

QUIMIOTAXIA ENTRE LINHAGENS DOADORAS E RECEPTORAS DE PLASMÍDIO R EM *Escherichia coli*

EDMAR CHARTONE DE SOUZA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade
de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Genética e Melhoramento de
Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Janeiro 1979

ERRATA

Página	Parágrafo ou item	Linha	Leia-se	Ao invés de
22	2º	5ª	Mot ⁻	Met ⁻
28	2º	8ª	seleção	relação
32	-	28ª	F-like	F line
35	-	12ª	plasmídios quime- ras	plasmídios quí- micos
37	-	-	K12.3.1 derivada de K12.3	K12.712R
42	g	4ª	Numa das placas era inoculada a <i>E.coli</i> K12 (con- trole)	Numa das pla- cas (controle)
43	b	2ª	12 ml	15 ml
67	1º	4ª	K12.2	K12.3.1
	3º	1ª	Tabela 8	Tabela 2
	4º	5ª	a fim	afim
69	<u>1/</u>	-	4.2.2.5	3.2.2.5
	<u>2/</u>	-	de 100 vezes	a 10 ⁻²
	<u>3/</u>	-	para não distor- cer	para torcer
72	<u>2/</u>	-	7000 rpm	8000 rpm
74	<u>2/</u>	-	7000 rpm	8000 rpm
81	-	6ª	2a, 3(a,b), 4(a,b,d,e)	2(a,b,c,d,e), 5(a,b)
		7ª	5(a,b,d,e)	6(a,b)
89	2º	7ª	K12.1.1	K12.1
		9ª	K12.3.1	K12.3
		9ª	K12.3.2	K12.3.1

*A todos aqueles que eu
quero bem,*

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Trabalho desta natureza depende da colaboração de pesoas e instituições. A todos que contribuíram direta ou indiretamente, os nossos agradecimentos.

Queremos agradecer em particular às seguintes pessoas ou instituições:

- *Prof. João Lúcio de Azevedo*, orientador, companheiro e homem de luta, por tudo que tem feito por nós e pela Genética de Microrganismos.
- *Prof.^a Dulce Regina Niffinegger e Souza*, companheira no lar e no trabalho, pelo carinho, sugestões e efetiva colaboração.
- *Prof.^a Aline Aparecida Pizzirani Kleiner*, pelo desprendimento e pelas ilustrações.
- *Prof. Sérgio Olavo Pinto da Costa*, pelas sugestões e companheirismo.
- *Prof.^a Flávia Maria Oliveira*, pela colaboração e amizade.
- *Prof. Flávio Cesar Tavares*, pelas sugestões e disponíbilidade.
- *Prof. Geraldo Toselo*, pela constante colaboração.
- *Prof. Diógenes Santiago Santos*, pela colaboração.
- *Altair Marchetti e Rondon Pessoa de Mendonça*, pelo muito que têm feito por nós.
- *Colegas de Pós-Graduação*, pela convivência: cada um sabe quanto nos estimulou e nos auxiliou.
- *Companheiros do Departamento de Biologia Geral do ICB-UFMG*, pela cooperação e incentivo.
- *Professores do Instituto de Genética da ESALQ*, pela contribuição na nossa formação científica.

- *Funcionários do Instituto de Genética da ESALQ, em particular aos Srs. Antonio José Rocha Campos, técnico de laboratório, e Luiz Próspero, Rodolfo Fulini, Salvador Pexe, Orlando Bueno Cardoso e Humberto Gorga Filho, pelos serviços prestados.*
- *Srs. José Broglio, Alaor de Oliveira e Cleusval Bissi, pela eficiência nos serviços de montagem, fotografia e datilografia.*
- *Departamento de Biologia Geral da UFMG, pelo incentivo e facilidades concedidas em prol da qualificação de seu pessoal docente.*
- *Instituto de Genética da ESALQ, em nome de seu Diretor Prof. Ernesto Paterniani, pela acolhida e facilidades concedidas.*
- *Universidade Federal de Minas Gerais, em nome de seu reitor Prof. Celso Vasconcellos Pinheiro e ex-reitor Eduardo Osório Cisalpino, e em particular ao Instituto de Ciências Biológicas, em nome de seu Diretor Prof. Marcelo Vasconcellos Coelho.*
- *COPERT, pelo regime de tempo integral e dedicação exclusiva.*
- *CNPq pela bolsa de estudos e pelo apoio financeiro às pesquisas, através do Plano Integrado de Genética (SIP/04-59 e SIP/04-52).*
- *A meus pais, meus filhos e demais familiares, pelo apoio e compreensão.*

CURRICULUM VITAE

EDMAR CHARTONE DE SOUZA, mineiro de Bias Fortes, nascido em 1939, filho de José Mendes de Souza e Maria Chartone de Souza, é bacharel e licenciado em História Natural pela Universidade Federal de Minas Gerais. Iniciou sua carreira na Universidade de Brasília e transferiu-se, após concurso, para a Universidade Federal de Minas Gerais. Foi Diretor Geral do Colégio Universitário da U.F.M.G. e chefe do Departamento de Biologia Geral do Instituto de Ciências Biológicas da U.F.M.G. É mestre em Microbiologia pela U.F.M.G. e Professor Adjunto do Departamento de Biologia Geral da U.F.M.G., onde participa das disciplinas Genética e Evolução e Genética de Microrganismos. Desenvolve pesquisas na área de genética bacteriana. Como parte do "Programa Quinquenal de Desenvolvimento do Departamento de Biologia Geral", ao qual o autor pertence, realizou o presente trabalho. Este constitui-se num dos requisitos do curso de doutorado em Genética e Melhoramento de Plantas da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" - Universidade de São Paulo.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.	5
3.1. Considerações gerais.	5
3.2. Quimiotaxia em bactérias.	6
3.2.1. Materiais e métodos em quimiotaxia . .	6
3.2.2. Quimiotaxia positiva: os atraentes . .	9
3.2.3. Quimiotaxia negativa: os repelentes. .	12
3.2.4. Mutantes não-quimiotácticos.	13
3.2.5. Quimiotaxia nas interações bacterianas..	14
3.2.6. Quimiotaxia determinada pelo sexo. . .	15
3.2.7. Quimiossensores: os quimiorreceptores	16
3.2.8. Transmissão da informação dos quimios-	
sensores para os flagelos: os mensa-	19
geiros	
3.2.9. Resposta flagelar aos estímulos qui-	
miotácticos	20
3.3. Conjugação em bactérias	22
3.3.1. Conceitos gerais	22
3.3.2. Colisão entre células doadoras e re-	
ceptoras	27
3.3.3. Formação de pares específicos e pares	
efetivos	28
3.3.4. Agregação e exclusão de superfície (ou	
de entrada).	31
4. MATERIAIS E MÉTODOS	36
4.1. Materiais	36
4.1.1. Linhagens de <i>Escherichia coli</i>	36
4.1.2. Meios de cultivo	36
4.1.3. Drogas antimicrobianas	40
4.1.4. Outros materiais	40
4.2. Métodos	41
4.2.1.	

	<u>Página</u>
4.2.1. Obtenção de mutantes para motilidade (IINO e ENOMOTO, 1971; modificado) . .	41
4.2.1.1. Obtenção de mutantes sem moti- lidade	41
4.2.1.2. Obtenção de mutantes de maior motilidade.	43
4.2.1.3. Obtenção das linhagens <i>E. coli</i> K _{12.1.1} e <i>E. coli</i> K _{12.2.1} . .	44
4.2.2. Ensaios de quimiotaxia em <i>E. coli</i> de tipos de reação sexual opostos.	45
4.2.2.1. Método da placa: inoculação em dois pontos (ADLER, 1966; BEZ- DEK e SOSKA, 1972)	45
4.2.2.2. Método da placa; diluição de filtrados (ADLER, 1966a) . . .	46
4.2.2.3. Método da placa: diluição do filtrado em meio semi-sólido de sais e glicerol (ADLER, 1966a) .	47
4.2.2.4. Método quantitativo de PFEFFER (ADLER, 1969 e 1973)	48
4.2.2.5. Método da conjugação para es- tudo de quimiotaxia	50
5. RESULTADOS	54
5.1. Mutantes para motilidade e transconjugantes..	54
5.2. Interação entre linhagens de <i>E. coli</i> doado- ras e receptoras em meio semi-sólido.	57
5.3. Diâmetro dos halos quimiotácticos formados em placas com filtrados diluídos em meio semi-sô- lido	64
5.4. Resultados decorrentes da aplicação do méto- do quantitativo de PFEFFER	64
5.5. Estudo de quimiotaxia pelo método da conjuga- ção	67
6. DISCUSSÃO	76
6.1. Obtenção de mutantes para motilidade e de transconjugantes.	76

	<u>Página</u>
6.2. Interações quimiotáticas entre linhagens de <i>E. coli</i> com tipos de reação sexual opostos, em meio triptonado semi-sólido	79
6.3. Uso de filtrados pelo método da diluição em placa e método quantitativo de PFEFFER	86
6.4. Estudo de quimiotaxia através do número de transconjugantes formado nos cruzamentos de <i>E. coli</i> com e sem motilidade	88
7. SUMMARY	96
8. LITERATURA CITADA	98

LISTA DAS TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Nomenclatura e característica das linhagens de <i>Escherichia coli</i>	37
2 - Diâmetro dos halos de movimento das linhagens de <i>E. coli</i> antes e após a obtenção de mutantes para motilidade	55
3 - Interações das linhagens de <i>E. coli</i> doadoras e receptoras em placa com meio semi-sólido . . .	63
4 - Diâmetro dos halos de quimiotaxia das linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e K _{12.1} frente aos filtrados, aquecidos e não aquecidos, das culturas de BH 100, K _{12.1} e K _{12.1.1} diluídos em meio triptonado semi-sólido	65
5 - Diâmetro dos halos de quimiotaxia da <i>E. coli</i> BH 100 frente aos filtrados, aquecidos e não aquecidos, das culturas de BH 100, K _{12.1} e K _{12.1.1} diluídos em meio semi-sólido de sais e glicerol.	65
6 - Número de células de <i>E. coli</i> doadoras e receptoras de plasmídeo R encontradas no interior de micropipetas após o uso do método quantitativo de PFEFFER (ADLER, 1969 e 1973) . . .	66
7 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de <i>E. coli</i> 100 e K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (1º experimento)	69
8 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (2º experimento).	71
9 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (3º experimento)	72

TabelaPágina

10 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (4º experimento)	74
11 - Número de transconjugantes obtido através de cruzamentos entre linhagens com (+) e sem (-) motilidade, de <i>E. coli</i> K ₁₂ doadoras e receptoras de plasmídeo R.	75

LISTA DAS FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Fases finais da obtenção de mutantes para moti- lidade em <i>E. coli</i>	56
2 - Interações quimiotáticas entre linhagens de <i>E. coli</i> do mesmo tipo de reação sexual e de ti- pos de reação sexual opostos	58
3 - Interações quimiotáticas entre linhagem de <i>E. coli</i> do mesmo tipo de reação sexual e de ti- pos de reação sexual opostos	59
4 - Interações simétricas entre linhagens do mes- mo tipo de reação sexual e interações assimé- tricas entre linhagens de tipos de reação se- xual opostos	60
5 - Interações simétricas entre linhagens de <i>E. coli</i> do mesmo tipo de reação sexual e interações as- simétricas entre linhagens de tipos de reação sexual opostos	61
6 - Interação assimétrica entre <i>E. coli</i> K _{12.1.1} (doa- dora e K _{12.3.1} (receptora)	62
7 - Número de transconjugantes originado dos cruza- mentos entre linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e <i>E. coli</i> K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade, realizados em caldo e meio semi-sólido, sem diluição das cul- turas mistas e diluídas 100 vezes, com uma e 6 horas de incubação.	70
8 - Número de transconjugante originado dos cruza- mentos de linhagens de <i>E. coli</i> BH 100 e <i>E. coli</i> K ₁₂ com (+) e sem (-) motilidade, com uma e 3 horas de incubação.	73

1. RESUMO

Investigou-se a possível presença de quimiotaxia entre linhagens de tipos de reação sexual opostos em *Escherichia coli* isogênicas e não isogênicas, através de vários métodos. Para atingir esse objetivo obtiveram-se mutantes para motilidade e transconjugantes a partir das linhagens básicas *E. coli* K₁₂ 712R e *E. coli* BH 100 portadora de plasmídeo R. Eventualmente usaram-se também as linhagens *E. coli* HfrC e W 1177/6 F⁻.

Pelo uso do método da placa, com meio triptona do semi-sólido, observou-se que as figuras constituídas pela interação dos halos das duas linhagens com tipos de reação sexual opostos eram sempre assimétricas, fossem elas isogênicas ou não isogênicas. Essa assimetria era decorrente da formação de bandas quimiotáticas pelas linhagens doadoras. Verificou-se que essas bandas se dirigiam para os locais de maior concentração das células receptoras. Quando as linhagens possuíam o mesmo tipo de reação sexual as figuras formadas eram simétricas, com ausência de bandas quimiotáticas.

Através do método da conjugação, observou-se correlação positiva entre número de transconjugantes e presença de motilidade das linhagens doadoras, quando as culturas mis

tas continham baixas densidades de células parentais.

Os resultados decorrentes da aplicação de ambos métodos permitem sugerir a presença de uma substância atraente, excretada pelas células receptoras e detectada especificamente pelas células doadoras.

Finalmente, dois outros resultados merecem citação: formação de bandas quimiotáticas só após o encontro dos halos externos das culturas doadoras e receptoras, nos experimentos de interação; e ausência de resposta quimiotática quando se usaram filtrados livres de células das culturas doadoras e receptoras. Esses dados parecem indicar a presença de um possível mecanismo indutivo para produção dessa substância atraente.

"Of all the attributes of living things the one that most fascinates me is the ability of organisms to detect a stimulus and respond to it by moving" (ADLER, 1975a).

2. INTRODUÇÃO

A comunicação por estímulo químico é de fundamental importância no mundo biológico e para alguns autores representa um dos atributos essenciais da própria vida. Na evolução os comunicadores químicos foram provavelmente os precursores dos hormônios. Comunicação através de substâncias químicas excretadas é bem conhecida em grande variedade de organismos. Essas substâncias detectadas em concentrações diminutas têm um efeito controlador sobre a comunidade ecológica, podendo estimular grande número de respostas comportamentais incluindo, entre outras, o sexualismo, a alimentação, o alarme, a agregação e interações predador-presa.

A quimiotaxia em microrganismos, isto é, o movimento contra ou a favor de uma determinada substância, foi descoberta há quase um século atrás. O assunto foi ativamen-

te estudado por algum tempo, passando depois por um período em que poucos trabalhos são encontrados na literatura. Atualmente, essa área da pesquisa está novamente em franca atividade devido principalmente ao desenvolvimento de novas técnicas e adaptações daquelas já existentes; o desenvolvimento da metodologia, usando técnica quantitativa, foi um importante passo para a reativação desse campo.

Com o uso de metodologia adequada muitas questões poderão agora ser resolvidas. Por exemplo, a conjugação bacteriana tem quase todas as suas fases bem estudadas, inclusive sob o aspecto molecular mas, contraditoriamente, continua obscuro se o encontro entre bactérias de tipos de reações sexuais opostos é ao acaso ou se algum mecanismo de atração está envolvido. A natureza, como se sabe, seleciona sistemas essencialmente econômicos e a comunicação através de substâncias aumentaria sobremaneira a frequência do encontro entre essas células. Entretanto há grande escassez de dados e limitadas evidências para tais substâncias atraentes em bactérias.

Levando em consideração os dados acima mencionados, e a importância e "atração" desse campo de pesquisa, decidiu-se desenvolver o presente trabalho. Para sua realização os materiais escolhidos foram a *Escherichia coli*, por ser um dos organismos bem caracterizados sob quase todos os aspectos, e o plasmídeo R pela sua manifestação fenotípica imediatamente após sua transferência para células receptoras.

O objetivo principal desta pesquisa foi investigar a presença de atração (quimiotaxia) em linhagens de *Escherichia coli* portadoras de plasmídeo conjugativo R, ou eventualmente F, frente a linhagens com tipo de reação sexual oposto. Para tanto houve necessidade de obtenção de linhagens adequadas, desenvolvimento e adaptação da metodologia.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Considerações gerais

A comunicação através de substâncias é conhecida em grande número de organismos, desde os mais simples até os mais complexos da escala evolutiva (LAW e REGNIER, 1971; ADLER, 1975 b; CHET e MITCHELL, 1976; SHORER, 1976; KOGAN, 1977; BONNER, 1977). Os feromônios e alemônios são substâncias excretadas que desempenham função importante no controle das comunidades ecológicas (CHET e MITCHELL, 1976; SHORER, 1976; PASTEELS, 1977). Enquanto o papel dos feromônios sexuais está bem estabelecido nos cruzamentos de muitos organismos (RAWITSCHER-KUNKEL e MACHLIS, 1962; MACHLIS, 1966; LAW e REGNIER, 1971; HOUILLON, 1972; SHORER, 1976; KOGAN, 1977; CRANDAL e col., 1977) eles são praticamente desconhecidos entre as bactérias (SAUNDERS, 1978). Assim, apesar do fenômeno da conjugação bacteriana ter sido descoberto há mais de trinta anos (LEDERBERG e TATUM, 1946) e ser bem estudado (HAYES, 1968; CURTISS III, 1969; WATANABE, 1971; SANDERSON, 1974; ACHTMAN, 1975; BACHMANN e col., 1976; MITSUHASHI e col., 1976; ECKERSON e REYNARD, 1977) não está decidido se o encontro entre células de tipos de reação sexual ("mating types") opostos é ao acaso (NELSON, 1951; HAYES, 1957) ou se há interferência de alguma substância atraente (BEZDEK e SOSKA, 1972).

Como o presente trabalho envolverá o conhecimento e metodologia empregados nos estudos da quimiotaxia e da conjugação bacteriana esses serão os próximos temas desta revisão. Dar-se-á ênfase, obviamente, aos trabalhos realizados com *Escherichia coli*.

3.2. Quimiotaxia em bactérias

Quimiotaxia é o movimento de organismos a favor ou contra uma substância (química). Este fenômeno tem sido observado em grande variedade de microrganismos, plantas e animais (ADLER, 1966a). A quimiotaxia em bactérias foi descoberta por ENGELMANN (1881) e PFEFFER (1888).

3.2.1. Materiais e métodos em quimiotaxia

Os seguintes gêneros bacterianos já foram estudados quanto à quimiotaxia: *Aerobacter*, *Bacillus*, *Beggiotoa*, *Bordetella*, *Chromatium*, *Clostridium*, ~~*Corynebacterium*~~, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Leptospira*, *Micrococcus*, *Pasteurella*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Rhizobium*, *Rhodospirillum*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Spirillum* e *Vibrio* (WEIBULL, 1960). Além desses, outros gêneros devem ser acrescentados como: *Bdellovibrio* (STARR e SEIDLER, 1971), *Bdellomonas* (CHET e MITCHELL, 1976) e *Spirochaeta* (GREEMBERG e CANALE-PAROLA, 1977).

Até 1965 os experimentos de quimiotaxia foram realizados em meios complexos. Portanto, foi necessário o desenvolvimento de condições para obtenção de motilidade e quimiotaxia em meio definido (ADLER, 1966a, ADLER e TEMPLETON, 1967; ADLER, 1973) e o estabelecimento de método quantitativo para o estudo da quimiotaxia (ADLER, 1969; ADLER, 1973). Um

meio simples e quimicamente definido e as condições ótimas para obtenção de motilidade foram determinados por *ADLER (1966a)* e *ADLER e TEMPLETON (1967)*: um agente quelante (EDTA ácido) para proteger contra inibição por traços de cátions de metais pesados; um tampão para manter os valores de pH entre 6,0 e 7,5; uma fonte de energia para estimular a motilidade; oxigênio ou pelo menos uma fonte que produza energia anaerobicamente; uma temperatura entre 25 e 37°C. O crescimento acima de 37°C ou na presença de glicose, como única fonte de energia, previne a síntese de flagelo. As condições para o estudo de quimiotaxia em *E. coli* descritas por *ADLER (1966a, 1973)* são na essência as mesmas já determinadas para motilidade, com a adição de L-metionina, se a linhagem for incapaz de sintetizá-la, e fixação da temperatura entre 20 e 30°C; com o uso dessa temperatura o número de bactérias que penetra em um tubo capilar com atraente é cerca de vinte vezes maior. Conforme as condições do experimento não é necessário adicionar qualquer fonte de energia, pois o endógeno fornece energia suficiente para a quimiotaxia.

Os métodos principais para o estudo de quimiotaxia são:

a) Método da placa - Para a pesquisa da quimiotaxia positiva a bactéria é inoculada no centro de uma placa contendo ágar mole (0,2 a 0,3%), o atraente metabolizável e sais necessários ao crescimento. Quando a bactéria cresce, consome o suprimento local do atraente e cria um gradiente que ela segue, formando um halo de crescimento em torno do inóculo (*ADLER, 1966a*). Para a pesquisa da quimiotaxia negativa, distribuem-se blocos de ágar contendo repelentes em Placa de Petri com ágar mole (0,2 a 0,3%). Esta já deve conter concentrações bacteriana suficiente para apresentar turvação. As bactérias afastam-se logo da área onde se encontra o repelen-

te, formando halos (*TSO e ADLER, 1974*). Os blocos de ágar podem ser substituídos por outro tipo de inoculação (*ADLER, 1975a*). A pesquisa das áreas da placa percorridas pela bactéria selvagem, durante a formação de halos, permite a obtenção de mutantes tanto para quimiotaxia positiva como negativa. No método da placa é a bactéria que cria o gradiente do atraente ou repelente; entretanto, o método não permite estudar a quimiotaxia de materiais não metabolizáveis.

b) Método do capilar - Foi usado por *PFEFFER (1888)* para observar quimiotaxia; inseria um capilar contendo a solução em estudo em uma suspensão bacteriana observando a seguir microscopicamente a acumulação bacteriana na boca e dentro do capilar (quimiotaxia positiva) ou movimento bacteriano contra o capilar (quimiotaxia negativa). *ADLER (1969 e 1973)* modificou esse método convertendo-o em um método quantitativo para estudo da quimiotaxia positiva. Isso foi possível pela sementeira de diluições convenientes da suspensão bacteriana contida no capilar e posterior contagem das colônias. *TSO e ADLER (1974)* observaram, comparando com um controle, que o repelente colocado dentro do capilar faz decrescer o número de células que entraria. Uma modificação foi realizada por *TSO e ADLER (1974)*: eles colocaram os repelentes na suspensão bacteriana e mediram o número de bactérias que entraram no capilar para se refugiar. No método do capilar o experimentador é que cria o gradiente do atraente ou repelente. Assim, substâncias não metabolizáveis também podem ser estudadas.

c) Método do gradiente definido - A análise quantitativa de migração bacteriana tem sido efetuada tomando gradiente definido de atraentes (*DAHLQUIST e col., 1972*) ou repelentes (*TSANG e col., 1973*). A determinação bacteriana no gradiente é efetuada pela medida da dispersão de um feixe de "laser" feita pela bactéria.

d) Método do "Coulter counter" - É um método rápido para estudar quimiotaxia positiva e negativa, usando um contador "Coulter" para medir a porcentagem de bactérias, que passa através de uma membrana de polycarbonato, em dado tempo, para um tampão, sob influência quimiotática. O meio usado foi o tampão fosfato 0,01 M pH 7,0 contendo 0,1 mM de EDTA (ADLER, 1973). O sistema formado por suspensão bacteriana de um lado e tampão fosfato do outro lado da membrana, foi incubado a 30°C. Retiraram-se amostras após 60 minutos para contagem das células (ARMITAGE e col., 1977).

3.2.2. Quimiotaxia positiva: os atraentes

As bactérias móveis são atraídas por uma variedade de substâncias químicas, a maioria das quais funciona também como nutriente. Entretanto, não há correlação entre o metabolismo de uma substância, liberação de sua energia, com habilidade para atrair bactéria (WEIBULL, 1960). Algumas substâncias como o glicerol, gluconato, fumarato e piruvato, que são metabolizadas pela *E. coli* não são atraentes, enquanto outras não metabolizáveis o são. Assim, mutante que perde a capacidade para metabolizar um atraente, como a galactose, continua sendo atraído por ele. Alguns análogos não metabolizáveis de substâncias metabolizáveis atraem bactéria, como é o caso de D-fucose um análogo da galactose (ADLER, 1969). Pelo menos dois análogos de aminoácidos essencialmente não oxidáveis, α -amino-isobutirato e α -metil-aspartato atraem *E. coli* (MESIBOV e ADLER, 1972).

A seguir serão mencionados alguns grupos de substâncias que funcionam como atraentes, dando-se ênfase aos trabalhos realizados com *E. coli*:

a) Aminoácidos e seus derivados

Os resultados obtidos por *ADLER (1966b)* e *MESIBOV e ADLER (1972)* mostram que as células de *E. coli* são atraídas pelos L-aminoácidos alanina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glicina, metionina, serina, treonina e prolina. Não são atraentes os aminoácidos arginina, cistina, glutamina, histidina, leucina, isoleucina, lisina, fenilalanina, triptofano, tirosina e valina. *ASWAD e KOSHLAND (1974)*, *SPRINGER e col. (1975)*, *SPRINGER e col. (1977)* confirmaram o importante papel da metionina na quimiotaxia bacteriana. O papel bioquímico principal da metionina na quimiotaxia é doar radicais metil. Ela é requerida para a cambalhota ("tumbling") e para o processamento de informações sensoriais (*SPRINGER e col., 1975*). Segundo *MESIBOV e ADLER (1972)* existem pelo menos dois quimiorreceptores para os aminoácidos atraentes em *E. coli*: quimiorreceptores de aspartato e da serina.

b) Açúcares

Vários açúcares e seus derivados foram ensaiados quantitativamente para a habilidade de atrair *E. coli* (*ADLER e col., 1973*; *ADLER e EPSTEIN, 1974*). Os atraentes mais efetivos foram: N-acetil-D-glucosamina, 6-deóxi-D-glucose, D-frutose, D-glicose, 1-D-glicerol, B-D-galactoside, galactitol, D-galactose, D-glucosamina, D-glucose, 1-D-glucose-1-fosfato, lactose, maltose, D-manitol, D-manose, metil-B-D-galactoside, D-ribose, D-sorbitol e trealose. A lactose e provavelmente a D-glucose-1-fosfato são atraentes somente após a conversão em monossacarídeos livres, enquanto os outros açúcares não requerem quebra para a taxia. Segundo os dados de *ADLER e col. (1973)*, *ADLER e EPSTEIN (1974)* e *ADLER (1975b)* dez diferentes quimiorreceptores estão envolvidos na detecção desses atraentes em *E. coli*.

c) Sais inorgânicos, nucleotídeos e vitaminas

Respostas positivas para íons inorgânicos foram obtidas por *PFEFFER (1904)*, entre outros. Este autor observou que sais de potássio foram, na maioria das vezes, efetivos para estimular quimiotaxia positiva em *Spirillum*. Entretanto, quando as concentrações dos sais foram aumentadas observaram-se respostas negativas. Segundo *ADLER (1975b)* outros íons inorgânicos mostraram-se atraentes para *E. coli*.

