

**MUTANTES DE *Brevibacterium flavum* RESISTENTES A DROGAS
E SUA PRODUÇÃO DE LISINA**

GISLENE GARCIA FRANCO DO NASCIMENTO

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Genética e Melhoramento de Plantas.

**PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Maio - 1976**

Aos meus pais,
esposo e filho,

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que contribuíram para a realização desse trabalho, e em especial:

- ao *prof. Dr. João Lucio de Azevedo* pela orientação recebida,
- ao *prof. Dr. Roland Vencovsky*, *prof. Dr. Vivaldo Francisco da Cruz* e *eng^o agr^o José Roberto Moro*, pelo auxílio na análise estatística,
- ao *prof. Dr. Geraldo Tosello* pelo uso de seu laboratório,
- ao colega *José Pinto de Siqueira Júnior* pelas valiosas sugestões,
- ao meu esposo *Virgílio Franco do Nascimento Filho* pelo estímulo constante,
- à *Comissão Nacional de Pesquisas* pela bolsa concedida durante o ano de 1973,
- à *Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo*, pelo auxílio concedido ao setor de *Genética de Microrganismos - Projeto Proteína*,
- aos técnicos de laboratório, *Antonio da Rocha Campos*, *Salvador Pêxe* e *Luiz Próspero*.

I N D I C E

	<u>Página</u>
1. INTRODUÇÃO	01
2. REVISÃO DE LITERATURA	04
2.1. Biossíntese da lisina	05
2.2. Produção de lisina por microrganismos	05
2.2.1. Microrganismos produtores de lisina.	07
2.2.1.1. Fungos e leveduras	07
2.2.1.2. Bactérias	08
2.2.2. <i>B. flavum</i> como produtora de lisina	11
2.3. Produção de outros aminoácidos e metabólitos por <i>B. flavum</i>	13
2.4. Mutantes resistentes a antibióticos em bactérias, utilizados em fermentações	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1. Materiais	17
3.1.1. Linhagens	17
3.1.2. Meios de cultura	18
3.1.2.1. Nutriente líquido	18
3.1.2.2. Nutriente Ágar	18
3.1.2.3. Meio mínimo líquido, segundo SANO e SHIIO (1967)	18
3.1.2.4. Meio mínimo sólido	18
3.1.2.5. Meio líquido de fermentação, modificado de SANO e SHIIO (1967)	19
3.1.2.6. Meio mínimo semi-sólido (PONTECORVO et alii, 1953).	19
3.1.3. Soluções	20
3.1.3.1. Solução de elementos traço.	20

	<u>Página</u>
3.1.3.2. Tampão carbonato - 0,05 M, pH-9,0	20
3.1.3.3. Tampão borato - 0,05 M, pH - 9,0.	20
3.1.3.4. Suspensão de fosfato de cobre..	
3.1.3.5. Solução de HCl - 1,2 N	21
3.1.3.6. Solução de 2-cloro-3,5-dinitro- piridina.	21
3.1.3.7. Solução estoque de lisina	21
3.1.3.8. Solução salina	21
3.1.4. Drogas	21
3.2. Métodos	22
3.2.1. Determinação do nível de resistência da <i>B. flavum</i> a drogas	22
3.2.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina	22
3.2.3. Isolamento de mutantes resistentes à es- treptomicina	23
3.2.4. Isolamento de mutantes resistentes à eri- tromicina	23
3.2.5. Isolamento de mutantes resistentes à van- comicina	23
3.2.6. Curvas de crescimento.	24
3.2.7. Cálculo da taxa de crescimento das linha- gens original e mutantes	24
3.2.8. Curva de sobrevivência à irradiação ul- tra-violeta	25
3.2.9. Determinação do crescimento da linhagem original em relação às linhagens mutan- tes através da mistura de linhagens.	25
3.2.10. Determinação quantitativa da força da es- treptomicina, eritromicina e vancomicina, através da mistura de linhagens.	26
3.2.11. Avaliação da capacidade de produção de li- sina das linhagens original e mutantes..	28
3.2.12. Determinação semiquantitativa do teor de lisina	28
3.2.13. Determinação quantitativa do teor de lisina	29

4. RESULTADOS	31
4.1. Determinação do nível de resistência da <i>B. flavum</i> a drogas	31
4.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina.	32
4.3. Isolamento de mutantes resistentes à estreptomicina	34
4.4. Isolamento de mutantes resistentes à eritromicina	36
4.5. Isolamento de mutantes resistentes à vancomicina	37
4.6. Curvas de crescimento	38
4.7. Determinação das taxas de crescimento das linhagens original e mutantes.	44
4.8. Curva de sobrevivência à irradiação ultra-violeta	45
4.9. Determinação do crescimento da linhagem original em relação às linhagens mutantes através da mistura de linhagens	48
4.10. Determinação das forças das drogas através da mistura de linhagens	50
4.11. Determinação semiquantitativa do teor de lisina	56
4.12. Determinação quantitativa do teor de lisina	58
5. DISCUSSÃO.	67
5.1. Nível de resistência a drogas	67
5.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina	68
5.3. Curvas de crescimento e taxas de crescimento das linhagens original e mutantes	71
5.4. A força dos antibióticos.	72
5.5. Avaliação semiquantitativa do teor de lisina.	74
5.6. Avaliação quantitativa do teor de lisina.	75

Página

6. RESUMO E CONCLUSÕES	80
7. SUMMARY AND CONCLUSIONS	84
8. BIBLIOGRAFIA.	88

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
01 - Nível de resistência da <i>B. flavum</i> à diferentes drogas	32
02 - Porcentagem de sobreviventes de <i>B. flavum</i> à estreptomicina (média de 2 repetições) . . .	33
03 - Porcentagem de sobreviventes de <i>B. flavum</i> à eritromicina (média de 2 repetições)	33
04 - Porcentagem de sobreviventes de <i>B. flavum</i> à vancomicina (média de 2 repetições).	34
05 - Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à estreptomicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de estreptomicina.	36
06 - Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à eritromicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de eritromicina.	37
07 - Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à vancomicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de vancomicina	38
08 - Número de células viáveis da linhagem original em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições). . .	40
09 - Número de células viáveis da linhagem original em diferentes tempos, cultivada em meio mínimo (média de 2 repetições)	41
10 - Número de células viáveis da linhagem resistente à estreptomicina (<i>str₁</i>) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições)	42

<u>Tabela</u>		<u>Página</u>
11	- Número de células viáveis da linhagem resistente à eritromicina (<i>ero₃</i>) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições)	43
12	- Número de células viáveis da linhagem resistente à vancomicina (<i>van₁</i>) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições)	44
13	- Taxas de crescimento das linhagens original e resistentes	45
14	- Curva de sobrevivência da linhagem original à irradiação ultra-violeta (média de 2 repetições).	46
15	- Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistentes à estreptomicina (<i>str₁</i>) em mistura	48
16	- Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistente à eritromicina (<i>ero₃</i>) em mistura	49
17	- Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistente à vancomicina (<i>van₁</i>) em mistura	50
18	- Quantidade relativa do número de células de linhagens resistentes à estreptomicina (<i>str₁</i>) e original quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições	51
19	- Quantidade relativa do número de células de linhagens resistente à eritromicina (<i>ero₃</i>) e original, quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições	52

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
20 - Quantidade relativa do número de células de linhagens resistentes à vancomicina (van_1) e original quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições.	53
21 - Valores do teste F, coeficientes de correlação linear (r) e coeficientes angulares (b) para cada antibiótico e repetição.	54
22 - Coeficientes angulares da regressão linear (\bar{b}) e Meia Vida relativa (MVR) dos mutantes resistentes (média de 2 repetições).	55
23 - Relação entre concentração de lisina de soluções padrões e absorvância	59
24 - Concentração de lisina em colônias da linhagem original nos meios mínimo e mínimo de fermentação (média de 2 repetições)	61
25 - Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à estreptomomicina (média de 2 repetições)	62
26 - Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à eritromicina (média de 2 repetições).	63
27 - Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à vancomicina (média de 2 repetições).	64
28 - Valores do Quadrado Médio entre as colônias das linhagens original e mutantes	65
29 - Valores do teste F entre os mutantes de cada droga e entre grupos de mutantes e original.	65
30 - Valores de correlação entre meios mínimo e mínimo de fermentação	66

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>		<u>Página</u>
01	- Biossíntese dos aminoácidos que apresentam como precursor o piruvato e aspartato (NAKAYAMA, 1972)	06
02	- Curvas de sobrevivência da linhagem original de <i>B. flavum</i> à estreptomicina, eritromicina e vancomicina	35
03	- Curvas de crescimento da linhagem original cultivada em nutriente líquido (ONL) e meio mínimo (OMM), e linhagens resistentes à estreptomicina (<i>str</i> ₁), eritromicina (<i>ero</i> ₃) e vancomicina (<i>van</i> ₁) cultivadas em nutriente líquido..	39
04	- Curva de sobrevivência da linhagem original de <i>B. flavum</i> à irradiação ultra-violeta.	47
05	- Halos de crescimento de <i>A. nidulans</i> ao redor de colônias das linhagens original e mutantes de <i>B. flavum</i>	56
06	- Aspecto geral de uma placa de Petri com halos de crescimento de <i>A. nidulans</i> ao redor de colônias de <i>B. flavum</i> da linhagem original. . .	57
07	- Relação entre concentração de lisina de soluções padrões e absorvância	60

1. INTRODUÇÃO

Tendo em vista a crescente demanda de proteínas de alto valor nutritivo, verifica-se uma insuficiência mundial na produção das mesmas pelos métodos tradicionais, o que tem levado muitos pesquisadores a procurarem outras fontes produtoras.

As alimentações ricas em cereais e pobres em proteínas de origem animal, geralmente apresentam um baixo teor de aminoácidos essenciais, principalmente de lisina, metionina e triptofano.

A obtenção desses aminoácidos por fermentação, utilizando-se de linhagens selecionadas de microrganismos seria um recurso para a complementação das alimentações deficientes (MENEZES, 1971). Além disso, esse processo oferece

vantagens sobre os processos químicos, pois forma-se somente o isômero *L* dos aminoácidos, forma utilizada pelos organismos dos mamíferos.

Segundo *AIDA (1972)*, os métodos desenvolvidos para a produção microbiana de aminoácidos, são aqueles que em pregam linhagens selvagens, mutantes, adição de precursores e enzimático.

No entanto, o problema da contaminação em fermentações contínuas em escala industrial, tem sido um fator de restrição para esse intento.

Diversos trabalhos tem focalizado a influência dos antibióticos no controle das contaminações em fermentações, principalmente as alcoólicas (*LACAZ, 1969*).

Na fermentação de aminoácidos pode-se utilizar antibióticos para seleção de células que reverteram para prototrofia ou ainda para esterilização do meio de fermentação. Os antibióticos quando acrescentados ao meio de cultura, impedem o desenvolvimento de microrganismos contaminantes que iriam concorrer no uso dos nutrientes, diminuindo assim a produção do metabólito desejado. Para que os antibióticos possam ser utilizados nesse sentido, é necessário primeiramente a obtenção de mutantes resistentes para que o microrganismo em questão, não seja eliminado do meio de cultura juntamente com os contaminantes.

Mutantes resistentes a drogas, obtidos em alguns microrganismos apresentaram produção inalterada de metabólitos, quando crescidos em presença da droga a que eram resistentes (*ABE e TAKAYAMA, 1972*).

O presente trabalho visou a obtenção de mutantes resistentes a drogas em *Brevibacterium flavum* e a verificção de sua produção de lisina, ensaiando-se a variabilida

.3.

de natural das populações sensível e mutantes. Procurou-se tam
bém estudar alguns aspectos da biologia da bactéria, uma vez
que poucos são os dados encontrados a respeito na literatura
e para que estudos genéticos possam ser realizados com suces-
so nesse microrganismo tais dados são indispensáveis.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A atividade metabólica de células vivas reflete grandemente o sensível balanço entre dois processos celulares interdependentes: a síntese e a utilização de metabólitos essenciais (*DATA et alii, 1973*).

Geralmente a produção de metabólitos por microrganismos é controlada pela retroinibição e repressão das enzimas envolvidas na síntese, isto ocorrendo principalmente na presença dos produtos finais. Esse controle possibilita uma utilização mais econômica dos nutrientes, pois evita a síntese de excesso de produto final. Desse modo, para que se consiga a superprodução de um dado aminoácido, é necessário se utilizar de mutantes que apresentem bloqueio no sistema regulatório. Não obstante (*MIYAJIMA e SHIIO, 1971*), obtiveram produção de considerável quantidade de lisina mesmo em linhagens

selvagens, as quais não apresentavam nenhum bloqueio genético.

2.1. Biossíntese da lisina

Na biossíntese da lisina em bactérias, plantas superiores, algas cianofíceas e alguns ficomicetos, o esqueleto carbônico é derivado do piruvato e aspartato com a formação do ácido α - β -diaminopimélico como produto intermediário. Em outras algas e fungos, o esqueleto carbônico é fornecido pelo acetato e o α -cetoglutarato, tendo como produto intermediário o ácido α -aminoadípico (NAKAYAMA, 1972).

Pelo fato desse trabalho ter sido realizado com bactéria, é apresentado na Figura 1, um esquema da biossíntese dos aminoácidos que tem como precursor o piruvato e aspartato. As duas primeiras enzimas, aspartoquinase e aspartato- β -semialdeído desidrogenase são comuns para a síntese de quatro aminoácidos: lisina, metionina, treonina e isoleucina. A enzima homoserina desidrogenase é influenciada pela ação dos aminoácidos, metionina, treonina e isoleucina (DATTA et alii, 1973).

2.2. Produção de lisina por microrganismos

A produção industrial de aminoácidos avançou com a descoberta de um eficiente produtor de ácido glutâmico, *Corynebacterium glutamicum* (sin. *Micrococcus glutamicus*) por Kinoshita, em 1957 (NAKAYAMA, 1973).

Entretanto, encontrou-se que a maioria das linhagens selvagens isoladas da natureza não produziram quantidades significativas industrialmente, tornando-se necessário

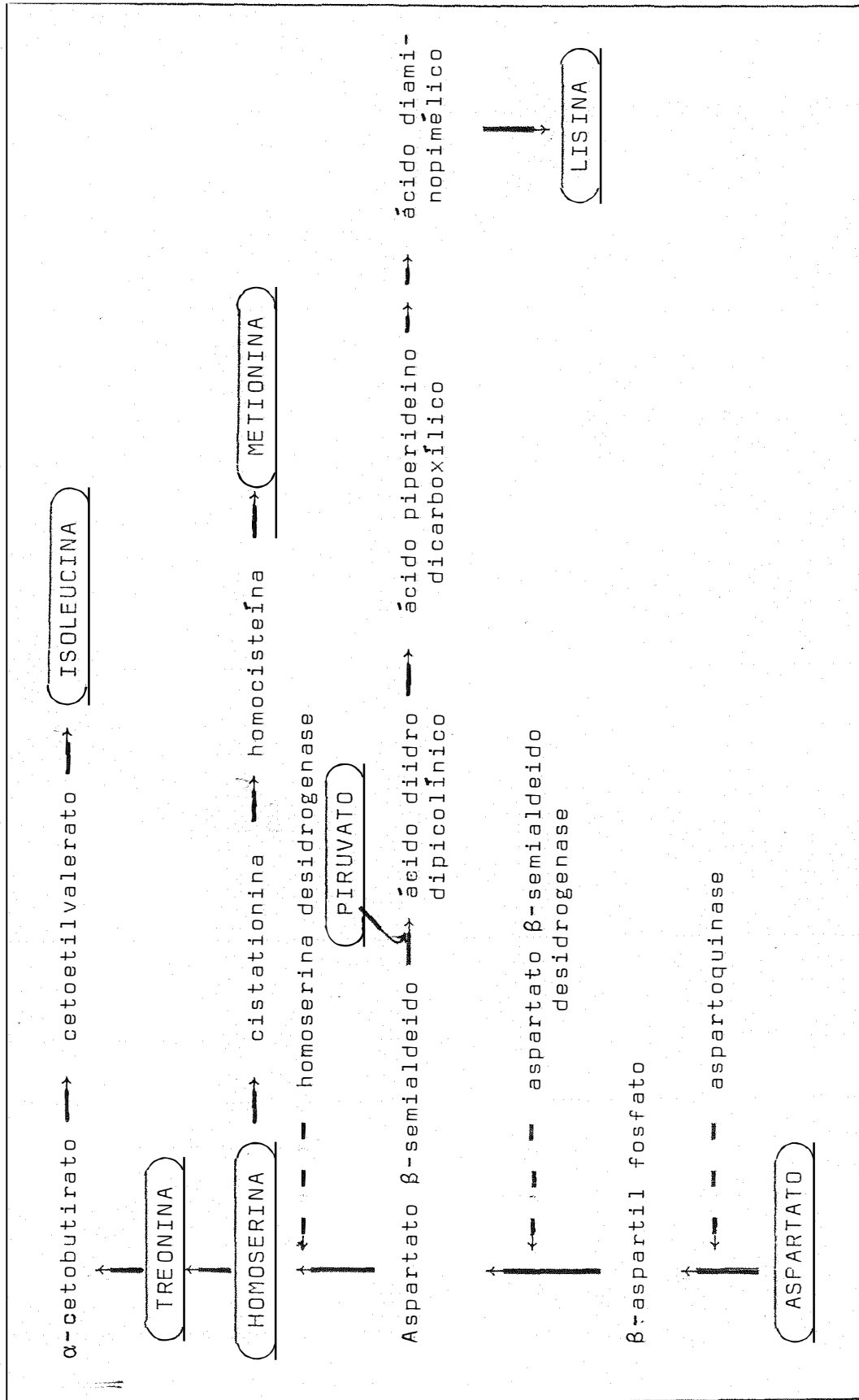


Figura 1. Biossíntese dos aminoácidos que apresentam como precursor o piruvato e aspartato (MAKAYAMA, 1972).

então, a obtenção de mutantes com grande capacidade de síntese.

