alta Osmolaridade.....	87
4.7.4	Eletroporação em Meio LBS contendo MgCl ₂	88
4.7.5	Eletroporação de protoplastos de <i>B. megaterium</i>	89
5	SUGESTÕES.....	94
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	95

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Tabela 3.3.2.1.1. Características dos cultivos de células de <i>B. megaterium</i> em Meio Nutriente e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl ₂ , HEPES e SMG).....	46
Tabela 3.3.2.1.2. Características dos cultivos de células de <i>B. megaterium</i> em Meio LB e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl ₂ , HEPES e SMG).....	46
Tabela 3.3.2.1.3. Características dos cultivos de células de <i>B. megaterium</i> em Meio LBS e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl ₂ , HEPES e SMG).....	47
Quadro 3.3.4.4. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando os Meios PEG/Sorbitol (PEG/s) e Sacarose/MgCl ₂ (Sac/Mg).....	54
Quadro 3.3.4.5. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando o Meio HEPES.....	58
Quadro 3.3.4.6. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando o Meio LBS.....	61
Tabela 3.3.4.7. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando o Meio LBSM MgCl ₂	62
Tabela 3.3.4.8. Condições elétricas empregadas nos ensaios de eletroporação de protoplastos de <i>B. megaterium</i> com pHis 1522	64
Tabela 4.3.1. Valores obtidos para a Duração dos pulsos elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de <i>B. megaterium</i> tratadas com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol (Ensaio UFC 1, UFC 5 e UFC 9)	72
Tabela 4.3.2. Valores obtidos para a Duração dos pulsos elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de <i>B. megaterium</i> tratadas com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl ₂ (Ensaio UFC 2, UFC 6 e UFC 10).....	73
Tabela 4.3.3. Valores obtidos para a Duração dos pulsos elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de <i>B. megaterium</i> tratadas com Meio de Eletroporação HEPES (Ensaio UFC 3, UFC 7 e UFC 11).....	75
Tabela 4.3.4. Valores obtidos para a Duração dos pulsos elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de <i>B. megaterium</i> tratadas com Meio de Eletroporação SMG (Ensaio UFC 4, UFC 8 e UFC 12)	76

Tabela 4.4.1. Quantificação da produção de biomassa (concentração celular, em g/L) pelo Método da Massa Seca, dos cultivos de <i>B. megaterium</i> nos Meios de Crescimento Nutriente (MS 1), LB (MS 2) e LBS (MS 3)	78
Tabela 4.6.1. Valores para Duração dos pulsos elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação HEPES. Campo elétrico inicial de 12 kV/cm.....	81
Tabela 4.6.2. Valores para Duração dos pulsos elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação HEPES. Campo elétrico inicial de 2,5 kV/cm.....	81
Tabela 4.6.3. Valores para Duração dos pulsos elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol. Campo elétrico inicial de 12 kV/cm.....	82
Tabela 4.6.4. Valores para Duração dos pulsos elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol. Campo elétrico inicial de 2,5 kV/cm.....	82
Tabela 4.7.1. Valores para Duração dos pulsos elétricos (ms) em cada um dos experimentos de eletroporação.....	84
Tabela 4.7.2. Valores para Duração dos pulsos elétricos (em ms) nos ensaios de eletroporação com o uso do Meio HEPES (Experimentos H1 a H4).....	86
Tabela 4.7.3. Valores para Duração dos pulsos elétricos (ms). Eletroporações de células vegetativas de <i>B. megaterium</i> tratadas com Meio de Alta Osmolaridade (SMG), com pHis 1522.....	88
Tabela 4.7.4. Valores para Duração dos pulsos elétricos (em ms) obtidos nos ensaios de eletroporação de <i>B. megaterium</i> crescidas em Meio LBS e tratadas com SMG acrescido de MgCl ₂ , nas concentrações 1 mM (Mg 1 e Mg 2), 20 mM (Mg 3 e Mg 4) e 40 mM (Mg 5 e Controle)	89
Tabela 4.7.5. Valores para Duração dos pulsos elétricos referentes às eletroporações de suspensões de protoplastos de <i>B. megaterium</i> após aplicação de pulsos elétricos de 700 V, utilizando-se resistor de 200 Ω e capacitor de 25 μF	90

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1.1. Imagem de microscopia eletrônica de células vegetativas de <i>Bacillus megaterium</i> e <i>Escherichia coli</i>	4
Figura 2.1.2. Esquemas comparativos entre as estruturas celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	6
Figura 2.5. Curva do decaimento exponencial do pulso produzido pela descarga de um capacitor	18
Figura 2.8. Mapa do plasmídeo pBM400 nativo de <i>B. megaterium</i>	25
Figura 2.9.1. Hidrólise de penicilinas, catalisadas por penicilinas acilases, para produzir ácido 6-aminopenicilânico (6-APA).....	27
Figura 2.9.2. Síntese de importantes antibióticos beta-lactâmicos, catalisada por penicilina acilase.....	27
Figura 2.9.3. Sequência de nucleotídeos e aminoácidos do gene <i>pac</i> de <i>B. megaterium</i> (Martín et al., 1995).....	31
Figura 3.1.4.1. Mapa do plasmídeo pET-32 (Novagen®).....	38
Figura 3.1.4.2. Mapa do plasmídeo pETDuet-1 (Novagen®).....	39
Figura 3.1.4.4. Mapa do plasmídeo pHis 1522 (MoBiTec®).....	40
Figura 4.1. Extração do DNA genômico de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945	64
Figura 4.2.1.1. Curva de concentração celular em g/L de <i>B. megaterium</i> por tempo de cultivo em Meio LB	65
Figura 4.2.1.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de <i>B. megaterium</i> em Meio LB contra DO 600 nm	66
Figura 4.2.2.1. Curva de concentração celular (em g/L) de <i>B. megaterium</i> por tempo (em horas) de cultivo em Meio Nutriente.....	67
Figura 4.2.2.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de <i>B. megaterium</i> em Meio Nutriente contra DO 600 nm	68
Figura 4.2.3.1. Curva de concentração celular em (g/L) de <i>B. megaterium</i> em Meio LBS por tempo de cultivo (em horas).....	69
Figura 4.2.3.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de <i>B. megaterium</i> em Meio LBS contra DO 600 nm	70
Figura 4.3.1. Técnica de estriamento para obtenção de colônias puras: colônias de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 selvagem em ágar Nutriente (controle)	71

Figura 4.3.2. Colônias de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 selvagem a partir de células tratadas com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl ₂	74
Figura 4.3.3. Colônias de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 selvagem a partir do plaqueamento em meio não-seletivo de células em meio da fase exponencial de crescimento, tratadas com Meio de Eletroporação HEPES 10 mM	75
Figura 4.3.4. Colônias de <i>B. megaterium</i> ATCC 14945 selvagem a partir de células tratadas com Meio de Eletroporação SMG	77
Figura 4.5.1. Preparações a fresco. Células de <i>B. megaterium</i> após 16 horas de cultivo e células imediatamente após os pulsos elétricos	79
Figura 4.5.2. Preparações permanentes (Coloração de Gram) de células de <i>B. megaterium</i> selvagem. Células de <i>B. megaterium</i> após 16 horas de cultivo e células tratadas com Meio de eletroporação	79
Figura 4.5.3. Preparações permanentes (Coloração de Gram). Células de <i>B. megaterium</i> imediatamente após os pulsos elétricos e células eletroporadas após o período de incubação de uma hora antes do plaqueamento	79
Figura 4.5.4. Preparações permanentes (Coloração Verde Malaquita). Células de <i>B. megaterium</i> após 16 horas de cultivo e tratadas com Meio de eletroporação.....	80

1. INTRODUÇÃO

Processos *downstream* para o isolamento de proteínas recombinantes a partir de hospedeiros microbianos geralmente representam mais de 40% dos custos da produção. A redução das etapas de purificação e de seus custos correspondentes podem ser atingidos pela secreção da proteína para o meio de cultura. *Escherichia coli*, o microorganismo mais utilizado na ciência e indústria biotecnológicas, não transloca proteínas eficientemente através de sua membrana externa. Em contraste, *Bacillus megaterium*, sendo uma bactéria Gram – positiva, não apresenta essa membrana, e é conhecida por sua elevada capacidade de secreção (Gamer et al., 2007).

Uma vez que pode manter plasmídeos estávelmente sem pressão seletiva e que possui apenas pequena atividade proteolítica extracelular comparada com a de outros *Bacillus*, *B. megaterium* é extremamente adequado para a produção e secreção de proteínas heterólogas. Diversas delas (GFP, enzimas modificadoras de açúcares, hidrolases) foram produzidas com sucesso, tanto intra como extracelularmente (Vary et al., 2007).

Além disso, o estabelecimento de processos com cultivos de elevada densidade celular indica a vasta aplicabilidade de *B. megaterium* no campo da produção industrial de proteínas recombinantes (Gamer et al., 2007).

As enzimas penicilinas acilases (PACs, EC 3.5.1.11) de *Escherichia coli* ATCC 11105, *Bacillus megaterium* ATCC 14945 e mutantes dessas duas linhagens são os mais largamente utilizados na indústria de antibióticos beta-lactâmicos (Rajendhran & Gunasekaran, 2007).

Muitas bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, são facilmente transformadas (incorporam DNA exógeno) por tratamento com íons metálicos divalentes, antes da adição de DNA plasmidial ao meio. De modo inverso, muitas bactérias Gram-positivas são notadamente difíceis de serem transformadas (Shark et al., 1991).

A reduzida competência ou a ausência de competência natural apresentada por diversas linhagens de *Bacillus* conduziram ao desenvolvimento de outras estratégias de transformação envolvendo a transdução por fagos (Yasbin & Young, 1974 *apud* Romero et al, 2006), a fusão de protoplastos (Chang & Cohen, 1979) e, finalmente, o método altamente versátil de eletrotransformação (ou eletroporação).

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 *Bacillus megaterium*

Segundo o Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, as espécies do gênero *Bacillus* apresentam células em forma de bastão, com dimensões entre 0,5 – 2,5 x 1,2 – 10 µm, geralmente dispostas em pares ou em cadeias. As células apresentam mobilidade por meio de flagelos e sua coloração é Gram-positiva. Os endósporos são ovais, arredondados ou cilíndricos e muito resistentes a condições adversas. Não há mais que um esporo por célula, tampouco ocorre supressão da esporulação por exposição ao ar. *Bacillus* são aeróbios ou anaeróbios facultativos, com metabolismo fermentativo ou respiratório e ampla diversidade de habilidades fisiológicas referentes a temperatura, pH e salinidade (Holt et al., 1994).

B. megaterium destaca-se dentro do gênero pelo grande tamanho de suas células vegetativas (2,5 × 2,5 × 10 µm, Figura 2.1.1) e esporos (0,8 - 1,2 x 1,5 - 2,0 µm), origem de seu nome. É essencialmente aeróbio e apresenta crescimento ótimo nas faixas de temperatura entre 28 - 35°C e pH entre 7,0 - 8,5 (Vary, 1994).

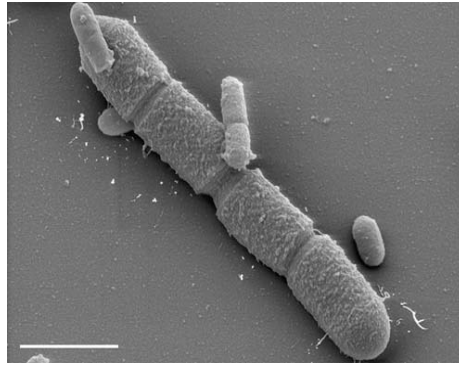


Figura 2.1.1. Imagem de microscopia eletrônica de células vegetativas de *Bacillus megaterium* e *Escherichia coli*. As células de *Bacillus megaterium* podem crescer até atingirem um volume superior a $60 \mu\text{m}^3$ ($2,5 \times 2,5 \times 10$). Comparado com o volume de *Escherichia coli* ($0,5 \mu\text{m}^3$, $0,5 \times 0,5 \times 2,0$), *Bacillus megaterium* apresenta, no mínimo, volume 100 vezes maior. (Aumento: 15000X; barra branca: $2 \mu\text{m}$). (Adaptado de Vary et al., 2007).

B. megaterium é encontrada em grande diversidade de habitats, desde solos a água marinha, sedimentos, plantações de arroz, mel, peixes e alimentos secos. É capaz de crescer em meios simples, em mais de 62 das 95 fontes de carbono testadas, incluindo todos os intermediários do ciclo do ácido tricarboxílico, formatos e acetatos. Dentre seus produtos estão proteínas como penicilina acilase, várias amilases, glicose desidrogenase, piruvato, vitamina B12, toxinas fungicidas e oxetanocina (um inibidor viral ativo contra HIV, vírus da hepatite B e da herpes simplex). Algumas das mais interessantes proteínas produzidas por *B. megaterium* são as da família citocromo - monooxigenases P-450 (He & Fulco, 1991 *apud* Vary et al., 2007), de grande interesse, dada sua considerável similaridade com as P-450 eucarióticas importantes em muitas doenças (Vary et al., 2007).

A Coloração diferencial de Gram divide a maioria das bactérias em dois grupos: Gram-positivas e Gram-negativas (Figura 2.1.2). Nas Gram-positivas, o complexo cristal violeta/iodo fica retido no interior da célula após lavagem com álcool-acetona, porque a espessa camada glicolípídica que constitui a parede celular não permite que esse complexo seja extraído da célula. Assim, as células de Gram-positivas são coradas em azul-púrpura (Tortora, 2005).

A parede celular bacteriana promove rigidez estrutural, confere forma à célula e cria uma barreira física contra o ambiente externo. O componente rígido da parede celular de todas as bactérias é constituído por glicopeptídeo. Os glicopeptídeos são encontrados em todas as espécies de bactérias, excetuando-se os micoplasmas e ureaplasmas, visto que carecem de parede celular. A estrutura do glicopeptídeo é formada por esqueleto de resíduos de carboidratos formados por unidades alternadas de N-acetilglicosamina e N-acetilmurâmico, unidos por ligações β 1,4. Tetrapeptídeos curtos, geralmente compostos por cadeias curtas e idênticas de D e L aminoácidos, encontram-se unidos aos resíduos do ácido N-acetilmurâmico, por meio de uma ligação peptídica com o grupo lactil do carbono 3. Estas cadeias curtas contêm aminoácidos incomuns, em geral não encontrados nas proteínas, incluindo isômeros D de ácido glutâmico e de alanina (em bactérias Gram-positivas) e ácido meso-diaminopimélico (nas bactérias Gram-negativas). Alguns desses tetrapeptídeos, por sua vez, estão unidos uns aos outros por peptídeos curtos, formando pontes cruzadas entre cadeias adjacentes de glicopeptídeos (Koneman et al., 2001).

A parede celular das bactérias Gram-positivas apresenta quase 80 nm de espessura e é composta principalmente de várias camadas de glicopeptídeos. No interior

dessa matriz de glicopeptídeos, existe uma variedade de proteínas e polissacarídeos, denominadas ácidos teicóicos. Esses ácidos são polímeros de unidades de ribitol ou de glicerol, unidos entre si por meio de ligações fosfodiéster. Os ácidos ribitol teicóicos estão associados à parede celular, enquanto que os ácidos glicerol teicóicos estão associados à estrutura interna da membrana da célula bacteriana. Os ácidos teicóicos de diferentes bactérias são adicionalmente modificados pela adição de grupos R, que incluem resíduos de *D*-alanina ou *D*-lisina, unidos por ligações do tipo O-glicosídeo. Os ácidos teicóicos, dentre outras funções, estabilizam a parede celular, mantêm a associação da parede com a membrana celular, formam quelatos com pequenos íons, necessários para a função e integridade da parede celular e participam da interação celular e na aderência à mucosa ou a outras superfícies (Tortora, 2005).

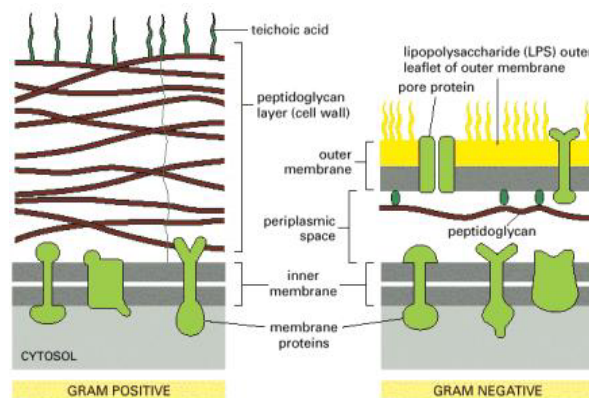


Figura 2.1.2. Esquemas comparativos entre as estruturas celulares de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Bactérias Gram-positivas como *B. megaterium* apresentam uma única membrana e uma espessa parede celular constituída de glicopeptídeos. As bactérias Gram-negativas como *E. coli* possuem duas membranas, separadas por um espaço periplasmático. A membrana interna das bactérias Gram-negativas é constituída por uma bicamada fosfolipídica. A face interna da membrana exterior é formada essencialmente por fosfolípidios e a face externa por lipopolissacarídeos (LPS) (Albert et al., 2007)

As paredes celulares de *B. megaterium* linhagem KM são compostas por dois distintos heteropolímeros. O primeiro, denominado ácido X-teicóico, apresenta massa molecular de aproximadamente 11000; consiste de cerca de dez subunidades contendo fósforo, glicose e GlcNHAc (na razão molar de 1/2/1,3), bem como um composto polioliol; não exerce qualquer função na manutenção da rigidez da parede celular. O segundo heteropolímero pode ser visualizado como uma rede tridimensional de subunidades estruturais consistindo de quatro resíduos de mucopeptídeos com uma média composição de GlcNHAc₁- (ácido N-acetilmurâmico)1-Ala_{2,20}-Glu₁- (α,ϵ -ácido diaminopimélico)₁; também contém glicose. Este mucopeptídeo é a estrutura basal da parede. Os dois heteropolímeros estão presentes em proporções equimolares. Eles estão covalentemente ligados por pontes glicosido-muraminil de alguns dos resíduos alanina do mucopeptídeo basal por ligações amídicas (Ghuysen et al., 1962).

A membrana citoplasmática e a parede celular de *B. megaterium* linhagem M são quimicamente muito distintas entre si. A parede contém grandes quantidades de ácido diaminopimélico e hexoxamina. Estas substâncias estão ausentes na membrana (Weibull & Bergström, 1958).

A membrana citoplasmática pode ser caracterizada como um complexo lipoprotéico, podendo conter pequenas quantidades de carboidratos (glicose). Ácidos nucléicos estão essencialmente ausentes. É muito provável que o sistema citocromo completo esteja presente na membrana. Estruturas granulares associadas com algumas membranas purificadas não apresentaram ácido diaminopimélico, hexoxamina, ácidos nucléicos ou citocromos. Dados analíticos sugerem que esses grânulos contêm compostos nitrogenados não-proteicos e que seu conteúdo lipídico e de fósforo é aproximadamente igual ou inferior ao das membranas (Weibull & Bergström, 1958).

Em seu estudo sobre a localização da barreira de permeabilidade nas células de *B. megaterium*, Weibull (1955) realizou determinações das razões de volume total/massa seca total e volume de protoplasma/massa seca total, para analisar a permeabilidade das células a vários solutos. Seus resultados foram facilmente compreendidos assumindo-se uma barreira de permeabilidade na superfície do protoplasma. A parede celular é provavelmente permeável a solutos.

2.2 Recombinação Genética em Bactérias

A reprodução de bactérias ocorre por fissão binária, um processo assexuado que não envolve eventos de recombinação e resulta na formação de duas células filhas idênticas à célula – mãe. Entretanto, diversos grupos de bactérias possuem a capacidade de troca e recombinação genética com outros microorganismos. A permuta genética entre bactérias ocorre por meio de um dentre três mecanismos: transdução, conjugação e transformação (Koneman et al., 2001).

A transdução refere-se à permuta de informação genética por meio de bacteriófagos. A conjugação é o único mecanismo de troca genética entre bactérias que requer contato célula a célula. A transformação envolve a incorporação de DNA livre no meio circundante. As células fisiologicamente capazes de captar e incorporar DNA livre em seus genomas são denominadas competentes. A competência é usualmente um estado transitório que ocorre no final da fase de crescimento exponencial (Koneman et al., 2001).

Nas células Gram-positivas competentes, pequenos fragmentos de DNA de cadeia dupla unem-se à célula por meio de um receptor de superfície celular, expresso

durante o período de competência. Na medida em que o DNA penetra na célula, uma das cadeias é hidrolisada por uma nuclease ligada à superfície. Os eventos de recombinação entre o DNA de cadeia simples e a região homóloga do cromossomo bacteriano resultam na integração do DNA transformado ao genoma bacteriano. Quando não existem regiões homólogas para o DNA, a cadeia de DNA não se integra, os genes desta cadeia não são expressos e o DNA de cadeia simples é degradado por endonucleases de restrição endógenas (Koneman et al., 2001).

Segundo Sambrook et al. (1989), o DNA plasmidial não é degradado; por essa razão, constitui-se vetor eficiente para carregar fragmentos de DNA para dentro da célula. O fragmento (ou inserto) a ser introduzido na célula contém o gene de interesse e, caso não estivesse inserido no plasmídeo, poderia ser degradado. No caso dos plasmídeos normalmente utilizados, não há recombinação com o DNA cromossomal nem integração ao cromossomo bacteriano. Por essa razão, tais vetores precisam conter uma origem de replicação (ORI) que funcione no hospedeiro, para permitir sua replicação de maneira independente do cromossomo bacteriano. Essa compatibilidade entre plasmídeos e hospedeiro possibilita a manutenção desses vetores no interior das células hospedeiras nas gerações seguintes.

A competência é o primeiro passo fundamental do processo de transformação. Os passos subsequentes envolvem replicação, segregação e expressão da nova informação genética. É geralmente aceito que a habilidade para desenvolver competência seja geneticamente controlada, possivelmente pela especificidade da natureza dos sítios receptores na superfície das células (Boot & Wilson, 1967).

A competência natural é a habilidade de uma bactéria para tomar DNA exógeno e incorporá-lo em seu genoma. Este fenômeno permitiu a clonagem gênica, a geração de mutantes e o mapeamento de genes em *B. subtilis* (Anagnostopoulos & Spizizen, 1961).

A formação de células competentes também requer a síntese *de novo* de RNA e proteínas. O desenvolvimento de competência deve ser acompanhado pela ativação da habilidade de recombinação intracelular, envolvendo a expressão de uma variedade de genes responsáveis pelo metabolismo de DNA e pela síntese de parede celular (Sadaie & Kada, 1983).

Anagnostopoulos & Spizizen (1960) encontraram que o desenvolvimento de sensibilidade para transformação em células vegetativas de *B. subtilis* 168 ocorreu próximo ao final da fase logarítmica de crescimento. Essas células tornaram-se otimamente competentes para transformação quando crescidas em meio simples e em estágio particular do ciclo de crescimento (final da fase logarítmica). A presença de quantidades relativamente grandes de aminoácidos, tais como os presentes na caseína hidrolisada, reduziu a sensibilidade para transformação. Elevadas quantidades de aminoácidos permitem a síntese de componentes da parede celular, prejudicando a tomada de DNA.

A habilidade de tomada de DNA deve envolver modificações estruturais na parede celular que permitam a penetração de macromoléculas, bem como o desenvolvimento de mecanismos enzimáticos para a tomada ativa de DNA. Linhagens de *B. subtilis* incapazes de realizar esporulação (e, presumidamente, também a pré-esporulação) não se tornam competentes. Isto sugere que algumas alterações na estrutura da parede celular associadas com a fisiologia da pré-esporulação são a base para a competência (Anagnostopoulos & Spizizen, 1960).