Ensaio com misturas não específicas tais como extrato de levedura e caldo nutriente evidenciaram atração bacteriana (*STRALEY e CONTI, 1974; CHET e MITCHELL, 1976*): junto aos componentes do extrato observou-se que *P. lachrymans* foi atraído não somente pelos açúcares e aminoácidos, mas também pelos nucleotídeos de adenina, guanina, timina, citosina e uracil e pelas vitaminas biotina e tiamina. Além disso, *CHET e MITCHELL (1976)* citam que suspensões de *Rhodospirillum rubrum* exibiram quimiotaxia positiva para compostos sulfidrílicos, ATP e ADP, ilustrando o grande espectro de compostos atraentes em bactéria.

d) Oxigênio

A resposta bacteriana ao oxigênio é geralmente chamada aerotaxia (*WEIBULL, 1960*). *ENGELMANN (1881)* descreveu aglomeração de *Spirillum* próximas a bolhas de ar e *BEIJERINCK (1893)* demonstrou quimiotaxia para oxigênio ao observar que bactérias móveis colocadas no fundo de um tubo com água formavam bandas visíveis em direção ao menisco. Sugeriram que as bactérias procuram certas concentrações ótimas de oxigênio. *SHERRIS e col. (1957)*, usando tubos capilares confirmaram e estenderam esses resultados. *ADLER (1966b)* demonstrou que *E. coli* colocada no fundo de um tubo capilar contendo uma fonte de energia e oxigênio, migrava formando uma ou

duas bandas. Parece que a bactéria se desloca preferencialmente na direção da maior concentração de oxigênio. Outros trabalhos evidenciaram o papel do oxigênio na quimiotaxia, *LARSEN e col. (1974)* observaram que um intermediário da fosforilação oxidativa é a fonte de energia para a motilidade ao invés do ATP diretamente. Há entretanto um requisito adicional para a quimiotaxia que é presumivelmente o ATP.

3.2.3. Quimiotaxia negativa: os repelentes

Na quimiotaxia negativa as bactérias movimentam-se contra a fonte da substância química. Neste caso a substância possui uma ação repelente (*WEIBULL, 1960*). Esse fenômeno vem sendo estudado desde os trabalhos pioneiros de *ENGELMANN (1881)* e *PFEFFER (1888)* que observaram movimento contra grandes concentrações de oxigênio e contra alcalis e ácidos, respectivamente. Muitos autores exploraram o assunto usando grande variedade de bactérias e de substâncias (*CHET e MITCHEEL, 1976*). Entre eles *MACNAB e KOSHLAND (1972)* confirmaram a observação de *LEDERBERG (1956)* de que o fenol funciona como repelente para *Salmonella typhimurium*. *SEYMOUR e DOETSH (1973)* trabalhando com dez tipos de bactérias e diversos compostos inorgânicos confirmaram suas observações iniciais de que o comportamento quimiotático negativo era uniformemente exibido contra estímulos ácidos (pH 1,0 - 3,0) e básicos (pH 10,0 - 12,0). Sugeriram que o papel biológico da quimiotaxia negativa está relacionada com sobrevivência, porquanto a resposta positiva em alguns casos para diversos agentes, pode ser eventual. Em *E. coli*, *TSO e ADLER (1974)* detectaram muitos repelentes incluindo ácidos graxos e seus análogos, alcoois alifáticos, aminoácidos e seus análogos, indol, compostos aromáticos e íons inorgânicos. Esse estudo revela que embora a maioria dos repelentes tenha ação tóxica esta "propriedade" não é necessária nem suficiente para causar respos-

ta negativa. Os repelentes podem ser agrupados em nove classes e os autores sugerem que cada uma corresponde a um quimiorreceptor.

3.2.4. Mutantes não-quimiotáticos

A partir de bactérias que apresentam quimiotaxia positiva ou negativa podem-se obter mutantes não quimiotáticos. Usando placas com meio de triptona semi-sólido *ARMSTRONG e col. (1967)* isolaram 40 mutantes não quimiotáticos de *E. coli*. Todos eles possuíam flagelos normais como foi visto através de observação microscópica e pela sensibilidade ao fago chi. Um dos mutantes estudados com detalhe perdeu a quimiotaxia para oxigênio, glicose, serina, treonina e ácido aspártico. Como foi observado a ausência de quimiotaxia não resultou da falha no uso das substâncias. Posteriormente, *HAZELBAUER e col. (1969)* ampliaram os estudos sobre a obtenção desses mutantes com o intuito de conseguirem mutantes defectivos em suas respostas para alguns atraentes mas não para todos. Esses mutantes "não-quimiotáticos-específicos" perdem a habilidade de serem atraídos ou repelidos por uma determinada substância ou por um grupo de substâncias proximamente relacionadas enquanto retêm a capacidade de serem atraídos ou repelidos por todos os outros atraentes. Por outro lado, como afirma *ADLER (1975b)*, os mutantes "não-quimiotáticos-generalizados", como os obtidos por *ARMSTRONG e col. (1967)*, falham em ser atraídos ou repelidos simultaneamente por todos os atraentes ou repelentes. *COLLINS e STOCHER (1976)* também obtiveram mutantes "não-quimiotáticos-generalizados" em *Salmonella typhimurium*. Com a descoberta dos mutantes "não-quimiotáticos-específicos" criaram-se as condições para a pesquisa da presença e funcionamento dos quimiorreceptores bacterianos.

3.2.5. Quimiotaxia nas interações bacterianas

O comportamento de espécies de microrganismos que vivem juntos em um ecossistema constitui uma comunidade. A estrutura das comunidades microbianas depende de uma grande diversidade bioquímica e é mantida por uma complexa série de interações (CHET e MITCHELL, 1976).

Para se ter uma idéia da complexidade dessas interações basta lembrar que o corpo humano adulto possui um total de aproximadamente 10^{14} células, sendo que 90% delas constituem-se de microrganismos procariotos e eucariotos. A maioria desses microrganismos compõe o ecossistema gastrointestinal (SAVAGE, 1977).

Em algumas interações, nas quais as bactérias estão envolvidas, a quimiotaxia exerce importante função; por exemplo, o relacionamento predador-presa entre microrganismos tem sido associado com a ação de enzimas produzidas pelo predador e responsáveis pela destruição da presa (MITCHELL, 1971). Agora foi evidenciado que, em adição à propriedade de degradar a presa, algumas bactérias predadoras são atraídas pela própria presa. No habitat natural onde as presas são escasas esta capacidade da bactéria predadora de se orientar em relação à presa poderia oferecer a ela vantagem seletiva (CHET e MITCHELL, 1976). Esse tipo de atuação foi verificado em *Pseudomonas* predadoras do fungo *Pythium debaryanum* (CHET e col., 1971), em *Bdellovibrio*, parasita obrigatório ou facultativo de leveduras (STRALEY e CONTI, 1974) e em outras bactérias.

Respostas quimiotáticas de bactérias fitopatogênicas foram reportadas por CHET e col. (1973). Segundo CHET e MITCHELL (1976) a interação simbiótica do *Rhizobium* com as leguminosas parece depender de quimiotaxia, isto é, da atra-

ção da bactéria por nutrientes ou por fatores desconhecidos da rizosfera. O papel da quimiotaxia nas relações simbióticas entre *Rhizobium* e leguminosas, bem como em outros sistemas simbióticos, deve ser importante e específico, mas infelizmente poucos dados são disponíveis. Outras interações são citadas por CHET e MITCHELL (1976).

3.2.6. Quimiotaxia determinada pelo sexo

BEZDEK e SOSKA (1972) usaram diversas linhagens de *Salmonella typhimurium* Hfr e F⁻ para investigar a possível atração quimiotática entre elas. Observaram que linhagens Hfr e F⁻ comportaram-se diferentemente quando inoculadas em dois pontos sobre meio semi-sólido. Células Hfr moveram-se rapidamente até formarem uma banda que caminhou preferencialmente para o local em que as células F⁻ estavam concentradas. Os autores sugerem que as linhagens F⁻ produzem uma substância sexo-atraente que pode ser utilizada especificamente pelas linhagens Hfr e que não é reconhecida por células do mesmo tipo de reação sexual. Segundo eles esse mecanismo de quimiotaxia aumenta a possibilidade de contato entre células de tipos sexuais opostos.

DUNNY e col. (1978) apresentaram evidência da presença de um feromônio sexual em *Streptococcus faecalis*; células portadoras de plasmídios conjugativos aglutinaram-se na presença de substância produzida pelas linhagens receptoras. O fenômeno relatado não deve ser considerado como quimiotaxia propriamente dita, uma vez que as células envolvidas eram imóveis.

3.2.7. Quimiossensores: os quimiorreceptores

Quimiorreceptor pode ser definido como a parte do quimiossensor que recebe a mensagem do agente químico; portanto é um componente que reconhece ou se liga à substância atraente ou repelente. O quimiossensor possui um componente adicional que pode ser chamado de mensageiro, isto é, que transmite ao flagelo as alterações havidas no quimiorreceptor ocupado pelo agente químico. Até 1969 não era conhecido se a bactéria detectava o atraente em si ou um produto de seu metabolismo, como o ATP, por exemplo. A primeira hipótese foi confirmada e a segunda rejeitada conforme os seguintes dados (ADLER, 1975b): algumas substâncias extremamente metabolizáveis não são atraentes; algumas substâncias essencialmente não metabolizáveis atraem bactérias, como é o caso dos análogos não metabolizáveis de atraentes metabolizáveis e dos mutantes que não metabolizam um atraente mas continuam sendo atraídos por ele; a substância atrai a bactéria mesmo na presença de uma substância não metabolizável não atraente; atraentes, intimamente relacionados em estruturas, competem entre si mas não com os atraentes estruturalmente não relacionados; podem ser isolados mutantes sem mecanismo de detecção possuindo, entre tanto, metabolismo normal; o transporte de uma substância química dentro da célula não é suficiente nem necessário para que funcione como um atraente.

Atualmente é conhecido um grande número de quimiossensores em *E. coli*, tanto para quimiotaxia positiva como negativa. Os seguintes critérios foram usados para dividir as substâncias químicas em classes de quimiossensores:

1) para cada quimiossensor foram isolados "mutantes não-quimiotáticos-específicos", isto é, sem a taxia correspondente (ADLER, 1969; HAZELBAUER e col., 1969; TSO e

ADLER, 1974; ADLER e EPSTEIN, 1974).

2) Em experimentos de competição, a substância A presente em concentração suficiente para saturar seu quimiorreceptor, bloqueará completamente a resposta para substância B se as duas forem detectadas pelo mesmo receptor. Não haverá bloqueio se A e B forem detectadas por diferentes receptores (ADLER, 1969; MESIBOV e ADLER, 1972; TSANG e col., 1973; AKSAMIT e KOSHLAND, 1974; TSO e ADLER, 1974).

3) muitos dos quimiossensores são induzíveis, sendo cada um induzido particularmente pela substância que ele detecta (ADLER, 1969; ADLER e col., 1973).

Com o uso dos critérios mencionados foram identificados diversos quimiossensores para quimiotaxia positiva e negativa em *E. coli*. Pelo menos dois sistemas de quimiossensores estão envolvidos na quimiotaxia dos aminoácidos atraentes; quimiossensores do aspartato e da serina. O mutante para taxia do aspartato tem seu quimiossensor não funcional para a detecção do aspartato, glutamato e metionina, e apresenta função reduzida para alanina, asparagina, cisteína, glicina e serina. O mutante para taxia da serina possui quimiossensor defectivo para serina, alanina, asparagina, cisteína e glicina, e não apresenta nenhuma taxia para a treonina (ADLER, 1969; MESIBOV e ADLER, 1972; ADLER, 1975b).

Diversos quimiossensores estão envolvidos na detecção dos vários açúcares atraentes: N-acetil-glicosamina, frutose, galactose (detecta D-galactose, D-glicose e D-fucose), glucose, manose (detecta D-glucose e D-manose), maltose, manitol, ribose, sorbitol e trealose. Todos esses quimiossensores são induzíveis, com exceção dos quimiossensores da glucose (ADLER e col., 1973; ADLER e EPSTEIN, 1974; ADLER, 1975b). Em adição a esses foram descritos os quimiossensores do ga-

lactitol e glucitol (PARKINSON, 1977).

Para quimiotaxia negativa são se seguintes os quimiossensores identificados em *E. coli* (TSO e ADLER, 1974; ADLER, 1975b): quimiossensores dos ácidos graxos, álcoois, aminoácidos hidrofóbicos, indol, compostos aromáticos, H^+ , OH^- , sulfetos e cátions metálicos.

A natureza dos quimiossensores tem sido estudada através da combinação de técnicas bioquímicas e genéticas. Assim, componentes protéicos foram identificados em alguns quimiossensores. Supõe-se que cada quimiossensor possui uma proteína que reconhece a substância atraente ou repelente. Esta proteína, localizada no envelope celular, constitui o "quimiorreceptor" (ou receptor), também chamado "componente reconhecedor" ou "proteína de ligação" (ADLER, 1975b). Todas as proteínas quimiorreceptoras identificadas até agora correspondem às proteínas de ligação do sistema de transporte. Todavia, os sistemas de transporte e de quimiotaxia seguem vias diferentes a partir desse ponto comum que é a proteína de ligação; existem mutantes que possuindo proteína de ligação para determinada substância exibem quimiotaxia para essa substância, mas não transporte. Em tais mutantes falta, provavelmente, algum componente requerido pela via dos transportes. Em adição foram obtidos mutantes que exibem transporte mas não quimiotaxia para certas substâncias. Nesse caso é na via quimiotáctica que falta algum componente (ADLER, 1975a).

A primeira proteína que evidenciou função quimiorreceptora foi a proteína de ligação da galactose (HAZELBAUER e ADLER, 1971; KALCKAR, 1971; ORDAL e ADLER, 1974; ADLER, 1975b). As outras proteínas de ligação que funcionam como quimiorreceptoras são: as proteínas de ligação da glucose (o símbolo gênico é *pts G*), manose (*pts M*), galactitol (*gat A*), frutose (*pts F*), glucitol (*gut A*), manitol (*mtl A*), ribose (*rbs P*)

e maltose (*mal E*) (*PARKINSON, 1977*). As posições relativas desses genes podem ser observadas no mapa recalibrado de *E. coli* K₁₂ (*BACHMANN e col., 1976*).

Não há nenhuma informação genética ou bioquímica sobre receptores para aminoácidos e repelentes em *E. coli* (*PARKINSON, 1977*).

3.2.8. Transmissão da informação dos quimiossensores para os flagelos: os mensageiros

De algum modo o quimiorreceptor deve transmitir aos flagelos as variações detectadas nas concentrações das substâncias atraentes ou repelentes. Embora a forma desta comunicação seja desconhecida essa transmissão parece ser mediada por uma rede de elementos informadores ou mensageiros. Os três tipos conhecidos de mutantes mensageiros *trg*, *tar* e *tsr* possuem motilidade normal, mas carecem de respostas para dois em três receptores (*PARKINSON, 1977*). Entretanto *ADLER (1975b)* baseado em trabalhos anteriores (*ADLER, 1969; MACNAB e KOSHLAND, 1972*) propõe as três seguintes possibilidades: despolarização da membrana citoplasmática, difusão de um mensageiro químico para a base dos flagelos e interação direta proteína-proteína. ~~A despolarização da membrana citoplasmática,~~ ocorreria como nos fenômenos de transmissão ao longo dos axônios das células nervosas. Conforme citação de *FRÈRE (1977)* é reconhecida uma fase de hiperpolarização da membrana citoplasmática (com duração de cerca de 15 segundos) após adição de uma substância atrativa. A presença da metionina é necessária para obtenção dessa fase. As substâncias repelentes provocam o aparecimento de uma hiperpolarização de mais longa duração. Essa alteração se propagaria ao longo da membrana celular em direção à base do flagelo. A causa da mudança no potencial da membrana seria uma variação na taxa de entrada e saída de al-

gum íon quando há modificação na concentração dos atraentes ou repelentes. Pela hipótese da difusão de um mensageiro considera-se que seu nível aumentaria ou decresceria através da ação de substâncias atraentes ou repelentes. Cálculos indicam que a difusão de uma substância de baixo peso molecular é muito lenta para explicar a reversão sincrônica do flagelo nas duas extremidades de *Spirillum volutans* que ocorre como resposta ao estímulo quimiotático (TAYLOR e KOSKLAND, 1974). Assim, pelo menos para esse organismo uma mudança no potencial da membrana parece ser o mecanismo mais provável entre os dois citados. Pela hipótese da interação direta proteína-proteína, a comunicação entre quimiorreceptores e flagelos seria muito simplificada. Embora as proteínas de ligação dos quimiossensores estejam provavelmente distribuídas uniformemente em torno da célula, devido à sua coparticipação no sistema de transporte, é possível que apenas aquelas moléculas situadas na base dos flagelos sirvam como quimiorreceptores.

3.2.9. Resposta flagelar aos estímulos quimiotáticos

A *E. coli* com motilidade desloca-se através de rotação dos filamentos flagelares (BERG e ANDERSON, 1973; SILVERMAN e SIMON, 1974). Para uma revisão sobre flagelos consultar SILVERMAN e SIMON, (1977.). Eles giram em dois sentidos (SILVERMAN e SIMON, 1974; BERG, 1974); no sentido anti-horário produzem deslocamento retilíneo; no sentido horário causam movimento em cambalhota (LARSEN e col., 1974), que permite à célula mudar a direção do deslocamento.

Na ausência de estímulos ou em concentrações uniformes e constantes de atraentes ou repelentes (ausência de gradiente), a *E. coli* selvagem reverte ao acaso o sentido da rotação flagelar (BERG, 1975; BERG e TEDESCO, 1975). Em con

sequência a bactéria move-se ao acaso, em um percurso tridimensional, alterando fase de deslocamento retilíneo ("run") com fase de cambalhota ("tumble") (BERG e BROWN, 1972). Segundo ADLER (1975a) a fase de deslocamento retilíneo dura cerca de um segundo e a fase de cambalhota um décimo de segundo. Por outro lado, as células bacterianas dão menos cambalhotas, e o deslocamento retilíneo torna-se maior quando elas são submetidas a concentrações crescentes de atraentes (BERG e BROWN, 1972; MACNAB e KOSHLAND, 1972) e mais cambalhotas, quando submetidas a concentrações decrescentes de atraente (MACNAB e KOSHLAND, 1972). O contrário acontece com os repelentes (TSANG e col., 1973). São necessárias menores variações nas concentrações de atraentes e repelentes para suprimirem as cambalhotas do que para estimulá-las (BERG e BROWN, 1972; ADLER, 1975b).

A *E. coli* é capaz de detectar tanto gradiente espacial (maior concentração a esquerda do que a direita, por exemplo) como gradiente temporal (maior concentração agora do que inicialmente, por exemplo). Esta interessante descoberta foi feita por MACNAB e KOSHLAND (1972), para os estímulos atraentes e por TSANG e col. (1973), para os repelentes.

Portanto, o controle da rotação flagelar nas respostas aos estímulos atraentes e repelentes é a base do comportamento quimiotático em *E. coli* (PARKINSON, 1977).

A maquinaria responsável pela resposta flagelar aos estímulos quimiotáticos pode ser operacionalmente dividida em três partes: rotor, interruptor e controle (PARKINSON, 1977).

O rotor é o responsável pela rotação flagelar. Os componentes importantes desse rotor estão provavelmente localizados no corpo basal do flagelo, uma complexa estrutura inserida na parede e membrana celular. Outros componentes do

corpo basal podem ser responsáveis pela determinação do sentido da rotação flagelar e podem funcionar como interruptor flagelar. O interruptor, por sua vez deve estar associado com elementos de controle que modulam a atividade do interruptor em resposta ao impulso quimiotático (PARKINSON, 1977).

A genética da estrutura e função flagelares foi revisada recentemente por SILVERMAN e SIMON (1977) e IINO (1977). Muitos genes estão envolvidos, a maioria dos quais produz mutantes, com fenótipo não flagelar (Fla^-). Mutantes [Met^-] possuem flagelos aparentemente normais, mas não funcionais. Mutantes "não-quimiotáticos-generalizados" (Che^-) são móveis mas não apresentam quimiotaxia para qualquer estímulo (ARMSTRONG e ADLER, 1967). Alguns mutantes desse tipo apresentam defeitos flagelares específicos que interferem com o comportamento rotatório normal (SILVERMAN e SIMON, 1973; WARRICK e col., 1977). Alguns mutantes [Che^-] não dão cambalhotas ("tumble") enquanto outros dão cambalhotas intensamente (PARKINSON, 1976). Nenhuma linhagem [Che^-] mostrou deslocamento normal indicando que todas as funções relacionadas com [Che^-] devem, de alguma forma, estar relacionadas com a regulação do comportamento das cambalhotas (PARKINSON, 1977). Através de várias técnicas foram definidos oito genes *che* em *E. coli*: sete deles estão mapeados na região que contém a maioria dos genes relacionados com motilidade. Um deles (*che D*) é mapeado em região inteiramente diferente (PARKINSON, 1977).

3.3. Conjugação em bactérias

3.3.1. Conceitos gerais

A descoberta da existência de processo sexual de conjugação bacteriana foi feita por LEDERBERG e TATUM (1946). Para isso eles usaram a *E. coli* K₁₂ cujas linhagens apresenta

vam grande variedade de marcadores genéticos para auxotrofia e resistência a inibidores. Num dos experimentos realizados eles misturaram linhagem deficiente para síntese de treonina, leucina e tiamina, além de resistentes a estreptomicina e fago, e obtiveram prototróficos em frequência relativamente alta.

A prova conclusiva de que havia necessidade de contato de célula com célula nesse processo foi apresentada por *DAVIS (1950)*. Ele utilizou um tubo em forma de U com a luz separada em duas metades por um filtro que impedia a passagem de bactérias de um braço para o outro, mas não dos outros componentes das duas culturas. Com isso ele eliminou a possibilidade de estar ocorrendo sintrofismo ou transformação, já conhecida na época (*AVERY e col., 1944*). Esse método mostrou-se também eficiente na caracterização da conjugação, após a descoberta do mecanismo da transdução por *ZINDER e LEDERBERG (1952)*.

Através de cruzamentos recíprocos *HAYES (1952a)* evidenciou a existência de diferenciação sexual entre as bactérias, ao constatar que a transferência do material genético ocorria em apenas um sentido. Ficou então definido que pelo menos em *E. coli* K₁₂ existiam dois tipos de reação sexual ("mating types"): F⁺ ou doador e F⁻ ou receptor de material genético. Logo após *HAYES (1953a)* sugeriu a existência de um vetor infeccioso que determinava o caráter F⁺ e que estava ausente nas células F⁻. Esta sugestão fundamentou-se na observação de que células irradiadas com luz ultra-violeta eram mais férteis, fato muito semelhante aos descritos anteriormente onde bactérias portadoras de bacteriófagos em estado latente libertavam grande quantidade desses fagos após indução com a mesma fonte de energia. Foi visto ainda, após uma hora de incubação, que a mistura de células doadoras e receptoras produzia em média apenas um recombinante em um milhão de células,

para os usuais genes cromossômicos, enquanto a maioria das bactérias receptoras convertia-se em doadora (LEDERBERG e col., 1952; HAYES, 1953a; CAVALLI-SFORZA e col., 1953). Concluiu-se portanto que o estado de doador é conferido por um agente chamado F^+ , ou fator sexual, que pode ser normalmente transmitido para a célula receptora independentemente do cromossomo bacteriano. Após a descoberta da existência de linhagens Hfr que apresentavam grande frequência de recombinação (HAYES, 1953b) os experimentos com cruzamentos interrompidos elucidaram o mecanismo da transferência do cromossomo da célula doadora para a receptora (WOLLMAN e JACOB, 1955; WOLLMAN, JACOB e HAYES, 1956; WOLLMAN e JACOB, 1958). Com esses cruzamentos evidenciou-se que no estado Hfr a bactéria possuía o fator F integrado em um determinado ponto do cromossomo. Foi possível também estabelecer geneticamente a circularidade do cromossomo de *E. coli*, uma vez que nas diversas linhagens Hfr os marcadores genéticos eram transferidos de maneira linear. Além desses dois tipos principais de doadores, F^+ e Hfr, ADELBERG e BURNS (1960) descobriram um novo tipo denominado doador intermediário ou F' . Sua origem pode ser explicada através do modelo proposto por CAMPBELL (1962).

Completando essas descobertas iniciais, relacionadas com o fenômeno da conjugação, BRINTON e col., (1964) descreveram certas estruturas existentes na superfície de células doadoras, denominadas F-pili, ou fímbrias sexuais, extremamente importantes na formação dos pares entre células doadoras e receptoras.

Atualmente é conhecido um grande número de plasmídios conjugativos tanto em enterobactérias e outras bactérias GRAM negativas (ANDERSON, 1968; CURTISS III, 1969; NOVICK, 1969; MEYNELL, 1973; SANDERSON, 1974; NOVICK e col., 1976) como em *Streptococcus* (JACOB e HOBBS, 1974; LEBLANC e col., 1978). Além da transferência de material genético, por

conjugação, ocorrer nos cruzamentos de uma mesma espécie é também comum a transferência inter-específica ou mesmo inter-genérica (CURTISS III, 1969; SANDERSON, 1974; WATANABE, 1971; MITSUHASHI e col., 1976). A maioria dos plasmídios conjugativos tem evidenciado a capacidade de transferir, em menor ou maior frequência, o cromossomo para uma célula receptora, mas apenas F, Col B e Col V têm sido encontrados no estado integrado dando linhagens estáveis com transferências cromossômica a partir de pontos iniciais fixos (SANDERSON, 1971). Entretanto um plasmídio R mostrou-se capaz de mobilizar o cromossomo de uma maneira estável, a partir de um ponto original fixo (PEARCE e MEYNELL, 1968). Embora existam evidências de integração os plasmídios R conjugativos são essencialmente autônomos e autotransferíveis (WATANABE e FUKASAWA, 1961; WATANABE, 1971; MITSUHASHI e col., 1976).