Como se pode depreender da revisão abaixo, inúmeros são os trabalhos realizados com microrganismos visando a obtenção de produtores de lisina de interesse comercial, bem como o estudo das enzimas envolvidas na síntese desse aminoácido.

A revisão sobre produção de lisina foi dividida em dois itens, um abordando a produção por microrganismos em geral e a outra especificamente pela *B. flavum*.

2.2.1. Microrganismos produtores de lisina

2.2.1.1. Fungos e leveduras

A possibilidade de produção microbiana de lisina praticamente se iniciou quando esse aminoácido foi sintetizado à partir de ácido aminoadípico por leveduras e *Neurospora* (MITCHELL e HOULAHAM, 1948; WINDSOR, 1951).

RICHARD e HASKINS (1957) cultivaram cerca de 600 linhagens de fungos para ensaiar a capacidade de produção de lisina. Entre essas, a maior produção encontrada foi 5 a 15 mg/l em algumas linhagens.

DULANEY (1957) conseguiu rendimentos maiores cerca de 400 mg/l, à partir de uma espécie de *Gliocadium* e uma linhagem de *Ustilago maydis*. Nesse mesmo fungo, HASKINS e SPENCER (1959) obtiveram produção de 1950 mg/l de lisina usando a linhagem PRL 1704.

BROQUIST et alii (1961) estudaram a conversão do ácido α -cetoadípico (KAA) para lisina por *Saccharomyces cerevisiae* e *Torulopsis utilis*. O processo demorou cerca de

72 horas e o meio de cultura continha de 1 a 5 mg/l desse precursor. A produção do aminoácido ocorreu com uma eficiência de conversão de 50 a 75%.

JENSEN e CHU (1961) obtiveram a conversão do ácido α -oxoadípico para lisina usando *S. cerevisiae*.

TAURO et alii (1963) utilizando linhagens de *U. maydis* previamente usadas por *DULANEY (1957)*, selecionaram as melhores condições para maior produção de lisina. Além das linhagens, foi ensaiado o efeito de diversas fontes de nitrogênio, carbono, substâncias promotoras de crescimento, meios de cultivo e ácido giberélico.

KURIMURA (1965) trabalhando com *S. cerevisiae* conseguiu uma produção de 5 a 17 g/l de lisina usando ácido aminoadípico como precursor.

SANCHEZ et alii (1969) usando um mutante de *U. maydis* obtido pela combinação de UV-etilenoamina e crescido em meio contendo extrato de *Agave sp* conseguiram a produção de até 2 g/l de lisina.

2.2.1.2. Bactérias

Através do método de *CASIDA e BALDWIN (1956)*, citado por *PRESCOTT e DUNN (1959)*, a lisina começou a ser produzida comercialmente por fermentação em duas etapas distintas: na primeira, utilizava-se um mutante de *Escherichia coli* incapaz de converter o ácido diaminopimélico (DAPA) em lisina, possibilitando dessa maneira um considerável acúmulo dessa substância no meio e numa segunda etapa do processo, um outro microrganismo que não exigia lisina para o crescimento, como o *Aerobacter aerogenes*, convertia esse ácido em lisina.

Posteriormente esse processo foi aperfeiçoado por *KITA e HUANG (1958)*, onde a linhagem de *E. coli* usada para produzir DAPA também continha a enzima descarboxilase para a conversão desse ácido em lisina.

KINOSHITA et alii (1958) trabalhando com *Micrococcus glutamicus*, obtiveram vários mutantes auxotróficos através da irradiação com ultravioleta e ^{60}Co . Entre esses, os auxotróficos para homoserina, apresentaram uma produção de lisina em torno de 29% da glicose consumida.

NAKAYAMA et alii (1961) obtiveram mutantes deficientes para a síntese de homoserina, metionina, leucina, isoleucina e treonina em *M. glutamicus*, *Bacillus subtilis* e *E. coli*, que apresentaram considerável acúmulo de lisina. Os maiores produtores foram os auxotróficos para homoserina, apresentando uma produção média de 5,9 mg/l, 4,0 mg/l e 0,8 mg/l, respectivamente, para aqueles organismos. Especial atenção foi dada à influência da concentração do fator de crescimento no meio de cultura para o acúmulo da lisina. Quando o microrganismo usado foi *M. glutamicus*, notou-se que um excesso de homoserina ou treonina e biotina no meio, resultava em acúmulo de ácido glutâmico em lugar de lisina. A ação da homoserina e treonina pareceu ser mais por inibição da ação da enzima do que à sua formação.

NAKAYAMA e KINOSHITA (1961) estudando dois mutantes de *M. glutamicus*, detectaram ácido diaminopimélico em meio com concentração limitada de lisina. Foram ainda estudados os modos de ação de algumas enzimas envolvidas na biossíntese desse aminoácido.

NAKAYAMA et alii (1966) em continuação a uma série de estudos sobre os mecanismos de acúmulo de lisina, utilizaram um mutante auxotrófico para homoserina em *M. glutamicus*. Observaram o efeito de vários aminoácidos em duas reações enzimáticas dessa síntese: a fosforilação do aspartato

β -semialdeído com piruvato e a dupla inibição da aspartoquinase por treonina mais lisina. À partir desses resultados, os autores discutem o mecanismo de acúmulo de lisina por esse organismo. De várias fontes de nitrogênio ensaiadas, o acetato de amônia proporcionou maior produção de lisina, quando se utilizou mutantes auxotróficos para homoserina nesse organismo (LODHA *et alii*, 1973).

Mais recentemente, no Japão e Estados Unidos, um dos processos para a produção comercial de lisina é o que utiliza o processo fermentativo em uma única etapa, realizado por um mutante auxotrófico de *M. glutamicus*, deficiente em homoserina, tendo uma produção de até 20 g/l (NAKAYAMA, 1973).

Produção de 52 g/l de lisina foi obtida pela Ajinomoto Co. Inc. (1968), usando *Brevibacterium lactofermentum* 2256-213 cultivada em meio contendo 16% de amido hidrolizado de batata como fonte de carbono, em 96 horas de fermentação.

CANTARELLI (1970) demonstrou a habilidade da *B. lactofermentum* 2256-213 em produzir lisina num meio de cultura contendo melaço como fonte de carbono. Foram estudados os efeitos da concentração de açúcares, pH inicial, açúcar invertido, termólise das células e melaço isento de SO₂. A quantidade máxima produzida foi 6,82 g/l após 62 horas, num meio contendo 12% de açúcares totais, fornecidos como melaço isento de SO₂.

ABE e TAKAYAMA (1972) cita a produção de lisina à partir de derivados do petróleo, onde *Mycobacterium tuberculosis* produziu 2,1 g/l em meio contendo 1,5% de n-decano; *Streptomyces coroniformis* produziu 1,2 g/l em meio com tetrahidroxinaftaleno. Produção de até 10 g/l à partir de n-parafinas, foi conseguida com *Arthrobacter paraffineus*, *Brevibacterium cetoglutamicum* e *Corynebacterium hydrocarboclastus*.

CHANG e ADAMS (1974) estudaram o efeito de algumas enzimas envolvidas na biossíntese da lisina, utilizando-se de mutantes de *Pseudomonas putida*.

SANDS e HANKIN (1974) usando análogos da lisina, selecionaram mutantes de *Lactobacillus plantarum*, um típico produtor de ácido lático, sintetizando lisina extracelularmente. A máxima produção obtida não ultrapassou 72 µg/ml.

A produção de lisina tem sido investigada nos gêneros *Arthrobacter*, *Bacillus*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Streptomyces*, *Azotobacter* e *Aerobacter*. Na maioria das vezes são usados mutantes auxotróficos diretamente relacionados com a síntese desse aminoácido. No entanto também são utilizados alguns mutantes não diretamente relacionados com essa síntese, como é o caso dos deficientes em adenina, uracila, triptofano ou tirosina, os quais apresentam rendimentos menores (ANON., 1975).

Revisões mais detalhadas sobre os processos utilizados na obtenção de lisina são dadas por KINOSHITA (1959), PRESCOTT e DUNN (1959), DULANEY (1967), YAMADA et alii (1972) e NAKAYAMA (1973).

2.2.2. B. *flavum* como produtora de lisina

SANO e SHIIO (1967) obtiveram mutantes auxotróficos produtores de lisina, mediante o emprego de raio-X e nitrosoguanidina como agentes mutagênicos. Foram identificados auxotróficos para homoserina, metionina, treonina e isoleucina, sendo que os maiores produtores de lisina foram os auxotróficos para homoserina (42,6 g/l). As quantidades de metionina, homoserina e treonina foram críticas para a produção, pois controlavam o mecanismo de retroinibição e repressão. Nesses mutantes deficientes em homoserina, foi perdida a ati-

vidade da enzima homoserina desidrogenase.

SHIIO e SANO (1969) usando um auxotrófico para homoserina obtiveram algumas reversões para prototrofia com maior capacidade de síntese de lisina (23 g/l) do que a linhagem original (1,5 g/l). Entretanto o crescimento desses mutantes foi completamente inibido pela adição de metionina ou treonina. Concluíram que a causa da mutação foi uma menor atividade da homoserina desidrogenase em relação a linhagem original.

SANO e SHIIO (1970) obtiveram alguns mutantes resistentes ao S (2-aminoetil)-L-cisteína (AEC), um análogo da lisina, os quais produziram até 32 g/l em meio de glicose e 34 g/l em meio de melaço. Esses mutantes não foram sensíveis à treonina ou metionina e a aspartoquinase sofreu uma retroinibição, logo no início da síntese.

SANO e SHIIO (1971) isolaram mutantes sensíveis à concentrações relativamente baixas de metionina ou treonina, os quais apresentaram características muito semelhantes àquelas mutantes revertidos, sensíveis à metionina ou treonina. Esses foram classificados em 3 tipos de acordo com o grau de inibição por metionina ou treonina: inibido por treonina, por metionina, por metionina e treonina. Dentre esses últimos, a produção média de lisina foi 17,2 g/l.

MIYAJIMA e SHIIO (1971) obtiveram uma produção de 5 g/l de lisina em linhagens selvagens. Nesse caso, observaram uma repressão incompleta da homoserina desidrogenase na presença de metionina.

SHIIO e SANO (1973) usando diferentes concentrações de treonina, observaram o crescimento de um mutante deficiente e sensível à treonina. Testaram ainda, alguns agentes promotores ou inibidores do crescimento e da produção de lisina desse mutante. Foram notados efeitos estimulatórios do

crescimento, quando se adicionou cloreto de sódio e serina mais isoleucina num meio contendo treonina. Segundo os autores, esses efeitos são devido a uma alteração na permeabilidade da treonina dentro da célula.

2.3. Produção de outros aminoácidos e metabólitos por *B. flavum*

Como pode ser notado, inúmeros trabalhos tem sido realizados com *B. flavum*, com a finalidade de se obter outros aminoácidos além da lisina. A maioria deles visa a produção de aminoácidos que apresentam um precursor comum ao da lisina, o ácido aspártico.

OKADA et alii (1961) trabalhando com uma linhagem de *B. flavum* típica produtora de ácido glutâmico, conseguiram a produção de ácido succínico.

YOSHINAGA et alii (1966) através da irradiação com ultravioleta obtiveram um auxotrófico para isoleucina que produziu prolina extracelularmente.

OTSUKA e SHIIO (1968) realizaram um trabalho sobre a composição da membrana celular da *B. flavum*. Verificaram que a concentração de biotina no meio influenciava a produção de glutamato devido a uma mudança na composição dos ácidos graxos da membrana celular.

Através de tratamento com raio-X, *KUBOTA et alii*, citados por *ABE e TAKAYAMA (1972)*, conseguiram mutantes auxotróficos para histidina, que acumularam histidinol.

YOSHINAGA (1969) obteve um mutante auxotrófico para isoleucina que produziu certa quantidade de prolina. Foram estudados ainda, as melhores condições para o acúmulo desse aminoácido, tendo em vista a adição de substâncias requeridas por esse mutante.

SHIIO et alii (1969) usando uma linhagem produtora de ácido glutâmico, estudaram a atividade de enzimas envolvidas na biossíntese desse aminoácido.

SHIIO e NAKAMORI (1970) obtiveram mutantes resistentes ao ácido α -amino- β -hidroxivalérico (AHV), um análogo da treonina, e com isto conseguiram o acúmulo desse aminoácido no meio de cultura.

SANO e SHIIO (1971) conseguiram a produção de alanina, prolina e valina, por mutantes sensíveis a treonina ou metionina em *B. flavum*. A produção foi bem maior quando comparada com a linhagem original.

NAKAMORI e SHIIO (1972) trabalhando com um mutante resistente ao AHV, conseguiram uma produção média de 12 g/l de treonina, sendo essa produção altamente influenciada pela adição de lisina ou metionina ao meio de cultura. Foram ainda estudadas algumas propriedades do mecanismo dessa síntese.

SHIIO et alii (1972) obtiveram mutantes resistentes a 5-metil-triptofano (5-MT), um análogo do triptofano, à partir de mutantes auxotróficos para tirosina e fenilalanina. Esses produziram cerca de 1,9 g/l de triptofano, enquanto os mutantes originais nada produziram. A alta concentração de tirosina no meio inibia a produção.

Dois tipos de mutantes resistentes a m-fluorofenilalanina (mFP), um análogo da fenilalanina, foram encontrados em *B. flavum* por *SUGIMOTO et alii (1973)*. O primeiro tipo acumulava somente fenilalanina e o segundo tipo, fenilalanina e tirosina. Auxotróficos para tirosina também produziram fenilalanina sob condições limitadas de tirosina no meio.

SHIIO et alii (1973) obtiveram mutantes resistentes a AHV e o-metil-L-treonina (OMT) com produção de 11,0

e 14,5 g/l de isoleucina, respectivamente. Dentre os resistentes a DMT, os auxotróficos para adenina e lisina foram os melhores produtores de isoleucina. Foi estudada também a atividade de algumas enzimas envolvidas na biossíntese desse aminoácido.

À partir de mutantes resistentes a AEC, *NAKA-MORI* e *SHIIO* (1973) conseguiram mutantes resistentes a AHV. Alguns deles chegaram a produzir cerca de 15 g/l de treonina, sendo que muitos, além da treonina, acumularam também lisina.

SHIIO et alii (1975) obtiveram mutantes resistentes a 5-fluorotriptofano (5FT), análogo do triptofano, com acúmulo de até 2,4 g/l de triptofano. Mutantes resistentes a 3 fluorofenilalanina (3FP) induzidos à partir de resistentes a 5FT produziram 2 vezes mais triptofano e ainda não foram afetados pela adição de fenilalanina e tirosina.

2.4. Mutantes resistentes a antibióticos em bactérias, utilizados em fermentações

Mutantes resistentes a cloranfenicol (1000 µg/ml) obtidos em *A. aerogenes* aumentaram a sua produção de valina. Em *B. lactofermentum*, foram isolados mutantes resistentes à estreptomicina (100 µg/ml), que produziram a mesma quantidade de ácido glutâmico que a linhagem sensível (*ABE*, 1972).

Altas produções de lisina tem sido obtidas por mutantes de *M. glutamicus* e *B. flavum* resistentes a alguns antibióticos, tais como: penicilina, bacitracina, cicloserina, gramicidina, polimixina e nistatina, onde a produção chega a ser maior em relação à linhagem sensível (*ANON.*, 1975).

Foi descrito também o uso de antibióticos na produção de ácido glutâmico por *B. flavum*. Num meio de melão, benzil-penicilina mostrou efeito de maior produção quando

comparado com outros antibióticos testados, hidroxitetraclina e estreptomicina (*FAM et alii*, 1972).

De acordo com *NAKAYAMA* (1972), num meio de fermentação para produção de lisina, 87% dos mutantes para auxotrofia reverteram para prototrofia, não havendo portanto, produção normal desse aminoácido. Esses mutantes revertidos foraram mais sensíveis a antibióticos do que os auxotróficos. Desse modo, a produção de lisina permaneceu inalterada quando se adicionou eritromicina, devido à inibição do desenvolvimento de reversões.

Além dos antibióticos, outros compostos também podem ser usados: furazolidone, furadodine, furaciline, formalina e pentacloropenato de sódio. Esses compostos foram usados em meios de fermentações de lisina com *B. flavum* e *B. di*-*varicatum* (*ANON.*, 1974).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Materiais

3.1.1. Linhagens

Linhagem de *Brevibacterium flavum*, ATCC-14067, cedida pelo Instituto de Tecnologia de Alimentos de Campinas.