2.3 Transformação

Muitas bactérias Gram-negativas, como *E. coli*, são facilmente transformadas por tratamento com íons metálicos divalentes, antes da adição de DNA plasmidial. De modo inverso, muitas bactérias Gram-positivas são notadamente difíceis de serem transformadas. A transformação natural de bactérias Gram-positivas apenas é conhecida entre *Bacillus subtilis* e algumas espécies de *Streptococcus*. As linhagens de *B. megaterium* não apresentam competência natural e a maioria delas são menos eficientemente transformadas que *B. subtilis* (Rygus & Hillen, 1992).

Com consideráveis esforços, preparação de protoplastos, conjugação e eletroporação, dentre outras técnicas, tornaram possível a manipulação genética de vários gêneros de bactérias Gram-positivas, incluindo *Bacillus*, *Lactobacillus*, *Listeria*, *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Streptomyces* e bactérias coneriformes. Entretanto, algumas espécies ainda se mantêm não-transformáveis mesmo após exaustivos testes utilizando as técnicas disponíveis. Além disso, muitos protocolos em uso atual devem ser ajustados individualmente para determinadas linhagens, de modo a atingir resultados satisfatórios (Shark et al., 1991).

Muitos protocolos de eletroporação foram descritos, focados no aumento das eficiências de transformação, utilizando células intactas ou a combinação com agentes modificadores da parede celular, pela alteração da composição dos meios de lavagem e de eletroporação, do pulso elétrico ou da natureza do DNA utilizado para a transformação (Romero et al., 2006).

A parede celular bacteriana e a membrana do protoplasto (célula desprovida de parede celular) possuem, dentre outras, a função de selecionar as moléculas que se

difundem através de canais aquosos ou poros que são parte integral de suas estruturas. A habilidade de um poro para excluir ou permitir a passagem de um composto é determinada principalmente pelos tamanhos e formas relativos das aberturas e das moléculas. Entretanto, as geometrias relativas não podem ser vistas como propriedades fixas, e o conjunto de relações é complexo. Na parede celular, as aberturas aparentemente não existem como simples perfurações de tamanho uniforme, mas como vias tortuosas, de tamanhos heterogêneos, inseridas em uma matriz tridimensional. Foi demonstrado que a parede celular bacteriana flexiona e modifica seu volume em resposta a alterações iônicas no meio, possivelmente com a dilatação e contração das aberturas na sua matriz (Scherrer & Gerhardt, 1971).

2.4 Transformação de protoplastos bacterianos

Apesar de a transformação de protoplastos requerer experiência experimental e ser menos eficiente, se comparada aos procedimentos padrão de transformação de *E. coli*, a habilidade para transformar *B. megaterium* imediatamente conduziu à clonagem de muitos genes, o estudo de seus plasmídeos e seu uso como um eficiente hospedeiro para expressão de genes (Vary et al., 2007).

Corner & Marquis (1969) realizaram um estudo da relativa efetividade de açúcares, pequenos peptídeos e aminoácidos como estabilizadores osmóticos para protoplastos de *B. megaterium*. Seus resultados indicaram que a membrana dos protoplastos pode agir como uma membrana de diálise de poro diferencial (como o fazem as membranas de celofane) e que sua efetiva porosidade aumenta quando ocorre sua expansão durante o inchaço osmótico. A membrana do protoplasto comporta-se

também como uma estrutura altamente extensível. Esses pesquisadores também encontraram que uréia e glicerol induzem o relaxamento mecânico das membranas dos protoplastos. Este dado, juntamente com outros descritos na literatura acerca das propriedades mecânicas das membranas dos protoplastos e do efeito de alargamento por tratamento com formaldeído, sugere que o componente mecanicamente importante da membrana é proteico, possivelmente sob a forma de um arranjo microfibrilar.

As propriedades osmóticas de protoplastos bacterianos foram investigadas por Weibull (1955). Os protoplastos foram obtidos pelo tratamento de células de *Bacillus megaterium* suspensas em soluções de polietilenoglicol (PEG) ou sacarose com lisozima. A concentração dessas substâncias (e, portanto, da pressão osmótica do meio) antes da remoção da parede celular tem pequena influência no volume dos protoplastos formados. Modificações na pressão osmótica após a remoção da parede celular, de modo inverso, causam a plasmólise dos protoplastos. Determinações do grau de plasmólise como função da pressão osmótica indicam a presença de uma barreira de permeabilidade contra o meio externo.

Thorsson & Weibull (1958) verificaram que, apesar de não haver parede celular circundando os protoplastos de *Bacillus megaterium*, uma única e delgada membrana pode ser vista em alguns espécimes, fortemente aderida à zona de material citoplasmático. Esta estrutura provavelmente representa uma membrana citoplasmática.

Segundo Marquis (1967), protoplastos de *B. megaterium* comportam-se como osmômetros e apresentam aumento e redução de tamanho em resposta a mudanças na osmolaridade de seu meio de suspensão. Uma vasta distribuição de tamanhos celulares foi observada nas populações de protoplastos preparados a partir de células em fase exponencial de crescimento. Mudanças na média de volume celular envolveram

mudanças na distribuição de tamanho dentro da população; essas modificações podem ocorrer tanto durante como após a remoção da parede celular. Os protoplastos liberados apresentaram maior tamanho e comportamento osmoticamente mais responsivo, em comparação a protoplastos encerrados por parede das células intactas a partir das quais foram preparados. Isto indica que protoplastos liberados possuem maior superfície de membrana por célula.

Brenner & Stent (1955) realizaram experimentos com protoplastos de *Bacillus megaterium* KM que revelaram crescimento de bacteriófagos C em células bacterianas infectadas, previamente tratadas com lisozima. O rendimento de fagos de protoplastos infectados foi menor que o de células intactas.

Chang & Cohen (1979) desenvolveram um método eficiente para a transformação de protoplastos de *B. subtilis* com DNA plasmidial. O procedimento, utilizando polietilenoglicol (PEG), apresentou rendimento de aproximadamente 80% de transformantes, com eficiência de 4×10^4 transformantes por μg de DNA plasmidial.

Muitos trabalhos subseqüentes tomaram por base o procedimento descrito por Chang & Cohen (1979) para a transformação de outras espécies do gênero *Bacillus* (Brown & Carlton, 1980; Martin et al., 1981; Olsson et al., 1985; Romero et al., 2006).

Protocolos para a preparação de protoplastos de *Bacillus megaterium* foram descritos por Vorobjeva et al. (1980) e Meinhardt et al. (1989) *apud* Schmidt et al. (2005); Von Tersch & Carlton (1983); Puyet et al. (1989) *apud* Rygus & Hillen (1992); McCool & Cannon (2001); Sholle et al. (2003); Malten et al. (2006).

2.5 Transformação por Eletroporação

A transformação genética proporciona uma moderna tecnologia para o melhoramento de microorganismos industrialmente importantes pela introdução de novos genes. Entretanto, o melhoramento de muitas linhagens bacterianas industriais tem sido dificultado pela falta ou pela baixa eficiência dos sistemas de transformação genéticos (Xue et al., 1999).

A eletroporação envolve a aplicação de campos elétricos de alta intensidade e curta duração para permeabilizar membranas reversivelmente. O potencial de membrana induzido, e, portanto, a eficiência de entrada de DNA nas células bacterianas, aumenta com a força do campo elétrico aplicado. Entretanto, a porcentagem de morte celular causada por danos elétricos também aumenta proporcionalmente com a força do campo elétrico aplicado. Como resultado, a eficiência de transformação é o efeito combinado desses dois fatores, sob dadas condições de transformação. A força do campo elétrico ótima varia entre as diversas espécies bacterianas e é usualmente mais baixa para bactérias Gram-positivas (4 – 12,5 kV/cm para alguns bacilos e 7 – 18 kV/cm para pequenos coccus) que para espécies Gram-negativas (10 – 20 kV/cm). Não está claro se isto é devido ao fato de que espécies de bactérias Gram-positivas sejam mais sensíveis a tratamentos com elevados campos elétricos que espécies Gram-negativas, sob as mesmas condições (Dower et al., 1992 *apud* Xue et al., 1999). Em geral, as eficiências de transformação obtidas por eletroporação de bactérias Gram-positivas são relativamente baixas, se comparadas às das espécies Gram-negativas (Trevors et al., 1992 *apud* Xue et al., 1999).

Teoricamente, maiores taxas de sobrevivência celular conduziriam a um aumento da eficiência de eletrotransformação, particularmente para espécies Gram-positivas, para as quais a aplicação de elevados campos elétricos deveriam facilitar a entrada de DNA nas células através de suas relativamente densas paredes celulares. Substâncias osmoticamente ativas como sacarose, sorbitol e glicerol são geralmente utilizadas em concentrações isosmóticas como meios para suspensão de células eletro-competentes. A inclusão de substâncias osmoticamente ativas no meio para eletroporação poderia balancear a elevada pressão interna das células bacterianas (Trevors et al., 1992 *apud* Xue et al., 1999).

A amplitude, a forma do campo elétrico e a força do pulso são determinadas pela capacitância do equipamento de eletroporação e pelas dimensões da cubeta. Células mantidas a 0°C após o pulso elétrico podem manter os poros abertos e, assim, aumentar a probabilidade de penetração do DNA através desses poros. A diluição deve ser realizada em meio à temperatura ambiente. O DNA em conformação linear apresenta os melhores níveis de expressão e transformação; recomenda-se utilizar concentração de DNA entre 1 e 40 µg/mL. A eficiência de transformação é aumentada se as células são ressuspendidas em tampão salino (por exemplo, tampão HEPES, comparado a tampões de solução não – iônicos como manitol ou sacarose) (Sambrook et al., 1989).

Argumentos teóricos sugerem que a formação do poro é devida a um potencial transmembrana que se desenvolve como resultado de um campo elétrico induzido pelo acúmulo de íons nas superfícies das membranas. A magnitude do campo externo requerido para gerar um potencial transmembrana suficiente para a formação do poro é inversamente relacionada ao tamanho da célula e depende da forma celular (Miller et al., 1988).

A amplitude (força do campo elétrico inicial, E_0) e a duração (Duração do Pulso Elétrico, T) da onda descarregada são importantes, e valores ótimos dependem da espécie e linhagem testadas (Miller et al., 1988). Para células procarióticas, recomenda-se a realização de processos de eletroporação com valores de T entre 5 e 10 ms (Gene Pulser® II Electroporation System Instruction Manual Catalog). Entretanto, melhores eficiências de transformação de espécies Gram – positivas foram obtidas sob valores para Duração do Pulso Elétrico superiores a 10 ms (Miller et al., 1988; Dunny et al., 1991)

O pulso produzido pela descarga de um capacitor apresenta forma de onda com decaimento exponencial. A força do campo elétrico declina com o tempo como uma função da resistência do circuito e do tamanho do capacitor. A curva do decaimento exponencial é descrita por

$$E_{(t)} = E_0 e^{-t/T}$$

em que $E_{(t)}$ é a força do campo elétrico (V/cm) em qualquer tempo t (s), E_0 é o campo elétrico inicial, e T é a Duração do Pulso Elétrico (s) resistência – capacitância (RC). A Duração do Pulso Elétrico (T) depende da resistência total (R , em Ω) e da capacitância (C , em F) do sistema, como segue:

$$T = RC$$

Portanto, T descreve a forma de decaimento da onda e é o tempo requerido para que a força do campo elétrico inicial decline para $1/e$ (aproximadamente 37%) do valor inicial. Devido ao fato de que a resistência da amostra afeta a Duração do Pulso Elétrico

(T), a composição da amostra e a geometria da cubeta têm importante influência na forma de descarga do pulso. A resistência da amostra é inversamente proporcional à força iônica e à temperatura do Meio e da área trans-seccional da interface solução-eletrodos. A resistência é diretamente proporcional à distância entre os eletrodos (Miller et al., 1988).

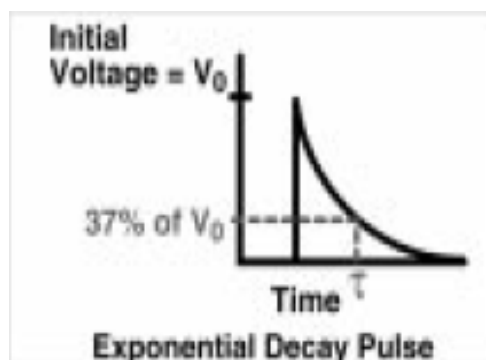


Figura 2.5. Curva do decaimento exponencial do pulso produzido pela descarga de um capacitor. A Duração do Pulso Elétrico (τ) é o tempo requerido para que a força do campo elétrico inicial (V_0) decline para $1/e$ (aproximadamente 37%) do valor inicial.

2.5.1 Condições elétricas requeridas para eletroporação

Segundo Sambrook et al. (1989), a voltagem transmembrana (ΔU) é um valor constante e independente da natureza bioquímica da membrana celular; provavelmente, variações na eficiência da eletroporação de uma linhagem celular para outra são devidas a diferenças na taxa e eficiência de reconstituição da membrana ao final do pulso elétrico. A voltagem transmembrana (ΔU) é induzida por campos elétricos e varia à proporção direta do diâmetro da célula. Valores ótimos caracterizados para leveduras e bactérias encontram-se entre 12,5 e 16,5 kV/cm.

Quando a descarga do capacitor é direcionada a uma amostra colocada entre dois eletrodos, a voltagem que atravessa os eletrodos atinge rapidamente um pico e declina com o tempo:

$$V_t = V_0 [e^{-t/T}]$$

em que T é a Duração do Pulso Elétrico, isto é, o tempo necessário para que a voltagem (V) decline para 1/e do valor inicial do pico de voltagem (V_0). A Duração do Pulso Elétrico é definida pelo produto da resistência total (R, em Ω) e pela capacitância (C, em μF). Desta forma, um alto capacitor requer mais tempo para descarregar através de um meio apresentando uma dada resistência; um capacitor de um dado tamanho descarrega mais lentamente na medida em que a resistência do meio aumenta (Sambrook & Russel, 2001).

De acordo com Sambrook & Russel (2001), a força do campo elétrico (E) varia à proporção direta da voltagem inicial aplicada (V_0) e à proporção inversa da distância (d) entre os eletrodos (parâmetro determinado pelo tamanho da cubeta para eletroporação). Por exemplo, uma cubeta de espaço entre eletrodos igual a 0,2 cm proporcionará um campo elétrico inicial de força igual a 500 V/cm, quando a ela for aplicada V_0 de 1000 V.

A forma do pulso é determinada pelo *design* do equipamento. A forma de onda produzida pela maioria dos equipamentos comerciais é simplesmente o padrão de decaimento exponencial de um capacitor em processo de descarga elétrica (Sambrook & Russel, 2001).

Cuidados especiais devem ser tomados para evitar a explosão da cubeta de eletroporação, geralmente causada por soluções muito condutivas. O limite da

condutividade depende da voltagem selecionada, da distância entre eletrodos e da força iônica da amostra; em geral, superior a 10 meq. Dentre as causas para a condutividade excessiva das soluções de eletroporação estão: (1) lavagem e ressuspensão de células em meio de elevada força iônica; (2) lavagem insuficiente das células; sais contidos no meio que não foram removidos; (3) células lisadas durante a preparação: conteúdo celular contribui para a condutividade; (4) DNA em solução de elevado conteúdo de sais; (5) eletroporação de células acima de 0°C (lise celular) (Gene Pulser® II Electroporation System Instruction Manual Catalog).

2.6 Transformação de células bacterianas intactas por Eletroporação

Miller et al. (1988) mostraram que células bacterianas intactas podem ser eficientemente transformadas por eletroporação, processo rápido, de fácil execução e que requer preparação mínima das amostras. Uma vez que a técnica foi bem sucedida quando aplicada a células de mamíferos, protoplastos de plantas, fungos, bactérias, é muito provável que dependa da conservação das propriedades físicas das membranas.

Muitos pesquisadores descreveram métodos para a transformação por eletroporação de células intactas de diversas espécies do gênero *Bacillus* e de outras bactérias Gram-positivas (Vehmaanperä, 1989; Masson et al., 1989; Mahillon et al., 1989; Belliveau & Trevors, 1989; Brigidi et al., 1990; Taylor & Burke Jr., 1990; Shark et al., 1991; Dunny et al., 1991; Moro et al., 1995; Xue et al., 1999; Rhee et al., 2007).

Masson et al (1989) e Mahillon et al (1989) realizaram transformações de diferentes linhagens de *B. thuringiensis* por eletroporação. Taylor & Burke Jr (1990)

utilizaram a técnica de eletrotransformação para *B. sphaericus* e Belliveau & Trevors (1989) para células vegetativas intactas de *B. cereus* 569.

Brigidi et al. (1990) utilizaram a técnica de eletroporação como uma alternativa à transformação de protoplastos ou de células competentes convencionalmente preparadas de *B. subtilis*.

Shark et al (1991) descreveram a transformação de células vegetativas de *B. megaterium* 7A17 por eletroporação utilizando microprojéteis.

Dunny et al. (1991) desenvolveram um protocolo para transformação de células intactas de *Enterococcus faecalis*, uma bactéria Gram – positiva, por eletroporação. Para isto, realizaram sistemática avaliação dos efeitos das variações em parâmetros como condição de crescimento; composição da solução de eletroporação; condições de eletroporação (como campo elétrico e resistência); tamanho, concentração e pureza do DNA utilizado para transformação e condições para seleção de transformantes. A solução de eletroporação utilizada foi composta por 0,625 M sacarose e 1,0 mM MgCl₂, pH 5,5.

Moro et al. (1995) realizaram a introdução de DNA plasmidial (pWH 1510 Tet^r e Amp^r) em células intactas de *Bacillus megaterium* WH320 *lac* por eletroporação, empregando o Meio de Eletroporação 25% polietilenoglicol (PEG) 6000 e 0,1 M sorbitol.

Xue et al (1999) desenvolveram um método de eletroporação de alta osmolaridade para a transformação de *B. subtilis* e *B. licheniformis*. A presença de elevadas concentrações de substâncias osmóticas, sorbitol e manitol, nos meios de

crescimento, eletroporação e recuperação resultou em um aumento de aproximadamente de 5000 vezes na eficiência de transformação de *B. subtilis*.

Rhee et al (2007) trataram células de *B. coagulans* P4-102B em início ou meio da fase exponencial de crescimento com Meio de Eletroporação SG (10% glicerol; 0,5 M sacarose e 1 mM MgCl₂). De modo a avaliar a transformabilidade de *B. coagulans*, esses pesquisadores utilizaram vetores plasmidiais que são empregados com sucesso para outras bactérias Gram-positivas, incluindo pNW33N, pDG148Stu, pMUTIN4, pMSP 3535 e pMSP 3535VA (Bryan et al., 2000; Joseph et al., 2001; Vagner et al., 1998 *apud* Rhee et al., 2007).

2.7 Eficiência de transformação

De acordo com Shark et al (1991), os fatores biológicos que afetam a eficiência de transformação e estão associados às células são: fase de crescimento; concentração osmótica do meio; densidade celular e linhagem celular. Diferentemente das leveduras, células de *B. megaterium* em fase exponencial de crescimento são mais eficientemente transformadas que as células em fase estacionária.

A eficiência de transformação por eletroporação, por sua vez, é também influenciada pela força do campo elétrico aplicado, pela amplitude do pulso elétrico, pela temperatura das células antes, durante e depois da eletroporação e pela conformação e concentração do DNA utilizado (Sambrook et al., 1989).

Foram relatadas eficiências de transformação por eletroporação de espécies do gênero *Bacillus* e de outras espécies Gram-positivas da ordem de 10⁶ transformantes/μg de DNA (Mahillon et al., 1989; Masson et al., 1989; Vehmaanpera, 1989; Bone & Ellar,

1989; Taylor & Burke Jr., 1990; Brigidi et al., 1990; Dunny et al., 1991; Moro et al., 1995; Xue et al., 1999; Rhee et al., 2007).

Belliveau & Trevors (1989) transformaram células vegetativas intactas de *Bacillus cereus* 569 por eletroporação com o plasmídeo pC194 e obtiveram eficiências máximas de transformação de $2,0 \times 10^{-5}$ transformantes por célula viável, utilizando campos elétricos de 3750 V/cm e capacitores de 3,0 μ F. Utilizando o mesmo plasmídeo, Bone & Ellar (1989) obtiveram eficiências de transformação superiores a 10^5 transformantes por μ g de pC194 para a eletroporação de células intactas de uma das linhagens de *B. thuringiensis* estudadas por esses pesquisadores.

Eficiências de transformação superiores a $2,0 \times 10^5$ transformantes por μ g de DNA plasmidial foram obtidas pela aplicação do protocolo descrito por Dunny et al. (1991) para células intactas de *E. faecalis*.

Masson et al. (1989) obtiveram eficiências de transformação superiores a 5×10^6 transformantes/ μ g de DNA para uma linhagem de *B. thuringiensis* e indicaram que a técnica de eletroporação deveria ser aplicável para outros membros do gênero *Bacillus*. Mahillon et al. (1989) obtiveram entre 10^2 a 10^5 transformantes/ μ g de DNA, dependendo da linhagem de *B. thuringiensis* utilizada ou do replicon.

Brigidi et al. (1990) introduziram DNAs plasmidiais (pB 1424) em *B. subtilis* e obtiveram 10^4 transformantes/ μ g de DNA como eficiência máxima de transformação.

A eletroporação de suspensões celulares de *B. sphaericus* realizada por Taylor & Burke Jr. (1990) produziu entre 10^5 a 10^6 transformantes/ μ g de DNA utilizado.

Shark et al (1991) verificaram uma interação entre a concentração osmótica do meio e a densidade celular na transformação de *B. megaterium* 7A17 por eletroporação

utilizando microprojéteis. A densidade celular ótima encontrada foi a de 10^8 CFU/ 85 mm de diâmetro de placa. Foram obtidos $8,32 \times 10^{-6}$ transformantes por célula recipiente para células bombardeadas provenientes de culturas em meio da fase exponencial de crescimento.

Moro et al. (1995) obtiveram $5,8 \times 10^3$ UFC por μg de pWH 1510, com 58% de sobrevivência celular, como rendimento máximo de eletroporação de células intactas de *B. megaterium* WH 320.

Xue et al. (1999) obtiveram rendimentos máximos de $1,4 \times 10^6$ e $1,8 \times 10^4$ transformantes por μg de DNA para a transformação de *B. subtilis* e *B. licheniformis*, respectivamente. Tais eficiências foram alcançadas pela aplicação do protocolo caracterizado pela combinação de alta osmolaridade e elevados campos elétricos, descrito por esses pesquisadores.

Rhee et al (2007) atingiram eficiência de transformação de *B. coagulans*, utilizando o plasmídeo pNW33N, de aproximadamente $1,5 \times 10^{16}$ por mol de DNA.

2.8 Plasmídeos nativos de *Bacillus megaterium*

Os plasmídeos podem constituir uma quantidade substancial do conteúdo genético total de uma bactéria. Podem carregar genes envolvidos na virulência, metabolismo, degradação de compostos tóxicos, resistência a antibióticos e a metais pesados, bem como sua própria transferência entre espécies ou gêneros. Portanto, podem ser considerados como *pool* de DNA extracromossomal que pode ser compartilhado entre populações. Muitos plasmídeos em *Bacillus* e em outras bactérias Gram-positivas não apresentam fenótipo aparente. A maioria das linhagens de *B.*

Megaterium contém mais de quatro plasmídeos nativos, mas até recentemente poucos de seus genes foram examinados (Rosso & Vary, 2005).