Apesar das variações individuais os plasmídios conjugativos comportam-se de uma maneira muito semelhante ao plasmídio F, que é o protótipo dos plasmídios sexuais. Assim, a conjugação promovida pelo plasmídio F em *E. coli*, tanto no estado autônomo como integrado, serve de modelo para a conjugação promovida por outros plasmídios tanto em *E. coli* como em outras bactérias. O processo da conjugação promovida tanto por plasmídios autônomos como integrados pode ser arbitrariamente dividida em estágios. HAYES (1968), considerando o cruzamento entre *E. coli* Hfr e F⁻ divide o processo em dois estágios principais: o primeiro é o estágio da formação do "zigoto", que começa com o contato inicial entre bactérias doadoras e receptoras e termina quando o doador completa a transferência de seu material genético. O segundo é o estágio da formação de recombinante que compreende os processos de recombinação, segregação e expressão de genes do doador, culminando com o aparecimento de uma bactéria recombinante independente. CURTISS III (1969) divi-

diu o processo conjugativo em cinco estágios. Enquanto esse autor não mencionou o estágio de "colisões" no início do processo, *HAYES (1968)* unificou alguns estágios considerados por *CURTISS III (1969)*. A seguir serão relacionados os cinco estágios mencionados por *CURTISS III (1969)*, antecédidos pelo "estágio de colisões" proposto por *HAYES (1968)*:

1) colisão; entre bactérias doadoras e receptoras.

2) formação de par específico; definido pela formação de uniões de células doadoras e receptoras estáveis durante suave diluição, isto é, com o mínimo de agitação da cultura mista.

3) formação de par efetivo; caracterizado pelo estabelecimento de uma conexão celular (tubo ou ponte) entre células doadoras e receptoras.

4) mobilização do cromossomo (ou do plasmídio conjugativo autônomo); definido como a preparação do cromossomo circular do doador (ou do plasmídio conjugativo) para transferência linear. Pode ocorrer durante formação de pares específicos ou efetivos ou após a formação do par efetivo.

5) transferência do cromossomo ou do plasmídio conjugativo.

6) integração; por permutação de partes do cromossomo transferido produzindo os recombinantes genéticos.

Deve ser mencionado que esses estágios podem se sobrepor havendo dificuldades de separá-los experimentalmente (*CURTISS III, 1969*). Levando em consideração os propósitos do presente trabalho, onde será usado fundamentalmente

um plasmídio autotransferível, o plasmídio R, só os três estágios iniciais serão aqui desenvolvidos. Para uma revisão geral sobre conjugação consultar entre outros, *HAYES (1968)*, *CURTISS III (1969)* e *EISENSTARK (1977)*.

3.3.2. Colisão entre células doadoras e receptoras

A colisão entre células doadoras e receptoras é obviamente o primeiro passo do processo conjugativo. Segundo *HAYES (1968)*, o maior número de colisões acontece nos primeiros minutos da mistura em caldo. *NELSON (1951)* e *HAYES (1957a)* chegaram à conclusão que essas colisões ocorrem ao acaso, em função da densidade e, em certas condições do tempo de mistura de bactérias parentais. Ambos autores usaram a frequência de recombinantes como parâmetro para o estudo das colisões entre células parentais. *NELSON (1951)* encontrou proporcionalidade entre frequência de formação de células prototróficas e densidade ou tempo de mistura das linhagens doadoras e receptoras. Entretanto durante as várias repetições do experimento em que ele variou o tempo de mistura foram observados dois fenômenos adicionais: a) após períodos longos de mistura, superiores a 6 horas, a concentração de células prototróficas deixou de aumentar em alguns experimentos. Portanto ocorreu saturação; b) contudo em suspensões menores do que 10^8 bactérias por 20 ml de meio ocorria um período inicial de indução. Segundo *NELSON (1951)* "enquanto não for obtida qualquer evidência direta da existência de inibidores ou estimuladores da singamia, tal como os gamônios da fertilização, sugere-se que o período de indução seja devido à preparação do meio ou à secreção pela bactéria de algum produto antes que a singamia possa ocorrer. Em suspensões mais concentradas uma concentração crítica dessa substância hipotética poderia ser atingida mais rapidamente do que em suspensões diluídas, eli

minando então a fase lag observada. Tais secreções podem atuar facilitando a aglutinação".

HAYES (1957) também desenvolveu experimentos sobre a cinética da conjugação, tratando amostras removidas periodicamente da mistura parental com bacteriófago virulento, para o qual apenas a célula doadora era susceptível. Somente os merozigotos já formados até o momento do tratamento com o bacteriófago poderiam segregar células recombinantes. Uma fase lag de 8 a 10 minutos precedeu o crescimento linear do número de merozigotos quando a relação foi feita para os marcadores T+ L+ do doador. O número de recombinantes tomados em dado tempo foi uma função de duas variáveis independentes: frequência de contato ao acaso e velocidade da transferência do cromossomo, a qual estava relacionada com produção de energia. Alteração na densidade da população parental ou nos valores do pH do meio não afetou o tempo de entrada dos genes de Hfr para células F⁻, mas modificou a taxa de formação de união efetiva.

3.3.3. Formação de pares específicos e pares efetivos

Unões de células doadoras com receptoras foram observadas inicialmente por *LEDERBERG (1956)*, usando microscópio de contraste de fase, e *ANDERSON (1958)*, com microscópio eletrônico. O estudo da formação de pares específicos tornou-se possível pela descoberta de que unões de células doadoras e receptoras resistiam à suaves diluições da suspensão mista (*de (HAAN e GROSS, 1962)*). Assim a cinética da formação da união pôde ser estudada misturando as culturas, removendo amostras em intervalos sucessivos, diluindo-as suavemente em caldo conforme a conveniência, incubando por período de tempo suficiente para a transferência de marcas seletivas e,

finalmente, semeando em placas para obtenção de recombinantes.

O papel das diluições é apenas de separar aquelas células que não estejam estavelmente reunidas e prevenir a ocorrência de posteriores colisões (HAYES, 1968; CURTISS III, 1969).

A formação de pares específicos implica na reunião de bactérias doadoras e receptoras e parece depender da presença de pili sexuais (BRINTON e col., 1964; MEYNELL e col., 1968) de suprimento de energia (CURTISS III e STALLIONS, 1967), de diferenças de carga elétrica na superfície celular (HAYES, 1968) e de outros componentes (KENNEDY e col., 1977).

Observou-se que a frequência de formação de pares específicos correlaciona-se estreitamente com frequência de pili sexuais (WALMSLEY, 1973). Isto foi visto em vários experimentos onde o número de pili foi modificado (FISHER, 1957a e b; BRINTON, 1965; FISHER, 1966; MEYNELL e col., 1968). Essas observações se estendem às linhagens portadoras de fatores Col e R (MEYNELL e col., 1968). Em adição, a mistura de células doadoras com fagos machos-específicos de RNA e DNA que adsorvem, respectivamente, na haste e na extremidade do pilus, reduz a transferência do material genético (NOVOTNY e col., 1968). É conhecido também que a capacidade da célula doadora para conjugar com a receptora é temporariamente abolida pelo tratamento com periodato de sódio (SNEATH e LEDERBERG, 1961). Desde que esse tratamento também inibe adsorção de fagos machos-específicos, pode-se presumir que o periodato atua sobre o pilus sexual (HAYES, 1968). Ainda mais, mutantes do fator sexual que perdem a capacidade de formar pilus tornam-se incapazes de transferir material genético (ACHTMAN e col., 1968). Entretanto, esses mutantes não se transformam em receptores eficientes como acontece com as doadoras que perdem seu fator

sexual.

A formação de par efetivo é definida como o processo através do qual um par específico estabelece uma conexão celular entre célula doadora e receptora de tal modo que a transferência do material genético pode ter início (*CURTISS III, 1969*). *FISHER (1957a e b)* sugeriu que esse processo depende de energia. Embora haja concordância entre os autores quanto a necessidade de pilus sexual para a efetivação da conjugação, seu modo de ação continua desconhecido. *ANDERSON e col. (1958)*, observando bactérias conjugantes ao microscópio eletrônico obtiveram dados que sugeriram que o "tubo de conjugação" era estabelecido após a mistura das células parentais e requeria íntimo contato celular, levando à ruptura parcial da parede e à conexão entre membrana celular das células doadoras e receptoras. *BRINTON (1965)*, após a descoberta dos pili sexuais propôs que essas estruturas possuíam uma dupla função; além de serem requeridos para a formação de pares específicos eles seriam usados como tubos de conjugação, mesmo quando células doadoras e receptoras permaneciam separadas várias micra uma da outra. Essa idéia tem sido apoiada por inúmeros autores mas, o principal argumento que suporta essa teoria é o tamanho da luz dos pili que varia de 20 a 25 Å, mas não foi possível isolar dessa luz qualquer ácido nucléico (*HAYES, 1968; CURTISS III, 1969*). *CURTISS III (1969)* baseando-se nos dados disponíveis propôs um modelo alternativo para o processo: "após formação de pares específicos envolvendo uma interação entre superfície da célula receptora e a extremidade do pilus da célula doadora, o pilus é retraído pela célula doadora com despreendimento de energia, efetivando o contato de parede com parede das células doadoras e receptoras". Entretanto, recentes evidências mostraram que F-pili são necessários apenas nos estágios iniciais da conjugação (*HELMUT e ACHTMAN, 1978*) exercendo pouca ou nenhuma função na transfe-

rência do DNA.

CURTISS III e col., (1969) realizaram experimentos para estabelecer as condições ideais dos eventos iniciais da conjugação. Eles observaram que as células doadoras crescidas anaerobicamente antes do cruzamento apresentavam: a) um grande número de F-pili por célula; b) longos pili; c) grande probabilidade de formarem pares específicos com a receptora; d) maior taxa de iniciação de transferência do cromossomo do que células crescidas aerobicamente. Observaram ainda que um meio rico é superior a um meio completamente sintético. Assim, a inanição das células doadoras em salina tamponada ou meio sem um aminoácido requerido resulta em: a) perda de F-pili; b) perda da capacidade de formarem pares específicos com a receptora e para produzirem recombinantes; c) perda da capacidade de adsorver fago doador-específico; d) em aumento na capacidade receptora. Ambos os processos de inanição constituíram-se em métodos rápidos para a produção de fenocópias F⁻ a partir de cultura doadora. Os autores observaram ainda, que a presença de pilus não era suficiente para caracterizar a capacidade doadora, nem sua ausência dava à célula a propriedade de funcionar como receptora. Os autores sugeriram que outros componentes além do pilus F, seriam necessários para a conversão de pares específicos em pares efetivos (ou mobilização cromossômica). Segundo *HAYES (1968)* "os dados parecem indicar que os fatores F são responsáveis por outras funções de superfície requeridas para a conjugação".

3.3.4. Agregação e exclusão de superfície (ou de entrada)

a) agregação

A constituição de pares de células bacterianas

durante a conjugação foi observada, entre outros, por *LEDERBERG (1956)* e *ANDERSON (1958)*, usando microscópio de fase e eletrônico, respectivamente. *ACHTMAN e col. (1971)*, *OU e ANDERSON (1972)* e *WALMSLEY (1973)* observaram que havia decréscimo do número de partículas nas misturas de células doadoras e receptoras quando ensaiadas em um contador Coulter. *WALMSLEY (1973)* apresentou uma fórmula matemática para esse decréscimo. A fórmula baseou-se na suposição de que todos os agregados eram constituídos por pares de células; o contador Coulter registrava esses pares como se fosse uma partícula. Usando um contador Coulter modificado, com analisador de multicanais, *ACHTMAN (1975)* pode detectar a presença de agregados celulares de diversos tamanhos. Esse autor mostrou que mistura de células doadoras e receptoras de *E. coli* apresentava agregados de duas a 20 células e não apenas pares de células conforme era mencionado na literatura. Na distribuição do tamanho dos agregados foram observados dois picos: um constituído de duas a 4 células e outro de 8 a 13 células. Quando igual número de células doadoras e receptoras foi misturado a maioria dos agregados continha 7 ou mais células com igual proporção de doadoras e receptoras. A eficiência de transferência de DNA foi proporcional ao tamanho dos agregados e à razão das células doadoras e receptoras. Os agregados foram melhor quantificados pelo contador "Coulter" modificado do que pelo uso de microscópio óptico ou centrifugação em gradiente de sacarose. *ECKERSON e REYNARD (1977)* estudaram a formação de agregados em *E. coli* durante a conjugação dirigida por um fator R do tipo "F-line". Os agregados foram medidos pelo número de setores Lac^+ e Lac^- das colônias provenientes da cultura mista. Os autores encontraram grande correlação entre as concentrações de transconjugantes produzidos e a concentração dos agregados observados em diferentes concentrações de células doadoras e receptoras. O decréscimo de agregados e de transconjugantes na cultura mista, em presença do fago doador específico

co MS-2, demonstrou que os agregados são pilus-específicos. Em adição a esses estudos realizados com *E. coli* foi verificado por *DUNNY e col. (1978)* em *Streptococcus faecalis* que uma linhagem receptora produzia um fator, sensível à tripsina e resistente ao calor e nuclease, que causava agregação entre as linhagens portadoras de plasmídios conjugativos. Esse fator recebeu o nome de CIA (Clumping-Inducing-Agent). Foi visto que para ocorrer agregação tinha de haver síntese de proteína e RNA mas não de DNA. Filtrados da receptora induziam a agregação dos doadores em alta frequência. A introdução de um plasmídio conjugativo na linhagem produtora de CIA reduziu, drasticamente, a atividade desse fator nessa linhagem mas permitiu que ela respondesse à CIA adicionada exogenamente. Os autores sugeriram que esse fator representa um feromônio bacteriano.

b) Exclusão de superfície ou de entrada

É conhecido que a presença de um plasmídio em uma célula receptora inibe a conjugação, quando a célula doadora é hospedeira de um plasmídio semelhante ou isogênico (*LEDERBERG e col., 1952*). Este fenômeno foi chamado de exclusão de superfície ou exclusão de entrada (*NOVICK, 1961; NOVICK, 1969; ACHTMAN, 1973*). *COHEN e col. (1968)* mostraram que a presença de F-pili na célula receptora não é a causa da exclusão da superfície. A possível causa desse fenômeno é a falta de agregação entre as células "masculinas" durante a conjugação (*ACHTMAN, 1973*). Portanto, parece possível que a exclusão de superfície resulte da falta de sinal, gerado pelo contato entre doadora e receptora, para a replicação do DNA de transferência (*OU, 1975*). Esse autor trabalhando com *E. coli* e minicélulas obteve as seguintes indicações: 1) o DNA de transferência pode não requerer replicação para ser transferido, confirmando a observação de *SARATHY e SIDDIQI (1973)*; 2) o con

tato de célula com célula é requerido para a geração de um sinal que é o responsável pela replicação do DNA de transferência e sua passagem para a outra célula. As seguintes observações sugerem que o pillus F pode ser o transmissor do referido sinal: DNA foi transferido entre par de células conectadas por uma "linha invisível" presumivelmente um pilus F (*OU e ANDERSON, 1970*); Zn^{2+} inibe a formação de contatos celulares ao atuar sobre a extremidade do pillus F (*OU e ANDERSON, 1972*). Se o sinal for mediado por pillus F parece que existem moléculas na superfície da célula "feminina" requeridas para gerar o sinal (*OU e ANDERSON, 1972*). *OU e REIM (1978)* trabalhando com *E. coli* e minicélulas concluíram que o sítio receptor do pilus F, necessário à produção do sinal para a transferência de DNA, está provavelmente localizado na parede da célula receptora. Resultados semelhantes foram encontrados por outros autores como *SKURRAY e col. (1974)*, *HAVEKES e col. (1976)* e, *SCHWEIZER e HENNING (1977)*.

Por outro lado *ECKERSON e REYNARD (1977)* observaram que durante a exclusão de entrada efetuada pelo fator R isogênico em relação ao fator R superinfectante, o número de transconjugantes foi marcadamente reduzido enquanto o mesmo não ocorreu com os agregados bacterianos. Sugeriram, baseados nesse dado, que a exclusão de entrada inibe a conjugação num estágio posterior à formação dos agregados entre células doadoras e receptoras.

A associação de técnicas genéticas e bioquímicas permitiu um grande avanço no sentido de esclarecer alguns aspectos do processo conjugativo. Assim, foi visto que os genes plasmidiais requeridos para a síntese de pillus F, estabilização de agregados, transferência de DNA e exclusão de superfície estão contidos em uma única e grande unidade de transcrição chamada operon *tra* (*HELMUTH e ACHTMAN, 1975*). Foram definidos geneticamente 13 cistrons. Desses, nove (*tra A, L, E,*

K, B, C, F, M e parte do *tra* G) são necessários para a síntese de pilus F (ACHTMAN e col., 1971; WILLETTS, 1973). A expressão do *tra* G, inteiro, é necessária para que a doadora possa formar agregados estáveis com a receptora (KENNEDY e col., 1977). Três outros cistrons *tra* M, que está fora do operon *tra*, *tra* D *tra* I são requeridos para a transferência do DNA (ACHTMAN e col., 1971; WILLETTS, 1973). Os cistrons *tra* S e *tra* T convertem as células hospedeiras de F em pobres receptoras quando conjugadas com outras células doadoras. Portanto esses cistrons estão envolvidos no fenômeno de exclusão de entrada (ACHTMAN e col., 1977). KENNEDY e col. (1977) usando plasmídios químicos identificaram os produtos protéicos de 12 cistrons *tra* do plasmídio F. Com exceção das proteínas Tra C e Tra D que variaram grandemente, as outras 10 foram estreitamente relacionadas com o envelope celular. MINKLEY Jr. e IPPEN-IHLER (1977) verificaram também a presença da proteína Tra S em preparações da membrana de *E. coli* portadora de plasmídios R ou F.

Conforme observado na literatura grande tem sido o avanço das pesquisas nesse campo e é de se esperar ainda maior progresso tendo em vista os novos recursos da engenharia genética.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Linhagens de *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* foi escolhida para a realização deste trabalho por se constituir num dos organismos mais estudados do mundo biológico. Uma das linhagens essenciais para o desenvolvimento desta pesquisa foi a *E. coli* K₁₂ 712R, bem estudada sob quase todos os aspectos e considerada uma boa receptora de plasmídios. A outra, a *E. coli* BH 100 é uma bactéria selvagem e hospedeira de plasmídio R conjugativo. A partir dessas duas foram derivadas quase todas as linhagens aqui usadas. Essas linhagens, bem como duas outras de *E. coli* K₁₂, estão relacionadas na Tabela 1 onde se discriminaram a origem e o processo de obtenção, além das características essenciais de cada uma. A nomenclatura usada para as linhagens de *E. coli* assim como para resistência a drogas está de acordo com DEMEREC (1966) e NOVICK e col. (1976).

4.1.2. Meios de cultivo

Os seguintes meios, com suas respectivas fórmu

Tabela 1 - Nomenclatura e características das linhagens de *Escherichia coli*.

Linhagem	Características essenciais							Origem
	Plasmí- dio	Resistência a drogas	Motili- dade	Metabo- lismo	Lac	Derivada de	Obtida por	
BH 100	R	KmHgTcCmHe ^{2/}	^{3/} +	^{4/} P	+	Natureza	Coleta	CHARTONE-SOUZA (1975)
BH 100.1	R	KmHgTcCmHe	-	P	+	BH 100	Mutação	Este trabalho
K ₁₂ .712R	^{1/} -	Str	+	A	-	o	o	CHARTONE-SOUZA (1975)
K ₁₂ .1	-	Str	+	A	-	K ₁₂ .712R	Mutação	Este trabalho
K ₁₂ .2	-	Str	-	A	-	K ₁₂ .712R	Mutação	Este trabalho
K ₁₂ .1.1	R	StrKmHgTcCmHe	+	A	-	K ₁₂ .1	Conjugação	Este trabalho
K ₁₂ .2.1	R	StrKmHgTcCmHe	-	A	-	K ₁₂ .2	Conjugação	Este trabalho ^{5/}
K ₁₂ .3.1	-	StrRfm	+	A	-	K ₁₂ .712R	Mutação	Este trabalho
K ₁₂ .3.2	-	StrRfm	-	A	-	K ₁₂ .3	Mutação	Este trabalho
K ₁₂ .Hfr C	F	s	+	A	+	o	o	Cedida por S.O.P. COSTA
K ₁₂ .W1177/6	-	Str	+	A	-	o	o	Cedida por S.O.P. COSTA

^{1/} - Plasmídio não detectado; o = ausência de dados; s = sensível a drogas.

^{2/} Km = Canamicina; Hg = bicloreto de mercúrio; Tc = tetraciclina; Cm = cloranfenicol; He = hetacilina;
Str = estreptomina; Rfm = rifamicina.

^{3/} + e - Significa presença ou ausência de motilidade.

^{4/} P = prototrófico; A = auxotrófico;

^{5/} O mutante resistente à rifamicina foi obtido por F.M. OLIVEIRA.

las por litro de água destilada, foram usados no presente trabalho:

a) Ágar eosina-azul de metileno-EMB (Difco)^{1/}

Peptona	10,0 g
Lactose	5,0 g
Sacarose.	5,0 g
K ₂ HPO ₄	2,0 g
Ágar	13,5 g
Eosina amarela.	0,4 g
Azul de metileno.	0,065 g
pH final = 7,2	

b) Caldo nutriente (Difco)

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
pH final = 6,8	

c) Ágar nutriente (caldo nutriente adicionado de 15 g de ágar)

d) Ágar nutriente semi-sólido (caldo nutriente adicionado de 7,5 g de ágar)

e) Caldo triptonado

Triptona	10,0 g
NaCl	5,0 g
pH final = 7,0	

^{1/} Todos os meios foram autoclavados a 121°C durante 15 minutos.

f) Meio triptonado semi-sólido 0,3%

Triptona (Difco). 10,0 g
 NaCl 5,0 g
 Ágar. 3,0 g
 pH final = 7,0

g) Meio triptonado semi-sólido 0,2%

Triptona (Difco). 10,0 g
 NaCl 5,0 g
 Ágar. 2,0 g
 pH final = 7,0

h) Meio mínimo líquido de sais e glicerol
(KAISER e HOGNES, 1960)

K₂HPO₄ 11,2 g
 KH₂PO₄. 4,8 g
 (NH₄)₂SO₄ 2,0 g
 MgSO₄.7H₂O 0,25 g
 Fe(SO₄)₃. 0,50 mg
 Glicerol. 5,0 g
 pH final = 7,0

O sal de magnésio foi adicionado somente após os demais componentes estarem completamente dissolvidos. O glicerol foi autoclavado separadamente.

i) Meio mínimo semi-sólido de sais e glicerol

(Meio mínimo líquido de sais e glicerol adicionado de 3 g de ágar)

pH final = 7,0

j) Meio para antibióticos (Antibiotic Medium No. 2 Base Ágar-Oxoid)

4.1.3. Drogas antimicrobianas

Bicloreto de mercúrio (Hg)	^{1/}	- E. Merk
Cloranfenicol	(Cm)	- Parke-Davis Ltda.
Hetacilina potássica	(He)	- Laborterápica - Bristol S.A.
Gentamicina	(Gm)	- Schering
Rifamicina	(Rf)	- Laboratórios Lepetit S.A.
Sulfato de estreptomicina	(Sm)	- Fontoura-Wyeth Indústrias Far- maceuticas S.A.
Sulfato de canamicina	(Km)	- Laborterápica Bristol S.A.
Tetraciclina	(Tc)	- Pfizer Inc.

4.1.4. Outros materiais

Suporte para membrana milipore	- Sartorius
Membrana milipore de 0,22 µm	- Millipore ICL
Micropipetas de 5 mcl	- DADE Diagnostics, Inc.
Tubos capilares em U	- Esses tubos foram fei- tos na chama usando-se tubos capilares (Kimble Products, USA) ou micro- pipetas de 5 mcl mencio- nadas acima. Alguns tu- bos em U foram gentil- mente cedidos pelo labo- ratório do Dr. J. ADLER da Universidade de Wis- consin.

^{1/} Para simplificar, as letras entre parênteses serão usadas em certas partes deste trabalho.

4.2. Métodos

4.2.1. Obtenção de mutantes para motilidade (*IINO e ENOMOTO, 1971; modificado*)

4.2.1.1. Obtenção de mutantes sem motilidade

a) As linhagens móveis de *E. coli*, das quais se desejavam obter mutantes imóveis, foram incubadas por um período de 18 a 24 horas a 37°C, em caldo triptonado.

b) A seguir inoculou-se 0,01 ml de cada uma das culturas no centro de placas com 12 ml de meio triptonado semi-sólido 0,3%.

c) Após incubação a 33°C, por período de tempo variável entre 8 e 16 horas, dependendo da linhagem e portanto da dimensão dos halos circulares de movimento (*swarms*), repicou-se com estilete material do centro de cada placa, correspondente ao local original do inóculo, para o centro de nova placa com o mesmo meio de cultivo. Repetiu-se este procedimento 5 a 9 vezes conforme a linhagem considerada, até a obtenção de nítido decréscimo na velocidade de expansão dos halos circulares de movimento (*swarms*), o que era evidenciado por inspeção visual seguida do dimensionamento feito com régua milimetrada, em determinados períodos de tempo. Para se proceder à leitura, as placas foram colocadas contra uma fonte luminosa. Simultaneamente, uma segunda evidência era considerada como indício do acúmulo de mutantes imóveis ou seja, a grande concentração de células na região central da placa correspondente ao local do inóculo e região circunvizinha.

d) A seguir, material do centro de cada placa foi inoculado através de estrias em placas com EMB com a finalidade de se obterem colônias isoladas. Essas placas foram

incubadas a 37°C por 24 horas.

e) Em seguida, 32 a 64 colônias foram repicadas, uma a uma, para igual número de tubos com caldo triptonado os quais foram incubados por 24 horas a 37°C.

f) Com o auxílio de uma multi-alça (peça com 17 alças de níquel-cromo com cerca de 1,8 mm de diâmetro cada uma) as culturas foram inoculadas em placas com meio-triptonado semi-sólido 0,3%. Em cada placa além das 16 culturas investigadas acrescentou-se uma linhagem de *E. coli* (controle) cujo padrão de movimento e outras características haviam sido estabelecidos. As placas foram incubadas a 33°C e os tubos com as culturas foram colocados em refrigerador a 4°C. Procediam-se duas leituras, com 5 e 10 horas de incubação, através de inspeção visual: os crescimentos que não apresentassem halos de movimento e que adquirissem um aspecto leitoso eram considerados como possíveis mutantes sem motilidade.

g) Para caracterização, 0,01 ml das respectivas culturas em caldo, estocadas no refrigerador, foram inoculadas nos centros de placas contendo meio-triptonado semi-sólido 0,3%. Numa das placas (controle). As leituras eram realizadas após 24 horas de incubação a 33°C. Se durante esse tempo algum crescimento evidenciasse halo de movimento abandonava-se a cultura correspondente. Do contrário, as culturas eram submetidas a exame microscópico com o uso da técnica da gota pendente para confirmação da perda de movimento.