Linhagem de *Aspergillus nidulans* $su_1 ad_{20}$, y , ad_{20} , $paba_8$, acr_1 , lys_5 , cha , deficiente em ácido *p*-aminobenzóico e lisina, resistente a acriflavina e contendo ainda marcas para coloração de esporos (y = amarelo, cha = chartreuse) e para deficiência em adenina com seu respectivo supressor ($su_1 ad_{20}$). Essa linhagem, que faz parte da Micoteca do Setor de Genética de Microrganismos - ESALQ/USP, foi usada para os ensaios de produção de lisina.

3.1.2. Meios de cultura

3.1.2.1. Nutriente líquido

Peptona	5 g
Extrato de carne.	3 g
Água destilada	1000 ml

3.1.2.2. Nutriente Ágar

Ao nutriente líquido (item 3.1.2.1.) foram adicionados 15 g de ágar Difco.

3.1.2.3. Meio mínimo líquido, segundo *SANO e SHIIO (1967)*

Uréia	1,5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1,5 g
KH ₂ PO ₄	1,0 g
K ₂ H PO ₄	3,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,1 g
CaCl ₂ . 2H ₂ O	1 mg
Glicose	5 g
Biotina	30 µg
Tiamina	100 µg
Solução de elementos traço.	1 ml
Água destilada	1000 ml

3.1.2.4. Meio mínimo sólido

Ao meio mínimo líquido (item 3.1.2.3.) foram adicionados 15 g de ágar Difco.

3.1.2.5. Meio líquido de fermentação, modificado
do de *SANO e SHIIO (1967)*

(NH ₄) ₂ SO ₄	40 g
KH ₂ PO ₄	1 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,4 g
CaCO ₃	50 g
FeSO ₄ . 7H ₂ O	2 mg
MnSO ₄ . H ₂ O	2 mg
Biotina	300 µg
Tiamina	200 µg
Glicose	100 g
Solução de caseína hidrolizada	2 ml
Água destilada1000 ml
ajustando o pH a 7,5, com NaOH 1%	

3.1.2.6. Meio mínimo semi-sólido (*PONTECORVO
et alii, 1953*)

NaNO ₃	6 g
KCl	0,5 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,5 g
Zn SO ₄ . 7H ₂ O	traço
FeSO ₄ . 7H ₂ O	traço
Glicose	10 g
Ágar.	7 g
Água destilada.1000 ml

3.1.3. Soluções

3.1.3.1. Solução de elementos traço

ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8 mg
FeCl ₃ . 6H ₂ O	970 mg
CuSO ₄ . 5H ₂ O	393 mg
Na ₂ B ₄ O ₇ . H ₂ O	88 mg
Água destilada	1000 ml

3.1.3.2. Tampão Carbonato - 0,05 M, pH - 9,0

3.1.3.3. Tampão Borato - 0,05 M, pH - 9,0

3.1.3.4. Suspensão de fosfato de cobre

Solução A

CuCl ₂ . 2H ₂ O	2,8 ml
Água destilada.	100 ml

Solução B

Na ₃ PO ₄ . 12H ₂ O	13,6 g
Água destilada	200 ml

As soluções A e B foram misturadas, centrifugadas e o sobrenadante descartado. Em seguida, foi suspensa três vezes em 15 ml de tampão borato (item 3.1.3.3.), centrifugando cada vez. Após a terceira lavagem, ressuspendeu-se em 80 ml de tampão borato.

3.1.3.5. Solução de HCl - 1,2N

3.1.3.6. Solução de 2-cloro-3,5-dinitropiridina: 30 mg em 1 ml de metanol

3.1.3.7. Solução estoque de lisina

L-lisina (na forma cloreto) 62,5 mg
Tampão carbonato (ítem 3.1.3.3.) 20 ml

3.1.3.8. Solução salina

NaCl 8,5 g
Água destilada 1000 ml

3.1.4. Drogas

Foram utilizados o ácido nalidíxico (comercialmente Wintomylon), um quimioterápico da Winthrop Products, e azida de sódio. Também foram usados os antibióticos sulfato de estreptomicina da Fontoura Wyeth S/A, eritromicina (comercialmente ilosone) e cloridrato de vancomicina da Eli Lilly do Brasil Ltda.

As drogas foram dissolvidas em água destilada esterilizada e as soluções preparadas momentos antes do seu uso.

A adição da droga ao meio de cultura foi sempre feita após a autoclavagem, quando o meio se encontrava a uma temperatura em torno de 45°C.

3.2. Métodos

3.2.1. Determinação do nível de resistência da *B. flavum* a drogas

Foram preparadas placas de Petri contendo nutriente ágar mais a droga, nas concentrações de 0; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg/ml. Em cada uma das placas foi semeado 0,1 ml de uma cultura de *B. flavum* desenvolvida à 30°C, por 48 horas em nutriente líquido. As placas assim preparadas foram incubadas durante 72 horas, à 30°C, quando então foi observado o crescimento das colônias para posterior correlação com o tipo de droga e concentração.

3.2.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina

A curva de sobrevivência à estreptomicina foi determinada preparando-se placas de Petri contendo nutriente ágar mais o antibiótico em concentrações crescentes de 0; 0,5; 1; 2; 2,5 e 3 µg/ml. Semeou-se nessas placas 0,1 ml de diluições adequadas de uma cultura de *B. flavum* desenvolvida em nutriente líquido por 48 horas, à 30°C. As placas assim preparadas foram incubadas por 72 horas, à 30°C, quando então foram contadas as colônias por placa.

O mesmo procedimento foi seguido para as curvas de sobrevivência à eritromicina e vancomicina. No caso da eritromicina, foram utilizadas as concentrações de 0; 1; 2; 5; 10 e 15 µg/ml e para a vancomicina, 0; 0,1; 0,2; 0,5; 0,8 e 1,0 µg/ml.

3.2.3. Isolamento de mutantes resistentes à estreptomina

Inicialmente semeou-se 0,1 ml de uma cultura de *B. flavum* desenvolvida à 30°C, por 48 horas em nutriente líquido, em placas contendo nutriente ágar mais 5 µg/ml de estreptomina. As colônias que apareceram nessa concentração foram transferidas para nutriente ágar e mantidas em estoque. Para confirmação da mutação para resistência, esses isolados foram novamente semeados em placas de Petri contendo nutriente ágar mais 0; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500; 1000; 5000, e 10000 µg/ml de estreptomina. Após 72 horas de incubação, à 30°C, foi observado o crescimento de colônias.

3.2.4. Isolamento de mutantes resistentes à eritromicina

Foi desenvolvido o mesmo procedimento ao da obtenção de mutantes resistentes à estreptomina. Os mutantes foram obtidos em placas com concentrações de 15 µg/ml de eritromicina. Para confirmação da mutação, os isolados foram semeados em placas com nutriente ágar mais eritromicina nas concentrações de 0; 1; 2; 5; 10; 20; 50; 100; 200; 500 e 1000 µg/ml.

3.2.5. Isolamento de mutantes resistentes à vancomicina

Foi desenvolvido o mesmo procedimento ao da obtenção de mutantes resistentes aos antibióticos anteriores. Os mutantes foram obtidos em placas cuja concentração de vancomicina foi 1 µg/ml. Para confirmação da mutação, os isola-

dos foram semeados em placas com nutriente ágar mais vancomicina nas concentrações de 0; 0.5; 1; 2; 5; 10 e 20 µg/ml.

3.2.6. Curvas de crescimento

Foram determinadas as curvas de crescimento em nutriente líquido para cada uma das 4 linhagens: original, resistente à estreptomicina, eritromicina e vancomicina. Ainda para a linhagem original, foi determinada a curva de crescimento em meio mínimo.

O método utilizado foi o descrito por AZEVEDO e NEDER (1968). Culturas de *B. flavum* desenvolvidas por 48 horas à 30°C em nutriente líquido, foram diluídas convenientemente e inoculadas em uma série de tubos contendo 10 ml de nutriente líquido e incubadas a seguir à 30°C. As amostras foram retiradas em intervalos de tempo, diluídas adequadamente e semeadas em placas de Petri contendo nutriente ágar. O número de colônias por placa foi contado após 72 horas de incubação, à 30°C.

3.2.7. Cálculo da taxa de crescimento das linhagens original e mutantes

As taxas de crescimento calculadas à partir dos dados obtidos no experimento anterior (Ítem 3.2.6.), foram expressas em termos de número de gerações, taxa de geração e tempo de geração, de acordo com STANIER *et alii* (1969), dados pelas equações:

$$N^{\circ} \text{ de gerações} = \frac{\log N_1 - \log N_0}{\log 2}$$

Taxa de geração = n° de gerações/t

Tempo de geração = $1/\text{taxa de geração}$

onde:

N_1 representa o maior número de organismos encontrados na fase exponencial, N_0 o menor número e t o tempo da fase exponencial das curvas de crescimento.

3.2.8. Curva de sobrevivência à irradiação ultra-violeta

A curva de sobrevivência foi determinada para a linhagem original, segundo a técnica de AZEVEDO e NEDER (1968).

Uma cultura de *B. flavum* desenvolvida por 72 horas, à 30°C, em nutriente líquido, foi centrifugada à 5000 rpm durante 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e as células foram suspensas em solução salina; a seguir fez-se a irradiação com luz ultra-violeta durante 30, 60, 90, 150, 240 e 300 segundos. Após cada tempo de exposição, semeou-se uma alíquota dessa suspensão em placas contendo nutriente ágar, as quais foram incubadas por 72 horas, à 30°C. Posteriormente as colônias foram contadas e comparadas com o número de colônias do controle.

3.2.9. Determinação do crescimento da linhagem original em relação às linhagens mutantes através da mistura de linhagens

A determinação foi feita segundo o método des-

crito por *AZEVEDO e NEDER (1968)*, onde as linhagens foram inoculadas em tubos de ensaio (contendo 10 ml de nutriente líquido) da seguinte maneira:

- a) linhagem original + linhagem resistente à estreptomicina,
- b) linhagem original + linhagem resistente à eritromicina,
- c) linhagem original + linhagem resistente à vancomicina.

As amostras foram coletadas após os tempos de 0, 24, 48 e 72 horas, semeadas e seguir em placas de Petri com nutriente ágar e incubadas à 30°C, por 72 horas. Após a contagem do número de colônias por placa, fez-se a réplica segundo *LEDERBERG e LEIDERBERG (1952)* para outras placas contendo nutriente ágar mais o antibiótico em questão. A concentração dos antibióticos nessas placas foi de 100 µg/ml para estreptomicina, 50 µg/ml para eritromicina e 1 µg/ml para vancomicina. As placas replicadas foram incubadas à 30°C, por 72 horas, quando então, foram contadas as colônias.

Desse modo, considerando o número total de colônias das placas onde se fez réplica como 100%, calculou-se as porcentagens de células resistentes e sensíveis nas diversas misturas de linhagens e nos diferentes tempos de cultivo.

3.2.10. Determinação quantitativa da força da estreptomicina, eritromicina e vancomicina, através da mistura de linhagens

Para medir a força da estreptomicina, eritro-

micina e vancomicina, seguiu-se o método proposto por *BERGAMIN FQ (1973)*.

Com os resultados obtidos através do experimento descrito em 3.2.9., construiu-se uma Tabela com 5 colunas onde na 1.^a estão os tempos de cultivo; na 2.^a, as porcentagens da linhagem sensível; na 3.^a, as porcentagens do mutante; na 4.^a, as porcentagens recalculadas de mutantes (tomando-se as porcentagens da linhagem sensível como 100%), e na 5.^a, os logarítmos decimais dos valores da 4.^a coluna.

Em seguida, de acordo com *PIMENTEL GOMES(1976)*, calculou-se a regressão linear entre os logarítmos decimais das porcentagens recalculadas de bactérias resistentes e o tempo de cultivo:

$$x = x_0 + bt$$

onde:

x = log da porcentagem recalculada de bactérias resistentes em um determinado tempo t .

x_0 = log da porcentagem recalculada de bactérias resistentes, no tempo $t = 0$.

b = coeficiente angular.

Também foi calculado a Meia Vida relativa (MVr), que é o tempo necessário para que uma população de uma linhagem de um microrganismo reduza à metade ou dobre em relação a uma outra linhagem considerada.

$$MVr = \frac{-\log 2}{b}$$

3.2.11. Avaliação da capacidade de produção de lisina das linhagens original e mutantes

As colônias selecionadas através do método semi-quantativo de lisina (ítem 3.2.12.) foram transferidas para frascos contendo 10 ml de meio mínimo, ou meio mínimo de fermentação ou meio de fermentação mais antibiótico. As concentrações de antibióticos usadas foram 50, 20 e 1 µg/ml, respectivamente para estreptomicina, eritromicina e vancomicina. A incubação foi à 30^oC durante 96 horas, sob agitação.

Em seguida o meio de cultura foi centrifugado à 10000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante armazenado em tubos esterilizados para a determinação quantitativa do teor de lisina (ítem 3.2.13.).

3.2.12. Determinação semiquantitativa do teor de lisina

Foi utilizado o método de seleção proposto por AZEVEDO (1973)*.

As linhagens original e resistentes foram semeadas em placas de Petri contendo meio mínimo de *B. flavum* e incubadas à 30^oC, durante 72 horas. As colônias foram replicadas para outras placas contendo o mesmo meio de cultura e incubadas sob as mesmas condições anteriores. As placas originais foram conservadas à temperatura de 4^oC.

Uma vez crescidas as colônias nas réplicas, estas foram mortas com clorofórmio (0,5 ml durante 15 minutos).

*Comunicação pessoal.

Em seguida, foi colocada nessas placas uma 2.^a camada de meio mínimo semi-sólido para fungo (Ítem 3.1.2.6.) mais a linhagem de *A. nidulans* testadora de lisina, acrescentado de ácido paraminobenzóico, requerido por essa linhagem. Após isso, as placas foram incubadas durante 5 dias, à 37^oC, quando então foram observados os halos de crescimento do fungo ao redor das colônias bacterianas. Os halos de maior tamanho foram observados e as colônias bacterianas correspondentes das placas originais puderam ser usadas para o teste quantitativo da lisina (Ítem 3.2.13).

3.2.13. Determinação quantitativa do teor de lisina

O método aplicado para testar o teor de lisina, foi o modificado de *VILLEGAS e MERTZ (1971)* usado no Laboratório do CIMMYT, México, para dosagem de lisina em milho.

Foi pipetado 1 ml da amostra a ser analisada em um tubo de centrífuga e adicionado 0,5 ml de tampão carbonato (Ítem 3.1.3.2.) e 0,5 ml da suspensão de fosfato de cobre (Ítem 3.1.3.4.). A mistura foi agitada por 5 minutos e centrifugada à 3000 rpm, por 15 minutos. Do sobrenadante foi retirado 1 ml, o qual foi transferido para um tubo de ensaio, adicionando-se em seguida 0,1 ml de uma solução de 2-cloro-3,5 dinitropiridina (Ítem 3.1.3.6.).

A seguir a mistura foi agitada de 30 em 30 minutos, durante 2 horas, e depois adicionou-se 5ml de HCl - 1,2 N. Após isso colocou-se 5 ml de acetato de etila, agitando-se novamente. O sobrenadante foi retirado e o processo repetido por 3 vezes, quando então procedeu-se a leitura no fotocolorímetro (Spectronic 20) à 390 nm.

A determinação do teor de lisina nas amostras foi realizada por comparação com a curva padrão feita com amostras

.30.

tras de 0 - 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$, obtidas por diluição com tampão carbonato de uma solução estoque de lisina (Ítem 3.1.3.7.).

4. RESULTADOS

4.1. Determinação do nível de resistência da *B. flavum* a drogas

O nível de resistência da linhagem original de terminado para cinco drogas, conforme o método descrito no ítem 3.2.1., é mostrado na Tabela 1.

Tabela 1. Nível de resistência da *B. flavum* à diferentes drogas.

Concentração (µg/ml)	Azida de sódio	Ácido nalidíxice	Eritromicina	Estreptomicina	Vancomicina
0	+	+	+	+	+
0,5	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	-
10	+	+	+	-	-
20	+	+	-	-	-
50	+	+	-	-	-
100	+	+	-	-	-
200	+	+	-	-	-
500	+	+	-	-	-
1000	-	+	-	-	-

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

4.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina

Os resultados do experimento descrito em 3.2.2. estão nas Tabelas 2 - 4, respectivamente para a estreptomicina, eritromicina e vancomicina.

A representação gráfica desses dados está na Figura 2.

Tabela 2. Porcentagem de sobreviventes de *B. flavum* à estreptomicina (média de 2 repetições).

Concentração de estreptomicina (µg/ml)	Nº de sobreviventes (bactérias/ml)	Porcentagem de sobreviventes
0	$4,10 \times 10^7$	$1,00 \times 10^2$
0,5	$1,12 \times 10^7$	$2,70 \times 10^1$
1,0	$1,26 \times 10^6$	$3,07 \times 10^0$
2,0	$5,32 \times 10^4$	$1,29 \times 10^{-1}$
2,5	$1,01 \times 10^4$	$2,46 \times 10^{-2}$
3,0	$6,67 \times 10^3$	$1,62 \times 10^{-2}$

Tabela 3. Porcentagem de sobreviventes de *B. flavum* à eritromicina (média de 2 repetições).