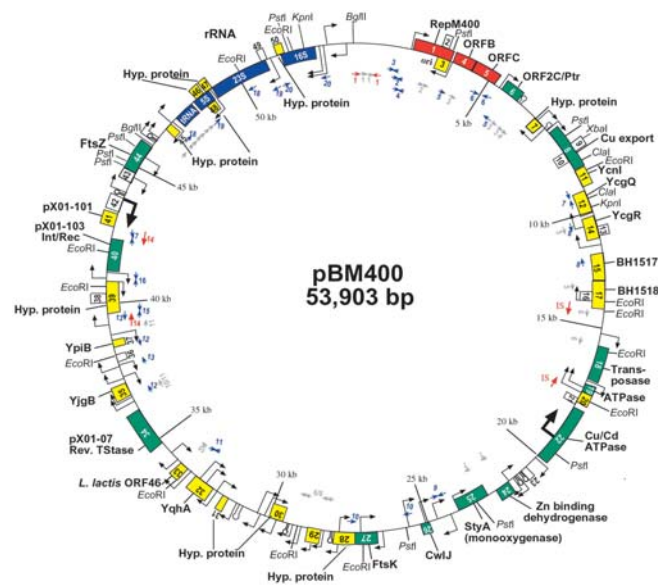


Figura 2.8. Mapa do plasmídeo pBM 400 nativo de *B. megaterium* (Sholle et al., 2003). Genes para replicação, divisão celular, recombinação, resistência a metais pesados são encontrados em pBM 400. A região replicon (RepM400, ORFB e ORFC) está em vermelho. RepM400, sozinha, é suficiente para a replicação; porém, ORFB é requerida para a estabilidade.

A maior parte dos estudos em genética de *B. megaterium* foi realizada na linhagem QM B1551 (Vary, 1994). Esta linhagem contém sete plasmídeos nativos. Seis das sete origens de replicação compatíveis foram clonadas e seqüenciadas. Os quatro plasmídeos da linhagem QM B1551 seqüenciados (dentre eles, o plasmídeo pBM 400, Figura 2.8) contêm genes que apresentam significativa similaridade com aqueles de

genomas e plasmídeos de bacilos patogênicos, como *Staphylococcus*, *Streptococcus* e Archea. Este fato representa importantes implicações na patogenicidade e na resistência a antibióticos entre bactérias (Rosso & Vary, 2005). Análises da composição de bases de pBM 400 revelaram conteúdo G + C de 36,5%, similar ao conteúdo G + C descrito para linhagens de *B. megaterium*, entre 37 e 39% (Priest et al., 1981 *apud* Sholle et al., 2003).

2.9 Penicilina G Acilase (PGA)

A enzima Penicilina Acilase, também denominada amidohidrolase, amidase ou beta-lactâmico acilase (E.C. 3.5.1.11), foi primeiramente isolada de *Penicillium chrysogenum* Q176 (Sakaguchi & Murao, 1950).

Penicilinas acilases (PACs) estão envolvidas tanto na hidrólise (Figura 2.9.1) como na acilação de antibióticos beta-lactâmicos, para gerar seus respectivos núcleos beta-lactâmicos, como o ácido 6-aminocefalosporânico (6-APA), utilizados na produção de penicilinas semi-sintéticas e cefalosporinas (Figura 2.9.2). Aplicações biotecnológicas de PACs emergiram como importante alternativa aos procedimentos químicos tradicionais para a produção de antibióticos beta-lactâmicos, de pequenos peptídeos e de isômeros puros a partir de misturas racêmicas (Arroyo et al., 2003).

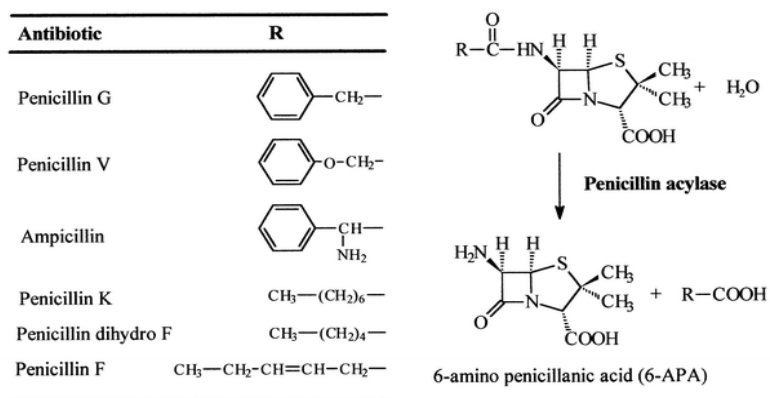


Figura 2.9.1. Hidrólise de penicilinas, catalisadas por penicilinas acilases, para produzir ácido 6-aminopenicilânico (6-APA) (Arroyo *et al.*, 2003).

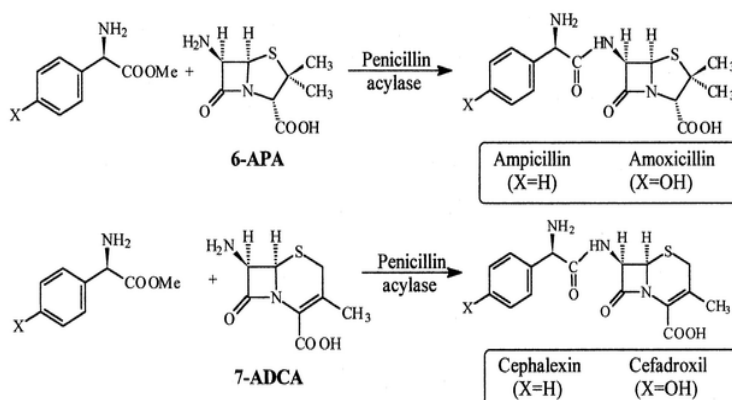


Figura 2.9.2. Síntese de importantes antibióticos beta-lactâmicos, catalisada por penicilina acilase (Arroyo *et al.*, 2003).

Penicilinas são os antibióticos beta-lactâmicos mais largamente utilizados. Representam cerca de 19% do mercado mundial estimado de antibióticos, devido à sua ação inibitória superior sobre a síntese de parede celular bacteriana, amplo espectro de atividade bactericida, baixa toxicidade e excepcional eficácia contra várias linhagens

bacterianas. Entretanto, o uso excessivo desses antibióticos conduziu à seleção de patógenos resistentes (Parmar et al., 2000).

Penicilinas semi-sintéticas como a amoxicilina e a ampicilina exibem melhores propriedades (estabilidade aumentada, absorção facilitada e reduzidos efeitos colaterais, como exemplos), se comparadas às penicilinas naturais G e V, e representam uma solução prática para o problema da resistência microbiana adaptativa a antibióticos (Arroyo et al., 2003).

Devido ao fato de o preço do 6-APA provocar impacto direto no custo das penicilinas semi-sintéticas, contínuos esforços têm sido empregados para melhorar a tecnologia de produção desse ácido. A disponibilidade de catalisadores enzimáticos de baixo custo, com especificidade, atividade, pureza e estabilidade melhoradas são esperadas para reduzir o custo de enzimas imobilizadas e, finalmente, o custo da produção de 6-APA e penicilinas semi-sintéticas (Parmar et al., 2000).

A expressão de PGA foi verificada em muitos sistemas microbianos de expressão, e uma variedade de estratégias foram utilizadas para o aumento de sua produtividade (Zhang et al., 2006). As culturas mais comumente empregadas na produção em larga escala dessas enzimas incluem *Bacillus megaterium*, *Escherichia coli*, *Streptomyces lavendulae*, *Achromobacter sp*, *Proteus rettgeri*, *Actinoplanes sp*, *Bovista plumbea*, *Kluyvera atrophila*, *Pseudomonas melanogenum* e *Penicillium chrysogenum* (Savidge, 1984; Shewale & Sivaraman, 1989).

Estima-se que mais de 88% do 6-APA produzido mundialmente é obtido por via enzimática pelo uso de PGA, e o restante, por Penicilina V Acilase (PVA) (Rajendhran & Gunasekaran, 2004), o que justifica o fato de a PGA ocupar a segunda posição como enzima mais utilizada industrialmente no mundo, sob a forma imobilizada, abaixo

somente da glicose isomerase. Em contraste com os processos de desacilação química, a conversão enzimática é sítio e estereo-específica, e as condições de reação são amenas. Dados econômicos comparativos sobre a produção de 6-APA por processos químicos convencionais e por processos enzimáticos indicam que a via enzimática é, ao menos, 9% mais barata. Essa redução de custos pode atingir mais de 20%, se a produção por via enzimática for integrada à produção de penicilina G por fermentação (Parmar et al., 2000).

Uma variedade de estratégias foi desenvolvida para aumentar a produtividade de linhagens carregando o gene da PGA (gene *pac*), pela busca de linhagens mutantes isoladas por mutagênese convencional e pelo uso de tecnologia de DNA, para a construção de linhagens recombinantes com maior produtividade de PGA.

Panbangred et al. (2000) isolaram uma linhagem de *B. megaterium* mutante, designada Bm-UN1, que produz mais PGA que sua linhagem parental, *B. megaterium* ATCC 14945. A expressão do gene *pac* de Bm-UN1 foi aumentada em *B. megaterium* UNcat (Bm-Uncat, em que falta o gene *pac*) pelo uso do plasmídeo recombinante pBA 402 contendo o gene *pac*. A atividade da PGA produzida por Bm-Uncat foi muito superior à produzida por *B. subtilis*, transformadas com o mesmo plasmídeo (pBA 402). O máximo de atividade de *B. megaterium* transformantes foi 20,4 U/mL, enquanto que para *B. subtilis* foi 5,8 U/mL, para 24 horas de cultivo.

Rajendhran & Gunasekaran (2007) clonaram o gene *pac* de *B.adius*, que foi expresso com seu próprio promotor em diferentes linhagens de *E. coli*. A máxima atividade para PGA recombinante (1,82 U/mL) foi obtida com *E. coli* DH5 α , com 20 horas de cultivo.

A organização polipeptídica típica das PGAs foi descrita como sendo a seguinte: sequência sinal – subunidade alfa – peptídeo espaçador – subunidade beta (Verhaert et al., 1997 *apud* Zhang et al., 2006).

A PGA de *B. megaterium*, como as de outras bactérias Gram – positivas, é secretada para o meio. O gene que codifica para a PGA de *B. megaterium* (gene *pac*) apresenta 2406 nucleotídeos. A subunidade alfa apresenta aproximadamente 29 kDa e a subunidade beta, 60 kDa. A sequência de aminoácidos do gene *pac* (Figura 2.9.3) revelou grande similaridade com a de outras beta-lactamases (Martín et al., 1995).

```

1  TTTTAATAATAAATAATAGCTGAATTAAGGAATACTACATGACTAAGGGATTTA
61  GAACAAAAGTTGGATAGACTAAGATAAAAACATAAATAATCTGAAAGTTCTAATA
121  TTTAAATATTATCTTSAATAGTATAACGCTAAGGTTATGATTCGATATAGTGTAT
      -35                -10
181  AAAAAGTGGAGTGGAAATGTAAATTATGAAGACGAACTGGCTAATATCACTCATAATGCT
      rbs                M K T E W L I S V I I L 12
241  ATTTGTTTTCATTTTCTCAAAATCTAGTTTTTCTGCGGAGGATAGAAATGAAAGGAT
      F V P I P P Q N L V F A G E D K N E Q V 32
      α—————>
301  CAAGCTAGTAGGTGATAAATTTGGAGTACCCCAATTTATACGCTAAAATAAAAAGATTT
      K V V R D N P Q V P H L Y A E N K K D L 52
361  ATATGAAGCTATGATATGTTATGCCAAGGATCGACTATTTAGTTGGAATGTTCCG
      Y E A Y G Y V M A K P R L P Q L E M P R 72
421  TCGCGAAATGGGGACCGTTTCAGAAATTTTGGAGAGATTTATCTTCAAAGATGA
      R G N B T V G B I P O R D Y L S K D E 92
481  GCATCCGAGAGAGATGATATAGTAATAAAGAAATTAAGAAATGATGACCGTCTGGA
      Q S R R D G Y S N K E I K K M I D Q L D 112
541  TGCTCAGCCAAAAGAAATTAAGCAAATTTGCTGAAGTATTTACGTTATGTAANTGA
      R Q P K K L I A K F A E G I S R Y V N E 132
601  AGCTTAAAGATCCAGATGATANGCTTTCGAAGGAGTTTCATGAATATCAGTTTTACC
      A L K D P D D K L S K E F H E Y Q F L P 152
661  GCAAAAATGGACTTCAACAGATCTGTCTCGGTGTTATATGATCCATGACCTATTTAT
      Q K W T B T D V V R V Y M V S M T Y P M 172
721  GSATAATCACCGAGTAAAAAAGCGAGACTTTCGAAAGCTAGAACATGAATATGG
      D N H Q E L K N A E I L A K L B H E Y G 192
781  GACGAAGTTCCCGAAAATGTTGATGATTTAGTGTGAAAATGATCTGAGCGCTCC
      T E V S R K M F D D L V W K N D P S A P 212
841  TACAAGCATGTAGCGAGGGGAACCAAAAGGACTGCTCTCAATCCCTTCAAAT
      T S I V S E G K P K R D S S S Q S L Q I 232
901  ACTGTCTTCAGCTGTAATCAAGCTTCTGAAAAGCTCGAAAAGGAAAAGGAGAAATTTGT
      L S S A V I K A S E K V G K E R R N P V 252
961  CCAACACTCGAAGAACTGGATTAACCTTAAGATAGCGAGTAATGCCCATAGTGG
      Q T S E E L G L P L K I G S N A A I V G 272
      β—————>
1021  TTCCGAAATCTCCACACGAAATGCTTTATATTAGTGGACACAGTAGTGTGTTG
      S E K S A T G N A L L P S G P Q V G P V 292
1081  TGCTCCTGGATTTTGTACGAGTGGTTTGCATCGGCGAGTTTGTATATGAAAGTTC
      A P G P L Y E V G L H A P Q P D M E G S 312
1141  AGGATTCATAGGCTATCTTTCATGATGTTGGAGCCACAACTCACTTTGCTTAAGTGC
      G F I G Y P P I M P G A N N H P A L S A 332
1201  TACAGCTGGGTACGGAATGTAACCGATATCTTGGAGAAAATTAAGTCCGAAGAACTC
      T A G Y G N V T D I F E E K L N A K N S 352
1261  TTCCAGTATTTATACAAAGGAAAGTGGAGACATGAAAAGAGGAAAGGAACTTTTCA
      S Q Y L Y K G K W R D M E K R K E S P T 372
1321  AGTCAAAGGAGCAATGGAGAAAAGAAAACAGTAGAAAAGATTTATATGACAGTACA
      V K G D N G E K K T V E K I Y Y R T V H 392
1381  TGCTCCTGTAATAGTAGAGATGAACAAATAAGTGGCTTACAGTAAGTGGTGTCTT
      G P V I S R D E T N K V A Y S K S W S P 412
1441  CCCTGGAAGTGGAGCCCAAGCATGTCGCTTACATGAAGGAAATGGGCAAAAACCTT
      R G T E A Q S M S A Y M K A N W A E N L 432
1501  AAAAGAATTTGAGAAATGAGCTAGTGAATACCGATGCTTTGAAATGGTATTATCGGGA
      K E F R N A A S E Y T M S L N W Y Y A D 452
1561  TAAGAGGGTGATATAGCTTATTATCATGTAGGAGATATCCAGTAGAAACAGCAAAAT
      K K G D I A Y Y H V G R Y P V R N S K I 472
1621  TGATGAAGAATCCCTACACCGAAGCAGGAGAAATAGAGTGGAAAGGTTTTATTCTTT
      D R R I P T P G T G E Y E W K G P I P P 492
1681  TAAAGAGAACCCCTCATGTAATCAATCCGAAGATGGCTATGTAGTTAATGGAAACATAA
      K E N P H V I N P K N G Y V V N W N N K 512
1741  GCCTTCTAAGAGTGGTAAATGGTGAATATGTTTTTATGGGAGGAGATATGAGT
      P S K E W V N G E Y S P Y W G E D N R V 532
1801  CCAACAATATCAATGGATGGAAGGAGGAGGAAAGTTACATTAAGAATATTAAAGA
      Q Q Y I N G M B A R G K V T L E D I N E 552
1861  AATTAATATACCGCAAGCTTTCACACCTTCGACCAACCTTTTAAACAGTATTGAT
      I N Y T A S F A Q L R A N L P K Q L L I 572
1921  TGATCTCTGCAAGAATAAATCAACCAACCGGAACTACATATTATTAAAGAAAAC
      D V L D K N K S T N G N Y I Y L I E K L 592
1981  GGAAAGATGGAAATATCTAAAAGAGACGAAATTAAGATGGATATTATGACGAGGGAT
      E E W N N L K E D E N K D G Y Y D A G I 612
2041  TGGGCACTTCTTGATGAATGGTGGATTAATCTCCATGATAAACTCTTTATGGATGAAT
      A A F P D E W W N N L H D K L F M D E L 632
2101  GGGAGACTTCTATGAAATACGAAAGAAATACCGATCATCGCTATGGGCTCATAGC
      G D P Y G I T X E I T D H R Y G A S L A 652
2161  ATATAAATATTAAACAGGAACTACAACATATAAATGGTGAACGATAGCAGGAAA
      Y K I L N K E S T N Y K W V N V D Q E K 672
2221  AATTAATGGAAGCACAAATGAAGTACTTGTAAATTCATCAGAAAAGGTTGAA
      I I M E S T N B V L A X L Q S B K O L K 692
2281  AGCAGAAAATGGGCTATGCTATAAAAAGAGTACTTTTGGIAAAATCATTGATGG
      A E K W R M P I K T M T F G E K S L I G 712
2341  TATCCCAAGGCTATGGCTCAATGACTCCAATATTGAATGAATGGTGAAGTGA
      I P H G Y G S M T P I E M N R G S E N 732
2401  TCATTAATGAATGACTCCACAGGCGAGTGGCTTTAAGTACACAGCCGCTGGTCA
      H Y I E M T P T G P S G P N I T P P G Q 752
2461  AATGGATTTGAAAAAAGATGCAAGTAAAGTACACTATGATGACCACTACTTAT
      I G P V K K D G T I S D H Y D D Q L V M 772
2521  GTTGGCGAATGCAATCAAGCCACTTATTAAACAGAAAGATTAATAAAGCAGC
      F A E W K P K P Y L P N E K D I N K A A 792
2581  TAAAATGTTAGCGCATTAATATGAGTAGTAGAAGTAAAGTTGATATACCCAT
      K N V S A L N M S K 802
2641  CATTCAGCATAAAGAGCTATACTATTGATGTGTGACCTCGAATTTGAATCGGGTCA
      -----> <-----
2701  TTTTGTAAATCCCACTTGTAAAGACTTTCAAAAAGTAGTTACAAAACAAAACCGCGG
2761  GCAAGGGAAATCTTACTCCGCAATATATTAGAATANTGGGAATGATGATATTG
2821  GGAGATGCTCAATCATGTGATGATAGTACAGTAAAGTATTAAAGATATTACGCAAT
2881  ATTTTGGCAGCAGCTGCTC

```

Figura 2.9.3. Sequência de nucleotídeos e de aminoácidos do gene *pac* de *B. megaterium* (dados depositados no GenBank, sob o número de acesso No. Z37542) (Martín et al., 1995).

2.9.1 Produção de PGA por microorganismos geneticamente modificados (OGMs)

A tecnologia do DNA recombinante tem sido largamente utilizada para aumentar a produção de proteínas em microorganismos naturalmente produtores dessas biomoléculas. Dentre os microorganismos mais utilizados, está a bactéria Gram – negativa *E. coli*, dada sua expressiva caracterização genética. A PGA de *B. megaterium* ATCC 14945 foi expressa em *E. coli*, mas não foi possível verificar a secreção da enzima recombinante, provavelmente devido ao fato de o peptídeo sinal contido na seqüência do gene *pac* de *B. megaterium* não ser reconhecido pela maquinaria enzimática de secreção de *E. coli* (Martín et al., 1995).

B. megaterium apresenta diversas vantagens sobre outros sistemas hospedeiros microbianos para a produção e secreção de proteínas recombinantes (Malten et al., 2005a). Em contraste com *E. coli*, *B. megaterium* possui elevada capacidade para exportação de proteínas. Comparado com *B. subtilis*, revela estabilidade de plasmídeos e baixa atividade intrínseca de proteases (Vary, 1994). Importantes pré-requisitos para aplicações biotecnológicas de *B. megaterium* incluem eficiente sistema de transformação, replicação de plasmídeos e a possibilidade de integrar genes heterólogos em seu genoma (Rygun et al., 1991 *apud* Yang et al., 2006).

Para maximizar a capacidade de *B. megaterium* para a secreção de exoenzimas em grandes quantidades para o meio, vetores utilizando os peptídeos sinais (SP) da esterase LipA de *B. megaterium* (Malten et al., 2006) e PGA (Biedendieck et al., 2007a) foram desenvolvidos para a produção de proteínas recombinantes extracelulares.

Yang et al. (2006) descreveram a expressão do gene da penicilina G acilase (PGA) isolado de *Bacillus megaterium* ATCC 14945 em sua linhagem derivada *B. megaterium* DSM 319.

Meevootisom & Sauders (1987) clonaram um fragmento cromossomal de 7,7 kb *EcoRI* incluindo uma região de cerca de 2,5 kb que codifica para PGA em *E. coli*. A enzima recombinante foi produzida e acumulada no espaço periplasmático, pois não foi detectada atividade enzimática no meio de cultivo. A enzima de *B. megaterium* é secretada para o meio, razão pela qual o gene *pac* dessa bactéria Gram – positiva apresenta o peptídeo sinal. É compreensível que não ocorra o reconhecimento do peptídeo sinal do gene *pac* de *B. megaterium* pela maquinaria de *E. coli*, uma vez que essa última é uma bactéria Gram – negativa e não secreta suas proteínas para o meio.

A relativamente baixa expressão do gene em *E. coli* pode ser devida à pequena força de seu promotor ou à pobre leitura transcricional pelo promotor do vetor. Uma vez que a PGA de *E. coli* é extensivamente processada pós-transcricionalmente, uma explicação adicional seria a de que a enzima de *B. megaterium* não é processada corretamente quando expressa de modo heterólogo. Isto explicaria a observação de falha de *E. coli* para a secreção de penicilina acilase de *B. megaterium*. Outras possibilidades incluiriam o enovelamento incorreto das subunidades alfa e beta da PGA de *B. megaterium* produzida por *E. coli*, dada a possível ausência de processamento do peptídeo espaçador, contido entre as duas subunidades da enzima em sua forma precursora (Meevootisom & Sauders, 1987).

Gamer et al. (2007) desenvolveram um vetor que permite a produção e secreção de proteínas recombinantes em *B. megaterium*. Diversos sistemas promotores (xilose ou sacarose-induzíveis, T7 RNA polimerase dependente) podem ser empregados para a

expressão de genes recombinantes, enquanto que uma série de diferentes peptídeos sinais podem ser usados para a secreção de proteínas. Sequências codificantes para peptídeos de fusão (His-6 e StrepII) tornam possível a purificação direta por afinidade (Gamer et al., 2007).