Após confirmação da estabilidade dos mutantes feita através de estrias em meio triptonado semi-sólido 0,3%, esses eram estocados em ágar nutriente (1,5% de ágar). Essa concentração de ágar não permite que possíveis revertentes móveis levem vantagem seletiva no meio de estoque.

4.2.1.2. Obtenção de mutantes de maior motilidade

a) As linhagens móveis de *E. coli* K₁₂, das quais se desejavam obter mutantes de maior motilidade, foram incubadas por um período de 18 a 24 horas a 37°C, em caldo triptonado.

b) A seguir inoculou-se 0,01 ml de cada uma das culturas nos centros de placas com 15 ml de meio triptonado semi-sólido 0,3%.

c) Após incubação a 33°C por período variável entre 8 e 16 horas, dependendo da linhagem e portanto da intensidade do movimento na formação de halos circulares (swarms) repicou-se com estilete material da periferia dos referidos halos para o centro de nova placa com o mesmo meio de cultivo. Repetiu-se este procedimento 6 a 14 vezes conforme a linhagem considerada, até a obtenção de nítido aumento na velocidade de expansão dos halos de movimento o que era evidenciado por inspeção visual seguida de dimensionamento feito com régua milimetrada, em determinados períodos de tempo. Para essa leitura colocavam-se as placas contra uma fonte luminosa.

d) A seguir, inoculava-se material da periferia dos halos, através de estrias, em placas com EMB para obtenção de colônias isoladas. Incubaram-se as placas a 37°C por 24 horas. Após a incubação 16 colônias foram repicadas uma a uma para igual número de tubos com caldo triptonado; esses foram incubados por 24 horas a 37°C.

e) Com o auxílio de uma multi-alça as culturas foram inoculadas em placas com 12 ml de meio triptonado semi-sólido 0,3% e em placas com EMB. Em cada placa além das 16 culturas acrescentou-se uma linhagem de *E. coli* K₁₂ (con-

trole). As placas foram incubadas a 33°C e os tubos com as culturas estocados em refrigerador a 4°C. As leituras foram efetuadas com 5 e 10 horas de incubação, através de inspeção visual: os crescimentos que apresentassem maiores halos de movimento eram considerados como possíveis mutantes.

f) Para caracterização dos mutantes, alíquotas de 0,01 ml das respectivas culturas estocadas em caldo eram inoculadas no centro de placas contendo meio-triptonado semi-sólido 0,3%. Numa das placas era inoculada a *E. coli* K₁₂ que havia dado origem aos mutantes. Após incubação a 33°C procediam-se às leituras com as respectivas medidas dos halos de movimento feitas em tempos determinados, até um máximo de 12 horas.

As culturas dos variantes de maior movimento foram submetidas à observação microscópica através da técnica da gota pendente. A comprovação da estabilidade do mutante foi feita pela comparação do halo de movimento e outras características (fermentação da lactose e resistência a drogas) de 64 colônias isoladas do mutante, com a linhagem original. Os mutantes foram estocados em ágar nutriente a 4°C.

4.2.1.3. Obtenção das linhagens *E. coli* K_{12.1.1} e *E. coli* K_{12.2.1}

As linhagens *E. coli* K_{12.1.1} e *E. coli* K_{12.2.1}, foram obtidas por conjugação da linhagem *E. coli* BH-100, portadora de plasmídio R, com *E. coli* K_{12.1} e *E. coli* K_{12.2} receptoras de plasmídios, conforme Tabela 2. A *E. coli* K_{12.1} é um mutante de grande motilidade enquanto a *E. coli* K_{12.2} é um mutante sem motilidade. Esse ensaio teve como finalidade a obtenção de duas linhagens doadoras a partir de duas linhagens receptoras de plasmídio R. Para isso usaram-se os procedimen

tos fundamentais descritos no ítem 4.2.2.5.

4.2.2. Ensaios de quimiotaxia em *Escherichia coli* de tipos de reação sexual opostos

Com a finalidade de investigar a possível existência de atração entre "tipos de reação sexual opostos", representados aqui por *E. coli* doadoras e receptoras de plasmídeo R, as seguintes linhagens foram usadas:

Receptores (Ø) - motilidade		Doadoras (Ø ⁺) - motilidade	
<i>E. coli</i> K ₁₂ .1	+	<i>E. coli</i> BH 100	+
<i>E. coli</i> K ₁₂ .2	-	<i>E. coli</i> BH 100.1	-
<i>E. coli</i> K ₁₂ .3.1	+	<i>E. coli</i> K ₁₂ .1.1	+
<i>E. coli</i> K ₁₂ .3.2	-	<i>E. coli</i> K ₁₂ .2.1	-

Em adição usaram-se em um dos ensaios, as linhagens *E. coli* K₁₂ Hfr C, portadora de plasmídeo F integrado e *E. coli* K₁₂ W 1177/6, de tipo de reação sexual F⁻. Ambas possuem motilidade.

Métodos convencionais para estudo de quimiotaxia foram selecionados e modificados para atingirem os abjetivos propostos. Um deles foi descrito pelo autor do presente trabalho. Seguem-se descrições sumárias dos métodos utilizados, incluindo as modificações.

4.2.2.1. Método da placa: inoculação em dois pontos (ADLER, 1966; BEZDEK e SOSKA, 1972)

As linhagens de *E. coli* BH-100, *E. coli* K₁₂.1,

E. coli K₁₂:1,1, *E. coli* K₁₂:3,1, *E. coli* Hfr C e *E. coli* K₁₂ (WM-1177/6) foram crescidas em caldo triptonado a 37°C durante 16 horas, aproximadamente. Inocularam-se com pipeta cerca de 10⁷ células móveis de linhagem com tipos de reação sexual opostos em dois pontos distantes 4,5 cm um do outro numa mesma placa com 12 ml de meio triptonado semi-sólido 0,3%. Linhagens do mesmo tipo de reação sexual foram também inoculadas duas a duas. A seguir as placas foram incubadas a 30°C e observadas periodicamente com o propósito de acompanhar o desenvolvimento dos halos de movimento (quimiotaxia) de cada linhagem, e para detectar possíveis modificações que pudessem ocorrer antes, durante e após o encontro dos dois halos. O tempo de incubação variou entre 6 e 10 horas, conforme as linhagens usadas, e os resultados foram anotados. Efetuaram-se três repetições desse experimento.

4.2.2.2. Método da placa; diluição de filtrados (ADLER, 1966a)

A diluição de substâncias, incluindo filtrados, em meio semi-sólido permite detectar exclusivamente atraentes metabolizáveis, pois as células ao consumirem determinada substância criam o gradiente necessário à quimiotaxia. Este método possui a mesma sequência do anterior com as seguintes alterações:

a) culturas em caldo triptonado das linhagens *E. coli* BH-100, *E. coli* K₁₂:1, *E. coli* K₁₂:1,1, incubadas 16 horas a 37°C, foram centrifugadas a 5.000 rpm durante 10 minutos e filtradas em membrana milipore de 0,22 µm. Misturaram-se os filtrados livres de células com meio triptonado semi-sólido 0,3%, na proporção de 1 para 5, a uma temperatura de 40°C aproximadamente.

b) Prepararam-se, com controle, placas exclusivamente com meio triptonado semi-sólido.

c) Inocularam-se as linhagens *E. coli* 100 e *E. coli* K₁₂.1 nos centros dessas 4 placas.

d) Após incubação por 5 horas a 30°C os halos foram medidos e anotados. O mesmo experimento foi realizado acrescentando um período de aquecimento dos filtrados a 80°C em banho maria, durante 15 minutos. O ensaio foi realizado com três repetições.

4.2.2.3. Método da placa: diluição do filtrado em meio semi-sólido de sais e glicérol (ADLER, 1966a)

Usou-se o meio de sais adicionado de glicérol (KAISER e HOGNES, 1960), por estar bem definido que o glicérol é metabolizável mas não se constitui num atraente para *E. coli*, não interferindo assim na formação de halos (swarms) de quimiotaxia.

a) Culturas em caldo triptonado das linhagens *E. coli* 100, *E. coli* K₁₂.1 e *E. coli* K₁₂.1.1, incubadas 16 horas a 37°C foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos e filtradas em membrana milipore de 0,22 µm. A seguir misturou-se cada filtrado livre de célula com meio semi-sólido de sais e glicérol na proporção de um para cinco a uma temperatura de 40°C, aproximadamente.

b) Prepararam-se, como controle, placas exclusivamente com meio semi-sólido de sais e glicérol.

c) A *E. coli* BH-100 foi crescida em caldo de

sais e glicerol a 37°C durante 16 horas, com agitação, para manter a motilidade. A seguir foi inoculada no centro das placas mencionadas.

d) As leituras foram realizadas após incubação por 8 horas a 30°C, com medida dos halos de quimiotaxia. A mesma sequência de procedimento foi efetuada adicionando-se uma fase de aquecimento do filtrado a 80°C em banho maria, durante 15 minutos. Esses ensaios foram realizados com três repetições.

4.2.2.4. Método Quantitativo de PFEFFER

(ADLER, 1969 e 1973)

O método consiste essencialmente na presença de uma substância atraente no interior de tubos capilares com uma das extremidades imersa numa suspensão bacteriana durante determinado tempo, seguida da contagem do número de bactérias que penetra nos referidos tubos.

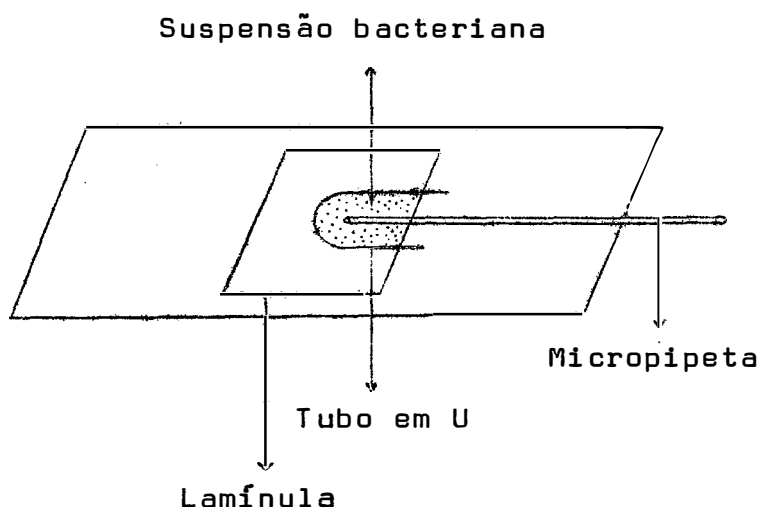
Para o desenvolvimento do presente ensaio modificou-se o método como se segue:

a) Culturas em caldo triptonado de linhagem *E. coli* BH 100, *E. coli* K₁₂.₁ e *E. coli* K₁₂.₁.₁ incubadas durante 18 horas a 37°C, foram centrifugadas a 5000 rpm durante 10 minutos e filtradas em membrana milipore de 0,22 micrometros. Os filtrados livres de células foram usados imediatamente ou estocados em refrigerador a 4°C por 24 horas, no máximo.

b) Alíquotas de 0,2 ml das culturas mencionadas, não submetidas à centrifugação nem à filtração, foram depositadas em pequenas câmaras. As suspensões continham cerca

de 8×10^7 células por mililitro.

Essas câmaras foram feitas com tubos capilares (com 5 cm de comprimento e com capacidade de 3,5 microlitro em forma de U colocados sobre lâminas de microscópio e cobertos com lamínula, conforme figura reproduzida de *ADLER* (1973):



"Aparelho" usado nos ensaios de quimiotaxia
(*ADLER*, 1973).

c) Introduziram-se nas câmaras, contendo as suspensões bacterianas, pipetas capilares preenchidas com 2 microlitros dos filtrados. Usaram-se pipetas capilares descartáveis de 5 microlitros com diâmetro interno de 0,4mm. Suas extremidades foram fechadas na chama. Para o preenchimento das micropipetas essas foram passadas rapidamente na chama por duas ou três vezes e imediatamente introduzidas em recipientes contendo os respectivos filtrados. Após cinco minutos, aproximadamente, introduziram-se suas extremidades abertas, sem lavar, nas câmaras contendo suspensões bacterianas. Montaram-se todas as combinações entre as suspensões (nas câmaras) e

os filtrados (nas micropipetas). Depois de incubar todo o sistema durante uma hora a 30°C, removeram-se as micropipetas. Essas foram lavadas com água destilada esterilizada. Após quebrar as extremidades fechadas das micropipetas transferiu-se, sob pressão, o conteúdo de cada uma para frasco com 10 ml de solução salina. Semearam-se alíquotas de 0,1 ml de diluições adequadas em EMB. Contaram-se as colônias depois de 24 horas de incubação a 37°C.

4.2.2.5. Método da conjugação para estudo de quimiotaxia

Este método baseou-se fundamentalmente na frequência de transferência do plasmídeo R nos diversos cruzamentos entre linhagens de *E. coli* com e sem motilidade. Para esses cruzamentos foram essenciais os mutantes para motilidade e as linhagens isogênicas obtidas por conjugação. Além desses mutantes foi importante ao desenvolvimento e eficiência do método o uso de diferentes diluições e de diferentes tempos de incubação das culturas mistas. Eventualmente, a presença de meios com variação de viscosidade também auxiliou na aplicação do método. Nesse caso foi usado o meio triptonado semi-sólido 0,2%. Para o desenvolvimento do método os seguintes cruzamentos foram organizados:

1º grupo	DOADORAS (motilidade)			RECEPTORAS (motilidade)		
	<i>E. coli</i> BH 100	+	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ .1	+	
	<i>E. coli</i> BH 100	+	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ .2	-	
	<i>E. coli</i> BH 100.1	-	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ .1	+	
	<i>E. coli</i> BH 100.1	-	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ .2	-	

2º grupo	DOADORAS (motilidade)			RECEPTORAS (motilidade)		
	<i>E. coli</i> K ₁₂ 4.1.1	+	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ 3.1	+	
	<i>E. coli</i> K ₁₂ 4.1.1	+	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ 3.2	-	
	<i>E. coli</i> K ₁₂ 2.2.1	-	x	<i>E. coli</i> K ₁₂ 3.1	+	
	<i>E. coli</i> K ₁₂ 2.2.1	-		<i>E. coli</i> K ₁₂ 3.2	-	

Conforme a Tabela 1 as linhagens doadoras são portadoras de um plasmídeo R conjugativo codificando resistência para cinco diferentes drogas antimicrobianas. As linhagens receptoras são dotadas de resistência cromossômica para estreptomicina unicamente ou para estreptomicina e rifamicina. Os quatro cruzamentos de um mesmo grupo foram montados simultaneamente. Para isso as linhagens envolvidas foram cultivadas em 10 ml de caldo triptonado por 24 horas, a 37°C, em frascos de Erlenmeyer de 50 ml. Através do estudo das culturas feitos anteriormente conheciam-se os números aproximados de células/ml que cada linhagem atingia ao final de 24 horas de incubação nas condições deste ensaio (esse número atingia cerca de 10⁸ células/ml). Quando havia necessidade de maior número de células as culturas eram centrifugadas a 7000 rpm, durante 10 minutos, e ressuspensas em caldo triptonado. Simultaneamente com a realização de cruzamentos procedia-se à comprovação dos padrões de motilidade e de resistência a drogas, das culturas envolvidas. Para isso inoculavam-se as culturas doadoras e receptoras em meio triptonado semi-sólido 0,3% e em placas contendo EMB adicionado de drogas antimicrobianas. As drogas usadas e as concentrações finais em µg/ml foram: estreptomicina (200), rifamicina (150), canamicina (20), bicloreto de mercúrio (10), tetraciclina (20), cloranfenicol (20) e hatacilina (20). Além disso prepararam-se outras placas com as combinações de estreptomicina (1º grupo de cruzamentos) e rifamicina (2º grupo) com cada uma das drogas, nas mesmas concentrações indicadas acima. Para realização dos cruzamen-

tos transferiam-se alíquotas adequadas de cada cultura para frascos de Erlenmeyer contendo caldo triptonado, de modo que doadora e receptora atingissem concentrações aproximadas de células. Após a mistura completava-se o volume do caldo de cada frasco para 5,0 ml. Na maioria das vezes preparam-se os cruzamentos acima em duas séries simultâneas; numa série as culturas mistas não sofreram qualquer diluição, conforme descrição acima; na outra série as culturas mistas foram diluídas 100 vezes, imediatamente após a mistura das duas linhagens. Além disso, em algumas oportunidades prepararam-se simultaneamente cruzamentos, sem diluir e diluído 100 vezes, em meio triptonado semi-sólido com 0,2% de ágar. O meio semi-sólido era fundido e mantido a 37°C até o momento de ser usado.

Logo após a realização dos cruzamentos transferia-se 1 ml de cada cultura mista para 9 ml de solução salina. Depois das devidas diluições, semeavam-se alíquotas de 0,1 ml em EMB para contagem das colônias. As culturas eram incubadas imediatamente a 37°C por tempo variável, conforme o ensaio: uma e 3 horas, uma, 3 e 6 horas e ainda uma, 6 e 18 horas. Em cada um desses períodos, conforme o experimento eram retiradas alíquotas da cultura mista para a contagem dos transconjugantes e verificação da concentração das células parentais. Para isso, tomava-se cuidado para não agitar a cultura mista. Nos ensaios em que duas séries dos mesmos cruzamentos eram montados, uma em caldo triptonado e outra em meio triptonado semi-sólido 0,2%, todo o sistema era colocado em refrigerador durante 5 minutos para a semi-solidificação do meio semi-sólido. Só após essa fase é que o sistema era incubado a 37°C.

Após cada período de incubação das culturas mistas semeavam-se alíquotas de 0,1 ml de diluições adequadas em dois tipos de meios: um constando só de EMB, para obtenção dos títulos das linhagens envolvidas e outro de EMB adicionado de estreptomicina (200 µg/ml) e canamicina (20 µg/ml), para sele

ção dos transconjugantes. Como se observa a canamicina foi escolhida para compor o meio seletivo dos transconjugantes em bora pudessem ser usadas quaisquer das outras drogas, para as quais o plasmídeo R codifica resistência.

Para os cruzamentos do 2º grupo, onde estavam envolvidas apenas linhagens de *E. coli* K₁₂ usou-se a mesma sequência metodológica já descrita com as seguintes modificações:

- a) não se usou meio triptonado semi-sólido.
- b) para obtenção dos títulos usaram-se placas com EMB e com EMB adicionado de rifamicina (150 µg/ml); isso porque todas as linhagens envolvidas eram *lac*⁻.
- c) para a seleção dos transconjugantes usaram-se placas com EMB adicionado de canamicina (20 µg/ml) e rifamicina (150 µg/ml).

Para comprovação da motilidade e dos modelos de resistência transferidos para a receptora, repicavam-se 16 colônias das placas seletoras correspondentes a cada cruzamento para tubos contendo caldo triptonado. Após incubação por 18 a 24 horas inoculavam-se essas culturas, com o auxílio de uma multi-alça, em placas com meio triptonado semi-sólido 0,3%, para comprovação dos padrões de movimento e em placas com EMB, adicionado de cada droga antimicrobiana envolvida, para comprovação dos modelos de resistência transferidos para a receptora.

5. RESULTADOS

5.1. Mutantes para motilidade e transconjugantes

Os mutantes sem motilidade assim como aqueles de maior motilidade foram obtidos a partir de linhagens de *E. coli* usadas anteriormente (CHARTONE-SOUZA, 1975). A Figura 1a, b e c mostra a sequência final de obtenção desses mutantes.

Como se observa na Tabela 2, o diâmetro do halo circular de movimento (quimiotaxia) da linhagem BH 100 "cresce" cerca de 13 mm por hora, nas condições do experimento. A partir dela obteve-se a linhagem BH 100.1, sem motilidade, que se apresentou estável quando estriada em meio semi-sólido.

A partir da *E. coli* K₁₂ 712 R cujo diâmetro do halo de movimento "crescia" 8 mm/hora, obtiveram-se os mutantes K₁₂.1 que crescia 11 mm/hora e K₁₂.2 sem motilidade, conforme Tabela 2. Os mutantes K₁₂.3.1 cujo diâmetro do halo crescia 11 mm/hora e K₁₂.3.2, sem motilidade, foram obtidos a partir da linhagem K₁₂.3 de 8 mm/hora.

Houve necessidade de maior número de repiques sucessivos (ítem 4.2.1.1.) para a obtenção dos mutantes sem

motilidade da *E. coli* K₁₂ do que para a *E. coli* 100.

Todos os mutantes tiveram sua motilidade confirmada ao microscópio através do uso da técnica da gota pendente.

O plasmídeo R da *E. coli* BH 100 foi transferido, por conjugação, para as linhagens receptoras K₁₂.1 e K₁₂.2. Portanto essas linhagens tiveram seus tipos de reação sexual alterados, passando de receptoras para doadoras de plasmídeo. Esses transconjugantes foram designados *E. coli* K₁₂.1.1. e K₁₂.2.1.

Tabela 2 - Diâmetro dos halos de movimento das linhagens de *E. coli* antes e após a obtenção de mutantes para motilidade.

Aumento dos diâmetros dos halos (mm/hora)			
Linhagens originais		Mutantes	
BH 100	13,0	BH 100.1	0,0
K ₁₂ .712 R	8,0	K ₁₂ .1	11,0
		K ₁₂ .2	0,0
K ₁₂ .3	8,0	K ₁₂ .3.1	11,0
		K ₁₂ .3.2	0,0
Hfr C	10,0	- ^{1/}	-
W 1177/6	8,0	-	-

^{1/} Ausência de dados.

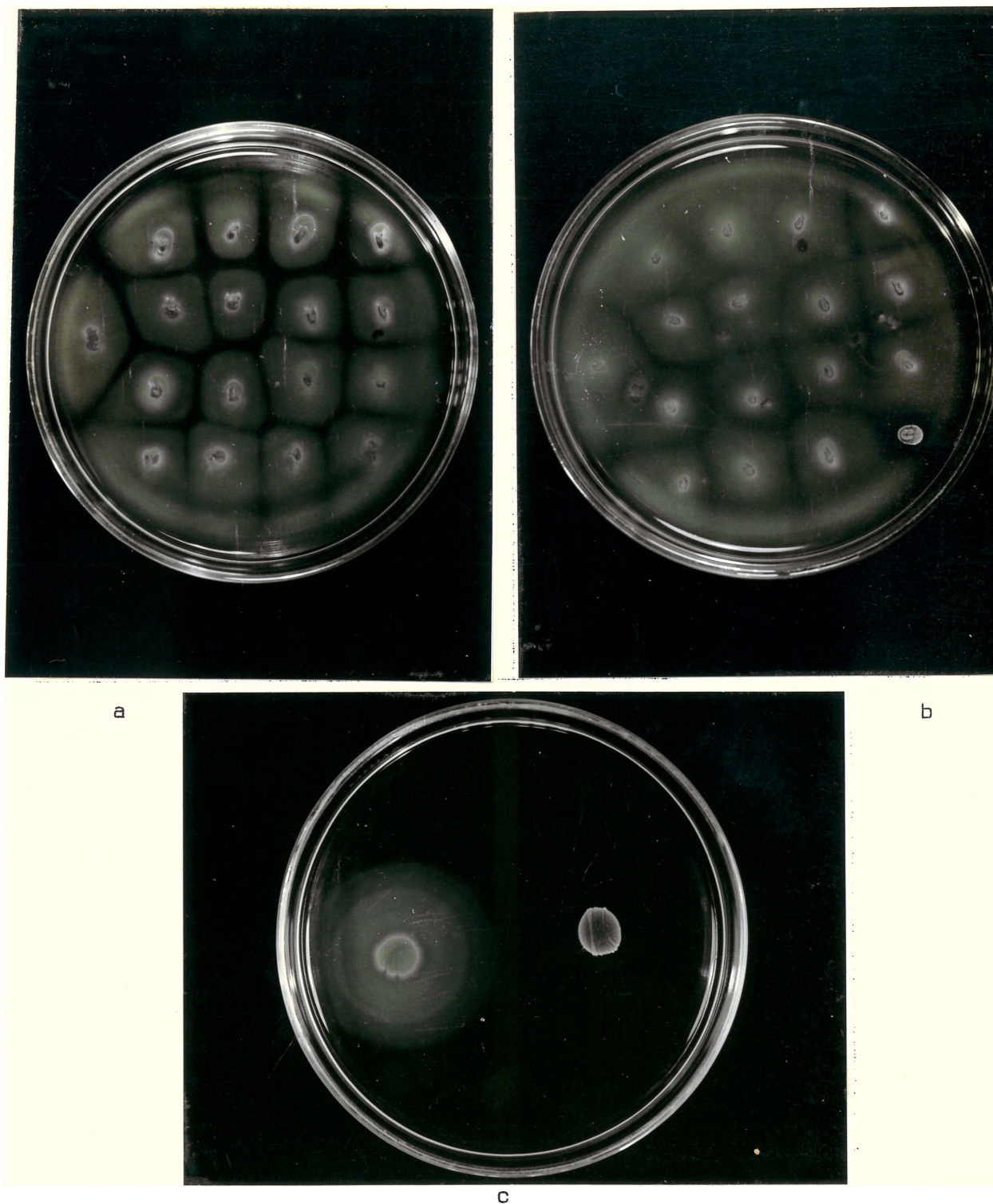


Figura 1 - Fases finais da obtenção de mutantes para motilidade em *E. coli*.
a) 17 amostras móveis, incluindo o controle; b) 16 amostras móveis, incluindo o controle, e um mutante sem motilidade; c) mutante sem motilidade (à direita) e mutante de maior motilidade (à esquerda).

5.2. Interação entre linhagens de *E. coli* doadoras e receptoras em meio semi-sólido

Quando se inocularam culturas móveis de uma mesma linhagem, isto é, doadora ou receptora, em dois pontos de uma mesma placa, as figuras formadas após o encontro dos halos de movimento, apresentaram-se simétricas. As seguintes Figuras ilustram esse fato: 2a (interação dos halos da linhagem $K_{12.1.1}$); 3a (Hfr C); 3b (W 1177/6); 4a (BH 100); 4b ($K_{12.1}$); 4d (Hfr C); 4e (W 1177/6); 5a (BH 100); 5b ($K_{12.3.1}$); 5d ($K_{12.1.1}$); 5e ($K_{12.1}$).

Quando as culturas inoculadas eram de tipos de reação sexual opostos, isto é, doadoras e receptoras, as figuras formadas após o encontro dos halos foram sistematicamente assimétricas. As figuras abaixo mencionadas mostram algumas das interações encontradas: 2b, 2c, 3c, 4c, 4f, 5c, 5f e 6.