Concentração de eritromicina (µg/ml)	Nº de sobreviventes (bactérias/ml)	Porcentagem de sobreviventes
0	$3,60 \times 10^7$	$1,00 \times 10^2$
1	$1,49 \times 10^7$	$4,14 \times 10^1$
2	$7,45 \times 10^6$	$2,07 \times 10^1$
5	$5,86 \times 10^5$	$1,63 \times 10^0$
10	$3,05 \times 10^2$	$8,47 \times 10^{-4}$
15	$2,95 \times 10^2$	$8,19 \times 10^{-4}$

Tabela 4. Porcentagem de sobreviventes de *B. flavum* à vancomicina (média de 2 repetições).

Concentração de vancomicina ($\mu\text{g/ml}$)	Nº de sobreviventes (bactérias/ml)	Porcentagem de sobreviventes
0	$5,32 \times 10^7$	$1,00 \times 10^2$
0,1	$3,60 \times 10^7$	$6,77 \times 10^1$
0,2	$2,60 \times 10^7$	$4,89 \times 10^1$
0,5	$4,70 \times 10^2$	$8,83 \times 10^{-4}$
0,8	$2,80 \times 10^1$	$4,89 \times 10^{-5}$
1,0	$2,40 \times 10^1$	$4,51 \times 10^{-5}$

4.3. Isolamento de mutantes resistentes à estreptomicina

Foram isoladas 4 colônias que cresceram em nutriente ágar mais 5 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina (item 3.2.3.). Esses mutantes foram denominados *str*₁, *str*₂, *str*₃ e *str*₄. A comparação entre a linhagem original e os mutantes quanto aos níveis de resistência é mostrada na Tabela 5.

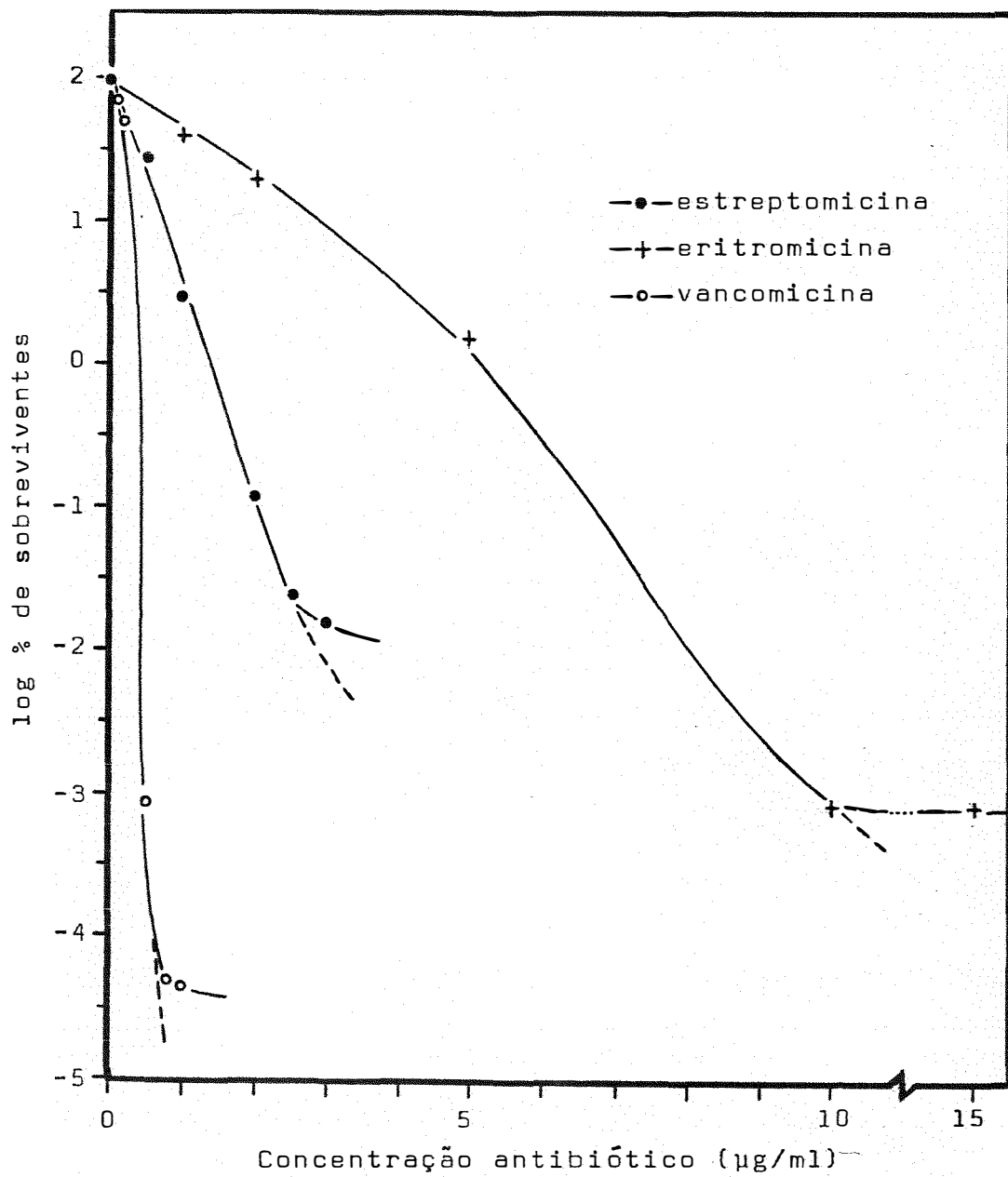


Figura 2. Curvas de sobrevivência da linhagem original de *B. flavum* à estreptomicina, eritromicina e vancomicina.

Tabela 5. Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à estreptomicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de estreptomicina.

Concentração de estreptomicina ($\mu\text{g/ml}$)	Colônias ensaiadas				
	Linhagem original	Mutante Δstr_1	Mutante Δstr_2	Mutante Δstr_3	Mutante Δstr_4
0	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
5	-	+	+	+	+
10	-	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+
100	-	+	+	+	+
200	-	+	+	+	+
500	-	+	+	+	+
1000	-	+	+	+	+
2000	-	+	+	+	+
5000	-	+	+	-	+
10000	-	+	-	-	+

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

4.4. Isolamento de mutantes resistentes à eritromicina

Foram isoladas 4 colônias que cresceram em nutriente ágar mais 15 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina (item 3.2.4.). Esses mutantes foram denominados ero_1 , ero_2 , ero_3 , ero_4 . A comparação entre a linhagem original e os mutantes quanto aos níveis de resistência é mostrada na Tabela 6.

Tabela 6. Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à eritromicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de eritromicina.

Concentração de eritromicina (µg/ml)	Colônias ensaiadas				
	Linhagem original	Mutante <i>ero</i> ₁	Mutante <i>ero</i> ₂	Mutante <i>ero</i> ₃	Mutante <i>ero</i> ₄
0	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+
5	+	+	+	+	+
10	+	+	+	+	+
20	-	+	+	+	+
50	-	+	+	+	+
100	-	-	+	+	+
200	-	-	+	+	+
500	-	-	-	-	-

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

4.5. Isolamento de mutantes resistentes à vancomicina

Foram isoladas 2 colônias que cresceram em nutriente ágar mais 1 µg/ml de vancomicina (item 3.2.5.). Esses mutantes foram denominados *van*₁ e *van*₂. A comparação entre a linhagem original e os mutantes quanto aos níveis de resistência é mostrada na Tabela 7.

Tabela 7. Crescimento da linhagem original em comparação com os mutantes resistentes à vancomicina em nutriente ágar com diferentes concentrações de vancomicina.

Concentração de vancomicina ($\mu\text{g/ml}$)	Colônias ensaiadas		
	Linhagem original	Mutante <i>van</i> ₁	Mutante <i>van</i> ₂
0	+	+	+
0,5	+	+	+
0,8	-	+	+
1,0	-	+	+
1,5	-	-	-

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

4.6. Curvas de crescimento

Os resultados do experimento descrito em 3.2.6. estão nas Tabelas 8 - 12, respectivamente para a linhagem original cultivada em nutriente líquido e meio mínimo, linhagens resistentes à estreptomicina, à eritromicina e à vancomicina. A representação gráfica desses dados está na Figura 3.

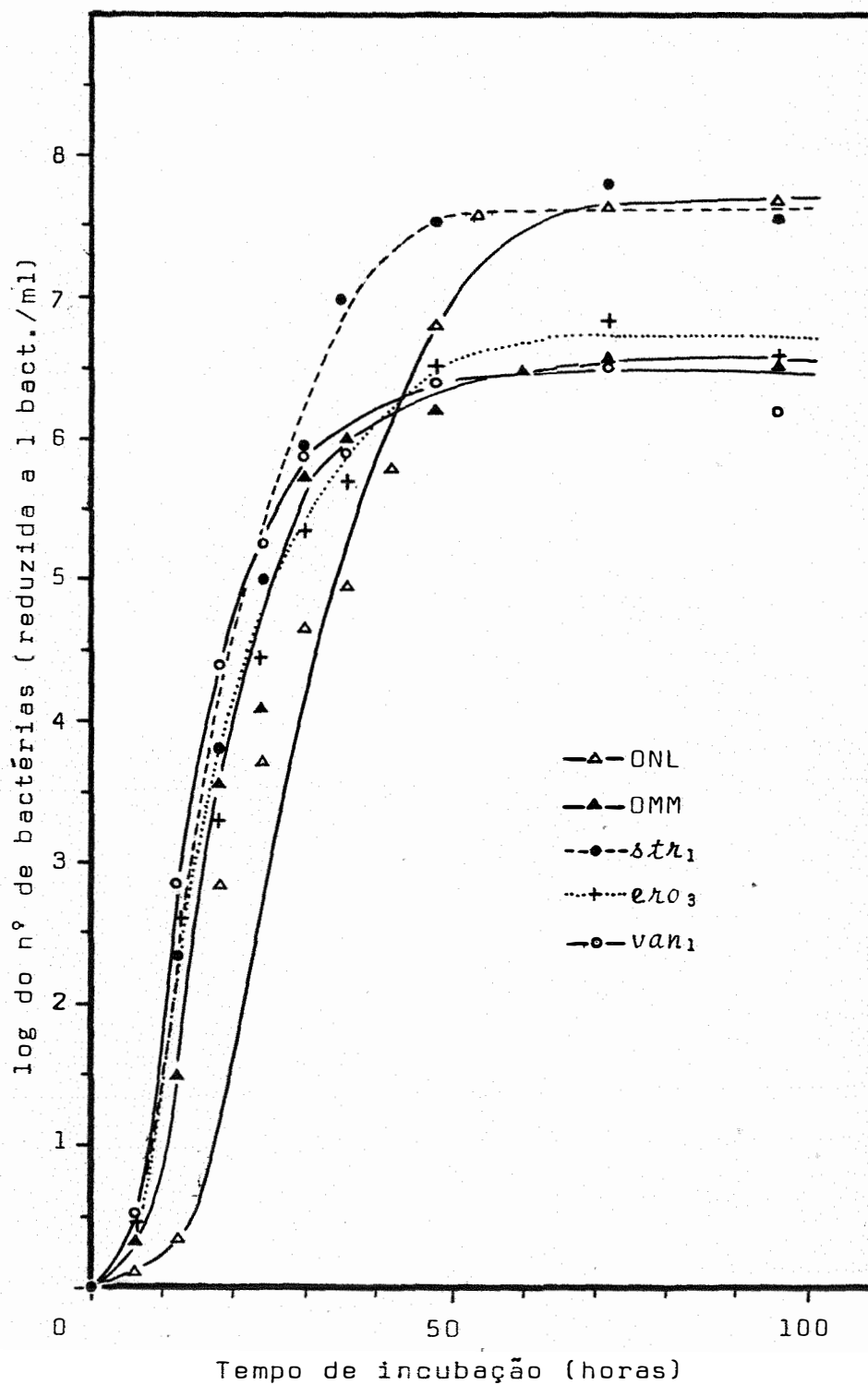


Figura 3. Curvas de crescimento da linhagem original cultivada em nutriente líquido (ONL) e meio mínimo (OMM), e linhagens resistentes à estreptomicina (δstr_1), eritromicina (eri_3) e vancomicina (van_1) cultivadas em nutriente líquido.

Tabela 8. Número de células viáveis da linhagem original em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições).

Tempo (horas)	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria
0	$1,20 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$
6	$1,60 \times 10^2$	$1,33 \times 10^0$
12	$2,70 \times 10^2$	$2,25 \times 10^0$
18	$8,76 \times 10^4$	$7,30 \times 10^2$
24	$5,83 \times 10^5$	$4,86 \times 10^3$
30	$5,23 \times 10^6$	$4,36 \times 10^4$
36	$1,04 \times 10^7$	$8,66 \times 10^4$
42	$7,18 \times 10^7$	$5,98 \times 10^5$
48	$7,30 \times 10^8$	$6,08 \times 10^6$
54	$4,17 \times 10^9$	$3,47 \times 10^7$
72	$5,00 \times 10^9$	$4,17 \times 10^7$
96	$5,80 \times 10^9$	$4,83 \times 10^7$

Tabela 9. Número de células viáveis da linhagem original em diferentes tempos, cultivada em meio mínimo (média de 2 repetições).

Tempo (horas)	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria
0	$1,01 \times 10^2$	$1,00 \times 10^0$
6	$2,10 \times 10^2$	$2,07 \times 10^0$
12	$3,00 \times 10^3$	$2,97 \times 10^1$
18	$3,50 \times 10^5$	$3,46 \times 10^3$
24	$1,20 \times 10^6$	$1,18 \times 10^4$
30	$5,41 \times 10^7$	$5,36 \times 10^5$
36	$9,73 \times 10^7$	$9,63 \times 10^5$
48	$1,60 \times 10^8$	$1,58 \times 10^6$
60	$3,00 \times 10^8$	$2,97 \times 10^6$
72	$3,90 \times 10^8$	$3,86 \times 10^6$
96	$3,32 \times 10^8$	$3,28 \times 10^6$

Tabela 10. Número de células viáveis da linhagem resistente à estreptomicina (*Str₁*) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições),

Tempo (horas)	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria
0	$1,20 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$
6	$4,28 \times 10^1$	$3,57 \times 10^0$
12	$2,70 \times 10^3$	$2,25 \times 10^2$
18	$8,00 \times 10^4$	$6,67 \times 10^3$
24	$1,14 \times 10^6$	$9,50 \times 10^4$
30	$1,03 \times 10^7$	$8,58 \times 10^5$
36	$1,16 \times 10^8$	$9,67 \times 10^6$
48	$4,00 \times 10^8$	$3,33 \times 10^7$
72	$4,75 \times 10^8$	$3,96 \times 10^7$
96	$4,21 \times 10^8$	$3,50 \times 10^7$

Tabela 11. Número de células viáveis da linhagem resistente à eritromicina (*ero₃*) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições).

Tempo (horas)	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria
0	$2,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$
6	$6,42 \times 10^1$	$3,21 \times 10^0$
12	$8,35 \times 10^3$	$4,17 \times 10^2$
18	$3,80 \times 10^4$	$1,90 \times 10^3$
24	$5,52 \times 10^5$	$2,76 \times 10^4$
30	$4,35 \times 10^6$	$2,17 \times 10^5$
36	$9,80 \times 10^6$	$4,90 \times 10^5$
48	$6,33 \times 10^7$	$3,16 \times 10^6$
72	$1,37 \times 10^8$	$6,85 \times 10^6$
96	$7,76 \times 10^7$	$3,88 \times 10^6$

Tabela 12. Número de células viáveis da linhagem resistente à vancomicina (van_1) em diferentes tempos, cultivada em nutriente líquido (média de 2 repetições).

Tempo (horas)	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria
0	$2,00 \times 10^1$	$1,00 \times 10^0$
6	$5,93 \times 10^1$	$2,96 \times 10^0$
12	$1,42 \times 10^4$	$7,10 \times 10^2$
18	$5,07 \times 10^5$	$2,53 \times 10^4$
24	$3,60 \times 10^6$	$1,80 \times 10^5$
30	$1,51 \times 10^7$	$7,55 \times 10^5$
36	$1,48 \times 10^7$	$7,40 \times 10^5$
48	$4,80 \times 10^7$	$2,40 \times 10^6$
72	$6,40 \times 10^7$	$3,20 \times 10^6$
96	$3,10 \times 10^7$	$1,55 \times 10^6$

4.7. Determinação das taxas de crescimento das linhagens original e mutantes

Com base nos resultados obtidos dos experimentos descritos nos itens 3.2.6. e 4.6., calculou-se as taxas de crescimento das linhagens original (em nutriente líquido e meio mínimo) e resistentes (em nutriente líquido), conforme indicado no item 3.2.7. Esses resultados estão na Tabela 13.

Tabela 13. Taxas de crescimento das linhagens original e resistentes.