2.10 OBJETIVOS

O objetivo central deste trabalho foi estudar as condições de cultivo e de eletrocompetência, de modo a estabelecer um protocolo para transformação por eletroporação de células vegetativas de *B. megaterium* ATCC 14945 com DNA plasmidial contendo o gene *pac* (gene da enzima PGA) do próprio *B. megaterium*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Material

3.1.1 Microorganismos

Foram utilizadas células vegetativas de *Bacillus megaterium* ATCC 14945, conservadas em solução de glicerol 20% (v/v), sob – 80°C. Tais células foram obtidas por meio de cultivo de esporos conservados em criotubos, em solução de glicerol 20% (v/v), sob – 80°C, doados pela Fundação André Tosello, Campinas, SP. Alíquotas das culturas de esporos para a produção de células vegetativas foram recolhidas após 12 horas de cultivo em Meio LB, a 300 rpm e 30°C, sob condições assépticas, para a preparação de estoques de células vegetativas em glicerol.

As linhagens de *E. coli* DH5 α e BL21 foram utilizadas para a amplificação e manutenção dos plasmídeos (Sambrook et al., 1989).

3.1.2 Meios de Cultivo

Foram realizados testes para obtenção de resultados preliminares que permitissem a comparação das taxas de crescimento de células vegetativas de *B. megaterium* em dois diferentes meios, LB e Nutriente.

O meio LB (Luria – Bertani) utilizado para o cultivo foi composto por (p/v): 10,0 g/L de triptona; 5,0 g/L de extrato de levedura e 10,0 g/L de NaCl. O pH foi

ajustado para 8,0. Para a preparação de ágar LB, adicionou-se 20 g/L de ágar bacteriológico.

O meio Nutriente foi testado como alternativa ao crescimento de *B. megaterium*, dada a hipótese de insuficiência de nutrientes no meio LB para essa espécie, considerando-se também as injúrias sofridas pelas células durante o processo de transformação por eletroporação. O meio Nutriente foi preparado adicionando-se 3,0 g/L de extrato de carne e 5,0 g/L de peptona, e ajustando-se o pH para 7,0. Para o ágar Nutriente, adicionou-se 20 g/L de ágar bacteriológico.

Finalmente, foi testado o Meio para o protocolo de eletrotransformação de Alta Osmolaridade, descrito para eletroporação de *B. subtilis* (Xue et al., 1999). O Meio de Crescimento foi composto pela adição de 0,5 M de sorbitol em Meio LB (Meio LBS).

3.1.3 Meios de Eletroporação e Recuperação pós-pulso elétrico

Os Meios de Eletroporação empregados foram: 25% PEG 6000/0,1 M Sorbitol (Moro et al., 1995); 0,625 M Sacarose/1,0 mM MgCl₂, pH 5,5 (Dunny et al., 1991) HEPES 10 mM, pH 7,0 (Belliveau & Trevors, 1989) e, finalmente, de acordo com o protocolo de eletrotransformação de Alta Osmolaridade (Xue et al., 1999), o Meio de Eletroporação consistindo de 0,5 M de sorbitol, 0,5 M de manitol e 10% de glicerol (SMG).

Belliveau & Trevors (1989) e Moro et al. (1995) utilizaram o Meio LB como Meio de Recuperação (para incubação das células após a aplicação dos pulsos elétricos).

O Meio de Recuperação proposto por Xue et al. (1999) foi composto por LB contendo 0,5 M de sorbitol e 0,38 M de manitol (LBSM).

Ambos os Meios de Recuperação, LB e LBSM, ricos, foram utilizados nos experimentos de eletroporação de *B. megaterium* ATCC 14945.

3.1.4 Plasmídeos

Os plasmídeos pBR 322 e pHis foram utilizados nos ensaios de eletroporação ainda não contendo o gene para a enzima PGA. O objetivo desses ensaios foi o de estabelecer um protocolo de transformação de células de *B. megaterium*. A transformação dessa espécie com o vetor carregando tal gene constituiria os passos subsequentes desta Linha de Pesquisa.

3.1.4.1 Vetor pET 32 (Novagen[®])

O vetor pET 32 (Novagen[®]) apresenta 5900 pb. A série pET-32 é designada para clonagem e elevada expressão de sequências de peptídeos fusionadas a proteína tioredoxina (Trx•Tag[®]). Os sítios de clonagem estão disponíveis para a produção de proteínas fusionadas contendo também sequências cliváveis His•Tag[®] e S•Tag[®].

O vetor aqui denominado pET 32 “PGA” foi preparado pela Dra. Mônica Rosas Costa Iemma (Departamento de Engenharia Química, UFSCar). Este plasmídeo contém o gene da enzima inteira (*pac*) sem o peptídeo sinal e com o peptídeo espaçador clonado entre os sítios de *Bam HI* e *EcoRI*.

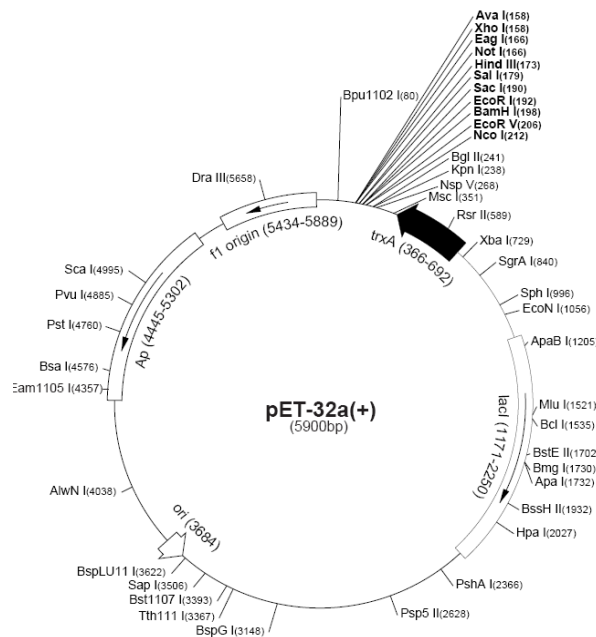


Figura 3.1.4.1. Mapa do plasmídeo pET-32 (Novagen®). O plasmídeo recombinante, no qual foram inseridos os genes das unidades alfa e beta da PGA de *B. megaterium* foi denominado “pET PGA 32”.

3.1.4.2 Vetor pETduet 1 (Novagen ®)

Foi também utilizado o vetor pETduet 1 (Novagen ®) como DNA plasmidial para a transformação de células vegetativas de *B. megaterium* por eletroporação. Esse vetor apresenta dois sítios múltiplos de clonagem (MSC 1 e MSC 2), sendo cada um deles precedido por um promotor T7 e por um Operon *lac* e por um sítio de ligação de ribossomo (rbs). O vetor também carrega o replicon ColE1 derivado de pBR 322, e os genes *lacI* e de resistência a ampicilina. O vetor pETduet 1 foi preparado para conter os genes das subunidades alfa e beta da PGA pela Dra. Mônica Rosas Costa Iemma. O gene da subunidade alfa da PGA de *B. megaterium* foi inserido entre os sítios das

enzimas *EcoRI* e *NotI*, no MSC 1. O gene da subunidade beta foi inserido no MSC 2, entre os sitios das enzimas *Nde* e *XhoI* (Figura 3.1.3.2).

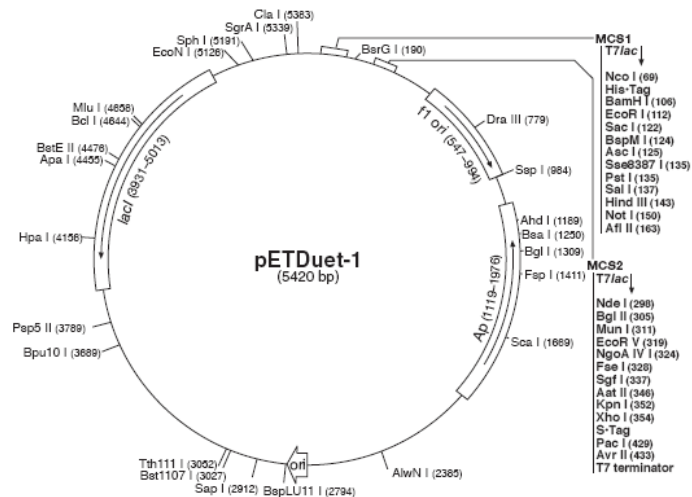


Figura 3.1.4.2. Mapa do plasmídeo pETDuet-1 (Novagen®). O plasmídeo recombinante, no qual foram inseridos os genes das unidades alfa e beta da PGA de *B. megaterium* foi denominado “Duet $\alpha\beta$ -Bm”.

3.1.4.3 Vetor pBR 322 (Fermentas®)

O vetor pBR322 apresenta 4361 pb e contém o replicon *rep* responsável pela replicação do plasmídeo; o gene *rop*, que codifica para a proteína Rop; o gene *bla*, que codifica para beta-lactamase (confere resistência a ampicilina) e o gene *tet*, codificando para resistência a tetraciclina.

Foram realizadas eletroporações de células vegetativas de *B. megaterium* com o DNA plasmidial pBR 322 (plasmídeo não contendo o gene para a enzima PGA), de modo a testar o uso de plasmídeos de famílias distintas da família pET. Os protocolos aplicados foram os mesmos utilizados para as eletroporações com o plasmídeo

pETDuet-1, a saber: protocolos de eletroporação com os Meios PEG/Sorbitol e HEPES, acima descritos. A quantificação espectrofotométrica de pBR 322 foi de 0,38 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Foram utilizados 26,3 μL para a eletrotransformação de 400 μL de suspensão celular em Meio de eletroporação. As condições de eletroporação, bem como os valores para a Duração do Pulso Elétrico tempo dos pulsos estão expressos nos Quadros 3.3.4.4 (Experimento P2) e 3.3.4.5 e na Tabela 4.7.2 (Experimento H8).

3.1.4.4 Vetor pHis 1522 (MoBiTec®)

O DNA plasmidial pHis 1522 apresenta operon xilose altamente induzível. É caracterizado por sua estabilidade, expressão de proteínas com elevados rendimentos em *B. megaterium* e por sua versatilidade para clonagem.

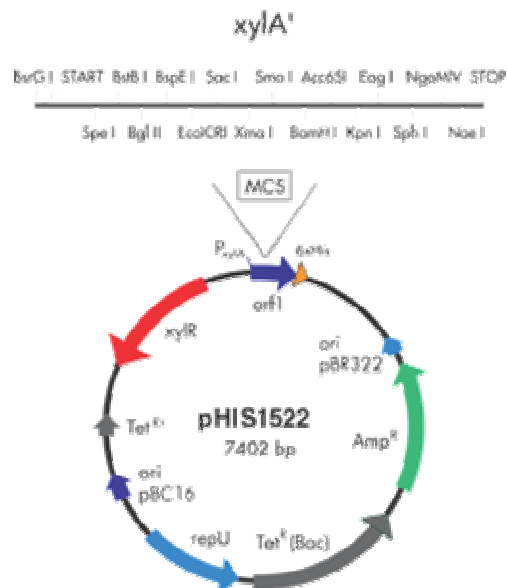


Figura 3.1.4.4. Mapa do plasmídeo pHis 1522 (MoBiTec®). A ORI pBC16 é específica para *B. megaterium*.

3.2 Métodos Analíticos

3.2.1 Leitura espectrofotométrica

Todas as medidas de absorvância a 260 ou 600 nm foram realizadas em espectrofotômetro Ultrospec 2100 Pro[®] (*Pharmacia*).

3.2.2 Microscopia e Análise de Imagens

O microscópio óptico comum utilizado foi um Olympus[®], modelo BX 50. O sistema para aquisição de imagens da UVP incluía transiluminador com lâmpadas UV e branca, com câmara fotográfica digital acoplada e o *software* “DocIpLS[®]”.

3.3 Procedimentos

3.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico de *B. megaterium* foi utilizado como molde para a PCR (utilizando com primers referentes à seqüência sinal – Sense sinal 14945 – e à seqüência C-terminal da subunidade beta – Antisense β). O uso desses primers produziu como produto final o gene *pac* inteiro (Martín et al., 1995). O produto de PCR esperado apresenta tamanho aproximado de 2500 pares de bases.

As extrações de DNA plasmidial tiveram como objetivo a preparação de vetores para sua utilização nos processos de eletrotransformação de *B. megaterium*. Os plasmídeos foram propagados em *E. coli* (linhagens DH5 α e BL 21) e extraídos por Lise Alcalina.

3.3.1.1 Extração de DNA genômico de *B. megaterium*

Para a extração do DNA genômico de *B. megaterium* foram cultivadas células vegetativas *B. megaterium* ATCC 14945, em 5,0 mL de meio LB. Após 16 horas de crescimento sob 300 rpm e a 30°C, as culturas foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 10 minutos. Os precipitados foram ressuspensos em 1,0 mL de Tris – HCl 30 mM pH 8,0; 25% sacarose (v/v) e 0,003 g de lisozima (E.C. 3.2.1.17; concentração final de 3,0 mg/mL).

As preparações foram levadas a banho-maria durante uma hora. Então, foram adicionados 1,0 mL de Tampão de Lise em cada amostra (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 1% SDS) e 120 µg de proteinase-K. As amostras foram mantidas em banho-maria a 37°C por mais 30 minutos. Logo, foram adicionados 2,0 mL de fenol e 2,0 mL de clorofórmio para cada amostra, misturando-se por inversão. Após decantação da fase orgânica, os sobrenadantes foram transferidos para novos microtubos estéreis e outros 2,0 mL de clorofórmio foram adicionados. As amostras foram centrifugadas a 5000 rpm, durante 5 minutos. A fase superior de cada uma foi transferida para novo microtubo e, a esse conteúdo, foram adicionados 0,1 volume de acetato de sódio 3M pH 4,8 e 2 volumes de etanol 95% e agitados continuamente até a formação de um precipitado. Com o auxílio de pipeta, os precipitados foram transferidos para novos microtubos. Esses conteúdos foram lavados com 10 mL de etanol 80% e então centrifugados a 5000 rpm, durante 5 minutos. Os sobrenadantes foram desprezados e os precipitados foram levados à secagem em estufa a 37 °C e então ressuspensos em 200 µL de água ultra-pura.

Foram utilizados 20 μ L de DNA genômico para quantificação espectrofotométrica a 260 nm. O sucesso do procedimento também foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%, aplicando-se 5,0 μ L de DNA ressuspendido em água ultra-pura adicionados a 2,0 μ L de tampão para DNA (0,25% de azul de bromofenol em 30% de glicerol).

3.3.1.2 Extração de DNA plasmidial por Lise Alcalina

Os procedimentos de extração abaixo descritos foram utilizados para a produção de DNA plasmidial a ser empregado nos protocolos de transformação de *B. megaterium*. Tais procedimentos também foram aplicados para o estabelecimento de um protocolo de extração de DNA plasmidial a partir de células do próprio *B. megaterium*.

Células de *E. coli* DH5 α e de *E. coli* BL 21 foram cultivadas em 10 mL meio LB contendo ampicilina (100 μ g/mL), sob agitação de 300 rpm, a 37°C, durante 16 horas. O volume de 1000 μ L dessa cultura foi diluído em 50 mL de meio LB fresco contendo ampicilina (100 μ g/mL). As preparações foram levadas a crescimento sob agitação de 300 rpm, a 37°C, durante aproximadamente 3 horas (para atingir D.O. 600 nm igual a 1,0). A extração de DNA plasmidial foi realizada por meio de protocolo de Extração de DNA por Lise Alcalina (Sambrook et al., 1989).

O DNA plasmidial foi ressuspendido em 30 μ L de água ultra-pura autoclavada, quantificado espectrofotometricamente e aplicado em gel de agarose 1% para eletroforese e armazenado a – 20°C.

O procedimento foi reproduzido com as seguintes modificações, visando o maior rendimento da técnica: utilização de etanol 100%, em substituição ao isopropanol;

aumento do tempo de incubação a – 80°C (na etapa de precipitação); realização de centrifugação adicional, após a adição de acetato de potássio.

O protocolo de lise alcalina acima descrito também foi aplicado a células vegetativas de *B. megaterium* tratadas previamente com lisozima (E.C. 3.2.1.17). Os precipitados foram ressuspensos em 200 µL de Tampão GTE pH 8,0 acrescido de lisozima (100 µg para 500 µL de Tampão GTE, adicionados imediatamente antes do uso).

3.3.2 Preparação de células para ensaios de Viabilidade Celular e Quantificação de Biomassa produzida

Culturas de células vegetativas de *B. megaterium* cresceram em Meio Nutriente, LB ou LBS até o final da fase exponencial de crescimento, a 300 rpm e 30°C. Após esse período de crescimento *overnight*, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 600 nm de amostras das culturas (ensaios com células vegetativas em final da fase exponencial). Para os ensaios com células vegetativas em meio da fase exponencial de crescimento, realizou-se a diluição das culturas crescidas *overnight* (0,5 - 1,0 mL) em 50 mL de meio fresco, permitindo-se o crescimento sob 300 rpm, a 30°C, até que as culturas atingissem leitura a 600 nm igual a 1,0 (de acordo com as Curvas de Calibração para Crescimento de *B. megaterium*, subitem 4.2).

Após o período de crescimento, as células foram centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C, para obtenção do precipitado, que foi lavado por três vezes com Meio de Eletroporação gelado (Meios PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES 10 mM ou SMG). A suspensão celular resultante foi utilizada para os ensaios de viabilidade celular (Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, Tabela 3.3.2.1,

subitem 3.3.2.1) e para a quantificação de biomassa produzida (Método da Massa Seca, subitem 3.3.2.2).

3.3.2.1 Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC)

Para verificar a viabilidade das células vegetativas de *B. megaterium* utilizadas nos protocolos de eletroporação, foi empregado o Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC). É de fundamental importância a quantificação de células viáveis que serão submetidas aos tratamentos com os Meios de Eletroporação, de modo a ajustar a concentração de DNA plasmidial a ser utilizada e permitir os cálculos de eficiência de transformação.

O Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias (UFC) considera que o número de colônias que crescem corresponde ao número de células presentes na amostra. Foi realizada a Diluição Seriada das culturas de células vegetativas de *B. megaterium* e seu posterior plaqueamento, de modo a permitir o isolamento de colônias e sua quantificação, de acordo com o fator de diluição correspondente (Tortora, 2005).

A quantificação de células viáveis pelo Método de Contagem de UFC foi realizada sistematicamente para o cultivo de *B. megaterium* em cada um dos três Meios de Crescimento (Nutriente, LB e LBS) e para cada um dos quatro diferentes Meios de Eletroporação empregados (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES e SMG), resultando em 12 ensaios (UFC 1 a 12), subdivididos em experimentos com células em meio e final da fase exponencial de crescimento (Tabelas 3.3.2.1.1, 3.3.2.1.2 e 3.3.2.1.3).

Os pulsos elétricos foram aplicados sobre as suspensões celulares em Meio de Eletroporação sem a adição de DNA plasmidial.

Tabela 3.3.2.1.1. Características dos cultivos de células de *B. megaterium* em Meio Nutriente e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES e SMG).

Ensaio	Fase Cresc. Exponenc.	Meio Eletroporação	V ₀ (kV)	E ₀ (kV/cm)	R (Ω)	C (μF)
UFC 1	Meio Final	PEG/Sorbitol	2,4	12	200	25
UFC 2	Meio Final	Sacarose/MgCl ₂	2,0	10	200	25
UFC 3	Meio Final	HEPES	2,5	12,5	200	25
UFC 4	Meio Final	SMG	2,5	12,5	200	25

Tabela 3.3.2.1.2. Características dos cultivos de células de *B. megaterium* em Meio LB e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES e SMG).

Ensaio	Fase Cresc. Exponenc.	Meio Eletroporação	V ₀ (kV)	E ₀ (kV/cm)	R (Ω)	C (μF)
UFC 5	Meio Final	PEG/Sorbitol	2,4	12	200	25
UFC 6	Meio Final	Sacarose/MgCl ₂	2,0	10	200	25
UFC 7	Meio Final	HEPES	2,5	12,5	400 *	25
					600	50
UFC 8	Meio Final	SMG	2,5	12,5	400 **	25
					600	50

* Para o resistor de 400 Ω, foi utilizado o capacitor de 25 μF; para o resistor de 600 Ω, foi selecionado o capacitor de 50 μF.

** Para cada um dos resistores selecionados (400 e 600 Ω), foram utilizados os capacitores de 25 e de 50 μF.

Tabela 3.3.2.1.3. Características dos cultivos de células de *B. megaterium* em Meio LBS e condições elétricas empregadas após o tratamento com os diferentes Meios de Eletroporação (PEG/Sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES e SMG).

Ensaio	Fase Cresc. Exponenc.	Meio Eletroporação	V ₀ (kV)	E ₀ (kV/cm)	R (Ω)	C (μF)
UFC 9	Meio Final	PEG/Sorbitol	2,4	12	200	25
UFC 10	Meio Final	Sacarose/MgCl ₂	2,0	10	200	25
UFC 11	Meio Final	HEPES	2,5	12,5	400 *	25 50
UFC 12	Meio Final	SMG	2,5	12,5	400 ** 600	25 50

* Para o resistor de 400 Ω, foi utilizado o capacitor de 25 μF; para o resistor de 600 Ω, foi selecionado o capacitor de 50 μF.

** Para cada um dos resistores selecionados (400 e 600 Ω), foram utilizados os capacitores de 25 e de 50 μF.

3.3.2.2 Análise da Produção de Biomassa pelo Método da Massa Seca

O Método da Massa Seca foi utilizado para a quantificação da produção de biomassa de *B. megaterium* nos cultivos em Meio Nutriente, LB e LBS, nos Experimentos MS 1, MS 2 e MS 3, respectivamente.

Foram utilizadas membranas de celulose Millipore® com diâmetro de poro 0,45 μm. As membranas previamente identificadas e foram levadas sobre vidros de relógio a secagem em estufa a 60°C, por período mínimo de 12 horas.

Após a secagem, as membranas foram transportadas em dessecador contendo sílica e submetidas a vácuo. Foi aguardado o resfriamento das membranas e então realizadas as pesagens. As filtrações foram realizadas após a aplicação dos volumes pré-

determinados de suspensão celular (preparadas conforme descrito no subitem 3.3.3.1) sobre cada membrana inserida no sistema de filtração a vácuo.

As membranas foram então levadas para secagem em estufa a 60°C por 24 horas. As quantificações espectrofotométricas a 600 nm foram realizadas para cada amostra, de modo a relacionar a concentração celular (Cx) em g/L com as leituras espectrofotométricas (D.O.) a 600 nm por meio de uma curva de calibração descrita pela equação linear:

$$C \times (\text{g/L}) = \text{coeficiente linear} + (\text{tangente ângulo} \times \text{D.O. } 600 \text{ nm})$$

3.3.3 Análise morfológica e pureza do cultivo

As preparações a fresco foram realizadas com o objetivo de verificar a morfologia das células e a pureza do cultivo. Tais preparações consistiam de aplicação de alíquotas de 20 µL de células em cultura líquida sobre lâminas, em condições assépticas, e imediata observação ao microscópio óptico comum (sob aumento de 1000 vezes).

As preparações permanentes utilizadas foram a Coloração de Gram e a Coloração Verde Malaquita. A Coloração de Gram permitiu a confirmação da natureza da parede das células sob análise: bactérias Gram – positivas, como *B. megaterium*, são coradas em roxo (violeta azulado). A Coloração Verde Malaquita foi aplicada para analisar o estado das células, se vegetativas ou se esporos, pois os esporos coram-se em verde e as células vegetativas apresentam coloração avermelhada.