A formação de figura ou interação assimétrica foi observada tanto entre linhagens isogênicas como não isogênicas. A Figura 6 (a,b,c,d,e,f) mostra fases sucessivas de formação de banda quimiotáctica. Observa-se que após o encontro dos halos externos (1º halo) das linhagens $K_{12.1.1}$ e $K_{12.3.1}$ esboça-se a formação de uma banda na região central da linha de contato entre os dois. Enquanto isso está ocorrendo, o halo interno (segundo halo) também emite uma banda. Esta se solda com a primeira constituindo a partir daí, uma grande banda que se dirige ao local de maior concentração das células receptoras. A Figura 2(b,c) também ilustra as fases mais adiantadas desse acontecimento. Nota-se que os halos externos se tocam, mas permanecem bem delimitados.

A Figura 3c evidencia a interação assimétrica entre as linhagens Hfr C e W 1177/6. Observa-se, neste caso, que o halo externo da linhagem doadora parece penetrar na região de crescimento da linhagem receptora. Nas Figuras 3(a,b) percebe-se o aspecto simétrico já mencionado anteriormente. As diversas combinações ou interações simétricas e assimétricas encontram-se na Tabela 3.

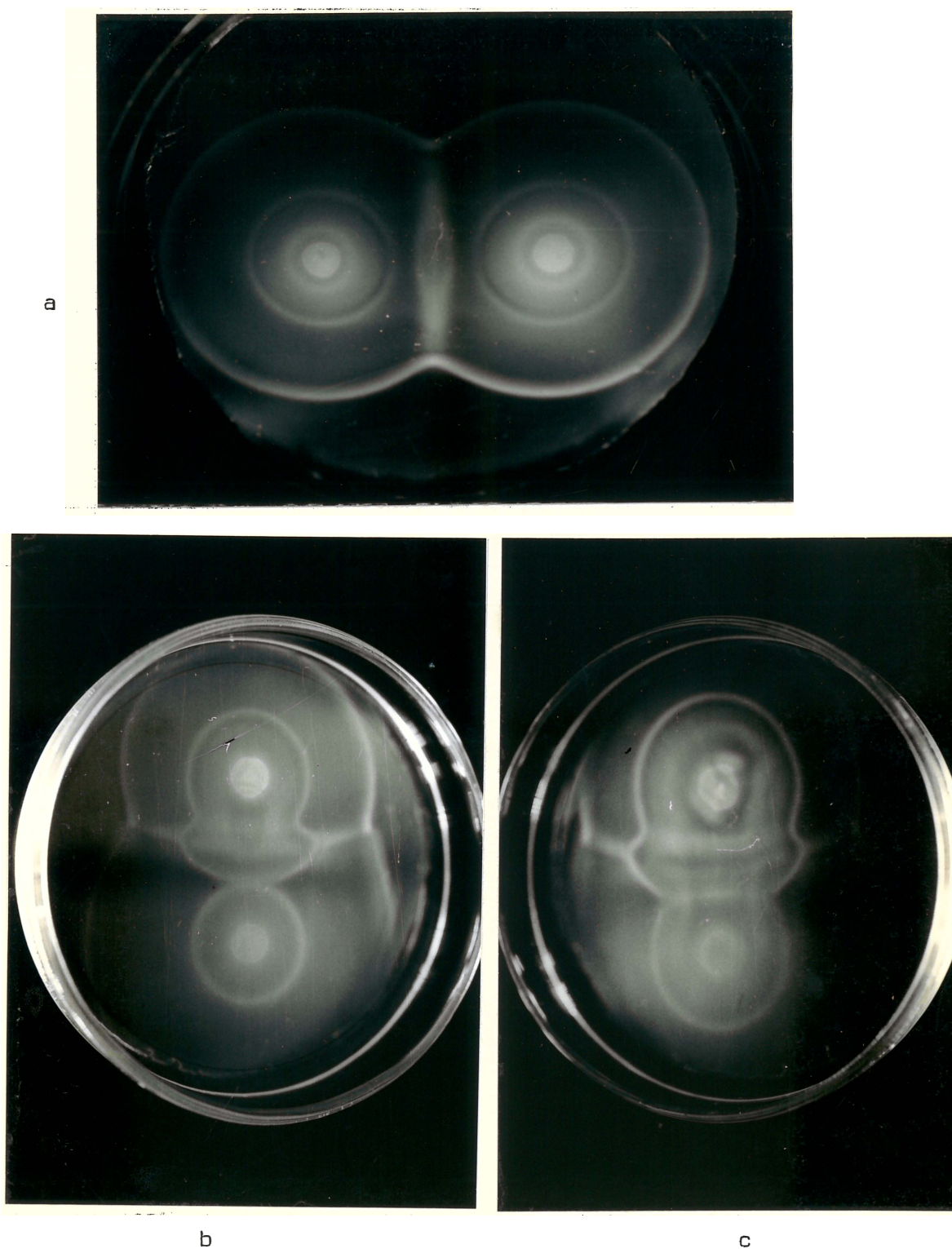


Figura 2 - Interações quimiotáticas entre linhagens de *E. coli* do mesmo tipo de reação sexual e de tipos de reação sexual opostos. a) interação entre K₁₂.1.1 e K₁₂.1.1; b, c) fases sucessivas da formação de banda quimiotática pela linhagem K₁₂.1.1 na interação entre K₁₂.1.1 e K₁₂.3.1.

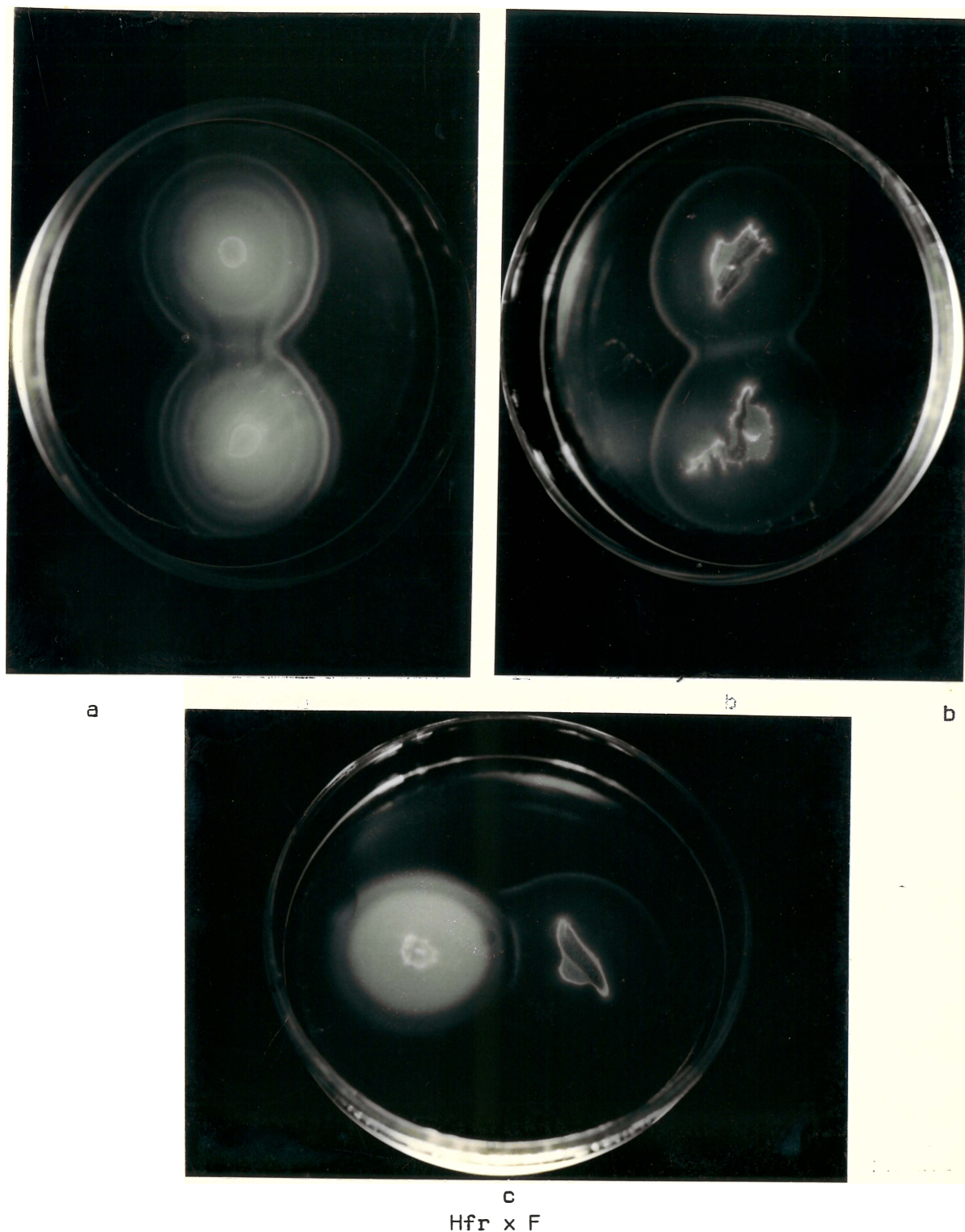
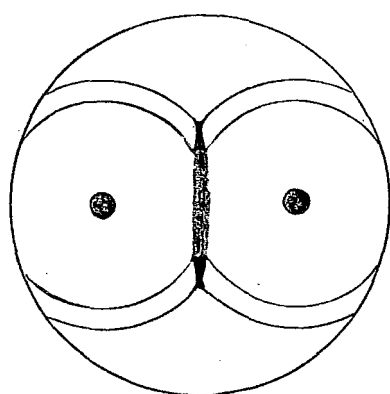
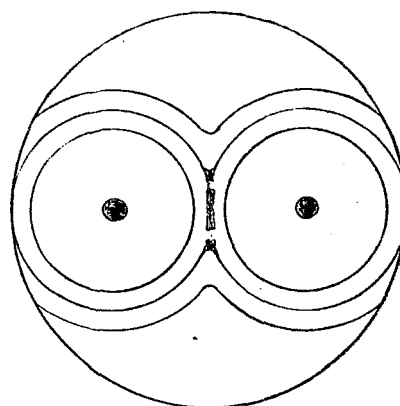


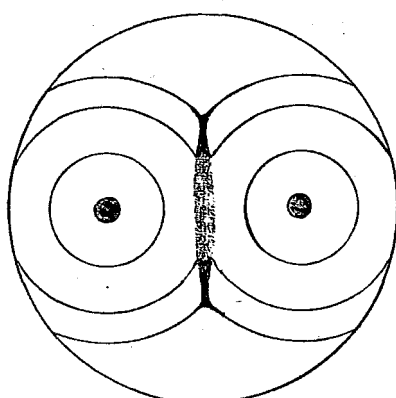
Figura 3 - Interações quimiotáticas entre linhagem de *E. coli* do mesmo tipo de reação sexual e de tipos de reação sexual opostos. a) HfrC com HfrC; b) W1177/6 F^- com W1177/6 F^- ; c) HfrC com W1177/6 F^- .



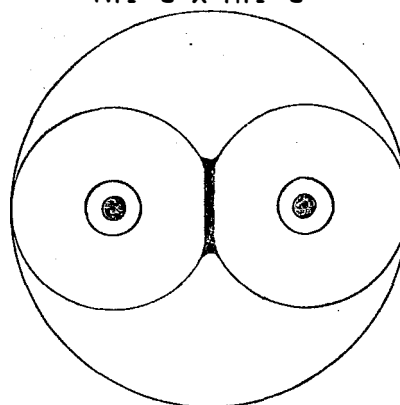
a
BH 100 x BH 100



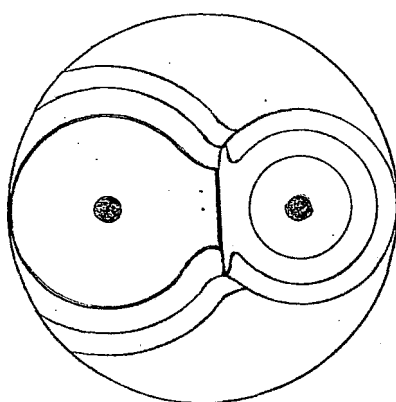
d
Hfr C x Hfr C



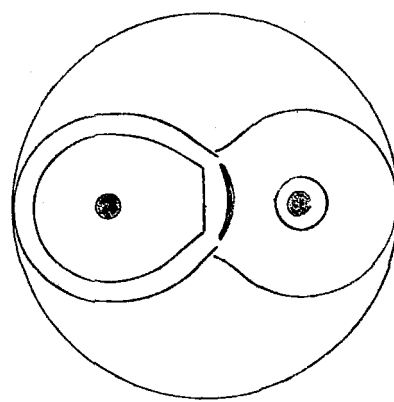
b
K12.1 x K12.1



e
W 1177/6 x W 1177/6

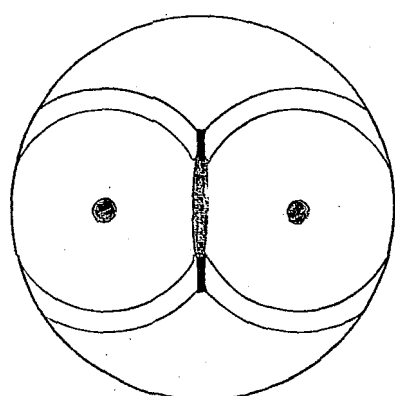


c
BH 100 x K12.1

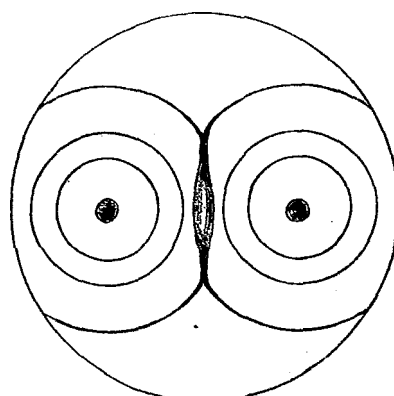


f
Hfr C x W 1177/6

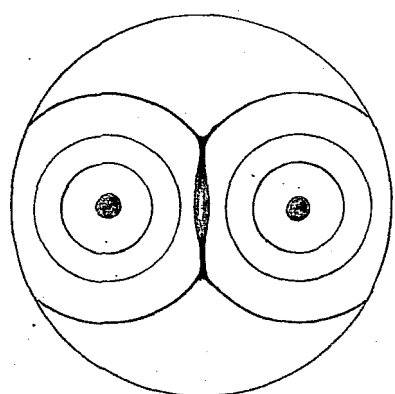
Figura 4 - Interações simétricas entre linhagens do mesmo tipo de reação sexual (a, b, d, e) e interações assimétricas entre linhagens de tipos de reação sexual opostos (c, f).



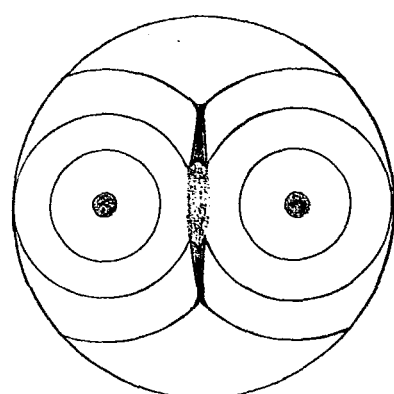
a
BH 100 x BH 100



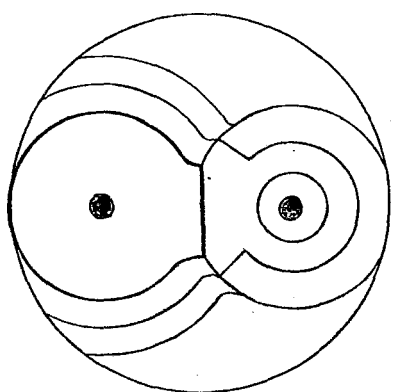
d
K12.1.1 x K12.1.1



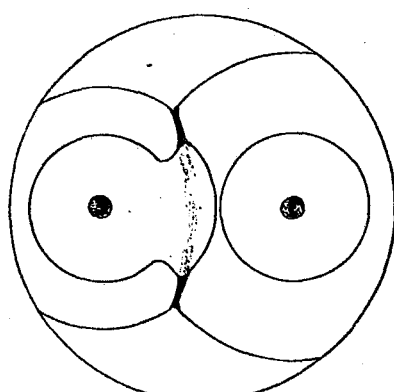
b
K12.3.1 x K12.3.1



e
K12.1 x K12.1



c
BH 100 x K12.3 .1



f
K12.1.1 x K12.1

Figura 5 - Interações simétricas entre linhagens de *E. coli* do mesmo tipo de reação sexual (a, b, d, e) e interações assimétricas entre linhagens de tipos de reação sexual opostos (c, f).

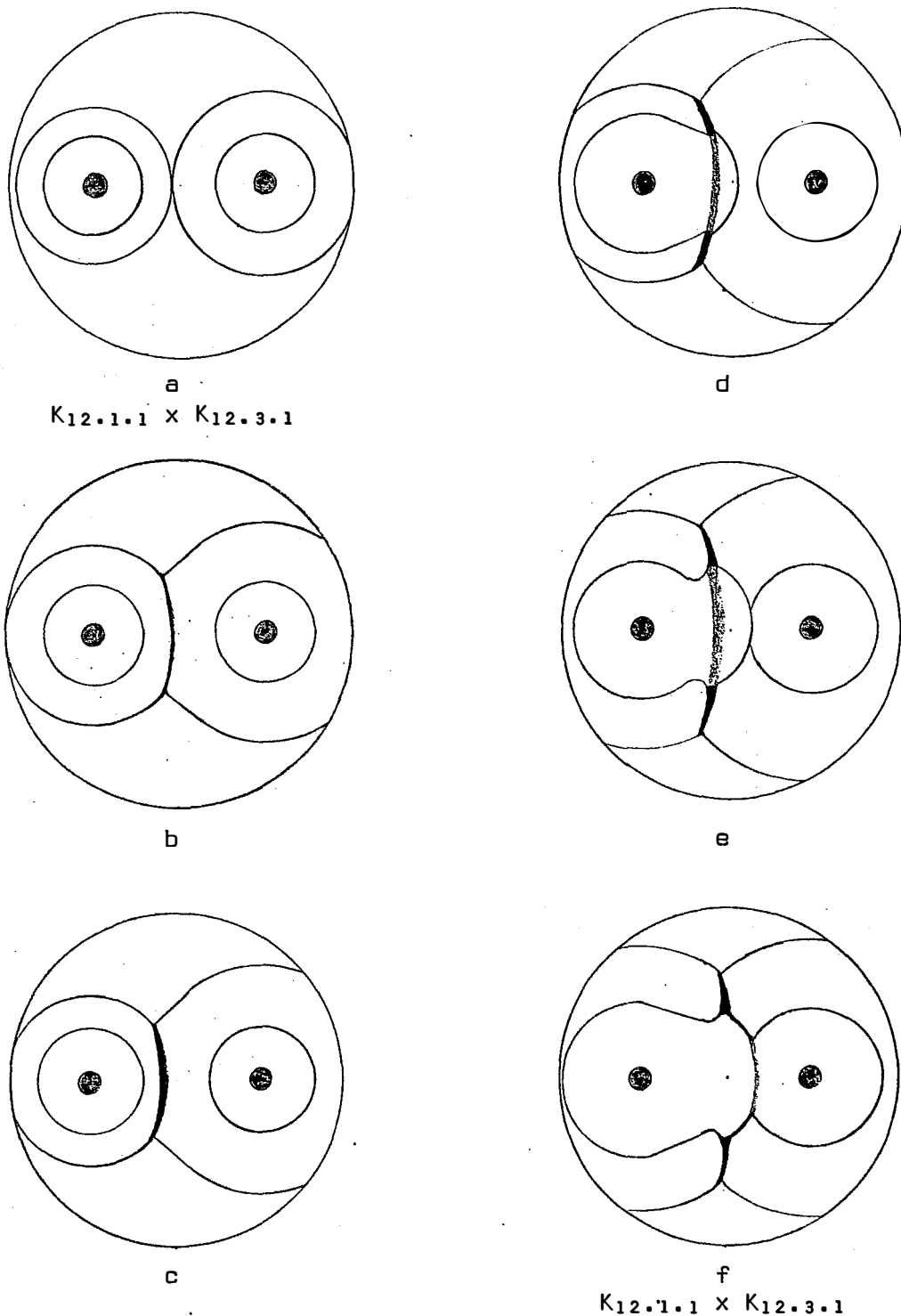


Figura 6 - Interação assimétrica entre *E. coli* K_{12.1.1} (doadora) e K_{12.3.1} (receptora). a) encontro dos halos externos das duas linhagens (b, c, d, e, f) estágios sucessivos da formação de banda quimiotática pela linhagem doadora.

Tabela 3 - Interações das linhagens de *E. coli* doadoras e receptoras em placa com meio semi-sólido.

Linhagens	BH 100	K ₁₂ .1.1	K ₁₂ .1	K ₁₂ .3.1	K ₁₂ .1177/6	K ₁₂ Hfr C
BH 100 (doadora)	- <u>1/</u>	-	+	+	o <u>2/</u>	o
K ₁₂ .1.1 (doadora)	-	-	+	+	o	o
K ₁₂ .1 (receptora)	+	+	-	-	o	o
K ₁₂ .3.1 (receptora)	+	+	-	-	o	o
K ₁₂ .1177/6 (receptora)	o	o	o	o	+	+
K ₁₂ Hfr C (doadora)	o	o	o	o	+	-

1/ Os sinais - e + significam, respectivamente, interação simétrica e interação assimétrica.

2/ o = ausência de dados.

5.3. Diâmetro dos halos quimiotácticos formados em placas com filtrados diluídos em meio semi-sólido

Filtrados, aquecidos e não aquecidos, das linhagens de *E. coli* BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1} foram diluídos em meio triptonado semi-sólido. Os diâmetros dos halos quimiotácticos das linhagens BH 100 e K_{12.1} estão discriminados na Tabela 4.

Na Tabela 5 encontram-se os valores dos diâmetros dos halos de quimiotaxia da linhagem BH 100 frente aos filtrados das linhagens BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1}, diluídos em meio mínimo semi-sólido de sais e glicerol.

5.4. Resultados decorrentes da aplicação do método quantitativo de PFEFFER

O número médio de células de *E. coli* doadoras e receptoras de plasmídios R encontrado no interior de micropipetas, após o uso do método quantitativo de PFEFFER, encontra-se na Tabela 6.

Dados anteriores, obtidos nas mesmas condições do presente experimento, mostraram que o número médio de células das linhagens BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1} no interior das micropipetas preenchidas com solução salina variava de 1 a $1,5 \times 10^3$.

Tabela 4 - Diâmetro dos halos de quimiotaxia das linhagens de *E. coli* BH 100 e K_{12.1} frente aos filtrados, aquecidos e não aquecidos, das culturas de BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1} diluídos em meio triptonado semi-sólido.

Linhagens inoculadas	Filtrados das linhagens	Diâmetro dos halos (mm)	
		Sem aquecimento	com aquecimento
BH 100	<u>-1/</u>	37	
	BH 100	44	49
	K _{12.1}	41	44
	K _{12.1.1}	46	52
K _{12.1}	-	26	
	BH 100	30	35
	K _{12.1}	28	35
	K _{12.1.1}	33	38

1/ Meio triptonado semi-sólido sem adição de filtrado.

Tabela 5 - Diâmetro dos halos de quimiotaxia da *E. coli* BH 100 frente aos filtrados, aquecidos e não aquecidos, das culturas de BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1} diluídos em meio semi-sólido de sais e glicerol.

Linhagem inoculada	Filtrados das linhagens	Diâmetro dos halos (mm)	
		Sem aquecimento	Com aquecimento
BH 100	<u>-1/</u>	8	
	BH 100	17	22
	K _{12.1}	23	21
	K _{12.1.1}	27	22

1/ Meio semi-sólido de sais e glicerol sem adição de filtrado.

Tabela 6 - Número de células de *E. coli* doadoras e receptoras de plasmídeo R encontradas no interior de micropipetas após o uso do método quantitativo de PFEFFER (ADLER, 1969 e 1973).

Culturas em suspensão ^{1/}	Filtrados das culturas	Nº de células nas micropipetas ^{2/}
BH 100	K _{12.1}	8,0 x 10 ⁴
	BH 100	4,1 x 10 ⁴
	K _{12.1.1}	3,8 x 10 ⁴
K _{12.1}	BH 100	8,0 x 10 ⁴
	K _{12.1}	8,2 x 10 ⁴
	K _{12.1.1}	5,0 x 10 ⁴
K _{12.1.1}	K _{12.1}	3,1 x 10 ⁴
	K _{12.1.1}	3,1 x 10 ⁴
	BH 100	4,0 x 10 ⁴

^{1/} As concentrações de células nas suspensões variaram de 7 a 9 x 10⁷ células/ml.

^{2/} Os valores representam a média de três repetições.

5.5. Estudo de quimiotaxia pelo método da conjugação

Nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e Figuras 7 e 8 estão os resultados obtidos através dos cruzamentos das linhagens de *E. coli* doadoras, BH 100 e 100.1, com as receptoras, K_{12.1} e K_{12.3.1}. Esses cruzamentos constituem o primeiro grupo estabelecido no item 4.2.2.5.

Tabela 7 e Figura 7: os cruzamentos cujos resultados estão na Tabela 7 e Figura 7 foram realizados simultaneamente em caldo triptonado e em meio triptonado semi-sólido 0,2%. Além disso, em cada um desses meios as culturas mistas foram usadas sem diluir e diluídas 100 vezes. Essas diluições foram efetuadas no "tempo zero de incubação". Nos períodos de uma, 6 e 18 horas de incubação retiraram-se amostras das culturas mistas para contagem de células. Na Figura 7 encontra-se o número de transconjugantes obtidos nos períodos de uma e 6 horas de incubação. Considerou-se o número de transconjugantes por 0,1 ml, e não por 1 ml, para evitar distorção nos resultados. Os dados da Tabela 7 e Figura 7 são de um só experimento embora duas outras repetições tenham mostrado resultados proporcionais.

Tabela 8: Os resultados observados na Tabela 2 correspondem aos mesmos cruzamentos cujos resultados constam da Tabela 7. Entretanto, as amostras das culturas mistas foram retiradas nos períodos de uma, 3 e 6 horas de incubação. Observa-se que as concentrações de células parentais são inferiores aos dados da Tabela 7.

Tabela 9 e Figura 8: A centrifugação das células doadoras e receptoras, isoladamente, antes da realização dos cruzamentos, permitiu o uso de grandes concentrações de células parentais nas culturas mistas. Considerou-se o número de transconjugantes por 0,1 ml afim de facilitar a compa

ração com os dados anteriores. Na Figura 8 consta o número de transconjugantes nos períodos de uma e 3 horas de incubação das culturas mistas.

