

PLASMÍDIOS CONJUGATIVOS E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM

Streptomyces felleus

JANETE MAGALI DE ARAÚJO

Bióloga

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada à Escola Superior de
Agricultura "Luiz de Queiroz", da
Universidade de São Paulo, para obtenção
do título de Doutor em Agronomia.
Área de Concentração: Genética e
Melhoramento de Plantas.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1990

Ficha catalográfica preparada pela Seção de Livros da
Divisão de Biblioteca e Documentação - PCAP/USP

Araújo, Janete Magali de
A663p Plasmídios conjugativos e fusão de protoplastos em
Streptomyces felleus. Piracicaba, 1990.
178p.

Tese - ESALQ
Bibliografia.

1. Bactéria Gram-positiva 2. Fusão de protoplasto 3.
Plasmídio conjugativo I. Escola Superior de Agricultura
Luiz de Queiroz, Piracicaba

CDD 589.9

PLASMÍDIOS CONJUGATIVOS E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM

Streptomyces felleus

JANETE MAGALI DE ARAÚJO

Aprovada em 13/11/1990

Comissão Julgadora:

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo
Prof. Dr. Sérgio Olavo Pinto da Costa
Prof. Dr. Gabriel Padilha
Prof. Dr. José Otamar Falcão de Moraes
Prof^a Dr^a Yoko Bomura Rosato

ESALQ/USP
IB/USP
ICB/USP
UFPE
UNICAMP



JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

-Orientador-

"In memoriam"

ofereço

ao Prof. Oswaldo Gonçalves de Lima

e ao meu irmão Juárez

À minha família,
em especial minha mãe
e a Jorginho

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo, por sua valiosa compreensão, amizade e orientação.

Ao Prof. Dr. Wlodzimierz Kurylowicz, pela alegria de ter recebido os primeiros ensinamentos me incentivando e induzindo a abraçar esta área de pesquisa.

Ao Prof. José Otamar Falcão de Moraes por sua amizade e imprescindíveis sugestões na correção deste trabalho.

Ao Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco nas pessoas de seus ex-chefes Prof. Francisco Dácio de Andrade Lyra e à Profa. Dra. Suely Galdino pela compreensão e pelo apoio oferecido no desenvolvimento deste trabalho.

Aos amigos do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Brasília na pessoa do Prof. Dr. Spartaco Astolfi Filho pela amizade e pelo apoio na realização das eletroforeses de DNA plamidial.

Ao Prof. Dr. Kazutaka Fukushima Chiba University - Japão pela purificação e caracterização do antifúngico constante neste trabalho.

A Profa. Dra. Luzia Paccola-Meirelles pela convivência amiga, companheirismo e imprescindíveis sugestões.

A CAPES PICD, pelo apoio financeiro recebido.

Aos amigos do Departamento de Antibióticos na pessoa da Profa. Eugênia Maria Maranhão Rios pelo apoio constante e amizade.

A Profa. Berenilda Ramalho de Mello pela amizade, compreensão e ajuda imprescindível, bem como pela correção, revisão gramatical e serviços de computação.

A todos os amigos do Laboratório de Genética de Microrganismos, em especial Edison Neiroti, Eleonora R. Carmona, Eduardo Bagalhi e Maria José Valarini pelo companheirismo.

Aos Srs. Antonio Rocha Campos, Sandra E. Rocha Campos e Carlos Alberto Nolasco, pelos serviços técnicos prestados no decorrer deste trabalho.

Aos Drs. Aline P. Kleiner, Itamar Soares de Melo e Beatriz Mendes pela alegria do convívio amigo.

A Bibliotecária Nilce T. Purga e Sra. Terezinha de Jesus L. Barreto pela normatização da Bibliografia e eficiente atendimento.

A estes e a todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram na realização deste trabalho desejo expressar os meus sinceros agradecimentos.