Ambos os tipos de preparação acima descritos foram realizados nas seguintes etapas dos protocolos de eletroporação: (1) ao final do período de cultivo a partir do pré-inóculo de células; (2) após lavagens e ressuspensão das células em Meio de eletroporação; (3) imediatamente após o pulso elétrico e (4) ao final do período de incubação pós-choque elétrico.

3.3.4 Eletroporações

Foi utilizado o equipamento Gene Pulser[®] II Electroporation System/Pulse Controller e cubetas de espaço entre eletrodos de 0,2 cm (BioRad[®]) para todos os experimentos de eletroporação, incluindo os Testes para determinação da Duração dos Pulsos Elétricos.

3.3.4.1 Testes para determinação da Duração dos Pulsos Elétricos

Para a caracterização e seleção de valores para a Duração dos Pulsos Elétricos adequados à eletroporação de células vegetativas de *B. megaterium*, foram realizados testes preliminares com os meios de eletroporação. Tais experimentos consistiram na aplicação de pulsos elétricos sobre alíquotas dos Meios HEPES 10 mM e PEG/Sorbitol, utilizando-se o volume recomendado de solução para as cubetas de 0,2 cm (400 μ L) e dispensando especial cuidado à temperatura dos Meios (manutenção a 0°C). Foram combinados diferentes valores de resistores paralelos (R, em Ω), capacitores (C, em μ F) e campos elétricos iniciais (E_0), de acordo com os valores utilizados por Miller et al.

(1989), Dunny et al. (1991), Shark et al. (1991) e Moro et al. (1995), como indicados nas Tabelas 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4 (vide Resultados e Discussão, subitem 4.6)

3.3.4.2 Protocolos para Eletroporação ou Eletrotransformação

Todos os protocolos para eletroporação foram realizados utilizando-se os Meios LB, Nutriente e Meio LBS (LB acrescido de 0,5 M de sorbitol, protocolo de Alta Osmolaridade) como Meios de Crescimento para o cultivo das células, em experimentos independentes. Para cada um dos meios, foram produzidas curvas de calibração referentes ao crescimento de *B. megaterium* pelo acompanhamento da produção de biomassa (Método da Massa Seca) e de leituras espectrofotométricas a 600 nm de alíquotas de cultura a tempos pré-determinados. As curvas de calibração foram produzidas pela média de dois experimentos independentes (amostras em duplicata), para cada um dos meios.

O tratamento das células vegetativas de *B. megaterium* anterior à aplicação do pulso elétrico (aqui denominado “pré-eletroporação”) é descrito abaixo (subitem 3.3.4.3). As variações referentes a cada experimento podem ser verificadas nas Tabelas 3.3.4.3.1, 3.3.4.3.2 e 3.3.4.3.3 e nas descrições nos subitens 3.3.4.4 a 3.3.4.8.

3.3.4.3 Preparação de células de *B. megaterium* para Eletroporação

Os cultivos de células vegetativas de *B. megaterium* foram iniciados a partir do inóculo de células vegetativas dessa espécie conservadas em glicerol 20% (v/v), sob -80°C, em 10 - 50 mL de Meio LB, Nutriente ou LBS, sob agitação de 300 rpm, a 30°C, durante 12 - 16 horas.

Após o referido período de crescimento *overnight*, foram realizadas as leituras espectrofotométricas a 600 nm de amostras de 1,0 mL das culturas. Para os trabalhos com células vegetativas em final da fase exponencial de crescimento, procedeu-se ao protocolo pré-eletrporação imediatamente após as leituras espectrofotométricas. Para os trabalhos com células vegetativas em meio da fase exponencial de crescimento, realizou-se a diluição das culturas crescidas *overnight* (0,5 - 1,0 mL) em 50 mL de meio fresco, permitindo-se o crescimento sob 300 rpm, a 30°C, até que as culturas atingissem leitura a 600 nm igual a 1,0 (de acordo com as Curvas de Calibração para Crescimento de *B. megaterium*, subitem 4.2).

As culturas foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 - 12 minutos, a 4°C e lavadas em Meio de Eletrporação (Sacarose/MgCl₂; PEG/Sorbitol, HEPES ou Meio SMG) gelado. As amostras foram centrifugadas a 3000 rpm, durante 10 minutos, a 4°C. As células foram ressuspensas em 1,0 - 2,0 mL de Meio de Eletrporação e centrifugadas a 3000 rpm, por 10 minutos, a 4°C. Os sobrenadantes foram desprezados cuidadosamente, com auxílio de pipeta.

As amostras foram ressuspensas em 1,0 - 1,125 mL de Meio de Eletrporação e mantidas em gelo por um período máximo de 30 minutos.

Foram adicionados 100 - 400 µL de suspensão celular e 1,0 - 10 µg de DNA plasmidial às cubetas de eletrporação pré-resfriadas, incubados em gelo por um minuto e imediatamente submetidos ao pulso elétrico. Foram selecionados os valores para capacitor (3, 25 ou 50 µF), resistor (200, 400 e 600 Ω) e voltagem (0,5 - 2,4 kV), para produzir campos elétricos iniciais entre 2,5 e 12,0 kV/cm. As características dos pulsos elétricos aplicados estão expressas nos Quadros 3.3.4.4 a 3.3.4.6 e nas Tabelas 3.3.4.7 e 3.3.4.8.

Imediatamente após o choque, as suspensões foram diluídas em 800 μL ou 3,780 μL de meio LB, Nutriente ou LBSM (Meio de Recuperação de Alta Osmolaridade) e cuidadosamente homogeneizadas. As células foram levadas a crescimento por períodos de uma, duas ou três horas, a 30°C, sob agitação de 80 ou 100 rpm. Após esse período de crescimento para permitir a replicação dos plasmídeos, as culturas foram centrifugadas por um minuto, a 3000 rpm e 4°C; parte do sobrenadante foi desprezada e o precipitado foi ressuscitado em aproximadamente 200 μL do sobrenadante restante. Esses foram então plaqueados em meio seletivo (meio LB, Nutriente ou LBS, contendo ampicilina, carbenicilina ou tetraciclina, antibióticos cuja resistência é conferida pelos plasmídeos pETDuet-1, pET 32 “PGA” e pHis 1522, respectivamente) e conduzidos à estufa a 37°C para crescimento, por um período mínimo de 20 horas.

Os controles negativos foram realizados por meio de crescimento de células vegetativas de *B. megaterium* selvagem submetidas à eletroporação, sob as mesmas condições das demais amostras, à exceção da adição de DNA plasmidial. Essas células selvagens eletroporadas foram plaqueadas, após o período de incubação, em meio seletivo. Esses controles negativos tiveram por objetivo demonstrar que não houve contaminação das culturas durante todo o processo de eletrotransformação (não foram produzidas colônias como resultado desses plaqueamentos).

Os controles positivos consistiram no plaqueamento de células que receberam pulso elétrico sem a adição de DNA plasmidial em meio não-seletivo. Essas células foram igualmente conduzidas a incubação pós-pulso elétrico acima descrita e, então, plaqueadas. Esse tipo de controle proporcionou a verificação da viabilidade das células mediante o tratamento para eletrotransformação. As placas de ágar não-seletivo

apresentaram colônias de *B. megaterium* em elevado número (oportunamente quantificadas pelo Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, por Diluição Seriada, abaixo descrito, subitem 3.3.2.1).

O lote de células vegetativas produzidas a partir do cultivo em Meio LB dos esporos de *B. megaterium* ATCC 14945 doados pela Fundação André Tosello e conservadas em glicerol 20% (v/v) foi submetido a análise de pureza, por meio do crescimento dessas células em Meio LB contendo os diferentes antibióticos utilizados nos ensaios experimentais (ampicilina, carbenicilina, kanamicina, tetraciclina e cloranfenicol). A partir do tubo “controle” (*B. megaterium* crescido em Meio LB não seletivo), dada a confirmação da pureza do cultivo, foi produzido o lote de células acima referido.

Para analisar a possibilidade de resistência natural de *B. megaterium* ATCC 14945 (tipo selvagem) ao antibiótico ampicilina, foram realizados testes de crescimento de células vegetativas dessa espécie em 10 mL de Meio LB, com e sem a adição de ampicilina (2,0 µL/mL). As células foram levadas a crescimento por 16 horas, sob agitação de 300 rpm e temperatura controlada a 30°C. Por meio dos resultados desse experimento, foi confirmado que *B. megaterium* ATCC 14945 (tipo selvagem) não é naturalmente resistente ao antibiótico ampicilina. Desta forma, descartaram-se os resultados falso - negativos do plaqueamento em meio seletivo de suspensões celulares em Meio de eletroporação.

3.3.4.4 Eletroporações com Meio Sacarose / MgCl₂ e Meio PEG / Sorbitol

As condições empregadas para todos os experimentos desse grupo estão expressas no Quadro 3.3.4.4. O primeiro experimento de eletroporação (P1) foi realizado com o uso do Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol (25% PEG 6000/Sorbitol 0,1 M), descrito por Moro et al. (1995).

Quadro 3.3.4.4. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando os Meios PEG/Sorbitol (PEG/s) e Sacarose/MgCl₂ (Sac/Mg).

Experimento	Meio Eletrop.	Fase Crescim. Exponenc.	Susp. celular (μL)	DNA (μg)	V₀ (kV)	E₀ (kV/cm)	R (Ω)	C (μF)
P 1	PEG/S	Meio	100	1,0 pET 32	1,2	6,0	200	25
S 1	Sac/Mg	Meio	100	5,0 pET 32	1,5 2,0	7,5 10	200	25
S 2	Sac/Mg	Final	200	5,0 pET 32	2,4	12	200	25
S 3	Sac/Mg	Final	200	5,0 pET 32	2,5	12,5	200	25
PS 1	PEG/S Sac/Mg	Meio	400	10 pETDuet	1,2	6,0	200	3 25
PS 2	PEG/S Sac/Mg	Final	400	10 pETDuet	2,4	12	200	25
PS 3	PEG/S Sac/Mg	Final	400	10 pETDuet	2,4	12	200	25
P 2	PEG/S	Final	400	10 pBR 322	2,5	12,5	200	50

Os experimentos de eletroporação S1, S2 e S3 foram realizados com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl₂ (Dunny et al., 1991). No Experimento S2, a variável analisada foi o meio de crescimento (Meios LB e Nutriente) para *B. megaterium*, antes e após o processo de eletroporação. No Experimento S3, as células crescidas em Meio Nutriente foram tratadas com 100 µg de lisozima por amostra e incubadas a 37°C, sob agitação de 100 rpm, durante 40 minutos, antes das lavagens e ressuspensão em Meio de eletroporação.

Nos experimentos seguintes (PS1, PS2 e PS3), foram testados os Meios de eletroporação Sacarose/MgCl₂ e PEG/Sorbitol para amostras retiradas de um mesmo cultivo, de modo a comparar suas eficiências.

O experimento PS1 foi realizado para testar a eficiência de transformação de células vegetativas de *B. megaterium* eletroporadas como função do tratamento das células com diferentes meios de eletroporação. Para amostras de um mesmo cultivo, foram utilizados os Meios PEG/Sorbitol e Sacarose/MgCl₂.

No Experimento PS3, o protocolo anterior (Experimento PS2) foi repetido de modo a obter maiores valores para a Duração do Pulso Elétrico, pelo uso de células no meio da fase exponencial de crescimento e pelo aumento do período de incubação em gelo antes e após a aplicação dos pulsos elétricos. As células vegetativas de *B. megaterium* utilizadas no Experimento PS3 foram produzidas conforme descrito anteriormente, à exceção do período de crescimento, que foi inferior ao de 16 horas. As células vegetativas foram obtidas a partir do cultivo de inóculo de células em estoque de glicerol em 10 mL de meio LB, sob agitação de 300 rpm, a 30°C, durante 16 horas. Após esse período de crescimento, as culturas apresentaram leitura espectrofotométrica a 600 nm de valores iguais a 0,984 e 0,990 e foram tratadas com lisozima antes das

lavagens e ressuspensão em Meio de eletroporação Sacarose/MgCl₂ e PEG/Sorbitol, como descrito acima para os Experimentos S3 e PS2.

O Experimento P2 teve por objetivo testar o uso de um vetor plasmidial não pertencente à família pET (até o momento, a única utilizada), o plasmídeo pBR 322, de modo a oferecer à maquinaria de *B. megaterium* uma origem de replicação (ORI) distinta e, assim, verificar a ocorrência de reconhecimento e consequente replicação dos plasmídeos. As características dos pulsos elétricos aplicados a células vegetativas intactas de *B. megaterium* crescidas em Meio LB estão também expressas no Quadro 3.3.4.4.

3.3.4.5 Eletroporações com Meio HEPES 10 mM

O Meio de Eletroporação HEPES 10 mM (N-2-hydroxyethyl-piperazine – N' - 2 – ethane sulphonic acid) pH 7,0 (Belliveau & Trevors, 1989), foi utilizado nos Experimentos H1 a H9. Os cultivos para os experimentos H1, H4, H5, H6, H7, H8 e H9 foram realizados em Meio LB. Os ensaios H2 e H3 empregaram células de *B. megaterium* ATCC 14945 crescidas em Meio Nutriente. O Quadro 3.3.4.5 traz as condições de cultivo das células e de seu tratamento para eletroporação para tais experimentos.

No Experimento H1, foi aplicada a diluição pós-pulso elétrico de 1:10 (amostra/meio), isto é, 3,78 mL de meio fresco e à temperatura ambiente para aproximadamente 420 µL de suspensão celular adicionada de DNA plasmidial. Essa diluição, após o pulso elétrico, constituiu-se em uma modificação em relação aos

protocolos anteriores, por meio do aumento dos volumes inferiores a 1000 μL de Meio de Recuperação, anteriormente utilizados, para 3,78 mL.

No Experimento H 2, foram adicionados 2,0 mL de cultura crescida por 16 horas a 10 mL de meio fresco e levados a crescimento até que atingissem leitura espectrofotométrica a 600 nm igual a 1,0 (aproximadamente 2,5 horas de incubação), de modo a obter células no meio da fase exponencial de crescimento em Meio Nutriente (Curvas de Crescimento, subitem 4.2).

Para o Experimento H3, foram utilizadas células em final da fase logarítmica de crescimento em Meio Nutriente (crescimento a 30°C, sob 300 rpm, durante 16 horas). Foram selecionados maiores valores de resistência e capacitância, comparadas às utilizadas nos experimentos anteriores. Neste experimento também foi testada a quantidade de 30 μL de ampicilina no ágar, para testar se essa seria suficiente para impedir o crescimento de colônias na ausência do plasmídeo que confere a resistência àquele antibiótico.

O Experimento H4 foi realizado com células em final da fase logarítmica de crescimento em Meio LB e as condições elétricas selecionadas para este experimento foram escolhidas de acordo com os maiores valores obtidos para a Duração do Pulso Elétrico.

O Experimento H5 foi realizado aplicando-se as condições de eletroporação mais drásticas (elevado campo elétrico inicial: 12 kV/cm; elevado resistor: 600 Ω ; capacitor de elevado tamanho: 50 μF ; valores para a Duração do Pulso Elétrico superiores a 5,0 ms, Quadro 3.3.4.5).

Quadro 3.3.4.5. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando o Meio HEPES 10 mM pH 7,0.

Experimento	Meio Eletrop.	Fase Crescim. Exponenc.	Susp. celular (μ L)	DNA (μ g)	V_0 (kV)	E_0 (kV/cm)	R (Ω)	C (μ F)
H 1	HEPES	Final	400	10	0,5	2,5	200	3
				pET32	0,7	3,5		25
H 2	HEPES	Meio	400	10 pETDuet	0,5	2,5	200	25
H 3	HEPES	Final	400	10	0,5	2,5	200	50
				pETDuet	2,4	12	600	*
H 4	HEPES	Final	400	10	0,5	2,5	200	50
				pETDuet	2,4	12	400	600
							**	
H 5	HEPES	Meio	400	10 pETDuet	2,4	12	600	50
H 6	HEPES	Início	400	10 pETDuet	2,4	12	600	50
H 7	HEPES	Final	400	10 pETDuet	2,4	12	600	50
H 8	HEPES	Final	400	pBR 322	2,5	12,5	200	25
H 9	HEPES	Final	400	10	2,5	12,5	400	25
				pHis	0,5	2,5	200	25
				1522				

* Para o resistor de 200 Ω , foi utilizada a voltagem de 2,4 kV; para o resistor de 600 Ω , foi selecionada a voltagem de 0,5 kV. ** Para cada um dos resistores selecionados (200, 400 e 600 Ω), foram testadas as voltagens de 0,5 e 2,4 kV

O Experimento de eletroporação H5 sob as condições mais drásticas foi repetido para células de *B. megaterium* sob outros dois diferentes estágios de crescimento em Meio LB, a saber: ao início da fase exponencial (Experimento H6: oito horas de cultivo, sob 300 rpm e a 30°C) e ao final da fase exponencial de crescimento (Experimento H7: 24 horas de cultivo, sob 300 rpm e a 30°C).

As células utilizadas no Experimento H6 encontravam-se no início da fase logarítmica de crescimento (8 horas) e foram tratadas com Meio de eletroporação HEPES 10 mM pH 7,0. As condições de eletroporação utilizadas foram as mais drásticas (Quadro 3.3.4.5), além do aumento da molaridade do Meio de Eletroporação, pela adição de sorbitol a 1,5 M.

O mesmo protocolo descrito para o Experimento H6 foi aqui aplicado para células no final da fase logarítmica de crescimento (24 horas). As condições de eletroporação selecionadas para este Experimento H7 foram, como no ensaio anterior, as mais drásticas (incluindo aumento da molaridade do Meio de Eletroporação pela adição de sorbitol 1,5 M, Quadro 3.3.4.5).

O Experimento H8, como o ensaio P2 descrito acima (Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol), foi realizado com o uso do vetor plasmidial pBR 322.

Para o ensaio H9, foi utilizado o vetor pHis 1522 para a eletroporação de células vegetativas de *B. megaterium* em fase final de crescimento exponencial em Meio LB (Curvas de Calibração, subitem 4.2.1), sob as condições elétricas expressas no Quadro 3.3.4.5.

3.3.4.6 Protocolo de Eletroporação de Alta Osmolaridade (Xue et al., 1999)

O protocolo de preparação de células eletrocompetentes utilizado para *B. subtilis* (Xue et al., 1999) foi aplicado a células vegetativas de *B. megaterium* ATCC 14945, como se segue. Uma cultura crescida por 12 horas, a 30°C e 300 rpm foi diluída 16 vezes em Meio de Crescimento LBS (LB contendo 0,5 M de sorbitol). A nova cultura foi levada a crescimento sob 300 rpm e a 37°C até que atingisse DO 600 nm entre 0,85 e 0,95 (correspondendo a um período de crescimento de aproximadamente 3 horas).

Após, a cultura foi mantida sob banho de gelo por 10 minutos e então centrifugada a 4°C, a 5000 x g, por 5 minutos. Procedeu-se quatro lavagens em Meio de Eletroporação SMG gelado (0,5 M sorbitol, 0,5 M manitol, 10% glicerol). As células foram ressuspensas em 1/40 do volume da cultura de Meio de Eletroporação, de modo a obter uma concentração celular entre $1 - 1,3 \times 10^{10}$ CFU/mL (concentração celular confirmada por plaqueamento após Diluição Seriada, Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, subitem 3.3.2.1). As células competentes foram armazenadas sob - 80°C, até seu uso, após 12 horas.

No Experimento AO 1, células de *B. megaterium* eletrocompetentes foram mantidas sob - 80°C por 24 horas e então conduzidas à eletroporação. Aliquotas de 400 µL de suspensão de células eletrocompetentes foram gentilmente adicionados a 2,0 µL de pHis 1522 (386 ng/ µL) e transferidos para cubeta de eletroporação (0,2 cm). (A concentração de DNA plasmidial utilizada por Xue et al., 1999, foi de 50 ng de DNA para 60 µL de células competentes). As células foram incubadas sob gelo por 1,5 minutos e expostas a pulso elétrico único. Imediatamente após a descarga elétrica, 1,0 mL de Meio de Recuperação (LB contendo 0,5 M de sorbitol e 0,38 M de manitol) foi adicionado à suspensão celular. As suspensões foram incubadas a 37°C por 3 horas e

logo plaqueadas em LB seletivo (contendo tetraciclina, concentração final de 10 µg/mL) para crescimento a 37°C, por um período mínimo de 16 horas.

Os Experimentos AO 2 e AO 3 diferem de AO 1 quanto às concentrações de DNA plasmidial empregadas (1,0; 5,0 e 10 µg de pHis 1522) e ao uso imediato das células eletrocompetentes (que não foram estocadas sob – 80°C antes de seu uso). Xue et al. (1999) afirmam que as células podem ser armazenadas a – 80°C até o seu uso, com algum decréscimo na eficiência de transformação. As condições elétricas referentes aos Experimentos de AO 1 a AO 3 estão expressas no Quadro 3.3.4.6.

Quadro 3.3.4.6. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando os Meios de Alta Osmolaridade (LBS: LB contendo 0,5 M de sorbitol; SMG: 0,5 M sorbitol, 0,5 M manitol e 10% glicerol).

Experimento	Meio Eletrop.	Fase Crescim. Exponenc.	Susp. Celular (µL)	DNA (µg)	V ₀ (kV)	E ₀ (kV/cm)	R (Ω)	C (µF)
AO 1	LBS	Meio	400	0,772	2,5	12,5	200	25
AO 2	LBS	Meio	400	1,0 5,0 10	2,5	12,5	200	25
AO 3	LBS	Meio	400	1,0 5,0 10	2,5	12,5	200	25

3.3.4.7 Eletroporação com Meio LBSM contendo MgCl₂

Os Experimentos de Mg 1 a Mg 6 foram realizados empregando-se o Meio LBS (Meio LB contendo 0,5 M de sorbitol) como Meio de Crescimento para as células vegetativas de *B. megaterium*. Foi também empregado como Meio de Eletroporação LBSM (LB contendo 0,5 M de sorbitol e 0,38 M de manitol) acrescido de MgCl₂, nas concentrações 1 mM, 20 mM e 40 mM (Rhee et al., 2007; Romero et al., 2006; McCool & Cannon, 2001; Martin et al., 1981; Brown & Carlton, 1980).

O protocolo para preparação de células eletrocompetentes utilizado foi o descrito por Xue et al. (1999), detalhado no subitem 3.3.4.6. As condições elétricas e os valores para Duração dos Pulsos Elétricos associados estão expressos na Tabela 3.3.4.7.

Antes do plaqueamento em Meio LBS seletivo (LBS contendo tetraciclina, concentração final de 10 µg/mL), as suspensões foram incubadas a 37°C, sob 100 rpm, durante 3,5 horas.

Tabela 3.3.4.7. Condições de cultivo de células e de seu tratamento para eletroporação para os experimentos de eletroporação empregando o Meio LBSM MgCl₂ (LBSM Mg).

Experimento	[] Mg	Fase	Susp.	DNA	V ₀	E ₀	R	C
	Meio	Crescim.	Celular	(µg)	(kV)	(kV/cm)	(Ω)	(µF)
	Eletrop.	Exponenc.	(µL)					
Mg 1	1 mM	Meio	400	5,0	2,5	12,5	200	25
Mg 2	1 mM	Meio	400	10	2,5	12,5	200	25
Mg 3	20 mM	Final	400	5,0	2,5	12,5	200	25
Mg 4	20 mM	Final	400	10	2,5	12,5	200	25
Mg 5	40 mM	Meio	400	5,0	2,5	12,5	200	25
Mg 6	40 mM	Final	400	10	2,5	12,5	200	25
Contr	40 mM	Final	400	---	2,5	12,5	200	25

3.3.4.8 Eletroporação de protoplastos de *B. megaterium*

Protoplastos de *B. megaterium* preparados por Silvia N. S. Hirayama, segundo Malten et al. (2006), foram eletroporados de acordo com o protocolo proposto por Romero et al. (2006) para *B. subtilis*.