Tabela 10: Os resultados mostram maior concentração de células parentais nas culturas mistas, do que no experimento precedente. Aqui também houve necessidade da centrifugação das culturas, antes de se procederem os cruzamentos. Duas séries de culturas mistas foram preparadas no início do experimento: uma sem ser diluída e outra diluída 100 vezes. Observa-se uma queda nas concentrações das culturas mistas, não submetidas à diluição, quando se comparam os períodos de zero a uma hora de incubações. Essas concentrações voltam a crescer no final de 3 horas de incubação.

Tabela 11: Os dados são decorrentes dos cruzamentos de linhagens derivadas da *E. coli* K₁₂ doadoras e receptoras de plasmídio R. Retiraram-se amostras das culturas mistas nos períodos de uma e 3 horas de incubação, para contagem dos transconjugantes. As concentrações parentais foram medidas nos períodos de zero e 3 horas de incubação, conforme tabela.

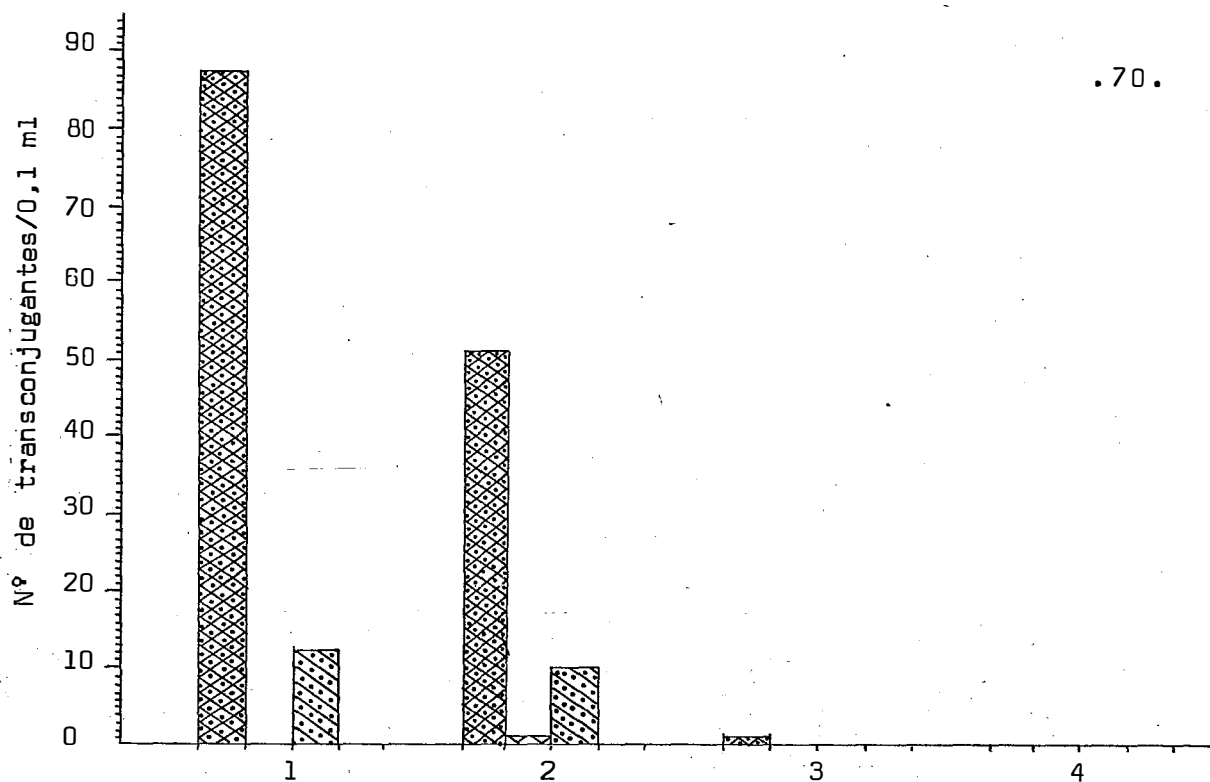
Tabela 7 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de *E. coli* BH 100 e K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (1º experimento)^{1/}

Incuba- ção (horas)	Culturas ^{2/} mistas (BH 100 x K ₁₂)			Nº de transconjugantes/0,1 ml ^{3/}				Concentração parental/ml
				Caldo triptonado		meio semi-sólido		(SD)
				SD	10 ⁻²	SD	10 ⁻²	
0	-	x	-					6,0 x 10 ⁷
	-	x	+					6,5 x 10 ⁷
	+	x	+					8,0 x 10 ⁷
	+	x	-					7,0 x 10 ⁷
1	-	x	-	0	0	0	0	
	-	x	+	1	0	0	0	
	+	x	+	51	1	10	0	
	+	x	-	87	0	12	0	
6	-	x	-	274	112	67	0	
	-	x	+	496	215	129	6	
	+	x	+	2080	594	360	24	
	+	x	-	2130	654	780	12	
18	-	x	-	605	780	1850	2180	3,5 x 10 ⁸
	-	x	+	3100	3180	850	4210	4,0 x 10 ⁸
	+	x	+	3210	4100	880	4380	2,3 x 10 ⁸
	+	x	-	3140	3910	1960	3510	3,6 x 10 ⁸

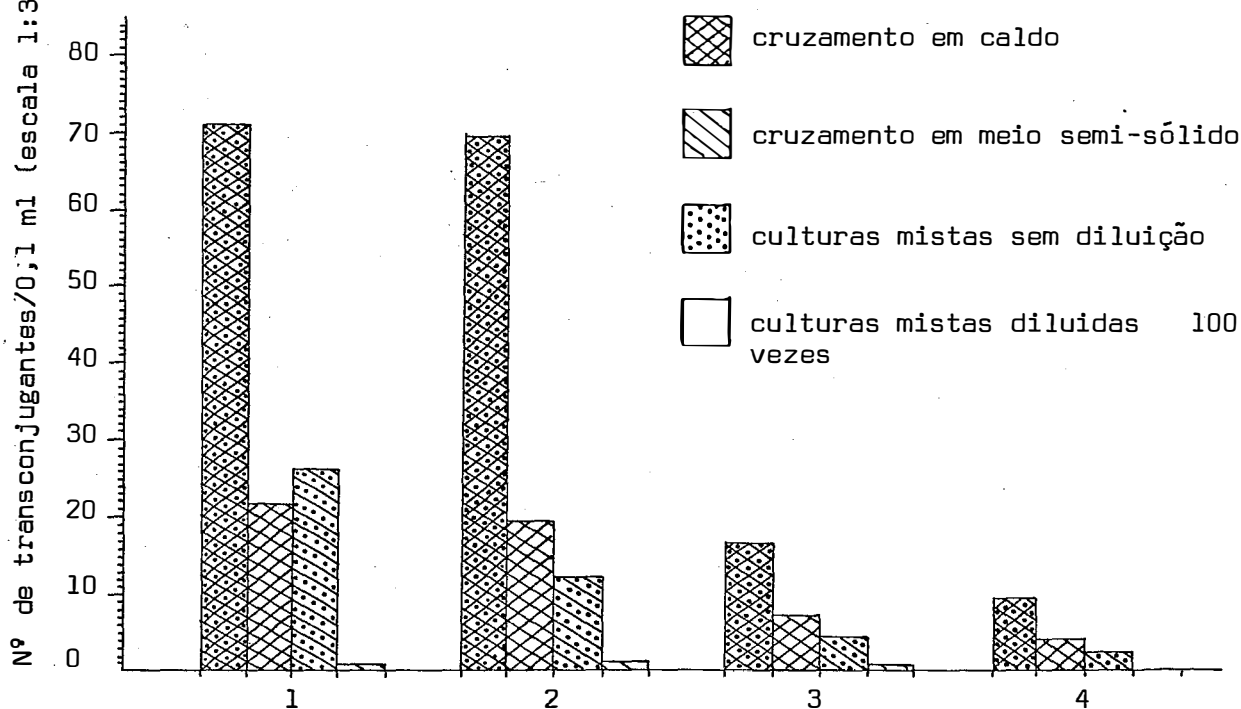
^{1/}Dados do 1º grupo de cruzamentos, conforme item 3.2.2.5.

^{2/}As culturas mistas foram preparadas em caldo triptonado e meio semi-sólido. Em ambos os meios foram usadas com diluição a 10⁻², no tempo zero, e sem diluição (SD).

^{3/}Considerou-se o número de transconjugantes/0,1 ml para torcer os resultados.



a - Uma hora de incubação da cultura mista



b - 6 horas de incubação da cultura mista

Figura 7 - Número de transconjugantes originado dos cruzamentos entre linhagens de *E. coli* BH 100 e *E. coli* K12 com (+) e sem (-) motilidade (1=BH100+x K12-; 2=BH100+x K12+; 3=BH100-x K12+; 4=BH100-x K12-), realizados em caldo e meio semi-sólido, sem diluição das culturas mistas e diluídas 100 vezes, com uma e 6 horas de incubação. (Da dos parciais da Tabela 7).

Tabela 8 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de *E. coli* BH 100 e K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (2º experimento)^{1/}.

Incubação (horas)	Cruzamentos (BH 100 x K ₁₂)			Nº de transconjugantes/0,1 ml	Concentração parental/ml
0	-	x	-		$1,2 \times 10^7$
	-	x	+		$1,0 \times 10^7$
	+	x	+		$1,2 \times 10^7$
	+	x	-		$1,0 \times 10^7$
1	-	x	-	1	$1,9 \times 10^7$
	-	x	+	0	$1,8 \times 10^7$
	+	x	+	11	$1,7 \times 10^7$
	+	x	-	24	$1,5 \times 10^7$
3	-	x	-	110	
	-	x	+	210	
	+	x	+	2100	
	+	x	-	1600	
6	-	x	-	318	$1,9 \times 10^8$
	-	x	+	803	$1,3 \times 10^8$
	+	x	+	3800	$4,0 \times 10^8$
	+	x	-	1950	$1,2 \times 10^8$

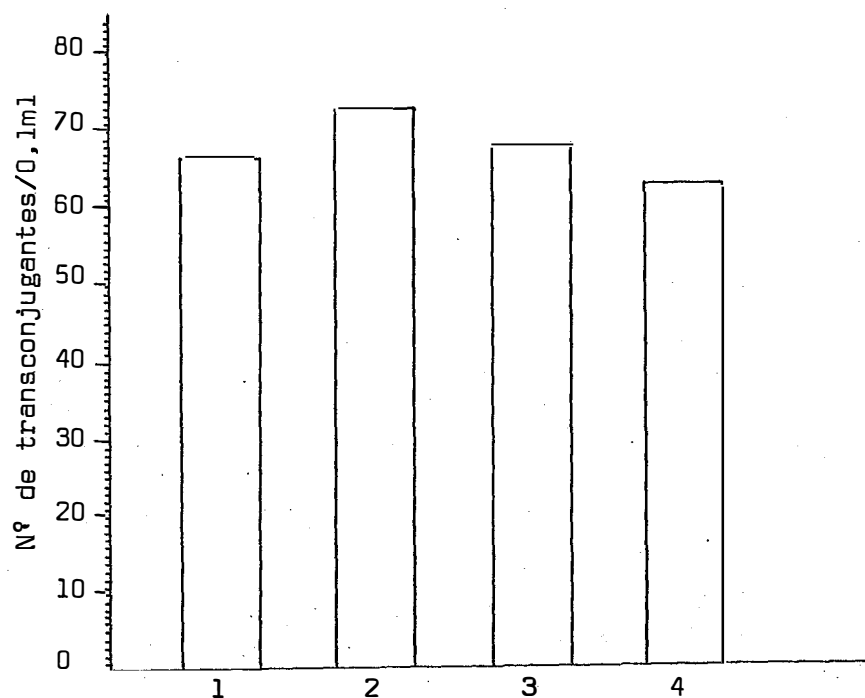
^{1/} Dados do 1º grupo de cruzamentos (realizados em caldo)

Tabela 9 - Número de transconjugantes obtido através de cruzamentos entre linhagens de *E. coli* BH 100 e K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (3º experimento).^{1/}

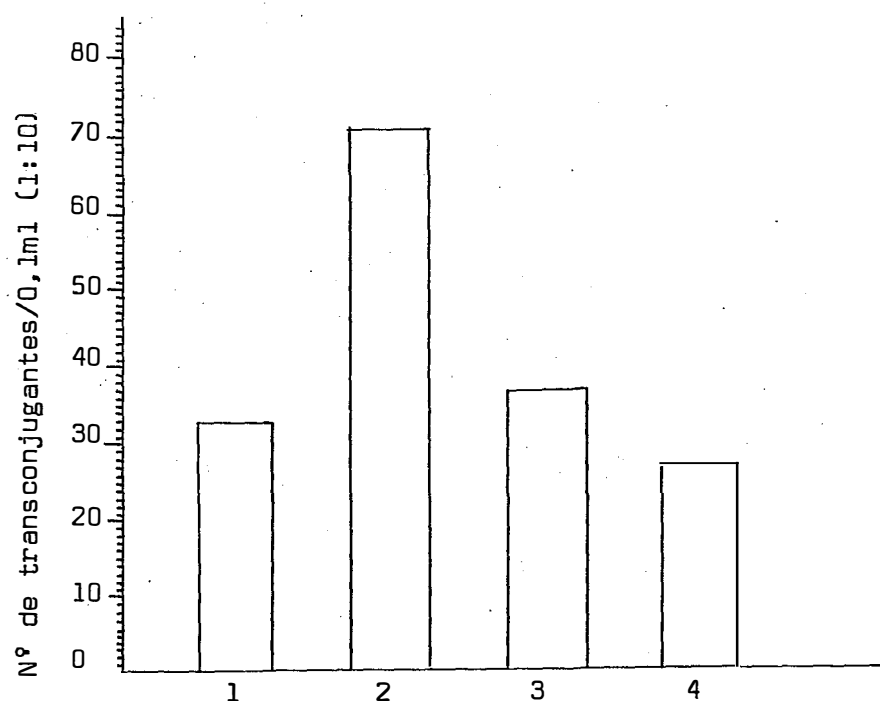
Incubação (horas)	Cruzamentos: (BH 100 x K ₁₂)	Nº de transconjugantes/0,1 ml	Concentração ^{2/} parental/ml
0	- x -		2,5 x 10 ⁸
	- x +		2,1 x 10 ⁸
	+ x +		2,3 x 10 ⁸
	+ x -		2,6 x 10 ⁸
1	- x -	62	
	- x +	67	
	+ x +	72	
	+ x -	66	
3	- x -	261	2,8 x 10 ⁸
	- x +	360	2,7 x 10 ⁸
	+ x +	700	3,4 x 10 ⁸
	+ x -	326	3,7 x 10 ⁸

^{1/} Dados do 1º grupo de cruzamento (realizados em caldo).

^{2/} As culturas parentais foram isoladamente centrifugadas a 8000 rpm, durante 10 minutos, para que atingissem maiores concentrações celulares nos cruzamentos.



a) Uma hora de incubação da cultura mista



b) 3 horas de incubação da cultura mista

Figura 8 - Número de transconjugante originado dos cruzamentos de linhagens de *E. coli* BH 100 e *E. coli* K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (1=BH 100+x K₁₂-; 2=BH 100+x K₁₂+; 3=BH 100-x K₁₂+; 4=BH 100 - x K₁₂-), com uma e 3 horas de incubação. (Dados parciais da Tabela 9).

Tabela 10 - Número de transconjugantes obtido através dos cruzamentos entre linhagens de *E. coli* BH 100 e K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade (4º experimento).^{1/}

Incuba- ção (horas)	Culturas ^{2/} mistas (BH 100 x K ₁₂)			Sem diluição		Diluídas 100 vezes	
				Transcon- jugantes/ 0,1 ml	Concentra- ção paren- tal/ml	Transcon- jugantes/ 0,1 ml	Concentra- ção paren- tal/ml
0	-	x	-		$1,7 \times 10^9$		
	-	x	+		$1,0 \times 10^9$		
	+	x	+		$3,0 \times 10^9$		
	+	x	-		$2,2 \times 10^9$		
1	-	x	-	71	$8,0 \times 10^8$	190	$3,6 \times 10^7$
	-	x	+	125	$9,0 \times 10^8$	250	$4,0 \times 10^7$
	+	x	+	254	$8,0 \times 10^8$	295	$5,0 \times 10^7$
	+	x	-	140	$5,0 \times 10^8$	110	$4,4 \times 10^7$
3	-	x	-	340	$1,5 \times 10^9$	750	$5,0 \times 10^7$
	-	x	+	910	$2,2 \times 10^9$	730	$8,7 \times 10^7$
	+	x	+	211	$2,3 \times 10^9$	720	$8,0 \times 10^7$
	+	x	-	750	$1,7 \times 10^9$	550	$7,3 \times 10^7$

^{1/} Dados do 1º grupo de cruzamentos (realizados em caldo).

^{2/} As culturas parentais foram isoladamente centrifugadas a 8000 rpm, durante 10 minutos, antes de se procederem os cruzamentos em caldo.

Tabela 11 - Número de transconjugantes obtido através de cruzamentos entre linhagens com (+) e sem (-) motilidade, de *E. coli* K₁₂ doadoras e receptoras de plasmídeo R.

Incubação (horas)	Cruzamentos ^{1/} K ₁₂ x K ₁₂ (doa- (recep- dora) tora)			Nº de trans- conjugantes/ 0,1 ml	Concentração parental/ml
0	-	x	-		3,5 x 10 ⁷
	-	x	+		7,0 x 10 ⁷
	+	x	+		6,0 x 10 ⁷
	+	x	-		4,5 x 10 ⁷
1	-	x	-	1	
	-	x	+	0	
	+	x	+	8	
	+	x	-	6	
3	-	x	-	0	1,0 x 10 ⁸
	-	x	+	0	2,0 x 10 ⁸
	+	x	+	2	1,5 x 10 ⁸
	+	x	-	4	1,0 x 10 ⁸

^{1/}Dados do 2º grupo de cruzamentos, conforme item 4.2.2.5.

6. DISCUSSÃO

6.1. Obtenção de mutantes para motilidade e de transconjugantes

Os mutantes para motilidade foram essenciais ao desenvolvimento deste trabalho. *IINO e ENOMOTO (1971)* consideraram o método da placa adequado tanto para a obtenção dos mutantes como para a comparação entre motilidade de diferentes linhagens, através da medida dos halos de movimento (swarms).

Obtiveram-se mutantes sem motilidade a partir das linhagens móveis de *E. coli* BH 100, K₁₂ 712R e K_{12.3}. Além disso, houve necessidade da obtenção de mutantes de maior motilidade a partir das linhagens móveis de *E. coli* K₁₂ citadas acima, de tal modo que se aproximassem mais do padrão da *E. coli* BH 100, que apresenta deslocamento de 13 mm/hora. Esse valor corresponde ao aumento do diâmetro do halo de movimento, por hora, em meio triptonado semi-sólido 0,3% (Tabela 2). Os mutantes obtidos K_{12.1} e K_{12.3.1} atingiram a velocidade de 11 mm/hora. A partir daí nenhum incremento adicional foi observado. Talvez o método tenha sido inadequado pois sabe-se que em *E. coli* existem muitos genes envolvidos com a motilidade (*SILVERMAN e SIMON, 1973 e 1977; IINO, 1977*).

Não foi possível estabelecer comparação dos dados aqui obtidos com outros da literatura, devido às variações nas condições de estudo. Por exemplo, *FRÈRE (1977)* mencionou que uma célula de *E. coli* pode atingir na água a velocidade de 20 μ m por segundo. A motilidade considerada por esse autor é celular e o meio é constituído pela água. No presente trabalho a motilidade é clonal e o meio usado era semi-sólido adicionado de triptona. Deve ser lembrado ainda que os mutantes móveis obtidos pelo método da placa possuem obrigatoriamente quimiotaxia positiva para substâncias metabolizáveis (*ADLER, 1966b*). Em outras palavras, culturas bacterianas constituídas por células comprovadamente móveis em meio líquido, só formam halos de movimento no meio semi-sólido se for adicionada a ele uma substância atraente metabolizável. Após a adição desse atraente forma-se o gradiente indispensável ao deslocamento celular. Assim sendo, bactérias que não formam halos de movimento no meio semi-sólido adicionado de nutrientes não são obrigatoriamente "mutantes sem motilidade", podendo tratar-se de mutantes quimiotáticos generalizados (*ARMSTRONG e col., 1967*), ou mesmo específicos (*HAZELBAUER e col., 1969*). Outro inconveniente que pode surgir do emprego do método da placa é a obtenção de mutantes com maior ou menor taxa de divisão celular, ao invés de mutante de maior ou menor motilidade. Considerando as razões apresentadas, mutantes obtidos pelo método da placa devem ser caracterizados por outros processos, como por exemplo, pela observação microscópica através da gota pendente, como aconteceu no presente trabalho. Por essa técnica observa-se que as culturas constituídas por células imóveis apresentam apenas movimento Browniano, enquanto as células móveis mostram agitação característica e deslocamentos rápidos. Esse método permite distinguir, grosseiramente, linhagens de diferentes motilidades.

Apesar do uso do método da placa não permitir

a distinção imediata entre mutantes para motilidade e quimio-táticos, todos os mutantes obtidos no presente trabalho estavam relacionados com motilidade, como foi observado, ao microscópio. Outros métodos indicados por *IINO e ENOMOTO*(1971) também se prestam à obtenção desses mutantes. Um deles requer "fago flagelo-móvel-específico", para obtenção de mutantes imóveis. Num outro método faz-se uso de anti-soro H. Esse método permite a obtenção de mutantes móveis a partir de linhagem que possui movimento mas, que não apresenta antígenos flagelares homólogos.

Existem dezenas de trabalhos descrevendo métodos para se medir com segurança a motilidade bacteriana, citando-se entre outros *SHOESMITH* (1960), *ADLER e DHAL* (1967), *SEGEL e col.* (1977) e *ARMITAGE e col.* (1977). Entretanto, o método da gota pendente atendeu às necessidades do presente trabalho que dependia apenas de dados comparativos. Cuidados especiais tiveram de ser tomados ao se usarem os mutantes mencionados devido à presença de possíveis revertentes, ou sejam: comprovação dos padrões de motilidade desses mutantes antes, durante e após alguns ensaios; estocagem dos mutantes sem motilidade em meio que continha 1,5% ou mais de ágar, para não permitir que possíveis revertentes fossem selecionados. Outras precauções foram tomadas ao se considerar que a motilidade é extremamente afetada por fatores do meio ambiente, tais como viscosidade, temperatura, pH e nutrientes (*ADLER e TEMPLETON*, 1967; *IINO e ENOMOTO*, 1971; *SCHNEIDER e DOETSH*, 1977). Além desses fatores, outros são citados na literatura. Assim, observou-se que um plasmídio R foi capaz de inibir a motilidade de uma linhagem de *E. coli* (*BOHLIN e BURMAN*, 1977) enquanto outro aumentou a motilidade de *Proteus* (*HESSLEWOOD e SMITH*, 1974). Observou-se ainda, a influência de algumas drogas antimicrobianas, como canamicina e hetacilina, que diminuíram a motilidade (ou quimiotaxia) da *E. coli* BH 100, em meio tripto

nado semi-sólido (*CHARTONE-SOUZA, não publicado*).

Finalmente, deve ser relatado que durante a obtenção dos mutantes com e sem motilidade encontraram-se no estoque da cultura da *E. coli* K₁₂ 712R duas populações de células; uma apresentando motilidade maior (8 mm/hora) e outra menor (3 mm/hora), quando incubadas em meio triptonado semi-sólido. As duas populações mantiveram-se durante o crescimento em meio líquido.

Após a obtenção de linhagens K_{12.1} e K_{12.2}, respectivamente com e sem motilidade, essas foram cruzadas com a *E. coli* BH 100 doadora de plasmídeo R. Com isso obtiveram-se quatro linhagens, todas derivadas da *E. coli* K₁₂ 712R; duas doadoras (K_{12.1.1} e K_{12.2.1}) e duas receptoras (K_{12.3.1} e K_{12.3.2}) com e sem motilidade, respectivamente. Essas linhagens foram essenciais para a investigação da quimiotaxia pelo método da conjugação.

Após essa discussão conclui-se que o método da placa, com meio triptonado semi-sólido, prestou-se para a obtenção dos mutantes sem motilidade e com maior motilidade. Na obtenção de linhagens K_{12.1} e K_{12.3.1} o aumento da motilidade foi limitado não ultrapassando certa velocidade. As linhagens receptoras de plasmídeo R foram convertidas em doadoras, através da conjugação com a *E. coli* BH 100.

6.2. Interações quimiotáticas entre linhagens de *E. coli* com tipos de reação sexual opostos, em meio triptonado semi-sólido

Os resultados das pesquisas sobre interações entre linhagens de *E. coli* de tipos de reação sexual opostos, em

meio triptonado semi-sólido, serão aqui discutidos de uma maneira global, tendo em vista a presença de uniformidade entre dois grupos de dados obtidos, conforme pode ser observado nas Figuras e Tabelas apresentadas. Os resultados permitem delinear dois modelos de interações: um simétrico, próprio das interações entre linhagens do mesmo tipo de reação sexual e outro assimétrico característico das interações entre linhagens de tipos de reação sexual opostos.

Apenas um trabalho, o de *BEZDEK e SOSKA (1972)*, trata dessas interações quimiotáticas. Os resultados obtidos por esses autores serão discutidos adiante.

ADLER (1966a) observou que células de linhagens móveis de *E. coli*, depositadas sobre meio triptonado semi-sólido, formavam três ou mais halos de movimento. Cada halo continha células de diferentes regimes metabólicos. Observou-se que cada um deles se originava de células do depósito. Em algumas linhagens foi observado, através do uso de aminoácidos marcados com carbono 14, que o primeiro halo formado consumia mais de 99% da serina e, de 90 a 95% do oxigênio disponível. Esse halo caminhava por toda a espessura do meio. O segundo halo encontrava condições já alteradas e caminhava na superfície do meio, onde existia oxigênio disponível. Esse halo consumia 90% do ácido aspártico, um aminoácido que só pode ser usado aerobicamente. O terceiro halo caminhava sob o meio e consumia anaerobicamente mais de 99% de treonina. Outros cinco aminoácidos oxidáveis, praticamente, não foram usados. Quando duas suspensões da mesma linhagem foram depositadas em dois locais de uma mesma placa os halos correspondentes de cada depósito paravam de crescer ao se encontrarem, provavelmente devido à ausência de algum aminoácido na área já ocupada pelos outros.