	Página
3. MATERIAL E MÉTODOS	38
3.1. Linhagens utilizadas	38
3.2. Meios de cultura	39
3.2.1. Meio de esporulação	39
3.2.2. Meio mínimo	39
3.2.3. Meio completo sólido	39
3.2.4. Meio nutriente-ágar	40
3.2.5. Meio "tryptic soya broth" (TSB) ...	40
3.2.6. Meio de Sabouraud	40
3.2.7. Meio R2 YE	40
3.2.8. Meio semi-sólido (overlay)	41
3.2.9. Meio ISP1 - Triptona-extrato de levedura	41
3.2.10. Meio ISP2 - Extrato de levedura- extrato de malte-ágar	41
3.2.11. Meio ISP3 - Aveia-ágar	42
3.2.12. Meio ISP4 - Amido-sais minerais- ágar	42
3.2.13. Meio ISP5 - Glicerol-asparagina- ágar	42
3.2.14. Meio ISP6 - Peptona-extrato de levedura-ferro-ágar	42
3.2.15. Meio ISP7 - Tirosina-ágar	43
3.2.16. Meio ISP9 - Para fontes de carbono	43

	Página
3.2.17. Meio de tolerância a cloreto de sódio	43
3.2.18. Meio de gelatina-ágar	44
3.2.19. Meio de produção de antibiótico ...	44
3.2.20. Esterilização dos meios	44
3.3. Soluções utilizadas	44
3.3.1. Soluções de vitaminas	44
3.3.2. Solução de caseína hidrolisada	45
3.3.3. Solução de ácido nucleico	45
3.3.4. Soluções-estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo	46
3.3.5. Solução-estoque de acrilamida	46
3.3.6. Solução reveladora da atividade esterase	46
3.3.7. Solução fixadora PAGE	47
3.3.8. Solução de glicina (20%)	47
3.3.9. Solução de sacarose 0,3M	47
3.3.10. Solução de lisozima (1,5 mg/ml) ...	47
3.3.11. Solução de PEG 1000 (50%)	47
3.3.12. Solução de elementos traços	48
3.3.13. Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,5%	48
3.3.14. Solução fenol-clorofórmio	48
3.3.15. Solução de bicloreto de mercúrio (15%)	48

	Página
3.3.16. Soluções-estoque de antibióticos utilizados	49
3.4. Tampões	49
3.4.1. Tampão P (protoplastos)	49
3.4.2. Tampão borato (TEB)	49
3.4.3. Tampão TE	50
3.4.4. Tampão da amostra para gel agarose .	50
3.4.5. Tampão do gel separador	50
3.4.6. Tampão do gel empilhador	50
3.4.7. Tampão eletrólito ou tris-glicerina pH 8,9	50
3.4.8. Tampão da amostra para o gel poli-acrilamida	51
3.5. Manutenção	51
3.5.1. Suspensão de esporos	51
3.5.2. Manutenção dos microrganismos-teste	52
3.5.3. Suspensão microbiana para os ensaios	52
3.5.4. Leitura de cores	53
3.6. Tratamento com agente intercalante	53
3.6.1. Linhagens	53
3.6.2. Cultivo	53
3.6.3. Determinação da concentração de acriflavina	54
3.6.4. Ensaio antimicrobiano	54

	Página
3.7. Extração de DNA plasmidial	55
3.7.1. Linhagens utilizadas	55
3.7.2. Cultivo	55
3.7.3. Obtenção de massa celular	56
3.7.4. Extração (mini-preparação)	56
3.7.5. Eletroforese em gel agarose (horizontal)	56
3.8. Caracterização de plasmídio conjugativo pela formação do fenótipo "pock"	57
3.8.1. Linhagens utilizadas	57
3.8.2. Cruzamento com <u>S. lividans</u> TK24	57
3.8.3. Expressão do fenótipo "pock"	58
3.9. Formação, regeneração e fusão de protoplastos	59
3.9.1. Linhagens utilizadas	59
3.9.2. Cultivo	59
3.9.3. Formação de protoplastos	59
3.9.4. Regeneração de protoplastos	60
3.9.5. Inativação de protoplastos	60
3.9.6. Fusão de protoplastos	61
3.9.7. Caracterização dos produtos de fusão	61
3.10. Estabilização dos setores	62
3.11. Caracterização do fenótipo "pock" dos setores segregantes	62