Aliquotas de 120 μL de suspensão de protoplastos foram gentilmente misturadas com 13,1 μL de pHis 1522 (correspondentes à concentração de 5,0 μg desse DNA plasmidial). As misturas foram incubadas em gelo por período mínimo de cinco minutos, transferidas para cubetas de eletroporação pré-resfriadas e então submetidas a pulso elétrico único (condições elétricas expressas na Tabela 3.3.4.8).

Imediatamente após o pulso, 1,0 mL de Meio de Recuperação foi adicionado à cubeta e conduzidos a incubação a 37°C, sob 100 rpm, por 12 horas. Ao término do período de incubação, as células foram plaqueadas em Meio LBSM seletivo (LB contendo 0,5 M de sorbitol, 0,38 M de manitol; tetraciclina, concentração final de 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e conduzidas a incubação a 37°C por 48 horas.

Tabela 3.3.4.8. Condições elétricas empregadas nos ensaios de eletroporação de protoplastos de *B. megaterium* com pHis 1522.

Amostra	Suspensão celular (μL)	DNA plasmidial (μg)	Voltagem inicial (V) selecionada	Voltagem inicial (V) real	Resistor (Ω)	Capacitor (μF)
1	400	5,0	700	690	400	25
2	400	10	700	660	400	25
3	400	10	700	680	400	25
Contr	400	---	700	680	400	25

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extração de DNA genômico de *B. megaterium* ATCC 14945

O sucesso do procedimento de extração do DNA genômico de *B. megaterium* foi verificado por meio de eletroforese em gel de agarose 1%. A extração resultou em ótimo rendimento, caracterizado pela intensidade das bandas no gel revelado com brometo de etídeo, embora também sejam verificados arrastes correspondentes a degradação de material.

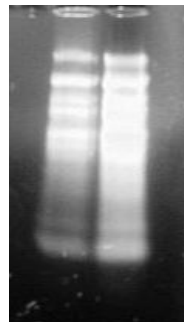


Figura 4.1. Extração do DNA genômico de *B. megaterium* ATCC 14945.

A quantificação do DNA genômico de *B. megaterium* ATCC 14945 foi realizada espectrofotometricamente a 260 nm. Foram utilizadas alíquotas de 5,0 μL de DNA, diluídas em 495 μL de água ultrapura. O rendimento médio das extrações (Sambrook et al., 1989) foi de 0,16 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$.

O DNA genômico de *B. megaterium* ATCC 14945 foi utilizado como molde para as reações PCR, para a clonagem do gene da PGA (gene *pac*), realizada pela Dra. Mônica R. C. Iemma.

4.2 Curvas de crescimento de células vegetativas de *B. megaterium* (Curvas de Calibração)

4.2.1 Crescimento de *B. megaterium* ATCC 14945 em Meio LB

Alíquotas de culturas de *B. megaterium* crescidas em Meio LB foram tomadas após 2, 4, 8, 12 e 16 horas do início dos cultivos. As medidas realizadas foram leitura espectrofotométrica a 600 nm (DO 600 nm) e determinação de massa seca (C_x , em g/L).

A curva da Figura 4.2.1.1 representa a concentração celular (C_x , em g/L) através do tempo, para os mesmos dados de C_x apresentados na Figura 4.2.1.2.

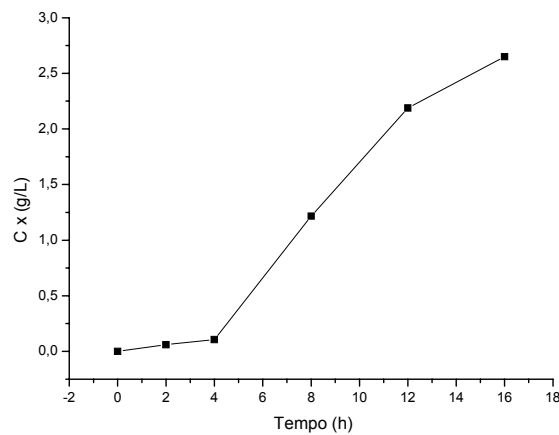


Figura 4.2.1.1. Curva de concentração celular em g/L de *B. megaterium* por tempo de cultivo em Meio LB (0, 2, 4, 8, 12 e 16 horas de cultivo), correspondentes aos dados da Figura 4.2.1.2.

Os dados de concentração celular (C_x) plotados contra as respectivas leituras espectrofotométricas foram tratados com análise de Regressão Linear (Figura 4.2.1.2).

A equação da reta é dada por:

$$Y = A + Bx$$

em que $A = -0,11876$ (erro = 0,04603), $B = 3,01278$ (erro = 0,09761); $R = 0,99739$; $SD = 0,07834$; $p < 0,0001$.

$$C_x \text{ (g/L)} = -0,11876 + 3,01278 * \text{DO } 600 \text{ nm}$$

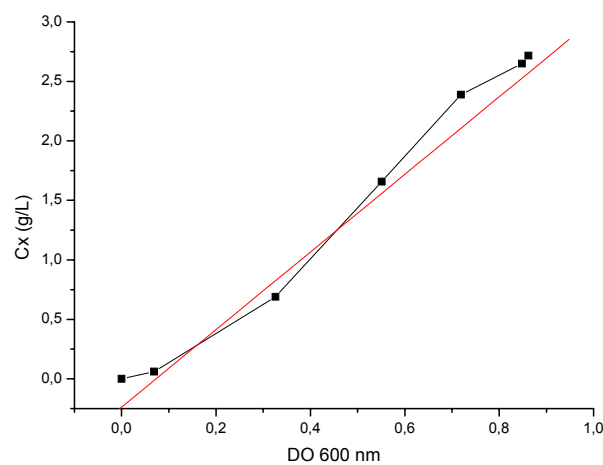


Figura 4.2.1.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de *B. megaterium* para os períodos de 0, 2, 4, 8, 12 e 16 horas de cultivo em Meio LB, contra as respectivas leituras espectrofotométricas a 600 nm de amostras desses cultivos (DO 600 nm).

4.2.2 Crescimento de *B. megaterium* ATCC 14945 em Meio Nutriente

Os pontos apresentados nas curvas das Figuras 4.2.2.1 e 4.2.2.2 representam amostras de cultivo de células de *B. megaterium* crescidas em Meio Nutriente e submetidas a leitura espectrofotométrica a 600 nm (DO 600 nm) e determinação de massa seca (C_x , em g/L).

Os pontos foram tomados para os períodos de 8, 12, 16 e 24 horas de cultivo.

A curva da Figura 4.2.2.1 representa a concentração celular (C_x , em g/L) através do tempo, para os mesmos pontos da Figura 4.2.2.2. Essa curva revela um perfil de crescimento típico de cultivo de células bacterianas, sendo possível a identificação das fases de crescimento, estando em evidência a fases exponencial e o início da fase estacionária (Tortora, 2005).

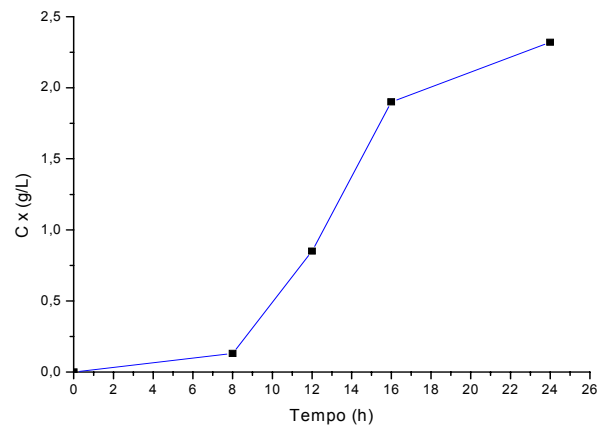


Figura 4.2.2.1. Curva de concentração celular (em g/L) de *B. megaterium* por tempo (em horas) de cultivo em Meio Nutriente (0, 8, 12, 16 e 24 horas), correspondentes aos dados da Figura 4.2.2.2.

Os dados foram tratados com análise de Regressão Linear. A equação da reta é dada por:

$$Y = A + Bx$$

em que $A = -0,264$ (erro = 0,31983), $B = 2,5133$ (erro = 0,47575); $R = 0,95023$; $SD = 0,36341$; $p = 0,01323$.

$$C_x \text{ (g/L)} = -0,264 + 2,5133 * DO \text{ 600 nm}$$

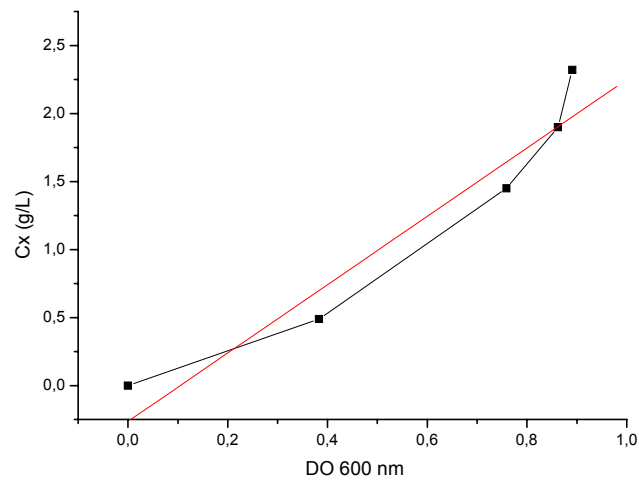


Figura 4.2.2.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de *B. megaterium* para os períodos de 0, 8, 12, 16 e 24 horas de cultivo em Meio Nutriente, contra as respectivas leituras espectrofotométricas a 600 nm de amostras desses cultivos (DO 600 nm).

4.2.3 Crescimento de *B. megaterium* ATCC 14945 em Meio LBS

As Figuras 4.2.3.1 e 4.2.3.2 apresentam os resultados de determinação de massa seca (C_x , em g/L) e das leituras espectrofotométricas a 600 nm (DO 600) de amostras de cultura de células de *B. megaterium* crescidas em Meio LBS. Os pontos foram tomados a 2, 4, 8, 12, 16 e 34 horas de cultivo.

A curva da Figura 4.2.3.1 representa a concentração celular (C_x , em g/L) através do tempo, para os mesmos valores de Y da Figura 4.2.3.2.

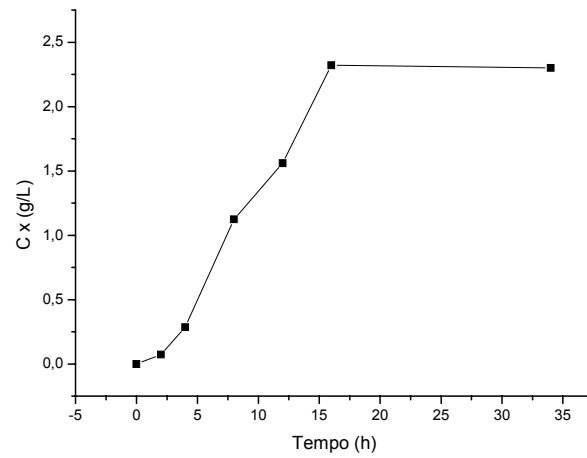


Figura 4.2.3.1. Curva de concentração celular em g/L de *B. megaterium* em Meio LBS por tempo de cultivo (0, 2, 4, 8, 12, 16 e 34 horas), correspondentes aos dados da Figura 4.2.3.2.

A análise de Regressão Linear, descrita pela equação de reta

$$Y = A + Bx,$$

resultou nos seguintes valores para esse experimento de crescimento de *B. megaterium* em Meio LBS:

$A = -0,11815$ (erro = 0,08234), $B = 3,09221$ (erro = 0,17463); $R = 0,99212$; $SD = 0,14015$; $p < 0,0001$.

$$C_x \text{ (g/L)} = -0,11815 + 3,09221 * \text{DO } 600 \text{ nm}$$

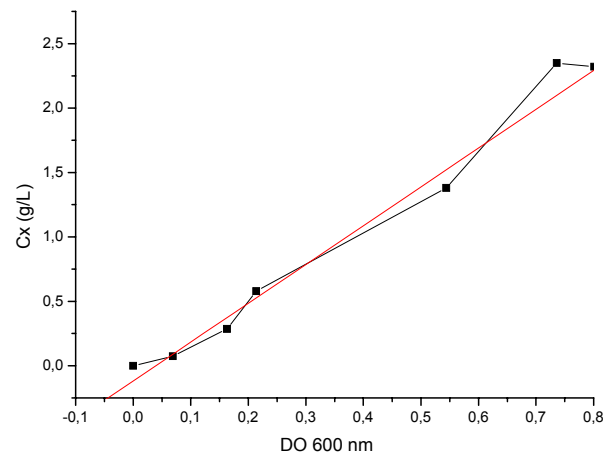


Figura 4.2.3.2. Regressão linear dos dados de concentração celular em g/L (C_x) de *B. megaterium* para os períodos de 0, 2, 4, 8, 12, 16 e 34 horas de cultivo em Meio LBS, contra as respectivas leituras espectrofotométricas a 600 nm de amostras desses cultivos (DO 600 nm).

4.3 Análise da Concentração de Células Viáveis

Segundo Rhee et al. (2007), a idade da cultura apresenta uma significativa função na habilidade das células em serem transformadas por eletroporação. Células entre o início e o meio da fase exponencial foram mais eficientemente transformadas que células em outras fases de crescimento (Shark et al., 1991; Rhee et al., 2007).

4.3.1 Protocolos para Eletroporação com Meio PEG/Sorbitol

As amostras para os Ensaios UFC 1, UFC 5 e UFC 9 foram tratadas com o Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol. A Figura 4.3.1 mostra colônias de *B. megaterium* selvagem em ágar Nutriente (placa controle) para o Experimento UFC 1.



Figura 4.3.1. Técnica de estriamento para obtenção de colônias puras: colônias de *B. megaterium* ATCC 14945 selvagem em ágar Nutriente (controle); Experimento UFC 1.

Moro et al. (1995) aplicaram o tratamento com o Meio de Eletroporação 25% PEG 6000/0,1 M de Sorbitol a células vegetativas de *B. megaterium* WH320 quando a diluição em meio fresco da cultura crescida *overnight* atingiu $DO_{660\text{ nm}}$ igual a 1,0. Não são trazidas quantificações de unidades formadoras de colônias (UFC) para tais células no momento anterior à aplicação dos pulsos elétricos, isto é, após o tratamento com o Meio de Eletroporação.

O Experimento UFC 5 (Tabela 4.3.1) traz a quantificação de células viáveis a partir de cultura de *B. megaterium* ATCC 14945 crescida em Meio LB ao término do tratamento com PEG/Sorbitol ($9,2 \times 10^8$ UFC/mL).

Os Experimentos UFC 1 e UFC 9, realizados para a obtenção de quantificação de células viáveis (em UFC/mL) e de valores para a Duração dos Pulsos Elétricos (em ms), empregaram células crescidas em Meio Nutriente e LBS, respectivamente, de modo a comparar os resultados atingidos para tais Meios de Crescimento em relação ao Meio LB (indicado por Moro et al., 1995).

Tabela 4.3.1. Valores obtidos para a Duração dos Pulsos Elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de *B. megaterium* tratadas com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol (Ensaio UFC 1, UFC 5 e UFC 9).

Ensaio	Meio Crescimento	Duração Pulsos Elétricos (ms) *	UFC/mL
UFC 1	Nutriente	5,46	$8,8 \times 10^8$
UFC 5	LB	6,06	$9,2 \times 10^8$
UFC 9	LBS	6,23	$2,3 \times 10^9$

* Valores médios para as réplicas das eletroporações

Comparativamente, dentre os experimentos realizados com células crescidas nos Meios Nutriente (UFC 1), LB (UFC 5) e LBS (UFC 9), o Experimento UFC 9 revelou os melhores resultados para viabilidade ($2,3 \times 10^9$ UFC/mL) e para Duração dos Pulsos Elétricos (6,23 ms), após o tratamento com o Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol (Tabela 4.3.1).

4.3.2 Protocolos para Eletroporação com Meio Sacarose/MgCl₂

Dunny et al. (1991) trataram células intactas da bactéria Gram – positiva *Enterococcus faecalis* com o Meio de Eletroporação 0,625 M de Sacarose/1,0 mM de MgCl₂. Após as lavagens e ressuspensão nesse Meio, a densidade celular encontrada foi de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Os valores obtidos para células intactas de *B. megaterium* tratadas com o mesmo Meio de Eletroporação encontram-se na mesma ordem de grandeza para o crescimento nos Meios LB e LBS (Tabela 4.3.2).

Tabela 4.3.2. Valores obtidos para a Duração dos Pulsos Elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de *B. megaterium* tratadas com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl₂ (Ensaio UFC 2, UFC 6 e UFC 10).

Ensaio	Meio Crescimento	Duração Pulsos Elétricos (ms) *	UFC/mL
UFC 2	Nutriente	2,78	2,8 x 10 ⁷
UFC 6	LB	3,45	4,6 x 10 ⁸
UFC 10	LBS	3,02	3,7 x 10 ⁸

* Valores médios para as réplicas das eletroporações

Células de *B. megaterium* crescidas em Meio LB e em Meio LB acrescido de sorbitol (LBS) apresentaram resultados equivalentes para viabilidade celular após tratamento com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl₂ (ordem de 10⁸ UFC/mL, como o obtido por Dunny et al., 1991). Após o tratamento das células com o referido Meio de Eletroporação, amostras das suspensões celulares obtidas foram submetidas a diluição seriada em Meio de Crescimento líquido (LB ou LBS) e imediatamente plaqueadas em ágar não-seletivo (ágar LB ou ágar LBS). O procedimento resultou em colônias como vistas na Figura 4.3.2.

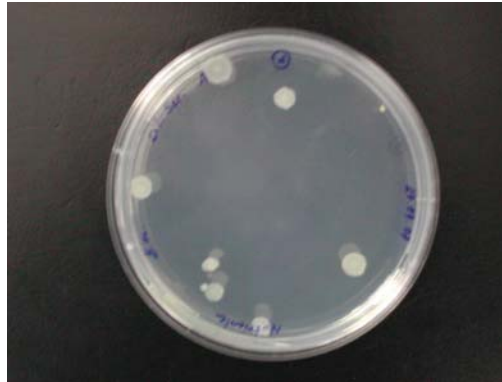


Figura 4.3.2. Colônias de *B. megaterium* ATCC 14945 selvagem a partir de células tratadas com Meio de Eletroporação Sacarose/MgCl₂, submetidas a diluição seriada (fator de diluição: 10⁸) e imediatamente plaqueadas em meio não-seletivo. Experimento UFC 2.

4.3.3 Protocolos para Eletroporação com Meio HEPES 10 mM

Belliveau & Trevors (1989) eletroporaram células vegetativas de *Bacillus cereus* 569 (crescidas em Meio LB) com o plasmídeo pC194, após tratamento dessas com o Meio HEPES 10 mM pH 7,0. A densidade celular encontrada, após lavagens e ressuspensão nesse Meio de Eletroporação, foi de $5,5 \times 10^8$ UFC/mL. Para a preparação de células de *B. megaterium* utilizando o mesmo Meio de Eletroporação (HEPES), foram realizados ajustes dos volumes empregados de Meios de Crescimento e de Eletroporação, de modo a obter densidade celular equivalente à utilizada por Belliveau & Trevors (1989). A Tabela 4.3.3 apresenta os resultados alcançados por meio dos referidos ajustes.

Tabela 4.3.3. Valores obtidos para a Duração dos Pulsos Elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de *B. megaterium* tratadas com Meio de Eletroporação HEPES (Ensaio UFC 3, UFC 7 e UFC 11).

Ensaio	Meio Crescimento	Duração Pulsos Elétricos (ms) *	UFC/mL
UFC 3	Nutriente	2,68	$5,6 \times 10^8$
UFC 7	LB	5,64	$2,93 \times 10^9$
UFC 11	LBS	3,32	$1,86 \times 10^8$

* Valores médios para as réplicas das eletroporações

Foram obtidos os maiores valores para viabilidade celular ($2,93 \times 10^9$ UFC/mL) e para Duração dos Pulsos Elétricos (5,64 ms) para células de *B. megaterium* crescidas em Meio LB (Ensaio UFC 7, Tabela 4.3.3), comparados aos valores obtidos nos Experimentos UFC 3 e UFC 11, que foram realizados com células crescidas em Meio Nutriente e LBS, respectivamente (Tabela 4.3.3). O plaqueamento em meio não-seletivo das suspensões celulares submetidas à diluição seriada produziu colônias de *B. megaterium* ATCC 14945, como verificado na Figura 4.3.3.

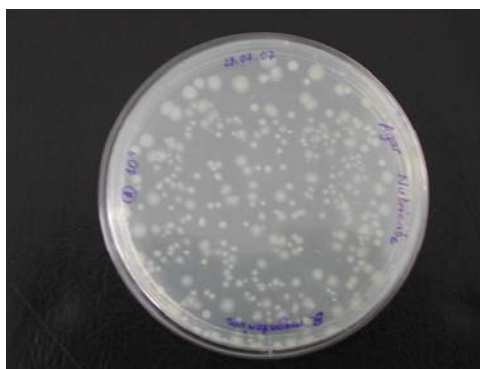


Figura 4.3.3. Colônias de *B. megaterium* ATCC 14945 selvagem a partir do plaqueamento em meio não-seletivo de células em meio da fase exponencial de crescimento, tratadas com HEPES 10 mM (Experimento UFC 3).

4.3.4 Protocolos para Eletroporação com Meio SMG

Xue et al. (1999) prepararam células eletrocompetentes de *B. subtilis* utilizando o protocolo de alta osmolaridade, para culturas crescidas em Meio LBS. A densidade celular, após lavagens e ressuspensão das células em Meio de Eletroporação SMG, foi de $1 - 1,3 \times 10^{10}$ UFC/mL.

O Experimento UFC 12 foi realizado com o uso dos Meios de Crescimento (LBS) e de Eletroporação (SMG), propostos por Xue et al. (1999). De modo a comparar os rendimentos para densidade celular utilizando os três diferentes Meios de Crescimento (Nutriente, LB e LBS), foram também realizados os Experimentos UFC 4 e UFC 8. A Tabela 4.3.4 traz os resultados para tais ensaios.

Tabela 4.3.4. Valores obtidos para a Duração dos Pulsos Elétricos (em ms) e quantificação de células viáveis (UFC/mL) para as células de *B. megaterium* tratadas com Meio de Eletroporação SMG (Ensaio UFC 4, UFC 8 e UFC 12).

Ensaio	Meio Crescimento	Duração Pulsos Elétricos (ms)	UFC/mL
UFC 4	Nutriente	1,83	$1,7 \times 10^9$
UFC 8	LB	3,86	$9,4 \times 10^9$
UFC 12	LBS	2,98	$1,1 \times 10^{10}$

* Valores médios para as réplicas das eletroporações

O Ensaio UFC 12 (Tabela 4.3.4), realizado com os mesmos Meios de Crescimento e de Eletroporação empregados por Xue et al. (1999), produziu $1,1 \times 10^{10}$ UFC/mL. Para a obtenção de tais resultados, foi igualmente necessária a realização de experimentos para ajustes de volume de cultura (Meio de Crescimento) e de Meio de

Eletroporação, para a preparação das suspensões celulares. Foi aplicado o método de diluição seriada a tais suspensões e imediatamente realizado o plaqueamento dessas amostras em meio não-seletivo (Figura 4.3.4).