No presente trabalho, os mesmos resultados fo-

ram obtidos quando se inocularam suspensões de células móveis de *E. coli*, de mesmo tipo de reação sexual, em dois pontos de uma mesma placa com meio triptonado semi-sólido. As figuras formadas pelas duas suspensões, após o encontro dos respectivos halos, apresentaram-se simétricas em todos os estágios observados, conforme atestam as Figuras 2 (a,b,c,d,e), 5(a,b) e 6(a,b). Entretanto, quando as culturas inoculadas eram de tipos de reação sexual opostos, isto é, doadoras e receptoras de plasmídeo R, as figuras formadas após o encontro dos halos das duas linhagens apresentavam acentuada assimetria. Essa assimetria se manifestava através da formação de bandas quimiotáticas pelas linhagens doadoras. Essas bandas eram formadas pelas linhagens doadoras e se dirigiam para os locais de maiores concentrações celulares das linhagens receptoras. Outro fato interessante é que elas se formavam, principalmente, a partir da periferia do segundo halo da linhagem doadora mas só iniciavam sua formação após o encontro dos halos externos das duas linhagens. O halo externo apenas esboçava o início da formação da banda. A necessidade do encontro dos primeiros halos (externos) para dar início à formação de bandas quimiotáticas leva a se pensar no envolvimento de um possível mecanismo indutivo em sua formação. A Figura 6 (a,b,c,d,e f) mostra a sequência de formação de uma banda quimiotática na interação das linhagens $K_{12.1.1}$ (doadora) e $K_{12.3.1}$ (receptora). As fotografias correspondentes à Figura 2 (b,c) também ilustram esse fato. O mesmo tipo de interação foi observado entre as linhagens *E. coli* $K_{12.1.1}$ e $K_{12.1}$ conforme Figura 5f. Deve ser lembrado que as linhagens $K_{12.1.1}$ e $K_{12.1}$ são isogênicas, o que valoriza os dados encontrados. Em adição deve ser mencionado que essas bandas quimiotáticas estavam também presentes nas interações entre a linhagem doadora *E. coli* BH 100 e as receptoras $K_{12.1}$ e $K_{12.3.1}$. Embora a forma apresentada pela banda da *E. coli* BH 100 não fosse a mesma da banda constituída pela linhagem $K_{12.1.1}$, ela também originava-se prin-

cipalmente do segundo halo da linhagem doadora e caminhava em direção da maior concentração de células da receptora, fundindo-se com o segundo halo formado por essa última linhagem. A Figura 5c mostra, além disso, que o terceiro halo da linhagem BH 100 também emite uma banda. Essa também caminhava em direção à receptora.

Os mesmos ensaios realizados com linhagens doadoras e receptoras de plasmídeo R, cujos resultados já foram discutidos parcialmente, foram também realizados com as linhagens *E. coli* Hfr C e W 1177/6 (receptora). Os resultados foram semelhantes aos descritos anteriormente quanto à simetria e assimetria encontradas, mas durante a formação da banda quimiotáctica era o halo externo (1º halo) da doadora que se deformava e parecia invadir os domínios da linhagem receptora. As Figuras 3c e 4f ilustram esse fato.

Os resultados obtidos com as linhagens não isotônicas *E. coli* Hfr C e W 1177/6 são semelhantes aos relatados por BEZDEK e SOSKA (1972) que trabalharam apenas com linhagens não isotônicas de *Salmonella typhimurium*. Entretanto, esses pesquisadores observaram que mesmo antes do encontro dos halos formados pelas duas linhagens, as células Hfr moviam rapidamente formando uma banda que se dirigia, preferencialmente, para o ponto em que as células receptoras estavam mais concentradas. Observaram ainda que esse fenômeno não ocorria em meio pobre de aminoácidos. Para explicar a presença de atração os autores sugeriram duas possibilidades: 1) linhagens Hfr poderiam usar certos produtos atraentes da linhagem F⁻, sem nenhuma implicação com o tipo de reação sexual; 2) as linhagens F⁻ produziam um atrante que seria reconhecido especificamente pelas linhagens Hfr. Pela primeira hipótese, o efeito poderia depender das diferentes linhagens de Hfr e F⁻ usadas.

Para explicar a presença de bandas quimiotácticas observadas no presente trabalho as mesmas possibilidades

sugeridas por *BEZDEK e SOSKA (1972)* poderiam ser aventadas. Entretanto, considerando-se que em parte deste trabalho foram usadas linhagens isogênicas de *E. coli* K₁₂, maior ênfase poderia ser dada à segunda hipótese, uma vez que a diferença entre elas era dada apenas pela presença do plasmídeo R. Assim, parece que a linhagem receptora excretaria uma substância atraente que se difundiria no meio. A linhagem doadora reconheceria essa substância através da presença de quimiorreceptores específicos e se locomoveria na direção do gradiente de maior concentração dessa substância, que deve corresponder ao local do inóculo ou depósito da linhagem receptora.

Foi mencionado, ao se fazer uso das linhagens de *E. coli* portadoras de plasmídeo R durante os ensaios de interação entre linhagens doadoras e receptoras, que as bandas quimiotáticas se originavam principalmente do segundo halo da cultura doadora e só se esboçavam no halo mais externo (1º halo). Nas linhagens de *E. coli* estudadas por *ADLER (1966a)*, o segundo halo descrito era constituído por células que metabolizavam cerca de 90% do ácido aspártico. Estaria esse aminoácido implicado na formação da banda quimiotática mencionada?

Para justificar a formação dessas bandas quimiotáticas, preferencialmente, a partir do segundo halo da linhagem doadora de plasmídeo R, poderia ser sugerida a seguinte hipótese: o segundo halo (e aqueles mais internos) deve ser constituído por maior número de células com pili do que o halo externo. Essa possibilidade é justificável porque sabe-se que os plasmídios R são encontrados normalmente no estado reprimido e assim só parte da população celular possui pilus (*SANDERSON, 1974*). Isso poderia acontecer porque a maior parte do oxigênio foi consumido durante a formação do halo externo (*ADLER, 1966a*) e em ambientes pobres de oxigênio há maior

formação de pili (*CURTIS III, 1969*). Células com pili devem encontrar maior dificuldade para se locomoverem em meio semi-sólido e assim se concentrariam no 2º halo e naqueles mais internos. Como se sabe, essas estruturas são inertes e várias vezes maiores do que o corpo celular (*BRINTON, 1965*). Finalmente, se o plasmídeo R no estado desreprimido é capaz de sintetizar pilus (*SANDERSON, 1974*), é razoável supor que ele possa também sintetizar um quimiorreceptor hipotético que reconheceria uma substância excretada pela linhagem receptora. Por outro lado, a formação de bandas quimiotáticas apenas se esboça no halo externo porque ele seria constituído, em maior parte, por células desprovidas de pili, portanto com o plasmídeo R reprimido. Como se sabe, o pilus é essencial para a conjugação, não se formando pares específicos na ausência delas (*BRINTON, 1965*).

O maior acúmulo de células com pilus no halo interno, quando comparadas com o halo externo, poderia também ser justificado apenas pela maior velocidade de locomoção das células sem pilus, sem a necessidade do envolvimento do ambiente anaeróbico acima mencionado. Por outro lado, sabe-se que o plasmídeo F é encontrado normalmente desreprimido. Assim, toda ou quase toda a população de células de uma linhagem portadora desse plasmídeo possui pilus (*SANDERSON, 1974; MITSUHASHI e col., 1976*). Diante desses dados, a hipótese sugerida anteriormente poderia também explicar a formação de bandas quimiotáticas a partir do halo externo (primeiro halo) nas interações entre linhagens de *E. coli* Hfr e F⁻, obtidas no presente trabalho, e aquelas observadas por *BEZDEK e SOSKA (1972)* nas linhagens Hfr e F⁻ de *Salmonella typhimurium*. A formação das bandas, a partir do halo externo, torna-se-ia possível porque as células constituintes estariam aptas a perceber a presença da substância excretada pela linhagem F⁻.

DUNNY e col. (1978) obtiveram dado interessan

te trabalhando com *Streptococcus faecalis*. Eles descobriram um agente excretado pela célula receptora, que possuía a capacidade de aglutinar células portadoras de plasmídeo conjugativo. Denominaram de CIA essa substância ("Clumping Inducing Agent"). Embora essa substância não seja um exemplo de um atraente representa de qualquer forma, uma descoberta importante para o esclarecimento do processo conjugativo entre bactérias. Na literatura existem diversos trabalhos realizados com *E. coli*, onde têm sido observados agregados celulares durante o fenômeno conjugativo. Entre esses citam-se (ACHTMAN, 1975; ECKERSON e REYNARD, 1977; ACHTMAN e COL., 1978). Substância semelhante à CIA poderá estar envolvida com a formação desses agregados.

Para finalizar, deve ser mencionado que a possível descoberta de quimiotaxia entre linhagens bacterianas de tipos de reação sexual opostos não evidencia uma exceção e sim uma regra, pois a presença de feromônios sexuais está bem estabelecida em grande número de espécies pertencentes tanto aos grupos inferiores quanto aos grupos superiores da escala evolutiva, como atestam, entre outros, RAWITSCHER-KUNKEL e MACHLIS (1962); MACHLIS (1966); LAW e REGNIER (1971); HOUILLON (1972); SHORER (1976); KOGAN (1977); CRANDAL e col. (1977).

Os resultados aqui discutidos, isto é, presença de interações simétricas entre linhagens de mesmo tipo de reação sexual, e de interações assimétricas, com formação de bandas entre linhagens com tipos de reação sexual opostos, permitem sugerir que: 1) há indícios de que as células das linhagens receptoras excretam uma substância atraente que é detectada especificamente pelas células das linhagens doadoras; 2) as células da linhagem doadora ao reconhecerem essa substância se locomovem através de seu gradiente, em direção ao local de maior concentração da célula receptora.

6.3. Uso de filtrados pelo método da diluição em placa e método quantitativo de PFEFFER

Os diâmetros dos halos de quimiotaxia das linhagens BH 100 e $K_{12.1}$ frente aos filtrados das culturas das linhagens BH 100, $K_{12.1}$ e $K_{12.1.1}$, diluídos em meio triptonado semi-sólido, não mostraram diferenças no comportamento quimiotático (Tabela 4). Nos experimentos onde os filtrados não foram submetidos ao aquecimento observou-se que a linhagem BH 100 apresentou comportamento semelhante tanto frente ao seu próprio filtrado como frente aos filtrados das linhagens $K_{12.1}$ e $K_{12.1.1}$. O mesmo fato aconteceu com a linhagem $K_{12.1}$. Porém, quando se compara a ação dos diversos filtrados, percebe-se que o filtrado da linhagem $K_{12.1.1}$ possui um poder de atração ligeiramente superior aos dos outros filtrados, tanto para a linhagem BH 100 como para a *E. coli* $K_{12.1}$. Resultados semelhantes foram obtidos quando os filtrados foram submetidos ao aquecimento. Entretanto, quando se compara a ação dos filtrados aquecidos e não aquecidos nota-se que aqueles submetidos ao aquecimento possuem maior poder de atração para ambas linhagens BH 100 e $K_{12.1}$. Quando a linhagem BH 100 foi inoculada em meio semi-sólido de sais e glicerol adicionados dos filtrados acima mencionados, nenhuma atração especial foi também evidenciada (Tabela 5). Nesse caso porém, filtrados submetidos ao aquecimento não aumentaram seu poder de atração para a linhagem BH 100.

Através da análise dos dois ensaios (Tabelas 4 e 5), observa-se que os filtrados adicionados tanto no meio triptonado semi-sólido, como no meio semi-sólido de sais e glicerol, aumentam a velocidade de expressão dos halos quimiotáticos, quando se compara com os controles constituídos pelos meios de cultivo desprovidos de qualquer filtrado. Essa diferença é maior no ensaio onde se usou meio semi-sólido de

sais e glicerol, pois na placa controle praticamente não houve formação de halo quimiotático, uma vez que o glicerol não funciona como atraente embora seja metabolizado pela *E. coli* (ADLER e TEMPLETON, 1967); o valor mencionado de 8 mm corresponde ao diâmetro do inóculo da linhagem BH 100.

Através dos resultados obtidos e relacionados nas Tabelas 4 e 5, podem ser sugeridas quatro hipóteses: 1) o método não apresenta sensibilidade para a detecção de um possível atraente sexual em *E. coli*, em virtude da interferência de outras substâncias metabolizáveis contidas nos filtrados e possuidoras de maior poder de atração quimiotática; 2) essa possível substância atraente pode estar presente e não ser detectada, por não ser metabolizada pela *E. coli*, não levando então à formação do gradiente necessário à quimiotaxia (ADLER, 1966B); 3) a possível substância atraente pode ser induzível e assim não estaria presente, uma vez que os filtrados foram preparados a partir de culturas sem qualquer contato anterior com culturas do sexo oposto; 4) não existe tal substância sexo atraente nas linhagens de *E. coli* estudadas.

Assim como foi observado nos dois ensaios precedentes, onde foram usados filtrados, o método quantitativo de PFEFFER (ADLER, 1969 e 1973) também não evidenciou diferenças quimiotáticas entre as linhagens de *E. coli* BH 100, K_{12.1} e K_{12.1.1} frente aos filtrados de cada uma delas (Tabela 6). Quatro explicações poderiam ser propostas para os resultados obtidos, sendo que três delas já foram mencionadas durante a discussão dos resultados anteriores, isto é, as que receberam os números 1, 3 e 4. A outra explicação para os resultados encontrados estaria relacionada com o erro técnico, já que o método é bastante exigente quanto ao controle de um número grande de variáveis. Por exemplo, foi usada micropipeta de 5 µl ao invés de 1 µl o que pode ter diminuído muito a eficiência do método (ADLER, 1973).

6.4. Estudo de quimiotaxia através do número de transconjugantes formado nos cruzamentos de *E. coli* com e sem motilidade

A obtenção dos mutantes com e sem motilidade, assim como dos transconjugantes, no início deste trabalho, foi essencial ao desenvolvimento do ensaio cujos resultados serão agora discutidos. O "método da conjugação" foi usado como uma tentativa de evidenciar algum comportamento quimiotático, entre linhagens com tipos de reação opostos, em culturas mistas. O método fundamentou-se na frequência de transferência do plasmídeo R, nos diversos cruzamentos realizados entre linhagens com e sem motilidade. Esse plasmídeo foi escolhido para a realização deste experimento devido a rápida manifestação fenotípica de alguns de seus marcadores genéticos (*CURTISS III e col.*, 1968).

A frequência de formação de transconjugantes foi aqui considerada como uma indicação da formação de pares específicos. Esse tipo de abordagem foi usado, entre outros por *NELSON (1951)*, *HAYES (1957)*, *FISHER (1957)*, *BRINTON (1965)*, *CURTISS III e col. (1968)*, *NOVOTNY e col. (1968)*, que consideraram a formação de recombinantes como uma indicação da formação de pares específicos, formação de pares efetivos e transferência do cromossomo. Entretanto, *CURTISS III e col. (1968)* sugeriram que era preferível usar, sempre que possível, indicadores que não requeressem integração no cromossomo da célula receptora. Portanto, o uso da frequência de transferência do plasmídeo R parece estar adequado aos propósitos deste trabalho. Entretanto, *WALMSLEY (1973)* relatou que o uso dos recombinantes, como uma indicação da formação de pares celulares durante a conjugação, apresenta grande sensibilidade, mas não fornece medidas absolutas e sim relativas ou proporcionais. Esse pesquisador, usando processo físico para estudar

a formação de pares celulares durante a conjugação, observou que apenas uma fração pequena das células "femininas" era competente num determinado tempo. Vale a pena mencionar que a partir dos trabalhos pioneiros de NELSON (1951), HAYES (1957) e FISHER (1957), concluiu-se que o número de recombinantes formados dependia de contatos ao acaso entre as células doadoras e receptoras e esses ~~dependiam~~ da densidade das células parentais e do tempo de incubação da cultura mista. Entretanto, nesses estudos da cinética da conjugação e em outros realizados posteriormente, não foi encontrada qualquer menção à presença ou ausência de motilidade nas linhagens conjugantes.

Para a discussão dos resultados do presente ensaio esses serão divididos em dois grupos. O primeiro grupo englobando os resultados obtidos pelos cruzamentos das linhagens doadoras *E. coli* BH₂100 (com motilidade) e *E. coli* 100.1 (imóvel) com as linhagens *E. coli* K₁₂.1 (com motilidade) e *E. coli* K₁₂.2 (imóvel). O segundo grupo é constituído pelos cruzamentos das linhagens doadoras *E. coli* K₁₂.1 (com motilidade) e *E. coli* K₁₂.2.1 (imóvel) com as linhagens receptoras *E. coli* K₁₂.3 (com motilidade) e K₁₂.3.1 (imóvel). As linhagens constituintes do segundo grupo derivaram, em última análise, da *E. coli* K₁₂ 712R.

A Tabela 7 e Figura 7 mostram os resultados do primeiro experimento, do primeiro grupo de cruzamentos. Observa-se que nos dois primeiros períodos de incubação (1 e 6 horas) o melhor número de transconjugantes concentrou-se nos cruzamentos das linhagens de *E. coli* K₁₂ com (+) e sem (-) motilidade com a linhagem *E. coli* BH 100 com motilidade (+). Para simplificar, os sinais + e - serão usados nesta discussão significando "com motilidade" e "sem motilidade", respectivamente. Nos cruzamentos de BH 100 - com K₁₂ + e K₁₂ - observou-se um número muito menor de transconjugantes. Resultados coerentes

foram observados tanto nas culturas em caldo como em meio semi-sólido. A mesma coerência foi encontrada, quando as culturas mistas foram diluídas 100 vezes. O uso de diluições das culturas mistas é essencial nos estudos da cinética da conjugação (NELSON, 1951; HAYES, 1957; HAAN e GROSS, 1962). Por outro lado os meios semi-sólidos ou viscosos são mais usados nos estudos da motilidade bacteriana de um modo geral (GREEMBERG e CANALE-PAROLA, 1977b). Os resultados deste experimento indicam que nos períodos de 1 e 6 horas de incubação, tanto nas culturas diluídas como naquelas não diluídas, a frequência de formação de transconjugantes está positivamente correlacionada com a motilidade das células doadoras. Indicam ainda que a motilidade das células receptoras parece ter menor influência de formação dos transconjugantes. Vale a pena lembrar, entretanto, que a linhagem receptora aqui usada era dotada de motilidade um pouco menor quando comparada com a motilidade da célula doadora (Tabela 2), apesar do ~~empenho~~ em se tentar obter um mutante de mesma motilidade, conforme discutido anteriormente no item 6.1. Quando se incubaram as culturas mistas durante 18 horas houve uma tendência no sentido da equiparação do número de transconjugantes nos diversos cruzamentos, com exceção daquele realizado em caldo entre as linhagens BH 100 e K₁₂, ambas sem motilidade, que continuou apresentando o menor número de transconjugantes. Não existe uma explicação simples para justificar esse último resultado, uma vez que nos períodos longos de incubação de culturas mistas variáveis incontrolláveis podem estar presentes. À primeira vista poderia ser sugerido que as linhagens doadoras e receptoras imóveis possuem respectivamente, menor capacidade de transferir ou de receber o plasmídeo R. Mas essa idéia pode ser abandonada tendo em vista que se observou formação normal de transconjugantes nos cruzamentos das linhagens BH 100 - com K₁₂ + e BH 100 + com K₁₂ -. Outro dado importante nessa discussão é que as linhagens BH 100 + e BH 100 - assim como K₁₂ + e K₁₂-

são isogênicas entre si. Para evitar interferência de variáveis incontrolláveis, outros autores usaram menores períodos de incubação (*NELSON, 1951; HAYES, 1957; CURTISS III, 1968*), nos estudos da cinética da conjugação, principalmente quando se tratava de transferência de cromossomos bacterianos.

Resultados proporcionais ao do primeiro experimento foram encontrados quando se usaram menores concentrações de células parentais nas culturas mistas, como pode ser observado na Tabela 8. Todavia, no cruzamento de BH 100 + com $K_{12}+$ encontrava-se maior número de transconjugantes que no cruzamento de BH 100 + com $K_{12}-$, nos períodos de 3 e 6 horas de incubação. Neste experimento e nos subsequentes os cruzamentos foram realizados apenas em caldo já que esse meio mostrou-se tão sensível como o meio semi-sólido na detecção de diferenças durante os cruzamentos de linhagens com e sem motilidade. Também foi abolido o período de incubação de 18 horas, tendo em vista justificativa apresentada anteriormente.

Quando se usaram maiores concentrações de células parentais nas culturas mistas, quando comparadas com as concentrações anteriores, os resultados foram diferentes (Tabela 9 e Figura 8). Neste caso houve grande equivalência entre o número de transconjugantes formado nos diversos cruzamentos. No período de uma hora de incubação o número de transconjugantes foi praticamente o mesmo nos quatro cruzamentos. Isso aconteceu provavelmente devido aos choques ao acaso, entre as células doadoras e receptoras, provocados pela agitação durante a fase inicial de preparação das culturas mistas. Portanto os resultados foram indiferentes à presença ou ausência de motilidade das linhagens doadoras e receptoras. Os dados parecem indicar que à medida que se aumenta a concentração das células parentais nas culturas mistas maior é a atuação do acaso nos encontros entre as células doadoras e receptores.

ras. Nesses casos parece que a motilidade das células parentais não teria nenhuma influência no número de transconjugantes observados. Entretanto, no período de incubação de 3 horas o número de transconjugantes observado foi maior no cruzamento das linhagens de *E. coli* BH 100 + com K₁₂ + do que nos outros cruzamentos. Deve ser acrescentado que após a agitação inicial, durante a preparação das culturas mistas, tomou-se o máximo cuidado para não se agitarem os frascos que continham essas culturas.

Resultados semelhantes foram encontrados quando se usaram maiores concentrações de células parentais que no experimento precedente (Tabela 10). Mais uma vez o cruzamento entre linhagens de *E. coli* BH 100 + com K₁₂ + produziu maior número de transconjugantes. Resultados interessantes foram observados quando se examinou o número de transconjugantes das culturas mistas diluídas 100 vezes: no período de incubação de uma hora o número de transconjugantes formado foi tão grande como nas culturas mistas que não sofreram quaisquer diluições. Esse dado pode ser explicado pela formação de grandes agregados celulares entre doadoras e receptoras nas culturas mistas que não sofreram diluição (ACHTMAN, 1975; ECKERSON e REYNARD, 1977). Nesse caso, o número de transconjugantes produzidos pelas culturas que não sofreram diluição pode ter sido subestimado, uma vez que muitos deles poderiam estar juntos em apenas um agregado e este ter sido transferido para a placa seletora sem ser desorganizado inteiramente. Essa explicação é razoável uma vez que a transferência de alíquotas das culturas mistas era feita, após agitação manual dos frascos, para as placas seletoras diretamente ou depois de uma ou duas diluições no máximo em solução salina. Para esses casos, onde estão presentes grandes concentrações de células na cultura mista, as técnicas mais indicadas para desfazer agregados e interromper a conjugação seriam as de LOW e WOOD (1965)

e de ZIPKAS e RILEY (1976). Os resultados deste experimento outra vez mostraram que em grandes densidades de células parentais o papel da motilidade é pequeno quando comparado com os experimentos onde se usaram menores densidades de doadoras e receptoras na cultura mista. Entretanto, deve ser observado que no cruzamento das linhagens *E. coli* BH 100+ com *E. coli* K₁₂+ mais uma vez apareceu maior número de transconjugantes que nos outros cruzamentos.

Os cruzamentos entre as linhagens de *E. coli* K₁₂, isto é, K₁₂ + e K₁₂ - (doadoras) com K₁₂ + e K₁₂ - (receptoras), produziram pequeno número de transconjugantes, como pode ser observado na Tabela 11. Apesar disso, esse pequeno número mostrou proporcionalidade quando comparado com os dados observados nos cruzamentos das linhagens de *E. coli* BH 100 (doadoras) com *E. coli* K₁₂ (receptoras), presentes nas Tabelas 7 e 8. Mais uma vez o maior número de transconjugantes foi encontrado nos cruzamentos onde o doador possuía motilidade. Resultados semelhantes, também apresentando pequeno número de transconjugantes, foram obtidos em duas repetições desse experimento. Várias explicações podem ser dadas para esse fato: o meio seletivo para os transconjugantes continha 150 µg/ml de rifamicina e essa droga, além de funcionar como inibidora da transferência de plasmídeo, poderia neste caso estar funcionando como agente inibidor ou agente de cura; os plasmídeos encontrados se encontram em estado muito reprimido e desta maneira transferem-se em baixa frequência.

Os resultados dos diversos experimentos de conjugação indicam que, nas menores concentrações das culturas mistas, o maior número de transconjugantes está correlacionado diretamente com a presença de doadores dotados de motilidade. Isso pode ser o início da presença de uma substância atraente excretada pela receptora e detectada especificamente pelas células doadoras. Contudo, em alguns cruzamentos, onde

as células receptoras também possuíam motilidade o número de transconjugantes foi maior ainda. É razoável supor que a presença de motilidade na receptora deve aumentar a chance de choques ao acaso. Mas será que as células receptoras também teriam um papel ativo procurando as células doadoras?

Após a discussão de todos os resultados obtidos no presente trabalho algumas considerações finais podem ser feitas.

Investigou-se em *E. coli* a possível presença de quimiotaxia entre linhagens de tipos de reação sexual opostos, através de vários métodos. Pelo uso do método da placa, com meio triptonado semi-sólido, observou-se que as figuras formadas pelo encontro dos halos de duas linhagens com o mesmo tipo de reação sexual eram sempre simétricas, sem formação de bandas quimiotáticas. Todavia, as figuras formadas pelo encontro dos halos de duas linhagens com tipos de reação sexual opostos apresentaram-se sempre assimétricas, com formação de bandas quimiotáticas pelas linhagens doadoras. Observou-se ainda, que essas bandas se dirigiam para os locais de maior concentração das células receptoras. Esses resultados permitem sugerir que as células receptoras excretam uma substância atraente que é detectada especificamente pelas células doadoras. Para isso, as células doadoras devem possuir quimiorreceptores específicos para essa possível substância. Sugere-se além disso que a aquisição ou perda de um plasmídeo faz com que a célula deixe de produzir ou passe a produzir a referida substância, respectivamente.

Nos experimentos de conjugação, observou-se correlação positiva entre número de transconjugantes e motilidade das células doadoras nas culturas mistas de menor densidades de células parentais. Esses resultados levam praticamente às mesmas sugestões anteriores: deve existir uma substân-

cia atraente produzida pelas células receptoras e detectadas pelas células doadoras.

Dois outros resultados devem ser mencionados:- formação de bandas quimiotáticas só após o encontro dos halos externos das culturas doadoras e receptoras, nos experimentos de interação; e ausência de resposta quimiotática nos experimentos onde se usaram filtrados das culturas doadoras e receptoras. Esses dois resultados parecem indicar que, caso exista uma substância atraente, ela provavelmente estaria submetida a um mecanismo indutivo de regulação.