L i n h a g e n s	Taxa de geração (gerações/ hora)	Tempo de geração (horas/geração)
Original (nutriente líquido)	0,57	1,75
Original (meio mínimo)	0,34	2,94
Resistente à estreptomicina (<i>str₁</i>)	0,55	1,81
Resistente à eritromicina (<i>ero₃</i>)	0,47	2,12
Resistente à vancomicina (<i>van₁</i>)	0,46	2,17

4.8. Curva de sobrevivência à irradiação ultra-violeta

Os dados do experimento descrito em 3.2.8. são mostrados na Tabela 14 e a representação gráfica na Figura 4.

Tabela 14. Curva de sobrevivência da linhagem original à irradiação ultra-violeta (média de 2 repetições).

Tempo (segundos)	Nº de sobreviventes (cels/ml)	Porcentagem de sobreviventes
0	$2,50 \times 10^8$	$1,00 \times 10^2$
30	$1,58 \times 10^8$	$6,32 \times 10^1$
60	$3,60 \times 10^7$	$1,44 \times 10^1$
90	$4,50 \times 10^6$	$1,78 \times 10^0$
150	$4,20 \times 10^5$	$1,68 \times 10^{-1}$
240	$5,00 \times 10^2$	$2,00 \times 10^{-4}$
300	$8,00 \times 10^0$	$3,20 \times 10^{-6}$

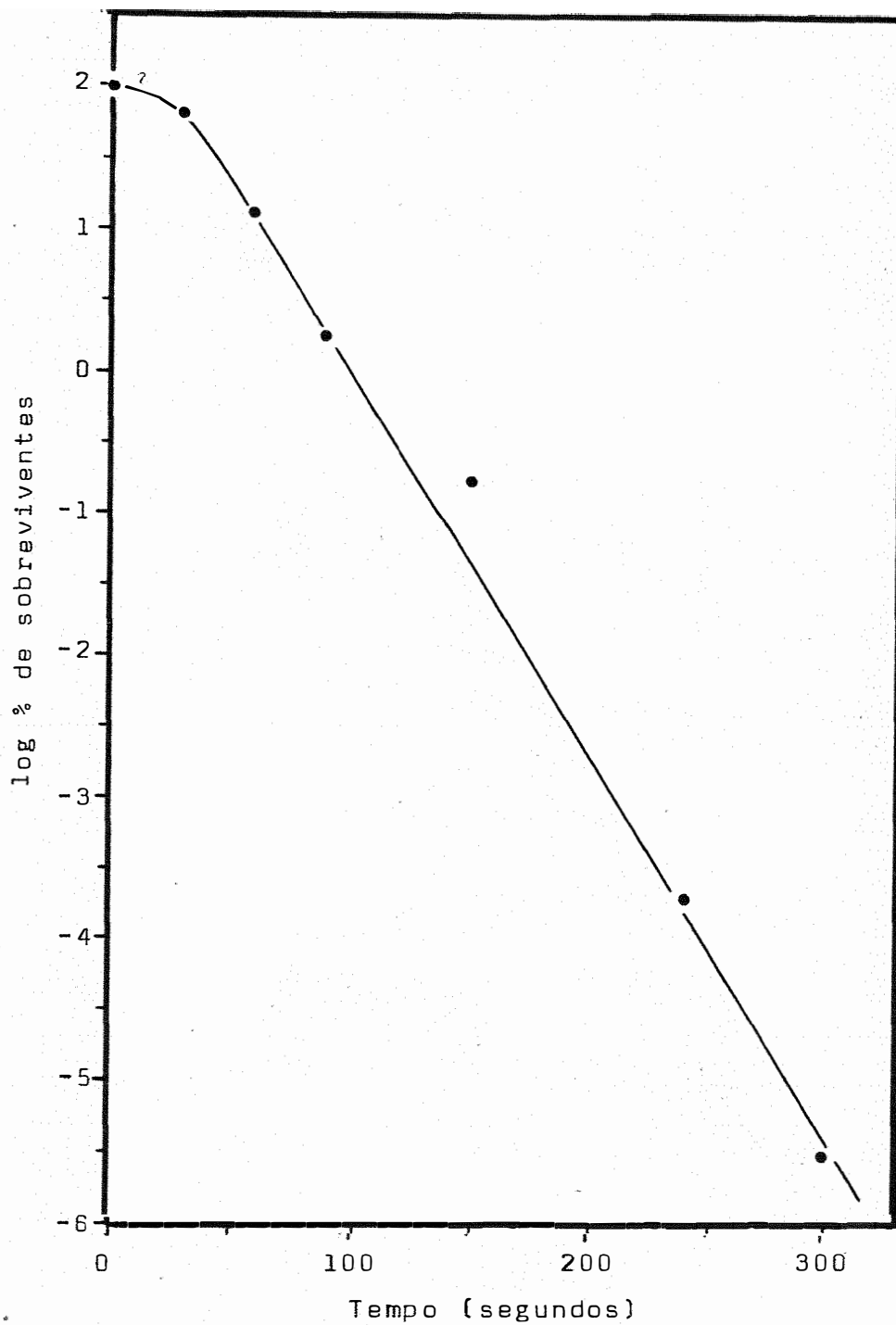


Figura 4. Curva de sobrevivência da linhagem original de *B. flavum* à irradiação ultra-violeta.

4.9. Determinação do crescimento da linhagem original em relação às linhagens mutantes através da mistura de linhagens

Os resultados do experimento descrito no item 3.2.9. estão nas Tabelas 15 - 17 para as misturas da linhagem original com o mutante resistente à estreptomicina, resistente à eritromicina e resistente à vancomicina, respectivamente.

Tabela 15. Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistentes à estreptomicina (str_1) em mistura.

Tempo de incubação (horas)	Nº total de bactérias*	Nº de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes
0	180	80	44,44
	56	20	35,71
24	97	16	16,49
	65	12	18,46
36	192	20	10,42
	340	40	11,76
48	46	4	8,70
	75	6	8,00
72	65	5	7,69
	31	2	6,45

$$\chi^2 = 57,25***$$

*3 a 6 placas.

Tabela 16. Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistente à eritromicina (ero_3) em mistura.

Tempo de incubação (horas)	Nº total de bactérias*	Nº de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes
0	104	74	71,15
	86	59	68,60
24	132	52	39,39
	147	54	36,73
48	60	14	23,33
	116	34	29,31
72	145	34	23,45
	105	22	20,95

$\chi^2 = 32,35^{***}$

*3 a 6 placas.

Tabela 17. Efeito do período de cultivo em nutriente líquido sobre a porcentagem de linhagens original e resistente à vancomicina (van_1) em mistura.

Tempo de incubação (horas)	Nº total de bactérias*	Nº de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes
0	65	37	56,92
	94	52	55,32
24	170	72	42,35
	92	35	38,04
48	220	76	34,55
	29	9	31,03
72	35	5	14,29
	87	14	16,09

$\chi^2 = 18,98***$

*3 a 6 placas.

4.10. Determinação das forças das drogas através da mistura de linhagens

Os resultados das análises realizadas conforme o item 3.2.10., estão nas Tabelas 18 - 20, para as linhagens resistentes à estreptomomicina, à eritromomicina e à vancomomicina, respectivamente. O coeficiente angular da regressão linear (b), assim como os valores dos testes F e coeficiente de correlação linear (r), para cada repetição estão na Tabela 21.

Foi aplicado o teste da hipótese que os coeficientes angulares das repetições para cada antibiótico não diferem entre si (*STEEL e TORRIE, 1960*), mesmo ao nível de 50%. A partir disto foi possível estimar para cada antibiótico, um coeficiente angular médio e a sua semi-amplitude do intervalo de confiança, ao nível de 5%. Também foi calculada a Meia Vida relativa (MVR) e esses dados se encontram na Tabela 22.

Tabela 18. Quantidade relativa do número de células de linhagens resistentes à estreptomicina (str_1) e original quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições.

Tempo (horas)	% de bactérias sensíveis	% de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes (recalculada)	$x = \log\%$ de bactérias resistentes (recalculada)
0	55,56	44,44	79,99	1,903
	64,29	35,71	55,54	1,745
24	83,51	16,49	19,75	1,295
	81,54	18,46	22,64	1,355
36	85,98	10,42	11,63	1,066
	88,24	11,76	13,33	1,125
48	91,30	8,70	9,53	0,979
	92,00	8,00	8,70	0,939
72	92,31	7,69	8,33	0,921
	93,55	6,45	6,89	0,838

Tabela 19. Quantidade relativa do número de células de linhagens resistente à eritromicina (*ero₃*) e original, quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições.

Tempo (horas)	% de bactérias sensíveis	% de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes (recalculada)	x=log % de bactérias resistentes (recalculada)
0	28,85	71,15	246,62	2,392
	31,40	68,60	218,47	2,339
24	60,61	39,39	64,99	1,813
	63,27	36,73	58,05	1,764
48	76,67	23,33	30,43	1,483
	70,69	29,31	41,46	1,618
72	76,55	23,45	30,63	1,486
	79,05	20,95	26,50	1,423

Tabela 20. Quantidade relativa do número de células de linhagens resistentes à vancomicina (van_1) e original quando cultivadas em mistura. Os dados se referem a 2 repetições.

Tempo (horas)	% de bactérias sensíveis	% de bactérias resistentes	% de bactérias resistentes (recalculada)	$x = \log$ % de bactérias resistentes (recalculada)
0	43,08	56,92	132,13	2,121
	44,68	55,32	123,81	2,093
24	57,65	42,35	73,46	1,866
	61,96	38,04	61,39	1,788
48	65,45	34,55	52,79	1,723
	68,97	31,03	44,99	1,653
72	85,71	14,29	16,67	1,222
	83,91	16,09	19,18	1,283

Tabela 21. Valores do teste F, coeficientes de correlação linear (r) e coeficientes angulares (b) para cada antibiótico e repetição.

Antibiótico	Repetições	F	r	b
Estreptomicina	1º	14,4494*	- 0,9099*	- 0,013592
	2º	43,6710**	- 0,9673*	- 0,013071
Eritromicina	1º	10,9254 ⁺	- 0,9193 ⁺	- 0,012700
	2º	17,6230 ⁺	- 0,9476 ⁺	- 0,012058
Vancomicina	1º	30,8153*	- 0,9690*	- 0,011833
	2º	71,0690*	- 0,9862*	- 0,010687

Tabela 22. Coeficientes angulares da regressão linear (\bar{b}) e Meia Vida relativa (Mvr) dos mutantes resistentes (média de 2 repetições).

Linhagem	\bar{b}	Mvr (horas)
Resistente à estreptomicina (str_1)	- 0,013333 \pm 0,004994	máximo 36,10 médio 22,58 mínimo 16,42
Resistente à eritromicina (ero_3)	- 0,012379 \pm 0,006654	máximo 52,59 médio 24,32 mínimo 15,82
Resistente à vancomicina (van_1)	- 0,011260 \pm 0,003431	máximo 38,45 médio 26,73 mínimo 20,49

4.11. Determinação semiquantitativa do teor de lisina

As Figuras 5 e 6 mostram os resultados obtidos através dos experimentos realizados de acordo com o ítem 3.2.12.

Nota-se que nem sempre as maiores colônias bacterianas são as que apresentam maior halo, como é o caso do mutante *str*₂, ou *ero*₁ e *ero*₃.

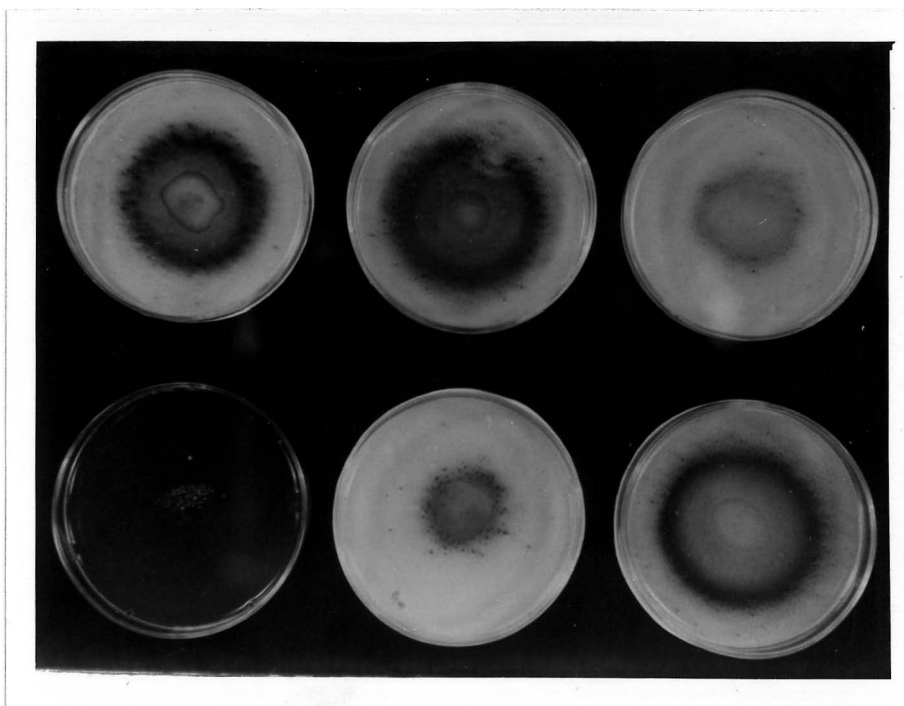


Figura 5. Halos de crescimento de *A. nidulans* ao redor de colônias das linhagens original e mutantes de *B. flavum*. Da esquerda para a direita, em cima: linhagem original, *ero*₁ e *ero*₃; em baixo: *str*₁, *str*₂ e *str*₃.

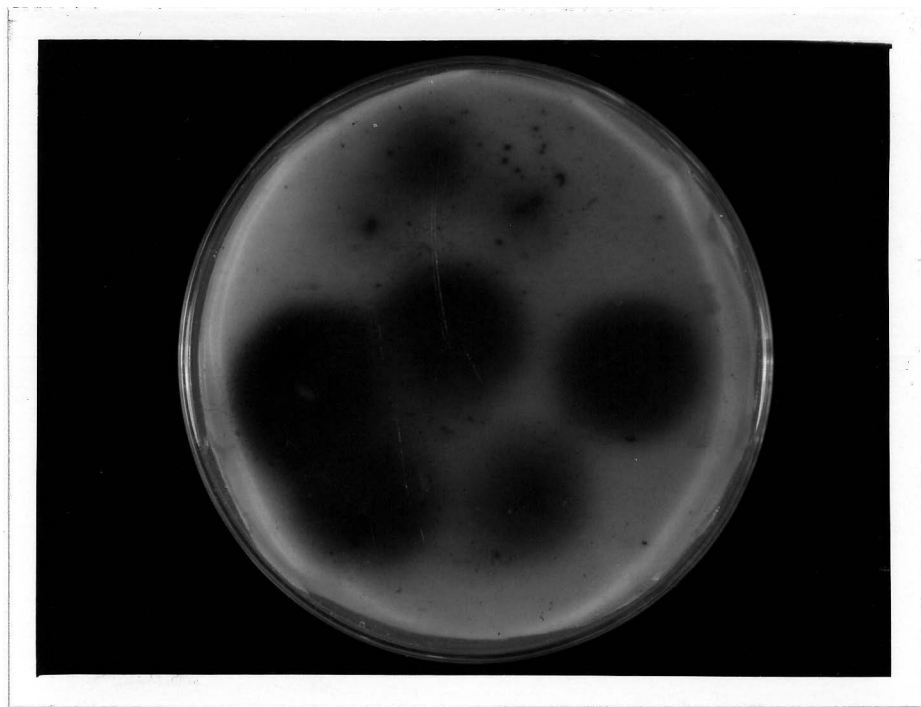


Figura 6. Aspecto geral de uma placa de Petri com halos de crescimento de *A. nidulans* ao redor de colônias de *B. flavum* da linhagem original.

4.12. Determinação quantitativa do teor de lisina

As análises da determinação quantitativa do teor de lisina foram realizadas de acordo com o item 3.2.13. Os dados da curva padrão e a equação da reta de calibração estão na Tabela 23 e representados na Figura 7. Os resultados das análises para a linhagem original e mutantes resistentes à estreptomicina, eritromicina e vancomicina encontram-se nas Tabelas 24 - 27, respectivamente.

À partir dos dados das Tabelas 24 - 27, foi calculado o quadrado médio (Q.M.) para testar a homogeneidade da variância entre as colônias de cada linhagem (original e mutantes) e meios de cultura (meios mínimo e mínimo de fermentação). Os resultados estão apresentados na Tabela 28.

Também foi feito o teste F para verificar a variância entre os valores médios dos mutantes para cada droga bem como para a média geral das linhagens original e resistentes (entre grupos). Esses valores são apresentados na Tabela 29. Apesar do teste F ter dado significativo ao nível de 5% para as médias entre grupos, para o meio mínimo de fermentação, os testes Tukey e de Duncan não acusaram significância nesse nível. Quanto aos valores médios de produção entre os mutantes para estreptomicina nesse mesmo meio, o teste Tukey ao nível de 5% resultou em uma diferença mínima significativa de 373,67 µg/ml.

Ainda foi calculado o coeficiente de correlação entre a produção de lisina em meio mínimo e em meio mínimo de fermentação para a linhagem original e mutantes resistentes às drogas. Com base nos valores desses coeficientes foi calculado o coeficiente médio (ponderado) de correlação entre esses meios. Esses valores se encontram na Tabela 30.