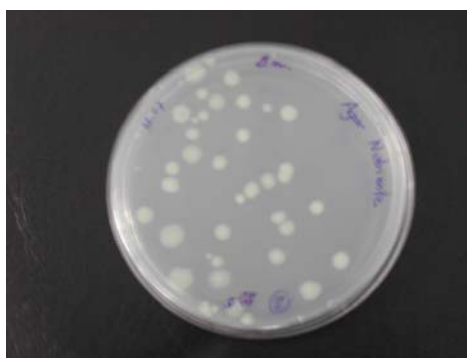


Figura 4.3.4. Colônias de *B. megaterium* ATCC 14945 selvagem a partir de células tratadas com Meio de Eletroporação SMG, submetidas à diluição seriada (fator de diluição: 10^5) e imediatamente plaqueadas em meio não-seletivo (Experimento UFC 4).

4.4 Análise da Produção de Biomassa pelo Método da Massa Seca

Os dados apresentados na Tabela 4.4.1 referem-se aos Experimentos MS 1, MS 2 e MS 3. Esses dados expressam os resultados finais (concentração celular, em g/L) da quantificação da produção de biomassa, pelo Método da Massa Seca, dos cultivos de *B. megaterium* nos Meios de Crescimento Nutriente, LB e LBS. Esses dados permitiram a construção das Curvas de Calibração para o crescimento de *B. megaterium* nos diferentes Meios, acima apresentadas (Figuras 4.2.1, 4.2.2 e 4.2.3, subitem 4.2).

Tabela 4.4.1. Quantificação da produção de biomassa (concentração celular, em g/L) pelo Método da Massa Seca, dos cultivos de *B. megaterium* nos Meios de Crescimento Nutriente (MS 1), LB (MS 2) e LBS (MS 3).

Ensaio	MS 1 (g/L)	MS 2 (g/L)	MS 3 (g/L)
Meio Crescimento	Nutriente	LB	LBS
2h	---	0,060	0,073
4h	---	0,106	0,285
8h	0,130	1,216	1,124
12h	0,850	2,189	1,560
16h	1,900	2,649	2,320
24h	2,320	---	---
34h	---	---	2,300

4.5 Análise morfológica e de pureza do cultivo

Para este ensaio, células em final da fase logarítmica de crescimento foram tratadas com Meio HEPES 10 mM, pH 7,0 (Belliveau & Trevors, 1989). Foram confeccionadas preparações permanentes e a fresco e realizada a determinação da massa seca para o mesmo lote de células. As preparações permanentes e a fresco foram preparadas nas seguintes etapas do processo de eletroporação: ao final do período de 16 horas de crescimento das células vegetativas (Figuras 4.5.1, 4.5.2 e 4.5.4); após lavagens e ressuspensão das células em Meio de eletroporação (Figuras 4.5.2 e 4.5.4); imediatamente após os pulsos elétricos (Figuras 4.5.1 e 4.5.3) e após o período de uma hora incubação das células eletroporadas, sob agitação de 150 rpm, a 30°C (Figura 4.5.3).

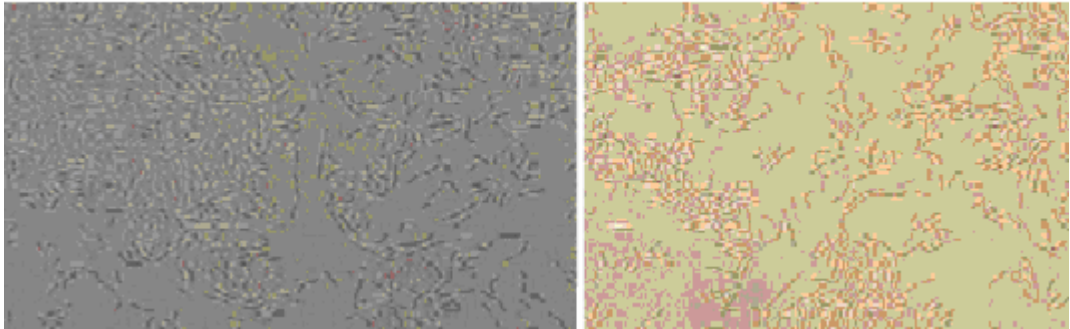


Figura 4.5.1. Preparações a fresco de células de *B. megaterium* selvagem. Células de *B. megaterium* após as 16 horas de cultivo (à esquerda) e células imediatamente após os pulsos elétricos (à direita) (Aumento: 10.000x).

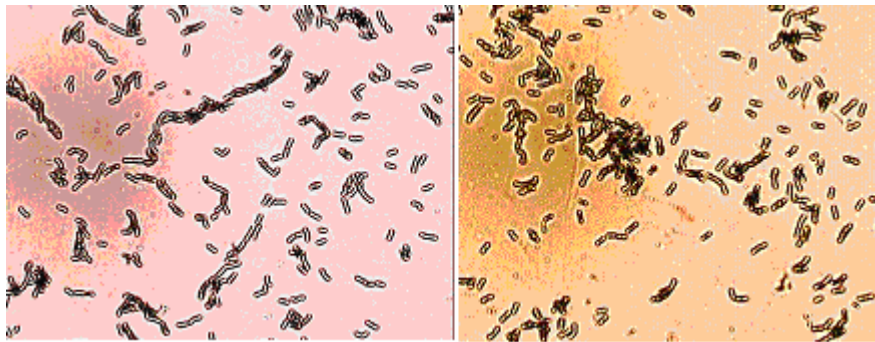


Figura 4.5.2. Preparações permanentes (Coloração de Gram) de células de *B. megaterium* selvagem. Células de *B. megaterium* após as 16 horas de cultivo (à esquerda) e células tratadas com Meio de eletroporação (à direita). (Aumento: 10.000x).

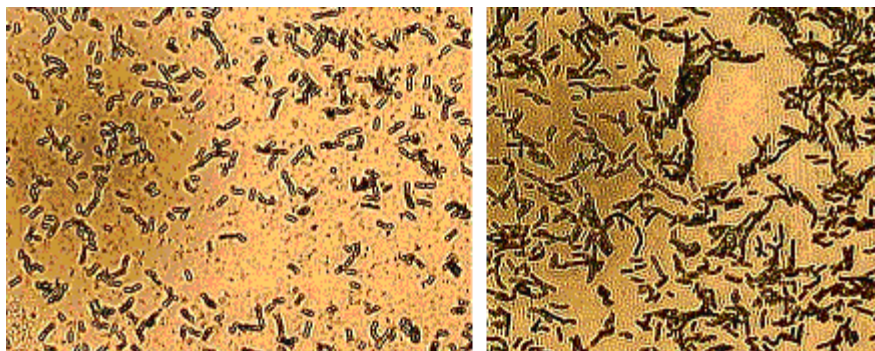


Figura 4.5.3. Preparações permanentes (Coloração de Gram) de células de *B. megaterium* selvagem. Células de *B. megaterium* imediatamente após os pulsos elétricos (à esquerda) e células eletroporadas após o período de incubação de uma hora antes do plaqueamento (à direita). (Aumento: 10.000x).

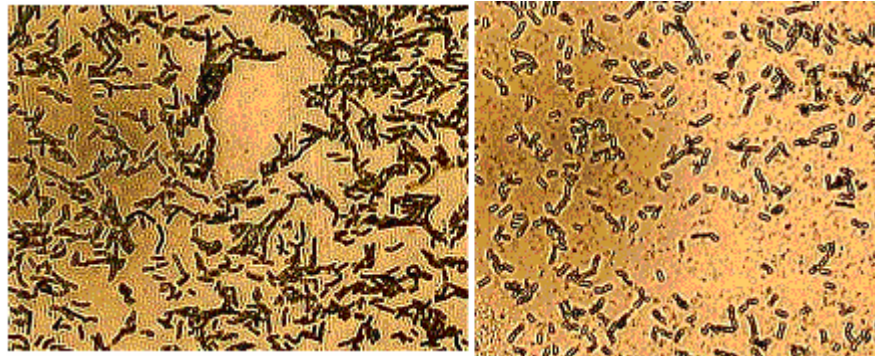


Figura 4.5.4. Preparações permanentes (Coloração Verde Malaquita) de células de *B. megaterium* selvagem. Células de *B. megaterium* após as 16 horas de cultivo (à esquerda) e células tratadas com Meio de eletroporação (à direita). A coloração avermelhada revela células em estado vegetativo. (Aumento: 10.000x).

4.6 Testes para determinação da Duração dos Pulsos Elétricos

A combinação de diferentes valores de resistores (R , em Ω), capacitores (C , em μF) e campos elétricos iniciais (E_0), como indicados nas Tabelas 4.6.1, 4.6.2, 4.6.3 e 4.6.4, permitiram a caracterização e seleção de valores para T (em ms) adequados à eletroporação de células vegetativas de *B. megaterium*. Os testes preliminares com os Meios de eletroporação consistiram na aplicação de pulsos elétricos sobre alíquotas de 400 μL dos Meios HEPES 10 mM e PEG/Sorbitol). Os valores obtidos para a Duração dos Pulsos Elétricos (T) estão expressos nas Tabelas 4.6.1 e 4.6.2 (Meio HEPES), 4.6.3 e 4.6.4 (PEG/Sorbitol).

Ressalta-se, aqui, a obtenção de valores muito superiores aos recomendados para organismos procariotos (entre 5 e 10 ms), como 14,3 ms; 21,7 ms (Tabela 4.6.1); 17,8 ms; 28,4 ms (Tabela 4.6.2); 23,7 ms (Tabela 4.6.3); 29,4 ms (Tabela 4.6.4). Esses resultados permitirão incrementos na eficiência de transformação por eletroporação de células de *B. megaterium*.

Tabela 4.6.1. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação HEPES 10 mM. Campo elétrico inicial de 12 kV/cm. T1/Volt Real 1 e T2/Volt Real 2 são valores para amostras em duplicata.

Resistor (Ω)	Capacitor (μF)	T1 (ms)	Volt Real 1 (V)	T2 (ms)	Volt Real 2 (V)
200	3	0,56	2,38	0,54	2,38
200	10	1,74	2,42	1,66	2,42
200	25	4,54	2,46	4,28	2,46
200	50	9,08	2,47	8,40	2,47
400	3	1,12	2,42	1,06	2,42
400	10	3,40	2,48	3,12	2,45
400	25	8,60	2,48	7,74	2,48
400	50	15,9	2,48	14,3	2,49
600	3	1,58	2,44	1,46	2,43
600	10	4,78	2,48	4,32	2,47
600	25	12,5	2,49	10,9	2,49
600	50	26,3	2,50	21,7	2,49

Tabela 4.6.2. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação HEPES 10 mM. Campo elétrico inicial de 2,5 kV/cm. T1/Volt Real 1 e T2/Volt Real 2 são valores para amostras em duplicata

Resistor (Ω)	Capacitor (μF)	T1 (ms)	Volt Real 1 (V)	T2 (ms)	Volt Real 2 (V)
200	3	0,60	460	0,58	450
200	10	1,88	470	1,78	470
200	25	4,88	470	4,74	470
200	50	9,92	470	9,40	470
400	3	1,20	470	1,08	460
400	10	3,52	480	3,32	480
400	25	9,68	480	8,98	470
400	50	19,2	470	17,8	470
600	3	1,74	470	1,58	470
600	10	6,00	490	5,40	480
600	25	16,1	480	14,2	490
600	50	31,8	470	28,4	470

Tabela 4.6.3. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol. Campo elétrico inicial de 12 kV/cm. T1/Volt Real 1 e T2/Volt Real 2 são valores para amostras em duplicata.

Resistor (Ω)	Capacitor (μF)	T1 (ms)	Volt Real 1 (kV)	T2 (ms)	Volt Real 2 (kV)
200	3	0,62	2,30	0,58	2,29
200	10	1,86	2,35	1,80	2,34
200	25	4,84	2,37	4,62	2,38
200	50	9,34	2,38	8,98	2,38
400	3	1,12	2,33	1,04	2,32
400	10	3,40	2,38	3,12	2,37
400	25	6,52	2,39	8,04	2,39
400	50	12,7	2,39	14,7	2,39
600	3	1,74	2,35	1,62	2,35
600	10	5,28	2,39	4,76	2,38
600	25	13,2	2,40	8,04	2,40
600	50	23,7	2,41	14,7	2,40

Tabela 4.6.4. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos (T) após tratamento com Meio de Eletroporação PEG/Sorbitol. Campo elétrico inicial de 2,5 kV/cm. T1/Volt Real 1 e T2/Volt Real 2 são valores para amostras em duplicata.

Resistor (Ω)	Capacitor (μF)	T1 (ms)	Volt Real 1 (V)	T2 (ms)	Volt Real 2 (V)
200	3	0,60	460	0,60	460
200	10	1,86	470	1,86	470
200	25	4,92	480	4,74	470
200	50	9,58	470	9,38	470
400	3	1,16	470	1,12	470
400	10	3,52	490	3,32	480
400	25	9,22	480	8,94	480
400	50	18,1	470	17,0	470
600	3	1,88	480	1,68	480
600	10	5,76	490	5,19	490
600	25	14,9	480	13,4	480
600	50	29,4	470	26,5	480

4.7 Protocolos para Eletroporação ou Eletrotransformação

Foram realizados diversos experimentos de eletrotransformação, por meio de distintos protocolos de eletroporação, com as respectivas modificações para encontrar as melhores condições para esse processo de transformação de células vegetativas de *B. megaterium*. No entanto, para quaisquer dos experimentos abaixo descritos (subitens 4.7.1 a 4.7.6), não foram obtidas colônias recombinantes dessa bactéria Gram-positiva (Eficiências de Transformação nulas). São abaixo apresentados os resultados obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos, viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, referentes a cada experimento de eletroporação.

4.7.1 Eletroporações com Meio Sacarose/MgCl₂ e Meio PEG/Sorbitol

As eletroporações do Experimento P1 foram realizadas com o Meio PEG/Sorbitol e os valores obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos estão expressos na Tabela 4.7.1.

No Experimento S1 (eletroporações com Meio Sacarose/MgCl₂), foram selecionados valores mais elevados para a voltagem inicial (V) e obtidos os consequentes incrementos nos valores para Duração dos Pulsos Elétricos (Tabela 4.7.1).

No Experimento S2, é possível observar que tanto o uso do meio LB (amostra 1 e controle LB) quanto o do meio Nutriente (amostra 2 e controle N) para o cultivo de células vegetativas de *B. megaterium* produziram valores semelhantes para Duração dos Pulsos Elétricos, quando eletroporadas com o Meio Sacarose/ MgCl₂ (Tabela 4.7.1).

Para alíquotas provenientes da mesma suspensão celular, foram aplicados os protocolos referentes aos dois diferentes Meios de eletroporação, Sacarose/MgCl₂ e PEG/Sorbitol (Experimento PS 1, Tabela 4.7.1).

Tabela 4.7.1. Valores obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos (em ms), viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, em cada um dos experimentos, para as réplicas de cada eletroporação (amostras de 1 a 6) e controles (Contr). O número de réplicas de cada experimento é proporcional ao número de condições de eletroporação testado.

T (ms)	1	2	3	4	5	Contr	Viabilidade (UFC/mL)	Eficiência Transf.
amostras								
Exp P1	1,54	1,96	1,78	1,65		1,22	9,2 x 10 ⁸	0
Exp S1	2,34	2,65	3,20	3,15	3,24	2,32	9,2 x 10 ⁸	0
Exp S2	2,45					2,14	9,2 x 10 ⁸	0
		2,20				2,02	8,8 x 10 ⁸	
Exp S3	2,25	2,36	2,42			2,00	8,8 x 10 ⁸	0
Exp PS1	9,42					8,66	9,2 x 10 ⁸	0
		9,32				8,98	4,6 x 10 ⁸	
Exp PS2	1,22					1,02	9,2 x 10 ⁸	0
		1,32				0,98	4,6 x 10 ⁸	
Exp PS3	5,12					4,24	9,2 x 10 ⁸	0
		4,06				3,88	4,6 x 10 ⁸	
Exp P2	6,22	6,36				5,98	9,2 x 10 ⁸	0

O experimento descrito acima (Experimento PS 1) foi reproduzido com a inclusão de uma etapa ao protocolo de preparação de células para eletroporação: o tratamento com lisozima (Experimentos PS 2 e PS 3). Esta etapa teve por objetivo

promover maior permeabilidade de células de *B. megaterium* pela remoção de sua parede celular (formação de protoplastos) e, desta forma, facilitar a transformação por meio de eletroporação. As amostras “1” dos Experimentos PS1, PS2 e PS3 referem-se às suspensões celulares em PEG/sorbitol, e as amostras “2” em Meio Sacarose/MgCl₂ (Tabela 4.7.1).

4.7.2 Eletroporações com Meio HEPES 10 mM

As características dos pulsos aplicados às amostras dos ensaios realizados com o uso do Meio HEPES para eletroporação estão expressas no Quadro 3.3.4.5.

Os primeiros ensaios de eletroporação com o uso do Meio HEPES 10 mM (Experimento H1) foram realizados com baixos valores de voltagem inicial (500 e 700 V). Para a amostra 1, foi obtido valor mínimo adequado para eletroporação de um organismo procarioto (superiores a 5,0 ms).

Os Experimentos H2 e H3 utilizaram células vegetativas de *B. megaterium* no meio e no final da fase exponencial de crescimento, respectivamente, em Meio Nutriente. O objetivo desse teste foi verificar a influência de fase de crescimento sobre a eficiência de transformação.

Após os diversos experimentos acima descritos e o estudo das melhores condições de eletroporação, foi possível a obtenção de resultados satisfatórios para o parâmetro Duração dos Pulsos Elétricos (Tabela 4.7.2) em ensaios utilizando células em final da fase logarítmica de crescimento em Meio LB e por incrementos na resistência e na capacitância (Experimento H4, Quadro 3.3.4.5, subitem 3.3.4.5).

Nos ensaios H6 e H7 foram aplicados protocolos de eletroporação sob as condições elétricas mais drásticas (Quadro 3.3.4.5).

As placas em que foram semeadas as suspensões celulares de *B. megaterium* em Meio HEPES 10 mM eletroporadas com o DNA plasmidial pETDuet-1 (Experimento H6) não apresentaram colônias. Isto indica que ou não houve a incorporação do plasmídeo ou a expressão do gene que confere a resistência ao antibiótico e, por inferência, tampouco do gene *pac* (PGA), uma vez que ambos estão contidos no mesmo plasmídeo utilizado nas eletroporações (pETDuet-1). A placa correspondente ao controle negativo (células de *B. megaterium* selvagem eletroporadas sem a adição de DNA plasmidial, plaqueadas em meio não-seletivo) apresentou colônias, confirmando a viabilidade celular mesmo após a aplicação de protocolo de eletroporação sob as condições mais drásticas.

Tabela 4.7.2. Valores obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos (em ms), viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação nos ensaios de eletroporação com Meio HEPES (Experimentos H1 a H9). O número de réplicas de cada experimento é proporcional ao número de condições de eletroporação testado.

T (ms) amostras	1	2	3	4	5	6	Contr	Viabilidade (UFC/mL)	Eficiência Transf.
Exp H1	5,02	4,36	3,94	3,88			3,68	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H2	3,98	3,70	3,66				3,85	5,6 x 10 ⁸	0
Exp H3	9,92	9,16	4,16				4,00	5,6 x 10 ⁸	0
Exp H4	6,42	9,32	11,0	4,52	5,84	6,40	8,98	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H5	8,94	8,62	7,08				7,02	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H6	10,2	9,90	10,1				9,80	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H7	9,82	9,93	9,01				9,78	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H8	3,20	3,45	3,52				2,98	2,93 x 10 ⁹	0
Exp H9	4,24	4,62	4,80				4,20	2,93 x 10 ⁹	0
				8,94	9,62	9,46	8,68		

No ensaio H9, foi realizada a eletroporação de células vegetativas de *B. megaterium*, crescidas em Meio LB, em final da fase exponencial de crescimento (de acordo com as Curvas de Calibração, subitem 4.2.1), com o DNA plasmidial pHis 1522. Após a aplicação dos pulsos elétricos, as células eletroporadas foram conduzidas a incubação sob agitação de 100 rpm, a 37°C, e então plaqueadas em meio seletivo sólido (contendo 10 mg/mL de tetraciclina). Foram igualmente incluídos os controles positivo e negativo nesse experimento. As amostras 1, 2 e 3 receberam pulsos elétricos de 0,5 kV (2,5 kV/cm), 200 Ω e 25 μ F. Às amostras 4, 5 e 6, foram aplicados pulsos elétricos de 2,5 kV (12,5 kV/cm), 400 Ω e 25 μ F (Quadro 3.3.4.5).

4.7.3 Eletroporações com Meio de Alta Osmolaridade (Xue et al., 1999)

O plaqueamento das suspensões celulares de *B. megaterium* ATCC 14945, crescidas em Meio LBS, ao término do tratamento com Meio de Eletroporação SMG precedido por Diluição Seriada (subitem 3.3.2.1), confirmou a concentração celular esperada entre $1 - 1,3 \times 10^{10}$ CFU/mL, de acordo com Xue et al. (1999).

As condições elétricas associadas aos Experimentos de AO 1 a AO 4 estão expressas no Quadro 3.3.4.6. Os valores para Duração dos Pulsos Elétricos, viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, correspondentes a tais experimentos, podem ser verificados na Tabela 4.7.3.

Tabela 4.7.3. Valores obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos (ms), viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, referentes às eletroporações de células vegetativas de *B. megaterium* tratadas com Meio de Alta Osmolaridade (SMG), com o DNA plasmidial pHis 1522 (amostras de 1 a 3 e controle negativo).

Experimento/T	1	2	3	Contr	Viabilidade (UFC/mL)	Eficiência Transf.
AO 1	3,98	4,28	4,32	3,90	$1,1 \times 10^{10}$	0
AO 2	4,72	4,96	5,02	4,24	$1,1 \times 10^{10}$	0
AO 3	4,68	4,62	4,74	4,02	$1,1 \times 10^{10}$	0
AO 4	4,26	4,42	4,98	3,98	$1,1 \times 10^{10}$	0

4.7.4 Eletroporação em Meio SMG contendo MgCl₂

O protocolo para preparação de células eletrocompetentes utilizado nos Ensaio Mg 1 a Mg 6 foi o descrito por Xue et al. (1999), detalhado no subitem 3.3.4.6.

As células de *B. megaterium* crescidas em Meio LBS e tratadas com SMG acrescido de MgCl₂, nas concentrações 1 mM (Mg 1 e Mg 2), 20 mM (Mg 3 e Mg 4) e 40 mM (Mg 5 e Controle), como Meio de Eletroporação, foram submetidas às condições elétricas expressas no Quadro 3.3.4.6. Abaixo, na Tabela 4.7.4, são encontrados os valores para Duração dos Pulsos Elétricos, viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, para esse conjunto de experimentos.

Tabela 4.7.4. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos (em ms), viabilidade das células conduzidas à eletroporação e eficiência de transformação, obtidos nas eletroporações de *B. megaterium* crescidas em Meio LBS e tratadas com SMG / MgCl₂, nas concentrações 1 mM (Mg 1 e Mg 2), 20 mM (Mg 3 e Mg 4) e 40 mM (Mg 5 e Controle).