	Página
3.12.6.6. Plastificação do gel ...	72
3.13. Produção de antibiótico	72
3.13.1. Linhagens	72
3.13.2. Inóculo	73
3.13.3. Fermentação	73
3.13.4. Extração	73
3.13.5. Ensaio antimicrobiano do líquido fermentado	74
3.13.6. Determinação quantitativa no lí- quido fermentado - Unidade Waksman	74
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	75
4.1. Tratamento com agente intercalante	75
4.1.1. Características fenotípicas das va- riantes obtidas após tratamento por acriflavina	79
4.2. Caracterização física de DNA plasmidial em <u>Streptomyces felleus</u> IA-M3079	90
4.3. Caracterização do fenótipo "pock" após cru- zamento com <u>S. lividans</u> TK24	92
4.4. Fusão de protoplastos	98
4.4.1. Formação e regeneração de protoplas- tos de linhagens para a fusão	98
4.4.2. Processo de fusão de protoplastos ..	101
4.5. Estabilização dos setores	104

	Página
3.12.6.6. Plastificação do gel ...	69
3.13. Produção de antibiótico	70
3.13.1. Linhagens	70
3.13.2. Inóculo	70
3.13.3. Fermentação	70
3.13.4. Extração	70
3.13.5. Ensaio antimicrobiano do líquido fermentado	71
3.13.6. Determinação quantitativa no lí- quido fermentado - Unidade Waksman	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	72
4.1. Tratamento com agente intercalante	72
4.1.1. Características fenotípicas das va- riantes obtidas após tratamento por acriflavina	76
4.2. Caracterização física de DNA plasmidial em <u>Streptomyces felleus</u> IA-M3079	88
4.3. Caracterização do fenótipo "pock" após cru- zamento com <u>S. lividans</u> TK24	91
4.4. Fusão de protoplastos	98
4.4.1. Formação e regeneração de protoplas- tos de linhagens para a fusão	98
4.4.2. Processo de fusão de protoplastos ..	101
4.5. Estabilização dos setores	105

	Página
4.6. Caracterização dos setores segregantes	109
4.6.1. Análise dos segregantes quanto à formação do fenótipo "pock"	109
4.6.2. Análise dos setores segregantes quanto às características fisioló- gicas e morfológicas	112
4.6.3. Teste de resistência a antibióticos	122
4.6.4. Comportamento eletroforético	124
4.7. Análise dos setores segregantes quanto à produção de antibióticos	127
4.7.1. Caracterização do antifúngico	134
5. CONCLUSÕES	135
6. REFEREÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	137

PLASMÍDIOS CONJUGATIVOS E FUSÃO DE PROTOPLASTOS EM

Streptomyces felleus

Autora: JANETE MAGALI DE ARAÚJO

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

RESUMO

Diferentes espécies de Streptomyces, isoladas de amostras de solo do Estado de Pernambuco, mostraram-se produtoras de actinomicina, apresentando formação de pigmento solúvel amarelo-laranja, uma característica de linhagens produtoras desse antibiótico. Três dessas espécies foram ensaiadas em diferentes concentrações de acriflavina e revelaram elevada instabilidade na produção de actinomicina. Em Streptomyces felleus IA-M3079 os mutantes antibiótico-negativos obtidos através do tratamento com o agente intercalante mostraram inicialmente um único tipo morfológico, enquanto que os mutantes antibiótico-negativos de S. regensis IA-M3053 apresentaram diferentes características fenotípicas. Foram,