Tabela 23. Relação entre concentração de lisina de soluções padrões e absorvância.

Concentração de lisina (C, µg/ml)	Absorvância (A)		
	Repetições		Média
	1. ^a	2. ^a	
0	0,000	0,000	0,000
50	0,039	0,038	0,038
100	0,075	0,080	0,078
150	0,138	0,140	0,139
200	0,170	0,170	0,170
400	0,380	0,400	0,390

$$A = - 0,01162 + 0,000983 C \quad (r = 0,9973^{**})$$

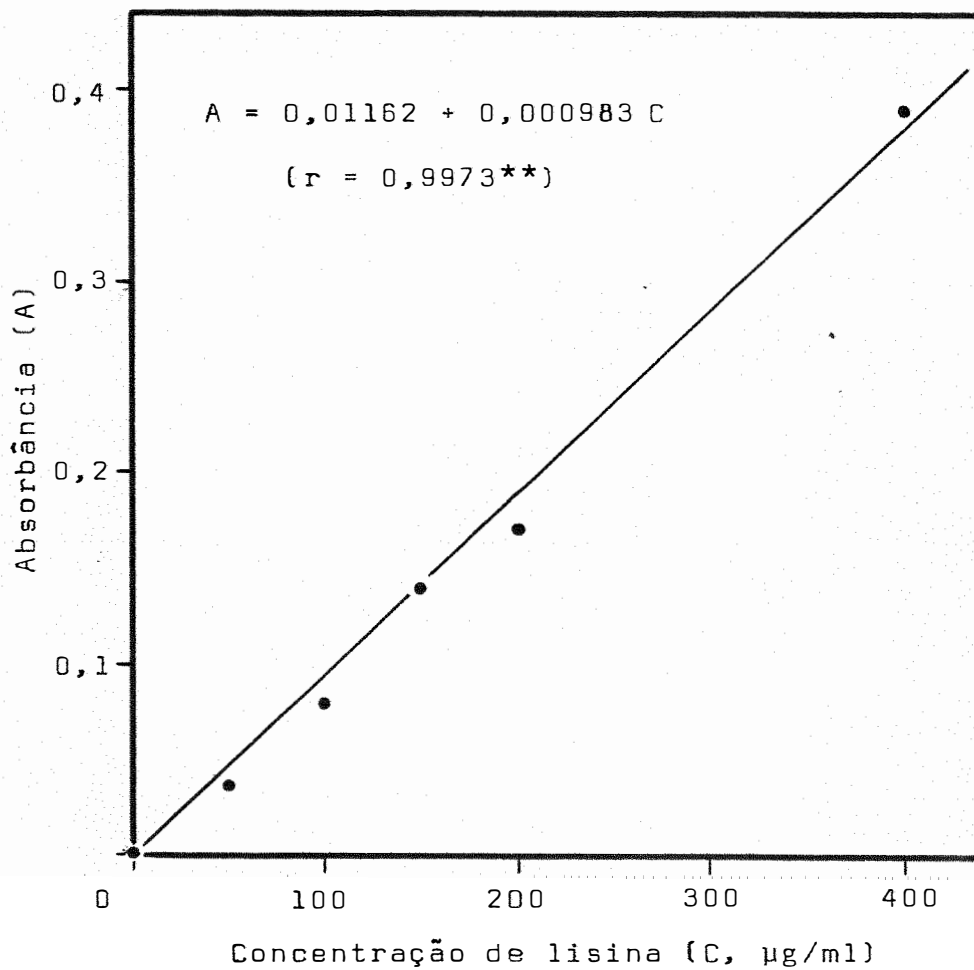


Figura 7. Relação entre concentração de lisina de soluções padrões e absorbância.

Tabela 24. Concentração de lisina em colônias da linhagem original nos meios mínimo e mínimo de fermentação (média de 2 repetições).

Colônias ensaiadas da linhagem original	Concentração de lisina ($\mu\text{g/ml}$)	
	Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
1	66,67	135,29
2	29,96	292,30
3	132,74	304,73
4	46,92	96,15
5	47,69	369,23
6	168,75	112,50
7	53,85	138,46
8	35,38	293,33
9	69,23	293,33
10	49,46	320,00
11	25,80	116,13
12	74,31	321,12
Média geral	66,65	283,13

Tabela 25. Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à estreptomicina (média de 2 repetições).

Mutantes resistentes à estreptomicina	Colônias ensaiadas (n°)	Concentração de lisina (µg/ml)	
		Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
<i>str₁</i>	1	87,06	387,61
	2	182,81	908,59
	3	57,97	282,72
	4	208,59	937,50
	5	49,56	304,42
	média	117,20	564,17
<i>str₂</i>	1	56,21	206,90
	2	46,90	181,03
	3	51,72	227,59
	4	81,03	242,07
	5	65,49	300,88
	média	60,27	231,69
<i>str₃</i>	1	76,47	348,87
	2	104,62	796,87
	3	140,62	714,84
	4	145,53	703,12
	5	58,59	300,02
	média	105,17	572,74
<i>str₄</i>	1	42,48	474,34
	2	129,20	676,11
	3	92,00	654,87
	4	95,39	615,93
	5	102,93	628,32
	média	92,40	609,91
Média geral		93,76	494,63

Tabela 26. Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à eritromicina (média de 2 repetições).

Mutantes resistentes à eritromicina	Colônias ensaiadas (n°)	Concentração de lisina (µg/ml)	
		Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
<i>ero₁</i>	1	98,50	288,49
	2	107,08	486,72
	3	155,75	300,00
	4	65,49	254,12
	5	24,61	135,29
	média	90,86	292,92
<i>ero₂</i>	1	96,09	193,95
	2	157,03	609,37
	3	63,08	284,61
	4	83,35	301,47
	5	163,34	761,72
	média	112,58	430,22
<i>ero₃</i>	1	60,18	300,77
	2	132,74	380,53
	3	58,41	309,77
	4	44,25	324,61
	5	64,61	285,76
	média	72,04	320,29
<i>ero₄</i>	1	81,18	633,63
	2	58,96	531,33
	3	75,52	527,43
	4	79,65	522,12
	5	60,00	174,34
	média	71,06	477,77
Média geral		86,49	380,30

Tabela 27. Concentração de lisina em colônias mutantes resistentes à vancomicina (média de 2 repetições).

Mutantes resistentes à vancomicina	Colônias ensaiadas (n ^o)	Concentração de lisina (µg/ml)	
		Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
<i>van</i> ₁	1	49,46	148,23
	2	56,67	197,65
	3	81,72	212,90
	4	49,46	152,94
	5	53,76	188,23
	média	58,21	180,00
<i>van</i> ₂	1	73,12	188,21
	2	70,97	183,37
	3	75,27	236,56
	4	58,06	181,20
	5	43,01	140,05
	média	64,09	185,88
Média geral		61,15	182,93

Tabela 28. Valores do Quadrado Médio entre as colônias das linhagens original e mutantes.

Linhagem	Quadrado Médio (Q.M.)	
	Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
Original	1830,25	13781,34
Resistente à estreptomicina	2013,79	45564,29
Resistente à eritromicina	1437,21	26785,34
Resistente à vancomicina	182,83	988,21
χ^2	10,45*	9,45*

Tabela 29. Valores do teste F entre os mutantes de cada droga e entre grupos de mutantes e original.

Linhagem	F	
	Meio mínimo	Meio mínimo de fermentação
Resistente à estreptomicina	1,4921 ns	3,6558*
Resistente à eritromicina	1,3242 ns	1,4453 ns
Resistente à vancomicina	0,4715 ns	0,0877 ns
Entre grupos	1,6180 ns	9,0348*

Tabela 30. Valores de correlação entre meios mínimo e mínimo de fermentação.

Linhagens	r
Original	0,5858*
<i>str</i> ₁	0,9911**
<i>str</i> ₂	0,5730
<i>str</i> ₃	0,8302 ⁺
<i>str</i> ₄	0,9407*
<i>ero</i> ₁	0,6062
<i>ero</i> ₂	0,9062*
<i>ero</i> ₃	0,8206 ⁺
<i>ero</i> ₄	0,6446
<i>van</i> ₁	0,8018
<i>van</i> ₂	0,8418 ⁺
$\bar{r} = 0,7550^{**}$	$\chi^2 = 8,609$

5. DISCUSSÃO

5.1. Nível de resistência a drogas

Considerando-se que a *B. flavum* já apresenta certa resistência natural ao ácido nalidíxico (1000 µg/ml) e azida de sódio (500 µg/ml), conforme foi visto no ítem 4.1., utilizou-se somente dos antibióticos estreptomicina, eritromicina e vancomicina para obtenção de mutantes. O nível de resistência da bactéria foi 10, 5 e 0,5 µg/ml para eritromicina, estreptomicina e vancomicina, respectivamente.

A alta resistência natural a azida de sódio e ácido nalidíxico podem, no entanto, ser de valor quando se pretende isolar linhagem de *B. flavum* de ambientes naturais. Pelo fato de muitas bactérias serem sensíveis a esses dois agentes antimicrobianos, meios de cultura com altas concentrações dessas drogas atuariam de modo seletivo para o isolamento

to de *B. flavum*. Uma vez que a variabilidade natural é pouco explorada em microrganismos (TAVARES, 1974), o isolamento de *B. flavum* de fontes onde normalmente ela ocorre (água, leite, solo e materiais em decomposição) poderia ser utilizado, para um estudo na produção de aminoácidos essenciais.

5.2. Curva de sobrevivência à estreptomicina, eritromicina e vancomicina

Analisando-se as três curvas de sobrevivência apresentadas na Figura 2 (item 4.2.), nota-se que a população de *B. flavum* não é uniforme, pois para que isso ocorresse, a queda da viabilidade deveria continuar em decréscimo logarítmico, seguindo a linha pontilhada teórica. A diferença entre essas duas linhas (teórica e real) indica que na população existem indivíduos com diferentes graus de resistência, ou seja, indivíduos mais resistentes e outros menos resistentes.

O modelo de resistência das bactérias em geral para esses três antibióticos, é principalmente do tipo "um só passo" (DEMEREK, 1948; AZEVEDO, 1973). Os resultados obtidos neste trabalho, indicam que a resistência à estreptomicina e eritromicina em *B. flavum* segue esse modelo, pois os mutantes foram de imediato resistentes a altas concentrações dos antibióticos, como pode ser constatado pelos dados das Tabelas 5 e 6. Desse modo, a mutação deve ter ocorrido no gene que determina o maior potencial de resistência, tornando a bactéria altamente resistente aos antibióticos em uma só passagem. Resultados similares foram encontrados por outros autores para estreptomicina, entre eles: DEMEREK (1950) para *E. coli*, AZEVEDO (1961) para *Xanthomonas campestris*, BERGAMIN FQ (1973) para *Corynebacterium michiganense*, ALVES (1975) para *Rhizobium japonicum*. Para eritromicina, BERGAMIN FQ (1973) notou o mesmo efeito em *C. michiganense*.

Com relação aos 4 mutantes resistentes à estreptomicina (Tabela 5), 2 deles cresceram em concentração de até 10000 µg/ml, e os outros 2 em concentrações de 5000 e 2000 µg/ml.

No caso dos 4 mutantes resistentes à eritromicina (Tabela 6), 3 deles cresceram em concentração de 200 µg/ml e 1 deles somente à 50 µg/ml.

Tal comportamento, tanto no caso da estreptomicina como no da eritromicina, pode ser explicado pela hipótese de que existem vários genes determinantes da resistência, com diferentes graus de potencialidade (AZEVEDO, 1961), ou mais provavelmente, por mutação em diferentes sítios do mesmo gene que confere alta resistência, ocasionando então diferentes níveis de resistência.

Os mutantes obtidos nos dois casos, foram resistentes sem serem dependentes das drogas e não se mostraram morfologicamente diferentes da linhagem original.

No caso da vancomicina, o nível de resistência apresentou-se bastante baixo (0,5 µg/ml), conforme mostram os resultados do item 4.5. ALEXANDER (1974) encontrou para *Staphi*lococcus aureus um nível de resistência em torno de 2 a 5 µg/ml.

Foram isolados 2 mutantes na concentração de 1 µg/ml, tendo sido realizado previamente a irradiação da cultura com luz ultra-violeta com o intuito de aumentar a frequência de mutação. Isso concorda com os dados obtidos por GERACI (1956), que com grande dificuldade conseguiu induzir resistência à vancomicina em duas linhagens de *S. aureus*, a qual foi adquirida gradualmente e em pequenos passos.

Esses mutantes obtidos na concentração de 1 µg/ml não apresentaram crescimento em concentrações maiores,

o que levou a pensar tratar-se de resistência em "múltiplos passos". No entanto, o mesmo ocorreu quando se utilizou da placa gradiente (*SZYBALSKY e BRYSON, 1952*), onde colônias crescidas numa certa concentração, não apresentaram crescimento em concentrações maiores.

Deve então tratar-se de uma resistência determinada por um único gene principal. Aliás, pelo fato de que um dos mutantes obtidos ($\{van_1\}$), ensaiado em competição com a linhagem original ter apresentado queda da porcentagem de resistência na mistura, a curva de crescimento e o tempo de geração serem acentuadamente diferentes da linhagem selvagem, demonstra que resistência a vancomicina afetou a característica da linhagem, o que faz supor mutação em um único gene (*BERGAMIN Fº et alii, 1975*). A não obtenção de resistência para doses maiores do antibiótico pode revelar apenas que mutação em outros sítios desse gene principal poderiam levar à letalidade, de modo que fica difícil estabelecer com precisão o modelo de resistência a vancomicina em uma pequena faixa (0,5 - 1 µg/ml).

No entanto, os dados (acima referidos) do tempo de geração, curva de crescimento, competição, bem como os valores de sobrevivência praticamente iguais nas concentrações de 0,8 e 1 µg/ml, fazem supor a existência de um gene principal e portanto um modelo monogênico de resistência a vancomicina como já demonstrado anteriormente em *X. campestris* (*AZEVEDO e MENEZES, 1966*).

Os mutantes que cresceram na concentração de 1 µg/ml não foram dependentes da droga, e apresentaram colônias menores do que as da linhagem original o que também concorda com *GERACI (1956)* em *S. aureus*.

5.3. Curvas de crescimento e taxas de crescimento das linhagens original e mutantes

Observando-se a Figura 3, representativa das tabelas 8 - 12, verifica-se que o crescimento da linhagem original em nutriente líquido foi bastante diferente quando comparado com meio mínimo ou mesmo com o dos mutantes crescidos em nutriente líquido. Esta apesar de apresentar uma lag-fase mais prolongada, o que não aconteceu em nenhum outro caso considerado, atingiu ao final de 96 horas, um maior número de células.

A linhagem resistente à estreptomicina (str_1) foi a que mais se aproximou da original, apresentando no entanto, uma lag-fase menor. Por esse motivo, apesar de terem atingido ao final de 96 horas números de células muito próximos, o seu tempo de geração foi levemente inferior à original (Tabela 13).

Os outros mutantes, bem como a linhagem original crescida em meio mínimo, apresentaram um maior tempo de geração quando comparados com a linhagem original crescida em nutriente líquido (Tabela 13).

É interessante observar que o mutante str_1 , teve apenas ligeira alteração na taxa de crescimento e tempo de geração, mas em competição com a linhagem original, o número de células resistentes foi sensivelmente afetado com o tempo. Portanto é de se supor que em mistura, a linhagem original sensível produza alguma substância que interfira com o crescimento da linhagem resistente. Casos inversos já foram descritos, onde linhagens resistentes crescem melhor em mistura com sensíveis do que isoladamente (BERGAMIN *et al.*, 1973). O resultado aqui apresentado pode ser explicado pela síntese de uma substância antimicrobiana produzida por *B. flavum* selvagem que dificulta o crescimento da linhagem str_1 . Outro

fenômeno que explicaria o comportamento do mutante Δtr_1 isoladamente e em mistura, seria supor uma alta frequência de reversão do caráter resistência para sensibilidade a estreptomina. Nesse caso, a linhagem crescida em meio sem antibiótico teria células revertidas ao estado selvagem com taxa de crescimento normal, e assim, a curva se assemelharia a da linhagem original sensível.

A alteração da taxa de crescimento de mutantes resistentes a drogas quando comparados com as linhagens originais sensíveis já é fato bastante conhecido. O que ocorre mais comumente é uma menor taxa de crescimento para os mutantes resistentes, quando crescidos na ausência do antibiótico. Isso representa uma vantagem seletiva para as células sensíveis que sobrepujam as resistentes ao final de algum tempo (BERGAMIN *Fº et alii*, 1975). No entanto, já foram descritos casos onde mutantes resistentes apresentaram taxas de crescimento inalterada (SCHNITZER e GRUNBERG, 1957; QUADLING, 1960; AZEVEDO e NEDER, 1963) ou ainda taxas de crescimento maior (ENGLISH e Mc COY, 1951; SCHNITZER e GRUNBERG, 1957).