Experimento/T	1	2	Controle	Viabilidade (UFC/mL)	Eficiência Transf.
Mg 1	3,58	3,70	3,24	1,1 x 10 ¹⁰	0
Mg 2	3,40	3,52	3,66	1,1 x 10 ¹⁰	0
Mg 3	2,76	2,68	2,56	1,1 x 10 ¹⁰	0
Mg 4	2,74	2,82	2,18	1,1 x 10 ¹⁰	0
Mg 5	1,58	1,56	1,28	1,1 x 10 ¹⁰	0
Mg 6	1,44	1,34	1,26	1,1 x 10 ¹⁰	0

4.7.5 Eletroporação de protoplastos de *B. megaterium*

As condições elétricas a que foram submetidos protoplastos de *B. megaterium* (preparados segundo Malten et al., 2006), de acordo com protocolo proposto por Romero et al. (2006) encontram-se na Tabela 3.3.4.8. Os valores obtidos para Duração dos Pulsos Elétricos e eficiência de transformação estão expressos na Tabela 4.7.5. O período de incubação das placas sob 37°C foi de 72 horas. Entretanto, não foram verificadas colônias de *B. megaterium* recombinantes (isto é, transformadas com pHis 1522).

Tabela 4.7.5. Valores para Duração dos Pulsos Elétricos, viabilidade das células conduzidas à eletroporação e para eficiência de transformação, referentes às eletroporações de suspensões de protoplastos de *B. megaterium* após aplicação de pulsos elétricos de 700 V, utilizando-se resistor de 200 Ω e capacitor de 25 μ F.

Amostra	Suspensão celular (μ L)	DNA plasmidial (μ g)	Duração Pulsos Elétricos (ms)	Eficiência Tranf.
1	400	10	2,96	0
2	400	10	2,84	0
Contr	400	---	2,72	0

Como acima exposto, durante a execução deste projeto de pesquisa foram estudadas as condições de cultivo de *B. megaterium* ATCC 14945 (volumes de meios de crescimento; volumes de inóculo com suspensão de células vegetativas criopreservadas em glicerol; tempo de cultivo, sob temperatura e agitação controladas), isoladamente e em combinação com as condições requeridas para eletroporação.

Os ajustes dos volumes dos Meios de Crescimento (LB, Nutriente e LBS) e dos volumes para ressuspensão das células nos Meios de Eletroporação (PEG/sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES e SMG) permitiram a obtenção das concentrações de células viáveis, quantificadas pelo Método de Contagem de Unidades Formadoras de Colônias, recomendadas pela literatura.

Somaram-se ainda a tais ajustes os ensaios para comparação da produção de biomassa nos três Meios de Crescimento utilizados e a concentração de células viáveis em diferentes fases de crescimento para *B. megaterium* (meio e final da fase exponencial), variando-se as condições elétricas (voltagem inicial, campo elétrico inicial, resistência e capacitância). Utilizando cubetas para eletroporação de espaço

entre eletrodos igual a 0,2 cm e os limites do equipamento (Gene Pulser, BioRad) para a aplicação dos pulsos elétricos, foram verificadas taxas de sobrevivência celular não-nulas para a totalidade dos experimentos, isto é, não houve letalidade total das células de *B. megaterium* ATCC 14945 eletroporadas com os Meios PEG/sorbitol, Sacarose/MgCl₂, HEPES ou SMG, mesmo sob as condições elétricas mais drásticas, que correspondem a 2,5 kV, 600 Ω e 50 μF nos ensaios realizados neste trabalho (vide Sugestões, item 6).

Rhee et al. (2007) verificaram que o número de transformantes decresceu cerca de 10 vezes como resultado da diminuição da voltagem de 15 kV/cm para 5 kV/cm. A 20 kV/cm, a viabilidade das células declinou muito rapidamente. A duração do pulso igual a 10 ms foi encontrada como sendo a ótima para o decaimento exponencial de onda para *B. coagulans*. A baixas voltagens como 12,5 kV/cm, valores ótimos para transformação foram obtidos pelo aumento da duração do pulso para 12,5 – 15 ms. Foi verificada uma relação inversa entre a força do campo elétrico e a duração do pulso na transformação de *B. coagulans*.

Em tais experimentos de eletroporação de *B. coagulans*, Rhee et al (2007) verificaram que plasmídeos maiores (pMSR10, 6091 bp) necessitaram de menores voltagens e duração de pulso maiores, comparados a plasmídeos menores (pNW33N, 4217 bp) para a eficiência ótima de transformação de *B. coagulans*. Esses resultados sugerem que as condições de eletroporação necessitam ser otimizadas para cada plasmídeo, bem como para vetores plasmidiais com variados tamanhos de insertos. O número de transformantes com o plasmídeo pMSR10 (6091 pb), utilizando-se as mesmas condições de eletroporação foi de cerca de 70% do número obtido com o plasmídeo pNW33N (4217 pb). Esta diferença entre os dois plasmídeos quanto ao

número de transformantes por μg de DNA plasmidial pode ser atribuída à diferença de tamanho entre ambos. Os experimentos combinaram cinco diferentes vetores com diversas linhagens de *B. coagulans*, tais como P4-102B, 36D1, 17C5, entre outras. Experimentos preliminares de eletroporação revelaram que apenas a combinação de *B. coagulans* linhagem P4-102B e o plasmídeo pNW33N produziram transformantes detectáveis (Rhee et al., 2007).

Por essas razões, para células de *B. megaterium* ATCC 14945, foram testadas tanto as combinações menores voltagens e duração de pulso maiores, quanto maiores voltagens e duração de pulso menores, para os quatro plasmídeos utilizados (pET-32 “PGA”, pETDuet-1, pBR 322 e pHis 1522, que apresentam os seguintes tamanhos, em pares de bases, 5900, 5420, 4361 e 7402, respectivamente).

Miller et al. (1988) observaram que a força do campo elétrico inicial apresentou maior efeito na eficiência de transformação de *Campylobacter jejuni* (bactéria microaerofílica Gram – negativa) que a Duração dos Pulsos Elétricos (T). Para campos elétricos entre 5 kV/cm e 13 kV/cm, um aumento de duas vezes na voltagem resultou em um incremento superior a 1000 vezes no número de transformantes por μg de DNA. A 5,25 kV/cm, aumentando-se a Duração dos Pulsos Elétricos de 10 ms para 20 ms, obteve-se elevação da eficiência em mais de 100 vezes.

Xue et al (1999) verificaram que a eficiência de transformação aumentou em proporção direta com o campo elétrico entre 12 e 23 kV/cm. Esse aumento na eficiência de transformação foi correlacionado com a taxa de sobrevivência celular, indicando que os meios de alta osmolaridade utilizados proporcionam uma ação protetora contra as injúrias elétricas às células. A aplicação do método de alta osmolaridade otimizado resultou em um aumento da eficiência de transformação de *B. licheniformis* de

aproximadamente 400 vezes, com um valor máximo de $1,8 \times 10^4$ transformantes por μg de DNA. Como para *B. subtilis*, a mais alta eficiência de transformação de *B. licheniformis* foi atingida com o uso de elevado campo elétrico inicial (21 kV/cm). Esses resultados indicam que a combinação de alta osmolaridade e elevados campos elétricos devem proporcionar o aumento da eficiência de transformação de algumas espécies de bactérias Gram-positivas capazes de crescer em meios de alta osmolaridade.

Os resultados de Shark et al. (1991) revelaram maiores eficiências de transformação para células de *B. megaterium* 7A17 em fase final do crescimento exponencial, quando comparado ao rendimento para tais células em fase estacionária. Células a partir de culturas em meio da fase exponencial renderam significativamente mais transformantes que células de culturas em final da fase exponencial. O aumento na concentração molar de sorbitol no meio de bombardeamento resultou no aumento da eficiência de transformação de células de *B. megaterium* 7A17 em fase exponencial de crescimento.

Moro et al. (1995) verificaram que o aumento da voltagem aplicada resultou no aumento gradual da eficiência de transformação e, simultaneamente, no decréscimo da porcentagem de sobrevivência das células. Para campos elétricos iniciais de 12 kV/cm, foram obtidas eficiências de transformação da ordem de $2,76 \times 10^3$ CFU por μg de pWH 1510, com sobrevivência celular de 83%. Para 15 kV/cm, foram obtidos valores para eficiência superiores a $5,8 \times 10^3$ CFU por μg de pWH 1510, com 58% de sobrevivência celular. O valor máximo de eficiência de transformação atingido está entre os descritos para outras bactérias Gram-positivas (Belliveau & Trevors, 1989), mas é inferior aos obtidos com *E. coli*. Isto pode ser devido à densa parede celular das bactérias Gram-positivas, quando comparadas às Gram-negativas.

5 Sugestões

Dentre as sugestões para a continuidade desse trabalho de pesquisa, estão:

- Realizar experimentos de eletroporação utilizando células de outras linhagens de *Bacillus megaterium*;
- Investir mais profundamente no estudo da estrutura da parede celular associada com a fisiologia da pré-esporulação (como base para a competência);
- Realizar experimentos utilizando meios de crescimento pobres em aminoácidos, como já caracterizados pelo Grupo de Pesquisa coordenado pela Dra. Raquel de L. C. Giordano. Segundo Anagnostopoulos & Spizizen (1960), elevadas quantidades de aminoácidos, por permitem a síntese de componentes da parede celular, prejudicam a tomada de DNA, reduzindo a sensibilidade para transformação;
- Investigar os limites de viabilidade das células que serão submetidas aos protocolos de eletroporação, utilizando cubetas de espaço entre eletrodos de 0,1 cm;
- Utilizar ferramentas de bioinformática para investigar ORI específica para a linhagem de *B. megaterium* utilizada;
- Analisar incompatibilidade de plasmídeos em *Bacillus megaterium*;
- Incluir, nos experimentos de eletroporação, o controle positivo constituído por alíquota de células competentes transformadas com quantidade conhecida de uma preparação padrão de DNA circular *supercoiled*, para o cálculo da eficiência de transformação.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBERTS, B., JOHNSON, A., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K., WALTER, P. *Molecular Biology of the Cell*. Fifth Edition. London: Garland Science, 2007
- ANAGNOSTOPOULOS, C. & SPIZIZEN, J. **Requirements for transformation in *Bacillus subtilis***. *J. Bacteriol.* 81, 741-746, 1960
- ARROYO, M.; DE-LA-MATA, I.; ACEBAL, C.; CASTILLÓN, M. P. **Biotechnological applications of penicillin acylases: state-of-the-art**. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 60, 507 – 514, 2003
- BAUM, J.A. & GILBERT, M.P. **Characterization and comparative sequence analysis of replication origins from three large *Bacillus thuringiensis* plasmids**. *Journal of Bacteriology*, 173 (17), 5280-5289, 1991
- BELLIVEAU, B. H. & TREVORS, J.T. **Transformation of *Bacillus cereus* vegetative cells by electroporation**. *Appl. Environ. Microbiol.* 55, 1649–1652, 1989
- BIEDENDIECK, R.; BEINE, R.; GAMER, M.; JORDAN, E.; BUCHHOLZ, K.; SEIBEL, J.; DIJKHUIZEN, L.; MALTEN, M.; JAHN, D. **Export, purification, and activities of affinity tagged *Lactobacillus reuteri* levansucrase produced by *Bacillus megaterium***. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74, 1062–1073, 2007a
- BONE, E.J. & ELLAR, D.J. **Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation**. *FEMS Microbiol. Lett.* 58, 171-178, 1989
- BOOT, K. F.; WILSON, G. A. **Development of competence in the *Bacillus subtilis* transformation system**. *Journal of Bacteriology*, 94, 562-570, 1967
- BRENNER, S. & STENT, G. S. **Bacteriophage growth in protoplasts of *Bacillus megaterium***. *Biochimica et Biophysica Acta*, 17, 473-475, 1955
- BRIGIDI, P.; DE ROSSI, E.; BERTARINI, M.L.; RICCARDI, G.; MATTEUZZI, D. **Genetic transformation of intact cells of *Bacillus subtilis* by electroporation**. *FEMS Microbiol. Lett.* 67, 135–138, 1990
- BROWN, B.J. & CARLTON, B. **Plasmid-mediated transformation in *Bacillus megaterium***. *Journal of Bacteriology*, 142 (2), 508-512, 1980
- CHANG, S. & COHEN, S.N. **High frequency transformation of *Bacillus subtilis* protoplasts by plasmid DNA**. *Mol. Gen. Genet.*, 168, 111-115, 1979
- CORNER, T. R. & MARQUIS, R. E. **Why do bacterial protoplast burst in hypotonic solutions?** *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes*, 183, 544-558, 1969
- DUNNY, G.M.; LEE, L.N.; LEBLANC, D.J. **Improved electroporation and cloning vector system for Gram positive bacteria**. *Appl. Environ. Microbiol.* 57 (4), 1194-1201, 1991

FODOR, K. & ALFÖLDI, L. **Fusion of protoplasts of *Bacillus megaterium***. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 73, 2147-2150, 1976

GAMER, M.; STAMMEN, S.; BIEDENDIECK, R.; FRODE, D.; YANG, Y.; JAHN, D. ***Bacillus megaterium* - An alternative expression system**. *Journal of Biotechnology* 131S, S211–S241, 2007

GHUYSEN, J.M.; LEYH-BOUILLE, M.; DIERICKX, L. **Structure des parois de *Bacillus megaterium* KM II. Étude des complexes mucopolipeptidique et phosphomucopolysaccharidique**. *Biochimica et Biophysica Acta*, 63, 297-307, 1962

HOLT, J.G.; KRIEG, N.R.; Sneath, P.H.A., STALEY, J.T.; WILLIAMS, S.T. (eds) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, pp. 559 – 561. Ninth edition. Baltimore: Willians & Wilkins, 1994

KONEMAN, E.W., ALLEN, S.D., JANDA, W.M., SCHRECKENBERGER, P.C.; WINN JR, W.C. **Diagnóstico Microbiológico: Texto e Atlas Colorido**. 5ª ed., Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan, 2001

MALTEN, M.; NAHRSTEDT H, MEINHARDT F, JAHN D. **Coexpression of the type I signal peptidase gene sipM increases recombinant protein production and export in *Bacillus megaterium* MS941**. *Biotechnol Bioeng*, 91, 616–621, 2005b

MALTEN, M.; BIEDENDIECK, R.; GAMER, M.; DREWS, A-C.; STAMMEN, S.; BUCHHOLZ, K.; DIJKHUIZEN, L.; JAHN, D. **A *Bacillus megaterium* plasmid system for the production, export, and one-step purification of affinity-tagged heterologous levansucrase from growth medium**. *Appl Environ Microbiol* 72, 1677–1679, 2006

MAHILLON, J.; CHUNGJATUPORNCHAI, W.; DECOCK, J.; DIERICKX, S.; MICHIELS, F.; PEFEROEN, M.; JOOS, H. **Transformation of *Bacillus thuringiensis* by electroporation**. *FEBS Microbiol. Lett.*,60, 205-210, 1989

MARQUIS, R. E. **Osmotic sensitivity of bacterial protoplasts and the response of their limiting membrane to stretching**. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 118, 323-331, 1967

MARTÍN, L.; PRIETO, M. A.; CORTES, E.; GARCIA, J. L. **Cloning and sequencing of the *pac* gene encoding the penicillin G acylase of *Bacillus megaterium***. *FEBS Microbiol. Lett.*, 125, 287 – 292, 1995

MARTIN, P.A.W.; LOHR, J.R.; DEAN, D.H. **Transformation of *Bacillus thuringiensis* protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid**. *Journal of Bacteriology*, 980-983, 1981

MASSON, L.; PRÉFONTAINE, G.; BROUSSEAU, R. **Transformation of *Bacillus thuringiensis* vegetative cells by electroporation**. *FEMS Microbiol. Lett*, 60, 273-277, 1989

McCOOL, G.J. & CANNON, M.C. **PhaC and PhaR are required for polyhydroxyalkanoic acid synthase activity in *Bacillus megaterium*.** *Journal of Bacteriology*, 183(14), 4235-4243, 2001

MEEVOOTISOM, V., SAUNDERS, J. R. **Cloning and expression of penicillin acylase genes from overproducing strains of *Escherichia coli* and *Bacillus megaterium*.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 25, 372 – 378, 1987

MELETZUS, D. & EICHENLAUB, R. **Transformation of the phytopathogenic bacterium *Clavibacter michiganense subsp. michiganense* by electroporation and development of a cloning vector.** *Journal of Bacteriology*, 173 (1), 184-190, 1991

MILLER, J.F.; DOWER, W.J.; TOMPKINS, L.S. **High-voltage electroporation of bacteria: genetic transformation of *Campylobacter jejuni* with plasmid DNA.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85, 856-860, 1988

MORO, A.; SÁNCHEZ, J. C.; SERGUERA, C. **Transformation of *Bacillus megaterium* by electroporation.** *Biotechnology Techniques*, 9 (8), 589-590, 1995

OLSSON, A.; HAGSTROM, T.; NILSSON, B.; UHLEN, M.; GATENBECK, S. **Molecular cloning of *Bacillus sphaericus* Penicillin V Amidase gene and its expression in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*.** *Appl. Environm. Microbiol.*, 49 (5), 1085-1089, 1985

PANBANGRED, W.; WEERADECHAPON, K.; UDOMVARAPHANT, S.; FUJIYAMA, K.; MEEVOOTISOM, V. **High expression of the penicillin G acylase gene (pac) from *Bacillus megaterium* UN I in its own pac minus mutant.** *J. Appl. Microbiol.*, 89, 152-157, 2000

PARMAR, A.; KUMAR, H.; MARWAHA, S.S.; KENNEDY, J.F. **Advances in enzymatic transformation of penicillins to 6-aminopenicillanic acid (6-APA).** *Biotechnol. Advances*, 18, 289-301, 2000

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. **Recent biotechnological interventions for developing improved penicillin G acylases.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 97, 01-13, 2004

RAJENDHRAN, J.; GUNASEKARAN, P. **Molecular cloning and characterization of thermostable β -lactam acylase with broad substrate specificity from *Bacillus badius*.** *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 103, 457-463, 2007

RHEE, M.S.; KIM, J-W.; QIAN, Y.; INGRAM, L.O.; SHANMUGAM, K.T. **Development of plasmid vector and electroporation condition for gene transfer in sporogenic lactic acid bacterium, *Bacillus coagulans*.** *Plasmid*, 58, 13–22, 2007

ROMERO, D.; PÉREZ-GARCÍA, A.; VEENING, J.W.; DE-VICENTE, A.; KUIPERS, O.P. **Transformation of undomesticated strains of *Bacillus subtilis* by protoplast electroporation.** *Journal of Microbiological Methods*, 66, 556-559, 2006

- ROSSO, M.L. & VARY, P.S. **Distribution of *Bacillus megaterium* QM B1551 plasmids among other *Bacillus megaterium* strains and *Bacillus* species.** *Plasmid*, 53, 205-217, 2005
- RYGUS, T. & HILLEN, W. **Catabolic repression of the xyl operon in *Bacillus megaterium*.** *Journal of Bacteriology*, 174 (9), 3049-3055, 1992
- SADAIE, Y. & KADA, T. **Formation of competent *Bacillus subtilis* cells.** *Journal of Bacteriology*, 153, 813-821, 1983
- SAKAGUCHI, K.; MURAO, S. **A preliminary report on a new enzyme, "penicillin acylase".** *J. Agric. Chem. Soc.* v. 23, p. 411-414, 1950
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E.F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual.** Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- SAMBROOK, J. & RUSSEL, D. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** Third Edition, Cold Spring Harbor, New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001
- SAVIDGE, T.A. **Enzymatic Conversions used in the Production of Penicillins and Cephalosporins.** In: *Biotechnology of Industrial Antibiotics*, edited by Vandame, E. J., Ed. Marcel Dekker, 1984.
- SCHERRER, R. & GERHARDT, P. **Molecular Sieving by the *Bacillus megaterium* cell wall and protoplast.** *Journal of Bacteriology*, 718-735, 1971
- SCHMIDT, S.; WOLF, N.; STREY, J.; NAHRSTEDT, H.; MEINHARD, F.; WALDECK, J. **Test systems to study transcriptional regulation and promoter activity in *Bacillus megaterium*.** *Appl Microbiol Biotechnol*, 68, 647-655, 2005
- SCHOLLE, M. D.; WHITE, C. A.; KUNNIMALAIYAAN, M.; VARY, P. S. **Sequencing and characterization of pBM400 from *Bacillus megaterium* QM B1551.** *Appl Environ Microbiol*, 69, 6888-6898, 2003
- SHARK, K.B.; SMITH, F.D.; HARPENDING, P.R.; RASMUSSEN, J.L.; SANFORD, J.C. **Biolistic transformation of a prokaryote, *Bacillus megaterium*.** *Appl. Environm. Microbiol.*, 57, 480-485, 1991
- SHEWALE J.W.; SIVARAMAN, H. **Penicillin Acylase: Enzyme Production and its Application in the Manufacture of 6-APA.** *Process Biochemistry*, 146-154, 1989
- THORSSON, K. G. & WEIBULL, C. **Studies on the structure of bacterial L forms, protoplast and protoplast-like bodies.** *Journal of Ultrastructure Reseach*, 1, 412-427, 1958
- TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L. **Microbiologia.** Trad. Atual. Por Roberta Marchiori Martins, 8ª edição, Porto Alegre: Artmed, 2005
- VARY, P.S. **Prime Time for *Bacillus megaterium*.** *Microbiology*, 140, 1001-1013, 1994

- VARY, P. S.; BIEDENDIECK, R.; FUERCH, T.; MEINHARDT, F.; ROHDE, M.; DECKWER, W.D.; JAHN, D. ***Bacillus megaterium* – from a simple bacterium to industrial protein production host.** *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 76, 957 – 967, 2007
- VEHMAANPERÄ, J., 1989. **Transformation of *Bacillus amyloliquefaciens* by electroporation.** *FEMS Microbiol. Lett.* 61, 165–170
- VON TERSCH, M.A. & CARLTON, B.C. **Megacinogenic plasmids of *Bacillus megaterium*.** *J. Bacteriol.* 155, 872-877, 1983
- XUE, G-P.; JOHNSON, J. S.; DALRYMPLE, B. P. **High osmolarity improves the electro-transformation efficiency of the gram-positive bacteria *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*.** *Journal of Microbiological Methods*, 34, 183-191, 1999
- YANG, S.; HUANG, H.; ZHANG, R.; HUANG, X.; LI, S.; YUAN, Z. **Expression and purification of extracellular penicillin G acylase in *Bacillus subtilis*.** *Protein Expression and Purification*, 21, 60-64, 2001
- YANG, Y.; BIEDENDIECK, R.; WANG, W.; GAMER, M.; MALTEN, M.; JAHN, D.; DECKWER, W. D. **High yield recombinant penicillin G amidase production and export into the growth medium using *Bacillus megaterium*.** *Microbial Cell Factories*, 36 (5), 2006
- WEIBULL, C. **The localization of a permeability barrier in the cells of *Bacillus megaterium*.** *Experimental Cell Research*, 9, 139-147, 1955
- WEIBULL, C. **Osmotic proprieties of protoplasts of *Bacillus megaterium*.** *Experimental Cell Research*, 9 (2), 294-304, 1955
- WEIBULL, C. & BERGSTRÖM, L. **The chemical nature of the cytoplasmic membrane and the cell wall of *Bacillus megaterium*, strain M.** *Biochimica et Biophysica Acta*, 30, 340-351, 1958
- ZHANG, M.; SHI, M.; ZHOU, Z.; YANG, S.; YUAN, Z.; YE, Q. **Production of *Alcaligenes faecalis* penicillin G acylase in *Bacillus subtilis* WB600 (pMA5) fed hydrolyzed starch.** *Enzyme and Microbiol Technology*, 39, 555-560, 2006