Finalmente, deve ser considerado que a presença de uma substância sexo-atraente aumentaria a probabilidade do contato entre células de tipos de reação sexual opostos. Essa atração específica poderia desempenhar importante papel no habitat natural da *E. coli*, onde ela convive com centenas de outras espécies de microrganismos.

O presente trabalho deve ser considerado como uma abertura para futuras pesquisas. Investigações estão em andamento tanto em *E. coli* como em outras enterobactérias, uma vez que são comuns nesse grupo os cruzamentos interespecíficos ou mesmo intergenéticos. Outra abordagem para futuras pesquisas poderia ser a procura de um agente que neutralizasse o efeito dessa substância atraente. Após isso, poder-se-ia tentar diminuir "in vivo" a frequência de transferência do material genético das células doadoras para as receptoras, o que teria implicação com a terapêutica através de drogas antimicrobianas, uma vez que o plasmídeo R é o veículo da resistência múltipla transferível.

7. SUMMARY

The chemotaxis role among strains of opposite sexual types was investigated in the bacterium *Escherichia coli*.

Two strains were mainly used to reach this objective: A donor carrying an R plasmid (BH 100) and a recipient (K₁₂ 712R), as well as motility mutants and transconjugants derived from them.

A first method, using Petri dishes with semisolid medium, permitted the study of the interactions among strains by the figures formed by their growth halos. These figures were always assymmetric between strains with different sexual types regardless if they were isogenic or not. On the other hand, strains with the same sexuality formed symmetric figures. The asymmetry was due to the presence of chemotactic bands from the donor strains growing in direction to the highest cell concentration of the recipient strains.

Through a second process, the conjugation method, a positive correlation between the number of transconjugants and higher motility of donor strains was obtained on low density of parental cells.

The obtained results suggested the presence of an attractive substance produced by recipient cells and specifically detected by donor cells. Since cell-free filtrates from donor or recipient cultures do not promote chemotactic response and since the chemotactic bands are only formed after contact of the external growth halos of donor and recipient strains, a possible inducible mechanism for the attractive substance production is also proposed.

8. LITERATURA CITADA

- ACHTMAN, M. 1973. Genetics of the F sex factor in enterobacteriaceae. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 60: 79-123.
- ACHTMAN, M., 1975. "Mating aggregates in *Escherichia coli* conjugation". *Journal of Bacteriology*, 123: 505-515.
- ACHTMAN, M., N. KENNEDY e R. SKURRAY, 1977. Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: Role of tra T protein in surface exclusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 74(11):5105-5108.
- ACHTMAN, M., M.S. WILLETTTS e A.J. CLARK, 1968. Mutants of the *E. coli* F-factor affecting its transfer. *Genetics*, 60: 157.
- ACHTMAN, M., N. WILLETTTS e A. J. CLARK, 1971. Beginning a genetic analysis of conjugational transfer determined by the F factor in *Escherichia coli* by isolation and characterization of transfer-deficient mutants. *Journal of Bacteriology*, 106: 529-538.
- ADELBERG, E.A. e S.N. BURNS, 1960. Genetics variation in the sex factor of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 79: 321-330.

- ADLER, J., 1966a. Chemotaxis in bacteria. *Science*, 153: 708-716.
- ADLER, J., 1966b. Effect of amino acids and oxygen on chemotaxis in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 92(1): 122-129.
- ADLER, J., 1969. Chemoreceptors in bacteria. *Science*, 166: 1588-1597.
- ADLER, J., 1973. A method for measuring chemotaxis and use of the method to determine optimum conditions for chemotaxis by *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 74: 77-91.
- ADLER, J., 1975a. The sensing of chemicals by bacteria. *Scientific American*, 234: 40-47.
- ADLER, J., 1975b. Chemotaxis in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 44: 341-356.
- ADLER, J. e M.M. DAHL, 1967. A method for measuring the motility of bacteria and for comparing random and non-random motility. *Journal of General Microbiology*, 46: 161-173.
- ADLER, J. e W. EPSTEIN, 1974. Phosphotransferase-system enzymes as chemoreceptors for certain sugars in *E.coli*. Chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 71: 2895-2899.
- ADLER, J., G.L. HAZELBAUER e M.M DAHL, 1973. Chemotaxis towards sugars in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 115(3): 824-847.
- ADLER, J. e B. TEMPLETON, 1967. The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 46: 175-184.
- AKSAMIT, R., D.E. KOSHLAND Jr., 1974. Identification of the ribose binding protein as the receptor for ribose chemotaxis in *Salmonella Typhimurium*. *Biochemistry*, 13: 4473-4478.

- ANDERSON, T.F., 1958. Recombination and segregation in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor symposia on Quantitative Biology*, 23: 47-58.
- ANDERSON, E.S., 1968. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 22: 131-180.
- ARMITAGE, J.P., D.P. JOSEY e D.G. SMITH, 1977. Simple quantitative method for measuring chemotaxis and motility in bacteria. *Journal of General Microbiology*, 102: 199-202.
- ARMSTRONG, J.B. e J. ADLER, 1967. Genetics of motility in *Escherichia coli*: Complementation of paralyzed mutants. *Genetics*, 56: 363-373.
- ARMSTRONG, J.B., J. ADLER e M. M. DAHL, 1967. Non chemotactic mutants of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 93: 390-398.
- ASWAD, D., D.E. KOSHLAND, Jr., 1974. Role of methionine in bacterial chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 118: 640-645.
- AVERY, O. T., C.M. MACLEOD e M. McCARTY, 1944. Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *Journal of Experimental Medicine*, 79: 137-158.
- BACHMANN, B.J., K.B. LOW e A.L. TAYLOR, 1976. Recalibrated linkage map of *Escherichia coli* k-12. *Bacteriological Reviews*, 40: 116-167.
- BEIJERINCH, M.W., 1893. Ueber atungsfiguren beweglicher bakterien. *Zentr. Bakteriöl. Parasitenk*, 14: 827-845. Apud: Adler, J., 1966a. Chemotaxis in bacteria. *Science*, 153: 708-716.
- BERG, H.C., 1974. Dynamic properties of bacterial flagellar motors. *Nature* (London), 249: 77-79.

- BERG, H.C., 1975. Bacterial behavior. *Nature* (London), 254: 389-392.
- BERG, H.C. e R.A. ANDERSON, 1973. Bacteria swim by rotating their flagella filaments. *Nature* (London), 245: 380-382.
- BERG, H.C. e D.A. BROWN, 1972. Chemotaxis in *E. coli* analyzed by three-dimensional tracking. *Nature* (London), 239: 500-504.
- BERG, H.C. e P.M. TEDESCO, 1975. Transient response to chemotactic stimuli in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 72:3235-3239.
- BEZDEK, M. e J. SOSKA, 1972. Sex-determined chemotaxis in *Salmonella typhimurium*. *Folia Microbiologica*, 17: 366-369.
- BOHLIN, T. e L.G. BURMAN, 1977. Influence on motility of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by a naturally occurring conjugative plasmid. *Journal of Bacteriology*, 130(2): 604-609.
- BONNER, J.T., 1977. Some aspects of chemotaxis using the cellular slime moulds as an example. *Mycologia*, 69(3): 443-459.
- BRINTON Jr., C.C. 1965. The structure, function, synthesis and genetic control of bacterial pili and a molecular model for DNA and RNA transport in gram-negative bacteria. *Transactions of the New York Academy of Sciences*, 27: 1003-1054.
- BRINTON Jr. C.C., P. GEMSKI Jr. e J. CARNAHAN, 1964. A new type of bacterial pilus genetically controlled by the fertility factor of *E. coli* K-12 and its role in chromosome transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 52: 776-783.
- CAMPBELL, A.M., 1962. Episomes. *Advances in Genetics*, 11: 101-137.

- CAVALLI, L.L., J. LEDERBERG e E. M. LEDERBERG, 1953. An infective factor controlling sex compatibility in *Bacterium coli*. *Journal of General Microbiology*, 8:89-103.
- CHARTONE-SOUZA, E., 1975. Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, ICB/UFMG, 79p. (Tese de Mestrado).
- CHEE, I. e R. MITCHELL, 1976. Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. *Annual Review of Microbiology*, 30: 221-239.
- CHEE, I., S. FOGEL e R. MITCHELL, 1971. Chemical detection of microbial prey by bacterial predators. *Journal of Bacteriology*, 106: 863-867.
- CHEE, I., Y. HENIS e R. MITCHELL, 1973. Effect of biogenic amines cannabinoids on bacterial chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 115: 1215-1218.
- COHEN, A., W. D. FISHER, R. CURTISS III e H.I. ADLER, 1968. The properties of DNA transferred to minicells by conjugation. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 61: 61-68.
- COLLINS, A.L. e B.A.D. STOCKER, 1976. *Salmonella typhimurium* mutants generally defective in chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 128: 754-765.
- CRANDALL, M., R. EGEL e V.L. MACKAY, 1977. Physiology of mating in three yeasts. *Advances in Applied Microbiology*, 15: 307-419.
- CURTISS III, R., 1969. Bacterial conjugation. *Annual Review of Microbiology*, 23: 69-136.
- CURTISS III, R. e D. R. STALLIONS, 1967. Energy requirements for specific pair formation during conjugation in *E. coli* k-12. *Journal of Bacteriology*, 94: 490-492.

- CURTISS III, R., L.G. CARO, D.P. ALLISON e D.R. STALLIONS, 1969. Early stages of conjugation in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 100(2): 1091-1104.
- CURTISS III, R., L.J. CHARAMELLA, D.R. STALLIONS e J. A. MAYS, 1968. Parental functions during conjugation in *Escherichia coli* k-12. *Bacteriological Reviews*, 32:320-348.
- DAHLQUIST, F.W., P. LOVELY, D.E. KOSHLAND Jr., 1972. Quantitative analysis of bacterial migration in chemotaxis. *Nature New Biology*, 236: 120-123.
- DAVIS, B.D., 1950. Non-filterability of the agent of genetic recombination in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 60: 507-508.
- DEMEREK, M., E.A. ADELBERG, A.J. CLARK e P.E. HARTMAN, 1966. A proposal for a uniform nomenclature in bacterial genetics. *Genetics*, 54: 61-76.
- DUNNY, G.M., B.L. BROWN e D.B. CLEWELL, 1978. Induced cell aggregation and mating in *Streptococcus faecalis*. Evidence for a bacterial sex pheromone. *Proceedings of National Academy of Sciences. U.S.A.*, 75(7): 3479-3483.
- ECKERSON, H.W. e REYNARD, A.M., 1977. Effect of entry exclusion on mating aggregates and transconjugants. *Journal of Bacteriology*, 129(1):131-137.
- EISENSTARK, A., 1977. Genetic recombination in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 11:369-396.
- ENGELMAN, T.W., 1881. Pfluger's Arch. *Gesante Physiol. Menschen Tiere*, 25:285-292. Apud: Adler, 1975b. Chemotaxis in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 44:341-356.
- FISHER, K.W., 1957a. The nature of the endergonic processes in conjugation in *Escherichia coli* k-12. *Journal of General Microbiology*, 16: 136-145.

- FISHER, K.W., 1957b. The role of the Krebs cycle in conjugation in *Escherichia coli* k-12. *Journal of General Microbiology*, 16: 120-135.
- FISHER, K.W., 1966. Amino acid deprivation and its effect on mating ability in *Escherichia coli* K-12. *Genetical Research* (Cambridge), 8:115-118.
- FRÈRE, J.M., 1977. La chimiotaxis chez les bactéries. *Bulletin de L'institut Pasteur*, 75: 187-203.
- GREENBERG, E.P. e E. CANALE-PAROLA, 1977a. Chemotaxis in *Spirochaeta aurantia*. *Journal of Bacteriology*, 130(1): 485-494.
- GREENBERG, E.P. e E. CANALE-PAROLA, 1977b. Motility of flagellated bacteria in viscous environments. *Journal of Bacteriology*, 132(1): 356-358.
- HAAN, P.G. e J.D. GROSS, 1962. Transfer delay and chromosomal withdrawal during conjugation in *E. coli*. *Genetical Research*, 3: 251-272.
- HAVEKES, L.M., B.J.J. LUGTENBERG e W.P.M. HOEKSTRA, 1976. Conjugation deficient *E. coli* k-12 F⁻ mutants with heptose-less hipopolysaccharide. *Molecular General Genetics*, 146: 43-50.
- HAYES, W., 1952. Recombination in *Bacterium coli* k-12 : unidirectional transfer of genetic material. *Nature* (London), 169: 118-119.
- HAYES, W., 1953a. Observations on a transmissible agent determining sexual differentiation in *Bacterium coli*. *Journal of General Microbiology*, 8: 72-88.
- HAYES, W. 1953b. The mechanism of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Cold Spring Harbor Symposium on Quantitative Biology*, 18: 75-93.
- HAYES, W., 1957. The kinetics of the mating process of *E. coli*. *Journal of General Microbiology*, 16: 97-119.

- HAYES, W., 1968. The genetics of bacteria and their viruses. Oxford. 2nd edition. Blackwell Scientific Publications. 925 pp.
- HAZELBAUER, G.L. e J. ADLER, 1971. Role of the galactose binding protein in chemotaxis of *Escherichia coli* toward galactose. *Nature New Biology*, 230: 101-104.
- HAZELBAUER, G.L., R.E. MESIBOV e J. ADLER, 1969. *E. coli* mutants defective in chemotaxis toward specific chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.* 64: 1300-1307.
- HELMUTH, R. e M. ACHTMAN, 1975. Operon structure of DNA transfer cistrons on the F sex factor. *Nature (London)*, 257: 652-656.
- HELMUTH, R. e M. ACHTMAN, 1978. Cell-cell interactions in conjugating *Escherichia coli*: Purification of F pili with biological activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 75(3):1237-1241.
- HESSLEWOOD, S.R. e J.T. SMITH, 1974. Envelope alterations produced by R factors in *Proteus mirabilis*. *Journal of General Microbiology*, 85: 146-152.
- HOUILLON, C., 1972. Sexualidade. São Paulo. Editora Edgard Blücher Ltda. 171pp.
- IINO, T., 1977. Genetics of structure and function of bacterial flagella. *Annual Review of Genetics*, 11:161-182.
- IINO, T. e M. ENOMOTO, 1971. Motility. In: Norris, R. e D.W. Ribbons (ed.). *Methods in Microbiology*, 5A. New York. Academic Press. 450pp.
- JACOB, A.E. e S.J. HOBBS, 1974. Conjugal transfer of plasmid-borne multiple antibiotic resistance in *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes*. *Journal of Bacteriology*, 117(2): 360-372.

- KAISER, A.D. e D.S. HOGNES, 1960. The transformation of *Escherichia coli* with deoxyribonucleic acid isolated from the bacteriophage λ dg. *Journal of Molecular Biology*, 2: 392-415.
- KALCKAR, H.M., 1971. The periplasmic galactose binding protein of *Escherichia coli*. *Science*, 174: 557-565.
- KENNEDY, N., L. BEUTIN e M. ACHTMAN, 1977. Conjugation proteins encoded by the F sex factor. *Nature* (London), 270:580-585.
- KOGAN, M., 1977. The role of chemical factors in insect plant relationships. *Proceedings of XV International Congress of Entomology*. Washington D.C. Proceedings Editors: D. White. p. 221-227.
- LARSEN, S.H., R.W. READER, E.N. KORT, W.W. TSO e J. ADLER, 1974. Change in direction of flagellar rotation is the basis of the chemotactic response in *E. coli*. *Nature*, (London), 249:74-77.
- LAW, M.S. e F.E. REGNIER, 1971. Pheromones. *Annual Review of Biochemistry*, 40: 533-545.
- LeBLANC, D.J., R.J. HAWLEY, L.N. LEE e E.J. ST. MARTIN , 1978. "Conjugal" transfer of plasmid DNA among oral streptococci. *Proceedings of the National Academy Sciences. U.S.A.*, 75(7): 3484-3487.
- LEDERBERG, J., 1956. Conjugal pairing in *E.coli*. *Journal of Bacteriology*, 71: 497-498.
- LEDERBERG, J. e E.L. TATUM, 1946. Gene recombination in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 112:315-326.
- LEDERBERG, J., L.L. CAVALLI, E.M. LEDERBERG, 1952. Sex compatibility in *Escherichia coli*. *Genetics*, 37: 720-730.

- LOW, B. e T. M. WOOD, 1965. A quick and efficient methods for interruption of bacterial conjugation. *Genetical Research*, 6: 300-303.
- MICHLIS, L., 1966. Sex hormones in fungi. In: The Fungi. II. Ainsworth, G.C. e A. S. Sussman (ed.). New York. Academic Press. 805 pp.
- MACNAB, R.M. e D. E. KOSHLAND, Jr., 1972. The gradient-sensing mechanism in bacterial chemotaxis. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 69: 2509-2512.
- MESIBOV, R. e J. ADLER, 1972. Chemotaxis toward amino acids in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 112 (1): 315-326.
- MEYNELL, G.G., 1973. Bacterial plasmids. The MacMillan Press Ltd., London. 164pp.
- MEYNELL, E., G.G. MEYNELL e N. DATTA, 1968. Phylogenetic relationships of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. *Bacteriological Reviews*, 32: 55-83.
- MINKLEY, E.G., Jr. e K. IPPEN-IHLER, 1977. Identification of a membrane protein associated with expression of the surface exclusion region of the F transfer operon. *Journal of Bacteriology*, 129: 1613-1622.
- MITCHELL, R., 1971. Role of predators in the reversal of imbalances in microbial ecosystems. *Nature*, 230: 257-258.
- MITSUHASHI, S., S. IYOBE e M. INOUE, 1976. Genetics of R factors. *Antibiotics and Chemotherapycs*, 20: 133-174.
- NELSON, T.C., 1951. Kinetics of genetic recombination in *Escherichia coli*. *Genetics*. 36: 162-175.
- NOVICK, R.P., 1961. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 33: 210-263.

- NOVICK, R.P., 1969. Extrachromosomal inheritance in bacteria. *Bacteriological Reviews*, 33: 210-235.
- NOVICK, R.P., 1974. Bacterial plasmids. In: Laskin, I. A. e H. A. Lechevalier (ed.). *Handbook of Microbiology*. IV. Cleveland, CRC Press, Inc.p. 537 - 586.
- NOVICK, R.P., R.C. CLOWES, S.N. COHEN, R. CURTISS III, N. DATTA e S. FALCOW, 1976. Uniform nomenclature for bacterial plasmids: a Proposal. *Bacteriological Reviews*, 40(1): 168-189.
- NOVOTNY, C., W. S. KNIGHT e C. C. BRINTON Jr., 1968 . Inhibition of bacterial conjugation by ribonucleic acid male-specific bacteriophages. *Journal of Bacteriology*, 95: 314-326.
- ORDAL, G. W. e J. ADLER, 1974. Properties of mutants in galactose taxis and transport. *Journal of Bacteriology*, 117: 517-526.
- OU, J. T., 1975. Mating signal and DNA penetration deficiency in conjugation between male *Escherichia coli* and minicells. *Proceedings of the National Academy of Sciences. U.S.A.*, 72(9): 3721-3725.
- OU, J. T. e T. F. ANDERSON, 1970. Role of pilli in bacterial conjugation. *Journal of Bacteriology*, 102: 648-654.
- OU, J. T. e T. F. ANDERSON, 1972. Effect of Zn^{2+} on bacterial conjugation: inhibition of mating pair formation. *Journal of Bacteriology*, 111(1):177-185.
- OU, J. T. e R. L. REIM, 1978. F^- mating materials able to generate a mating signal in mating with HfrH dna B (Ts) cells. *Journal of Bacteriology*, 133(1):442-445.
- PARKINSON, J.S., 1976. Che A, che B and che C genes of *Escherichia coli* and their role in chemotaxis. *Journal of Bacteriology*, 126: 758-770.

- PARKINSON, J.S., 1977. Behavioral genetics in bacteria. *Annual Review of Genetics*, 11: 397-414.
- PASTEELS, J.M., 1977. Evolutionary aspects in chemical ecology and chemical communication. *Proceedings of XV International Congress of Entomology*. Washington, D. C. p.211-227.
- PEARCE, L.E. e E. J. MEYNEL, 1968. Specific chromosomal affinity of a resistance factor. *Journal of General Microbiology*, 50: 159-172.
- PFEFFER, W., 1888. *Untersuch. Bot. Int. Tübingen*, 2: 582-661. Apud: Adler, J., 1975b. Chemotaxis in bacteria. *Annual Review of Biochemistry*, 44: 341-346.
- PFEFFER, W., 1904. *Pflanzenphysiologie*, 2: 798. Leipzig. Engelmann. 2nd ed. Apud: Chet, I. e R. Mitchell, 1976. Ecological aspects of microbial chemotactic behavior. *Annual Review of Microbiology*, 30: 221-239.
- RAWITSCHER-KUNKEL, E. e L. MACHLIS, 1962. The hormonal integration of sexual reproduction in *Oedogonium*. *American Journal of Botany*, 49: 177-183.
- SANDERSON, K. E., 1974. Conjugation in bacteria. In: Laskin, I. A. e H. A Lechevalier (ed.). *Handbook of Microbiology*. IV. Cleveland, CRC Press, Inc. p. 529-536.
- SARATHY, P.V. e O. SIDDIQI, 1973. DNA synthesis during bacterial conjugation. *Journal of Molecular Biology*, 78: 443-451.
- SAUNDERS, J. R., 1978. Sex pheromones in bacteria. *Nature* (London), 275: 692-694.
- SAVAGE, C.D., 1977. Microbial ecology of the gastrointestinal tract. *Annual Review of Microbiology*, 31: 103-133.
- SCHNEIDER, W.R. e R.N. DOETSCH, 1977. Temperature effects on bacterial movement. *Applied Environmental Microbiology*, 34: 695-700.

- SCHWEITZER, M. e U. HENNING, 1977. Action of a major outer cell envelope membrane protein in conjugation of *E. coli* k-12. *Journal of Bacteriology*, 129: 1651-1652.
- SEGEL, L. A., I. CHET e Y. HENIS, 1977. A simple quantitative assay for bacterial motility. *Journal of General Microbiology*, 98: 329-337.
- SEYMOUR, F.W.K. e R.N. DOETSCH, 1973. Chemotactic responses by motile bacteria. *Journal of General Microbiology*, 78: 287-296.
- SHERRIS, J.C., N.W. PRESTON e J.G. SHOESMITH, 1957. The influence of oxygen and arginine on the motility of a strain of *Pseudomonas* sp. *Journal of General Microbiology*, 16: 86-96.
- SHOESMITH, J.G., 1960. The measurement of bacterial motility, *Journal of General Microbiology*, 22: 528-585.
- SHORER, M.M., 1976. Animal communication by pheromones. New York. Academic Press. 167pp.
- SILVERMAN, M. e M. SIMON, 1973. Genetic analysis of flagellar mutants in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 113: 105-113.
- SILVERMAN, M. e M. SIMON, 1974. Flagellar rotation and the mechanism of bacterial motility. *Nature* (London), 249: 73-74.
- SILVERMAN, M. e M.I. SIMON, 1977. Bacterial flagella. *Annual Review of Microbiology*, 31: 397-419.
- SKURRAY, R.A., R.E.W. HANCOCK e P. REEVES, 1974. Con⁻ mutants: class of mutants in *E. coli* k-12 lacking a major cell wall protein and defective in conjugation and adsorption of a bacteriophage. *Journal of Bacteriology*, 119: 726-735.

- SNEATH, P.H.A. e J. LEDERBERG, 1961. Inhibition by periodate of mating in *E. coli* k-12. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 47: 86-90.
- SPRINGER, M. S., M. F. GOY e J. ADLER, 1977. Sensory transduction in *E. coli*: A requirement for methionine in sensory adaptation. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 74: 183-187.
- SPRINGER, M.S., E.N. KORT, S. H. LARSEN, G. W. ORDAL, R.W. READER e J. ADLER, 1975. Role of methionine in bacterial chemotaxis: Requirement for tumbling and involvement in information processing. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.*, 72: 4640-4644.
- STARR, M.P. e R.J. SEIDLER, 1971. The *Bdellovibrios* *Annual Review of Microbiology*, 25: 649-678.
- STRALEY, S.C. e S.F. CONTI, 1974. Chemotaxis in *Bdellovibrio bacteriovorus*. *Journal of Bacteriology*, 120: 549-551.
- TAYLOR, B.L. e D.E. KOSHLAND Jr., 1974. Reversal of flagellar rotation in monotrichous and peritrichous bacteria : generation of changes in direction *Journal of Bacteriology*, 119: 640-642.
- THONEMANN, P.C. e C.J. EVANS, 1976. The dispersal of an initial concentration of motile bacteria. *Journal of General Microbiology*, 92: 25-31.
- TSANG, N. R. MACNAB, D.E. KOSHLAND Jr., 1973. Common mechanism for repellents and attractants in bacterial chemotaxis. *Science*, 181: 60-63.
- TSO, W. W. e J. ADLER, 1974. Negative chemotaxis in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 118: 560-576.
- WALMSLEY, R.H., 1973. Physical assay of competence for specific mating-pair formation in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 114(1): 144-151.

- WARRICK, H. M., B. L. TAYLOR e D. E. KOSHLAND Jr., 1977. Chemotactic mechanism of *Salmonella typhimurium*: preliminary mapping and characterization of mutants. *Journal of Bacteriology*, 130(1): 223-231.
- WATANABE, T., 1971. Infectious drug resistance in bacteria. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 56: 43-98.
- WATANABE, T. e T. FUKASAWA, 1961. Episome-mediated transfer of drug resistance in enterobacteriaceae. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *Journal of Bacteriology*, 81: 669-678.
- WEIBULL, C., 1960. The bacteria. Gunsalus, I. C. e R.Y. Stanier (ed.). New York. Academic Press. p. 513.
- WILLETTS, N.S., 1973. Characterization of the F transfer cistron, tra L. *Genetical Research*, 21: 205-213.
- WOLLMAN, E.L., F. JACOB, 1955. Sur le mécanisme de transfert de matériel génétique au cours de la recombinaison chez *Escherichia coli* k-12. *Comptes Rendus de l'Académie de Sciences*, 240: 2449-2451.
- WOLLMAN, E.L. e F. JACOB, 1958. Sur les processus de conjugaison et de recombinaison chez *E. coli*. V. Le mécanisme du transfert de matériel génétique. *Annales de L'Institut Pasteur*, 95: 641-666.
- WOLLMAN, E.L., F. JACOB, W. HAYES, 1956. Conjugation and genetic recombination in *E. coli*. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 21: 141-162.
- ZINDER, N.D. e J. LEDERBERG, 1952. Genetic exchange in *Salmonella*. *Journal of Bacteriology*, 64: 679-699.
- ZIPKAS, D. e M. RILEY, 1976. Simplified method for interruption of conjugation in *E. coli*. *Journal of Bacteriology*, 126(1): 559-560.