Finalmente, ainda com relação ao crescimento da bactéria, a capacidade da *B. flavum* crescer em meio de cultura definido (meio mínimo) e em meio complexo (nutriente líquido) faz com que essa bactéria possa ser empregada em Genética mais eficientemente. Assim, mutantes auxotróficos podem ser obtidos, e conseqüentemente podem ser ensaiados os processos de recombinação tais como conjugação, transformação e transdução.

5.4. A força dos antibióticos

Uma droga pode ser considerada como forte, quando o mutante resistente a ela tiver sua taxa de crescimento

diminuída, pois o gene que foi alterado pela mutação, deve controlar uma importante função no metabolismo do microrganismo. Será neutra, se a taxa de crescimento permanecer inalterada; fraca se a taxa de crescimento aumentar (*BERGAMIN FQ, 1973*).

Deve-se considerar ainda, que para dois mutantes resistentes a uma mesma droga, mas cada um tendo um gene diferente conferindo essa resistência, a força da droga não será a mesma para ambos.

Observando os dados das Tabelas 15 - 17, que mostram a determinação quantitativa das forças da estreptomicina, eritromicina e vancomicina, respectivamente, em relação à *B. flavum*, verifica-se que houve uma diferença significativa entre o número de bactérias resistentes e sensíveis nos diferentes tempos ensaiados.

No caso da estreptomicina, a porcentagem média inicial de mutantes resistentes na mistura, passou de 40,07 a 7,07% ao final de 72 horas. Dados obtidos por outros autores mostram uma redução de 48,5 para 14,3% em 72 horas para *X. campestris* (*AZEVEDO e NEDER, 1963*), 61,51 para 51,96% em 96 horas para *C. michiganense* (*BERGAMIN FQ, 1973*) e 20,26 para 7,47% em 120 horas para *R. japonicum* (*ALVES, 1975*).

Pode-se deduzir por esses dados, que a estreptomicina mostrou-se mais forte para a *B. flavum* do que em todos esses casos considerados.

Os valores da Meia Vida relativa (MVR) foram mais baixos que os encontrados para *C. michiganense* e *R. japonicum* (168,16 e 77,20 horas, respectivamente), indicando que a estreptomicina é mais forte para a *B. flavum* pois bastou 22,58 horas para a população de células resistentes cair à metade em relação ao número original.

O coeficiente angular ($b = - 0,01333$) sendo negativo também indica que essa droga é forte.

No caso da eritromicina, a porcentagem média de mutantes resistentes na mistura passou de 69,87 para 22,20% ao final de 72 horas, indicando uma MVR de 24,32 horas. *BERGAMIN FØ (1973)* encontrou para *C. michiganense* uma redução de 64,86 para 48,58% em 96 horas, e uma MVR de 104,51 horas.

Também nesse caso, a droga pode ser considerada forte para *B. flavum* em vista do valor negativo do coeficiente angular ($b = - 0,01237$).

Para vancomicina, o mutante originalmente presente em 52,12% na mistura, decaiu para 15,19% ao final de 72 horas, apresentando uma MVR de 26,73 horas. Como nos casos anteriores, o valor negativo do coeficiente angular ($b = -0,01126$) indica ser esta uma droga forte.

Portanto, quando se compara a ação dos três antibióticos, estreptomina, eritromicina e vancomicina, nota-se que todos funcionam como drogas fortes para *B. flavum*.

Essas drogas funcionaram como uma pressão seletiva modificando a proporção de genótipos da população de *B. flavum*. Quando se removeu essa pressão, ou seja, voltando-se a cultivar os mutantes em meio sem os antibióticos houve seleção em direção à população original, chamada por *VAN DER PLANK (1968)* de seleção estabilizadora.

5.5. Avaliação semiquantitativa do teor de lisina

O método semiquantitativo de avaliação da produção de lisina, usando mutante auxotrófico de fungo deficiente para a síntese desse aminoácido, mostrou-se viável, embora

possa dar apenas uma indicação grosseira dessa produção. No entanto, é válido para se estabelecer uma triagem inicial quando se tem diferentes linhagens a serem selecionadas, ou mesmo quando se tem colônias de uma única linhagem submetida previamente a um agente mutagênico. Modificações dessa técnica, poderiam ser sugeridas tais como utilização de linhagens que detectem níveis mais baixos de lisina, ou ainda linhagens que não sofram interferências de outros aminoácidos. Sabe-se que o método usado não detecta lisina em presença de altas concentrações de arginina (AZEVEDO *et alii*, 1967). Desse modo, mutantes *lys⁻* que não são inibidos por arginina se prestariam para tal tipo de análise de modo mais eficiente.

5.6. Avaliação quantitativa do teor de lisina

O objetivo inicial a ser alcançado nesse ítem, era o de se avaliar a capacidade de produção de lisina em três diferentes meios: mínimo, mínimo de fermentação e mínimo de fermentação mais antibiótico. No entanto, dados preliminares mostraram que a produção de lisina por mutantes crescidos em meio contendo antibiótico foi a mesma daquela na ausência do antibiótico. Desse modo, utilizou-se somente dos meios mínimo e mínimo de fermentação para a avaliação da produção de lisina em colônias da linhagem original e mutantes resistentes.

Como era esperado, a produção de lisina em meio de fermentação foi maior que em meio mínimo, o que pode ser comprovado através das médias de produção tanto na linhagem original como nos mutantes de cada grupo. Isso se justifica pelo fato de que o meio de fermentação possui uma quantidade de glicose muito maior. Os dados da Tabela 30 evidenciam ainda, correlação entre a produção nos dois meios, na maioria dos casos considerados. Dessa forma, quando se pretender ava

liar a capacidade de produção de uma determinada colônia, pode-se usar somente um dos meios de cultura.

Quando se analisa a produção dentro da população original ou dentro de cada população mutante, nos dois meios de cultura, nota-se uma grande variabilidade natural, onde colônias obtidas do mesmo clone mostram diferentes níveis de produção.

Várias hipóteses podem ser aventadas para explicar a alta variabilidade na produção de lisina a partir de uma única linhagem. Uma delas seria de que a célula original da qual resultaram as diferentes colônias ensaiadas, não seja geneticamente pura. Ela poderia por exemplo, ser constituída de dois ou mais genomas que poderiam então segregar nas células derivadas. Esta hipótese é apoiada pelo fato de que mutantes auxotróficos não puderam ser obtidos com facilidade nessa linhagem (*NASCIMENTO, não publicado*). Também a curva de sobrevivência à luz ultra-violeta (Figura 4) mostra um pequeno patamar inicial. Como demonstrado por *PETIT e PREVOST (1973)*, uma curva sem o patamar inicial é obtida apenas quando linhagens uninucleadas são irradiadas; no caso de células bi ou multinucleadas observa-se o patamar inicial.

Uma outra hipótese que poderia explicar a alta variabilidade encontrada dentro de um clone seria que a produção de lisina fosse grandemente afetada por fatores ambientais. Embora as condições de crescimento tenham sido as mais uniformes possíveis, efeitos ambientais não controláveis na metodologia utilizada, podem ter sido a causa da alta variabilidade encontrada.

Finalmente o método químico utilizado para dosagem de lisina, embora satisfatório em detectar grandes diferenças, talvez não seja sensível para detectar variações menores.

Os valores do quadrado médio (Q.M.) apresentados na Tabela 28, mostram que a menor variação encontrada foi para mutantes resistentes à vancomicina nos dois meios de cultura. Por outro lado, a maior variação foi para mutantes resistentes à estreptomicina cultivados em meio de fermentação.

A produção de lisina pelos mutantes resistentes para cada antibiótico (ou grupo) em meio mínimo, não acusa diferença significativa nem mesmo quando se compara as médias dos diferentes grupos (teste F, Tabela 29). No entanto, quando se considera o meio de fermentação, há uma diferença significativa da produção do mutante *str₄*, em relação ao *str₂*, ao nível de 5%. Como já foi mencionado anteriormente, apesar do teste F acusar significância ao nível de 5% entre grupos em meio de fermentação, os testes Tukey e Duncan não acusaram significância nesse mesmo nível.

Pelo exposto, pode-se verificar que a mutação para resistência à estreptomicina, eritromicina ou vancomicina não alterou a produção de lisina quando comparada com a linhagem original sensível. Isso concorda com os dados citados por ABE (1972), onde mutantes resistentes à estreptomicina em *B. lactofermentum*, apresentaram a mesma produção de ácido glutâmico que a linhagem sensível.

Quando se comparam os mutantes dentro de cada grupo, nota-se que nem os resistentes à vancomicina ou eritromicina se diferenciam significativamente quanto à produção de lisina, apesar de terem sido obtidos independentemente. Somente o mutante *str₄* aumentou sua produção quando crescido em meio mínimo de fermentação, o que não foi confirmado em meio mínimo simples. Dessa forma, para que essa diferença fosse comprovada, seria necessário analisar um número maior de colônias, já que são vários os casos descritos de mutantes resistentes a drogas que aumentaram sua produção de metabólitos. Entre eles, mutantes resistentes a cloranfenicol em *A. aerogenes* pro

dutores de valina (ABE, 1972) e mutantes resistentes a benzil-penicilina em *B. flavum* produtores de ácido glutâmico (FAM et alii, 1972).

Os mutantes resistentes à estreptomicina, eritromicina ou vancomicina comportaram-se de modo semelhante, levando-se em conta as médias de produção ou ainda os valores da Meia Vida relativa muito próximos para os três antibióticos. O fato desses antibióticos apresentarem modelo de resistência em "um só passo" na maioria dos microrganismos estudados, não implica que os mutantes devam se comportar do mesmo modo, já que esses atuam em diferentes funções dentro da célula. Esse comportamento semelhante frente aos três antibióticos pode ser vantajoso no caso de prevenção de contaminação em fermentações. Isto porque o uso contínuo de antibióticos origina o aparecimento de formas resistentes e nesse caso, poderia ser usado uma alternância de drogas a fim de prevenir mais eficientemente a ocorrência de agentes contaminantes resistentes.

O uso de linhagens resistentes a antibióticos e que não sofram concomitantemente alterações na sua produção de lisina, pode ser vantajoso na prevenção de contaminantes. No entanto, uma desvantagem seria a taxa de crescimento reduzida desses mutantes em comparação com a linhagem original, o que se torna bastante evidente no caso de mutantes resistentes a eritromicina e vancomicina.

Como é conhecido, resistência bacteriana a drogas pode ser conseguida pela célula por dois processos: o primeiro envolvendo mutações cromossômicas e o segundo envolvendo plasmídeos (GURGEL e AZEVEDO, 1969). No presente trabalho, é de se supor que tenha ocorrido mutação cromossômica, originando a resistência.

A hipótese de que plasmídeos pré-existentes na bactéria tivessem mutado acarretando resistência, é improvável.

vel em virtude dos dados obtidos pelas curvas de crescimento. Como demonstrado por *AOKI-WATANABE (1973)*, células com plasmídeos tem taxa de crescimento praticamente inalterada quando comparada com a linhagem não portadora. Assim, uma sugestão para se obter linhagens resistentes e com taxa de crescimento praticamente inalterada em relação a linhagens sensíveis, seria a de se transferir plasmídeo que confere resistência a drogas de uma espécie portadora para a *B. flavum*. Essa transferência entre espécies bem diferentes já foi conseguida por vários autores (*PANOPOULOS et alii, 1975; De BIAGGI e AZEVEDO, 1975*).

6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como objetivo a obtenção de mutantes resistentes na bactéria *Brevibacterium flavum* e a verificação de sua produção de lisina, ensaiando-se a variabilidade natural das populações sensível e mutantes. Foram também estudados alguns aspectos da biologia dessa bactéria.

A resistência natural da bactéria ao ácido nalidíxico, azida de sódio, estreptomina, eritromicina e vancomicina foi determinada e obteve-se mutantes resistentes às três últimas drogas. Foram construídas curvas de crescimento das linhagens original (em meio mínimo e nutriente líquido) e resistentes (em nutriente líquido). Determinou-se também as curvas de sobrevivência da linhagem original em relação à estreptomina, eritromicina e vancomicina. Foi estudado ainda, o crescimento da linhagem original em competição com os

mutantes através da mistura de linhagens.

Um método semiquantitativo da avaliação do teor de lisina foi ensaiado e a produção de lisina nas linhagens original e mutantes, em diferentes meios de cultura foi feito através de um método quantitativo.

Os níveis naturais de resistência dessa bactéria foram 1000, 500, 10, 5 e 0,5 $\mu\text{g/ml}$ para ácido nalidíxico, azida de sódio, eritromicina, estreptomicina e vancomicina, respectivamente. Mutantes resistentes até 10000 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina, 200 $\mu\text{g/ml}$ de eritromicina e 1 $\mu\text{g/ml}$ de vancomicina, foram obtidos. Os tempos de geração, calculados a partir dos dados das curvas de crescimento, foram 1,75, 2,94, 1,81, 2,12 e 2,17 horas, respectivamente para as linhagens original cultivada em nutriente líquido e meio mínimo e mutantes resistentes à estreptomicina, eritromicina e vancomicina.

O crescimento através da mistura de linhagens original e mutantes resistentes, mostrou que ao final de 72 horas, a porcentagem média de mutantes passou de 40,07 a 7,07, 69,87 a 22,20 e 52,12 a 15,19% respectivamente para estreptomicina, eritromicina e vancomicina. As Meias Vidas relativas encontradas para os mutantes resistentes à estreptomicina, eritromicina e vancomicina foram 22,58, 24,32 e 26,73 horas.

A linhagem original produziu em média 66,65 $\mu\text{g/ml}$ de lisina em meio mínimo e 283,13 $\mu\text{g/ml}$ em meio mínimo de fermentação.

Observou-se grande variabilidade natural quanto à produção de lisina, dentro das populações original e mutantes, sendo que a menor variação encontrada foi para mutantes resistentes à vancomicina nos dois meios de cultura. A maior variação foi para mutantes resistentes à estreptomicina em meio mínimo de fermentação.

Com exceção do mutante *str₄*, que diferiu de *str₂* em meio mínimo de fermentação, nenhuma variação foi detectada quanto à produção de lisina quando se comparou mutantes de cada grupo e original, nos dois meios de cultura considerados.

Pelos resultados obtidos, pode-se concluir que:

1. a alta resistência da *B. flavum* à azida de sódio e ácido nalidíxico indica que essas drogas podem atuar como seletivas no isolamento de bactérias de fontes naturais. Por outro lado, mutantes resistentes à estreptom_{ic}ina, eritromicina e vancomicina podem ser obtidos com relativa facilidade nesse micorganismo,
2. o modelo de resistência da estreptom_{ic}ina, eritromicina e vancomicina frente à *B. flavum* é do tipo "um só passo",
3. as mutações para resistência obtidas foram cromossomais, isso com base nas taxas de crescimento e curvas de sobrevivência,
4. o estudo da competição entre as linhagens original e mutantes mostra que as três drogas comportaram-se como fortes para a *B. flavum*,
5. a produção inalterada de lisina pelas linhagens original e mutantes, revela que estas últimas podem ser utilizadas em fermentações na prevenção de contaminantes. Por outro lado, as taxas de crescimento reduzidas dos mutantes resistentes em relação a linhagem original dificultaria essa utili-

zação. É sugerido que introdução de plasmídeos de resistência possa ser usada nesse sentido,

6. o método semiquantitativo de avaliação do teor de lisina, pode ser utilizado para uma seleção inicial de colônias isoladas mais produtivas de lisina,
7. a correlação quanto à produção de lisina nos meios mínimo e mínimo de fermentação mostra que um único meio pode ser utilizado nessa avaliação,
8. a alta variabilidade encontrada em *B. flavum* para produção de lisina, sugere que as células podem conter mais de um genoma, ou que ligeiras variações ambientais podem influenciar nessa produção.

7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work was carried out aiming the obtention of drug resistant mutants in the bacterium *Brevibacterium flavum*. The production of lysine in the original and mutant strains and the natural variability of the strains regarding lysine production was studied. Also some biological aspects of the bacterium studied.

The natural resistance of the bacteria to nalidixic acid, sodium azid, streptomycin, eritromycin and vancomycin was determined. Resistant mutants to the last three drugs were obtained. Growth curves of the original strain and resistant mutants were constructed. Survival curves of the original strain to streptomycin, eritromycin and vancomycin were determined. Also a study of competition between the wild-type and each resistant mutant was carried out.

A semiquantitative method to evaluate lysine production was tested and lysine production was determined through a quantitative method in the original and mutant strains using two culture media.

The natural levels of resistance of *B. flavum* were 1000, 500, 10, 5 and 0,5 µg/ml in relation to nalidixic acid, sodium azid, eritromycin, streptomycin and vancomycin respectively. Resistant mutants till 10000 µg/ml streptomycin, 200 µg/ml eritromycin and 1 µg/ml vancomycin were obtained. Generation times were 1,75 and 2,94 hours for the original strain in nutrient broth and minimal medium and 1,81, 2,12 and 2,17 hours for the resistant mutants to streptomycin, eritromycin and vancomycin respectively.

After 72 hours of mixed growth the percentage of mutants decreased in all cases when in competition with the wild-type strain. The relative half lives (MVR) were 22,58, 24,32 and 26,73 hours for resistant mutants to streptomycin, eritromycin and vancomycin respectively.

The original strain produced average 66,65 µg/ml lysine in minimal medium and 283,13 µg/ml in fermentation medium. There was observed a great variability in relation to lysine production both in the original and mutant strains. With exception of *str₄* mutant, all other strains presented, on both culture media used, comparable amounts of lysine.

From the obtained results the following conclusions could be drawn:

1. the high natural resistance of *B. flavum* to nalidixic acid and sodium azid can be used in a way to provide selective media for the isolation of *B. flavum* from natural sources. In the other hand, resistant mutants to the other drugs used can be easily obtained,

2. the model of resistance of the bacterium for the three antibiotic used was the "one-step" resistance model,
3. mutation to resistance was chromosomic with basis on the survival and growth curves,
4. competition between wild-type and mutant strain has revealed that the three used drugs behaved as "strongs" for *B. flavum*,
5. the levels of lysine produced by the original and resistant strains have shown that such resistant strains can be used in fermentation to prevent contamination. In the other hand the reduced growth rates of revertant mutants in relation to the sensitive original strain poses some difficulty in such utilization. It is suggested that resistant plasmids introduced in the sensitive strain could overcome such difficulty,
6. the semiquantitative method for the evaluation of the lysine production can be used for a initial selection of more productive colonies,
7. the correlation found between lysine production in fermentation and minimal media indicates that one other medium can be used in the evaluation of lysine production,

8. the high variability found in *B. flavum* regarding lysine production suggests that individual cells can present more than one genome or that, environmental factors influentiate strongly the production of this amino acid.

8. BIBLIOGRAFIA

ABE, S., 1972. Mutants and their utilization. In: YAMADA, K.; S. KINOSHITA; T. TSUNODA e K. AIDA ed. *The Microbial Production of Amino Acids*. Tokyo, Kodansha. cap. 2, p.39-66.

ABE, S. e K. TAKAYAMA, 1972. Amino acid producing microorganisms: variety and classification. In: YAMADA, K.; S. KINOSHITA; T. TSUNODA e K. AIDA, ed. *The Microbial Production of Amino Acids*. Tokyo, Kodansha. cap. 1, p.3-39.

AIDA, K., 1972. Introduction. In: YAMADA, K.; S. KINOSHITA; T. TSUNODA e K. AIDA, ed. *The Microbial Production of Amino Acids*. Tokyo, Kodansha. p. XIII-XX.

- AJINOMOTO Co. Inc., 1968. Fermentative production of L-lysine. Fr. 1, 527, 312 (Cl. C 12 d), May 31.
- ALEXANDER, M.R., 1974. A review of vancomycin. *Drug Intelligence and Clin. Pharm.*, 8:520-525.
- ALVES, M.F., 1975. Mutantes de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, resistentes a estreptomicina e sua infecciosidade. Piracicaba, 81p. [Mestrado - ESALQ].
- ANON., 1974. Production of L-lysine. SU 378 411. August Kirkhenshtein Inst. Microbiol. P. 18.4.73 A 22.11.71. *Microb. Abstr.*, 9(1):9A 5.
- ANON., 1975. Production of L-lysine by fermentation. US 3687810 Kyowa Hakko Kogyo KK P. 29.8.72 A (-). *Microb. Abstr.*, 10(2):10A 663.
- AOKI-WATANABE, D.S., 1973. Contribuição ao estudo do crescimento de *Escherichia coli* sensível e resistente a drogas por mutação e aquisição de fatores R. Botucatu, 67p. [Doutoramento - FCMBB].
- AZEVEDO, J.L., 1961. Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Piracicaba, 48p. [Doutoramento - ESALQ].
- AZEVEDO, J.L., 1973. Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. *Ciência e Cultura*, 25:326-329.
- AZEVEDO, J.L.; R.A. CALDAS; J.C.S. CAVENAGUE e P.M. LACAVA, 1967. Microbiological methods for the determination of amino acids in maize. *Fitotecnia Latinoamericana*, 4:147-154.

- AZEVEDO, J.L. e T.J.B. MENEZES, 1966. Resistência de *Xanthomonas campestris* com relação à tilosina e vancomicina. *Anais E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, 23:187-191.
- AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de *Xanthomonas campestris* (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes de Pammel Dowson. *Anais E.S.A. "Luiz de Queiroz"*, 20:163-173.
- AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1968. Manual de Genética de Bactérias. Piracicaba, Instituto de Genética, E.S.A. "Luiz de Queiroz", 81p. (Publicação didática, nº 10).
- BERGAMIN Fº, A., 1973. O conceito de força de drogas ilustrado com resistência de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen a antibióticos. Piracicaba, 51p. [Mestrado - ESALQ].
- BERGAMIN Fº, A.; H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phitopathol.*, 1:31-42.
- BROQUIST, H.P.; A.V. STIFFEY e A.M. ALBRECHT, 1961. Biosynthesis of lysine from α -keto adipic acid and α -amino adipic acid in yeast. *Appl. Microbiol.*, 9:1-5.
- CANTARELLI, P.R., 1970. The use of sugar cane molasses for the microbial production of lysine. Ohio, 51p. [M.S.-OSU].
- CHANG, Y.F. e E. ADAMS, 1974. O-Lysine catabolic pathway in *Pseudomonas putida*: interrelations with L-lysine catabolism. *J. Bacteriol.*, 117:753-764.

- DATA, P.; S. DUNGAN e R. FELDBERG, 1973. Regulation of aminoacid biosynthesis of the aspartate pathway in different microorganisms. In: VANEK, Z.; Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. *Genetics of Industrial Microorganism*. New York, Elsevier, v.I, cap. 5/13, p.177-193.
- DE BIAGGI, C.M.R. e J.L. AZEVEDO, 1975. Transferência de plasmídeo. IX Congresso Brasileiro de Fitopatologia (Resumo).
- DEMEREK, M., 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. *J. Bacteriol.*, 56:63-74.
- DEMEREK, M., 1950. Reactions of populations of unicellular organisms to extreme changes in environment. *Amer. Nat.*, 84:5-16.
- DULANEY, E.L., 1957. Formation of extracellular lysine by *Ustilago maydis* and *Gliocadium* sp. *Can. J. Microbiol.*, 3:467-476.
- DULANEY, E.L., 1967. Microbial production of aminoacids. In: PEPLER, H.J., ed. *Microbial Technology*. New York, Reinhold. cap. 12, p.308-343.
- ENGLISH, A.R. e E. Mc COY, 1951. Growth comparisons of streptomycin-sensitive and streptomycin resistant *Micrococcus piogenes* var. *aureus*. *J. Bacteriol.*, 62:19-26.
- FAM, L.D.; Y.V. KAPTEREVA e M.S. PISAREVA, 1972. Effect of antibiotics on glutamic acid biosynthesis by *Brevibacterium flavum*. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.*, 8:319-322. *Microbiol. Abstr.*, 7(11): 7A 9872, 1972.

GERACI, J.E., 1956. Some laboratory and clinical experiences with a new antibiotic, vancomycin. *Staff Meeting of the Mayo Clinic*, 31:564-582.

HASKINS, R.H. e J.F.T. SPENCER, 1959. Production of lysine, arginine and glutamic acid. US Patent, 2, 902, 409 Sept. 1.

JENSEN, A.L. e P. SHU, 1961. Production of lysine rich yeast. *Appl. Microbiol.*, 9:12-15.

KINOSHITA, S., 1959. The production of aminoacids by fermentation process. In: UMBREIT, W., ed. *Advances in Applied Microbiology*. New York, Academic Press. v.1, p.201-214.

KINOSHITA, S.; K. NAKAYAMA e S. KITADA, 1958. L-lysine producing using microbial auxotroph. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 4:128-129.

KITA, D.A. e H.T. HUANG, 1958. Fermentation process for the production of L-lysine. US Patent, 2, 841, 532, July 1.

KURIMURA, Y., 1965. L-lysine production by microorganisms. Japan, 15, 958. July 23. *Chem. Abst.*, 63:17098g.

LACAZ, C.S., 1969. Antibióticos e controle microbiológico das fermentações. In: _____. *Antibióticos*. São Paulo, Sarvier. cap. XXX, p.589-591.

LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG, 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *J. Bacteriol.*, 63:399-406.

LODHA, M.L.; S.L. METHTA, e N.B. DAS, 1973. Effect of nitrogen sources on L-lysine production by homoserine auxotroph of *Micrococcus glutamicus*. *Curr. Sci.*, 42: 388-399. *Microb. Abst.*, 9(2):9A 650, 1974.

MENEZES, T.J.B., 1971. Produção de lisina por microrganismos. Campinas, Instituto de Tecnologia de Alimentos. 17p. (Boletim nº 27).

MITCHELL, H. e M. HOULAHAN, 1948. An intermediate in biosynthesis of lysine in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 174:883-887.

MIYAJIMA, R. e I. SHIIO, 1971. Regulation of aspartate family amino acid biosynthesis in *Brevibacterium flavum*. IV. Repression of the enzymes in threonine biosynthesis. *Agric. Biol. Chem.*, 35:424-430.

NAKAMORI, S. e I. SHIIO, 1972. Microbial production of L-threonine. III. Production by methionine and lysine auxotrophs derived from α -amino β -hydroxyvaleric acid resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 36:1209-1216.

NAKAMORI, S. e I. SHIIO, 1973. Production of L-threonine by mutants resistant to both α -amino β -hydroxyvaleric acid and S-(2 aminoethyl)-L-cysteine derived from *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 37:653-659.

- NAKAYAMA, K., 1972. Lysine and diaminopimelic acid. In: YAMADA, K.; S. KINOSHITA; T. TSUNODA e K. AIDA, ed. *The Microbial Production of Amino acids*. Tokyo, Kodansha, cap. 13, p.369-397.
- NAKAYAMA, K., 1973. Amino acid production using microbial auxotrophic mutants. In: VANEK, Z.; Z. HOSTALEK e J. CUDLIN, ed. *Genetics of Industrial Microorganisms*. New York, Elsevier. v.I, cap. 5/15, p.219-225.
- NAKAYAMA, K.; H. HAGINO e S. KINOSHITA, 1966. Studies on lysine fermentation. V- Concerted feedback inhibition of aspartokinase and the absence of lysine inhibition on aspartic semialdehyde pyruvate condensation in *Micrococcus glutamicus*. *Agric. Biol. Chem.*, 30:611-616.
- NAKAYAMA, K. e S. KINOSHITA, 1961. Studies on lysine fermentation. III- α - ϵ -diaminopimelic acid decarboxylase. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7:161-172.
- NAKAYAMA, K.; S. KITADA e S. KINOSHITA, 1961. Studies on lysine fermentation. I- The control mechanism on lysine accumulation by homoserine and threonine. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7:145-154.
- OKADA, H.; I. KAMEYAMA; S. OKUMURA e T. TSUNODA, 1961. L-glutamic acid and succinic fermentation by *Brevibacterium flavum* n^o 1996. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 7:177-191.
- OTSUKA, S. e I. SHIIO, 1968. Fatty acid composition of cell wall-cell membrane fraction from *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 14:135-146.

- PANOPOULOS, N.J.; W.V. GUIMARÃES; J.J. CHO e M.N. SCHROTH, 1975. Conjugative transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant pathogenic *Pseudomonas* spp. *Phytopathol.*, 65:380-388.
- PETIT, C. e G. PREVOST, 1973. A mutagênese. In: _____. Genética e Evolução. São Paulo, Edgard Blucher. cap. X, p.201-219.
- PIMENTEL GOMES, F., 1976. O uso da regressão na análise da variância. In: _____. *Curso de Estatística Experimental*. São Paulo, L. Nobel, cap.12, p.295-313.
- PONTECORVO, G.; J.A. ROPER; L.M. HEMMONS; K.D. McDONALD e A. W.J. BUFTON, 1953. The genetics of *Aspergillus nidulans*. *Adv. Genet.*, 5:141-238.
- PRESCOTT, S.C. e C.G. DUNN, 1959. The production of amino acids by microorganisms. In: _____. *Industrial Microbiology*. New York, Mc Graw-Hill. cap.43, p.710-722.
- QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *Can. J. Microbiol.*, 6:387-396.
- RICHARD, M. e R.H. HASKINS, 1957. Extracellular lysine production by various fungi. *Can. J. Microbiol.*, 3:543-546.
- SANCHEZ, M.; A. VIERNA; L. MANRIQUE e S. HIRAKANA, 1969. Production extracelular de L-lisina por mutantes de *Ustilago maydis*, em jugo de *Agave* sp. *Rev. Lat. Amer. Microbiol. Parasitol.*, 11:183-190.

SANDS, D.C. e L. HANKIN, 1974. Selecting lysine excreting mutants of *Lactobacilli* for use in food and feed enrichment. *Appl. Microbiol.*, 28:523-524.

SANO, K. e I. SHIIO, 1967. Microbial of lysine. I- Production by auxotrophs of *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 13:349-358.

SANO, K. e I. SHIIO, 1970. Microbial production of L-lysine. III- Production by mutants resistant to S(2-aminoethyl)-L-cysteine. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 16:373-391.

SANO, K. e I. SHIIO, 1971. Microbial production of L-lysine. IV- Selection of lysine producing mutants from *Brevibacterium flavum* by detecting threonine sensitivity or halo-forming method. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 17:97-113.

SANO, K. e I. SHIIO, 1971. Microbial production of alanine, L-proline and L-valine by threonine or methionine sensitive mutants of *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 17:169-172.

SCHNITZER, R.J. e E. GRUNBERG, 1957. Drug resistance of microorganisms. New York, Academic Press. 395p.

SHIIO, I.; H. MOMOSE e A. OYAMA, 1969. Genetic and biochemical studies on bacterial formation of L-glutamate. I- Relationship between isocitrate lyase, acetate kinase and phosphate acetyltransferase levels and glutamate production in *Brevibacterium flavum*. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15: 27-40.

- SHIIO, I. e S. NAKAMORI, 1970. Fermentative preparation of threonine. *Agric. Biol. Chem.*, 34:448-454.
- SHIIO, I. e K. SANO, 1969. Microbial production of L-lysine. II- Production by mutants sensitive to threonine or methionine. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15:267-287.
- SHIIO, I. e K. SANO, 1973. Effects of isoleucine, serine and sodium chloride on the threonine sensitive and requiring strains of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 37:19-28.
- SHIIO, I.; A. SASAKI; S. NAKAMORI e K. SANO, 1973. Production of L-isoleucine by AHV resistant mutants of *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 37:2053-2061.
- SHIIO, I.; H. SATO e M. NAKAGAWA, 1972. L-tryptophan production by 5-methyltryptophan resistant mutants of glutamate producing bacteria. *Agric. Biol. Chem.*, 36: 2315-2322.
- SHIIO, I.; M. SUGIMOTO e M. NAKAGAWA, 1975. Production of L-tryptophan by mutants of *Brevibacterium flavum* resistant to both tryptophan and phenylalanine analogues. *Agric. Biol. Chem.*, 39:627-635.
- STANIER, R.Y.; M. DOUDOROFF e E.A. ADELBERG, 1969. Crescimento e morte de bactérias. In:_____. *Mundo dos Micróbios*. São Paulo, Edgard Blucher, cap.15, p.310-333.
- STEEL, R.G.D. e J.H. TORRIE, 1960. Linear regression. In:_____. *Principles and Procedures of Statistics*. New York, Mc Graw-Hill. cap.9, p.161-180.

- SUGIMOTO, S.; M. NAKAGAWA; T. TAKAYASU e I. SHIIO, 1973. Regulation of aromatic amino acid biosynthesis and production of tyrosine and phenilalanine in *Brevibacterium flavum*. *Agric. Biol. Chem.*, 37:2327-2336.
- SZYBALSKY, W. e V. BRYSON, 1952. Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. I- Cross resistance of *Escherichia coli* to five antibiotics. *J. Bacteriol.*, 64:489-499.
- TAURO, P.; T.N. RAMACHANDRA; D.S. JOHAR; A. SREEVIVASAN e V. SUBRAHMANYAN, 1963. L-lysine production by Ustilaginales fungi. *Agric. Biol. Chem.*, 27:227-235.
- TAVARES, F.C.A., 1974. Principios do melhoramento em função de parâmetros biométricos aplicados a *Saccharomyces uvarum* Beijerinck. Piracicaba, 100p. [Doutoramento - ESALQ].
- VAN DER PLANK, J.E., 1968. *Disease Resistance in Plants*. New York, Academic Press. 206p.
- VILLEGAS, E. e E.T. MERTZ, 1971. Chemical screening methods for maize protein quality at CIMMYT, 8p. (Research Bulletin n° 20).
- YAMADA, K.; S. KINOSHITA; T. TSUNODA e K. AIDA, 1972. *The Microbial Production y Amino Acids*. Tokyo, Kodansha. 548p.
- YOSHINAGA, F., 1969. Studies on the fermentation production of L-proline. IV- Mechanism of L-proline production by *Brevibacterium flavum* 2247 n° 14-5. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 15:387-398.

YOSHINAGA, F.; S. KONISHI e S. KATSUYA, 1966. Fermentative production of L-proline. I- Production of L-proline by an isoleucine auxotrophic mutant of *Brevibacterium flavum* 2247. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 12:219-223.

WINDSOR, E., 1951. α -aminoadipic acid as a precursor to lysine in *Neurospora*. *J. Biol. Chem.*, 192:607-609.