também, observadas variantes de S. felleus IA-M3079 com produção de pigmento amarelo-laranja mais intenso que o das linhagens selvagens. As variantes de S. regensis IA-M3053 mostraram-se estáveis para esta característica e as de S. felleus IA-M3079 eram instáveis, vindo a desaparecer o pigmento após algumas transferências. Contudo, entre as variantes de S. felleus IA-M3079 destacou-se uma estável com intensa pigmentação. Foi observada, através do fenótipo "pock", nas três linhagens em estudo - S. felleus IA-M3079, S. parvulus IA-M3042 e S. regensis IA-M3053 - a presença de plasmídios conjugativos. A fusão de protoplasto entre S. felleus IA-M3079 e a variante AF-3079(90/57) mostrou setores recombinantes com formação de pigmento azul-violáceo, que após estabilização e testes antimicrobianos apresentaram elevada atividade antifúngica. As culturas estabilizadas provenientes dos referidos setores segregantes, mostraram estreita similaridade com as parentais quanto às características bioquímicas, micromorfológicas e culturais e ao comportamento eletroforético. O antifúngico produzido pelos setores foi preliminarmente caracterizado através do espectro de absorção na luz ultravioleta.

CONJUGATIVE PLASMIDS AND PROTOPLAST FUSION IN

Streptomyces felleus

Author: JANETE MAGALI DE ARAÚJO

Adviser: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

SUMMARY

Different Streptomyces species, isolated from soil samples of Pernambuco State, Brazil, produce actinomycin and present the formation of yellow-orange soluble pigment: a characteristic of strains producing that antibiotic. Three Streptomyces species were tested in different concentrations of acriflavine and showed high instability in the actinomycin production. In Streptomyces felleus IA-M3079, the negative antibiotic mutants obtained through the treatment with the intercalant agent showed a single morphologic type, the negative antibiotic mutants of S. regensis IA-M3053 presented different phenotypical features. Besides, it were observed variants of S. felleus IA-M3079 with yellowish-orange pigment production more

intensive than that of the wild strains. The S. regensis IA-M3053 variants showed themselves stable for this character and the S. felleus IA-M3079 variants were unstable, disappearing its pigment after some subcultivation. However, among the S. felleus IA-M3079 variants one appeared with intensive and stable pigment.

Through the pock phenotype it was observed the presence of conjugative plasmids in the three strains under study: S. felleus IA-M3079, S. parvulus IA-M3042 and S. regensis IA-M3053. The protoplast fusion between S. felleus IA-M3079 and the variant AF-3079(90/57) produced recombinant sectors with formation of bluish violaceous pigment. Such sectors, after stabilization and antimicrobial tests present high antifungal activity. The purified and stabilized cultures obtained from the recombinant sector showed to be very similar to the parental cultures regarding to biochemical, micromorphological and cultural characteristics as well as to the electrophoretical patterns. The antifungal compound produced by the sector recombinant cultures was characterized through ultraviolet spectra (UV) and by antimicrobial spectra.

1. INTRODUÇÃO

Entre os actinomicetos são encontrados mais de 30 gêneros de bactérias Gram-positivas e, entre eles, encontra-se o gênero Streptomyces que apresenta micélio aéreo com grande ramificação.

Streptomyces são bactérias filamentosas, aeróbicas que se assemelham às eubactérias com relação ao seu metabolismo e fisiologia e, aos fungos, com relação à presença de micélio vegetativo e micélio aéreo com esporulação reprodutiva após crescimento em meio sólido.

A grande importância destas bactérias é a sua versatilidade na elaboração de inúmeros antibióticos, enzimas e vitaminas. Entretanto, é na produção de antibióticos que estes microrganismos se destacam. Aproximadamente, 6.000 antibióticos de origem microbiana já foram caracterizados e cerca de 60% deles são produzidos por actinomicetos. Vale salientar que o gênero Streptomyces é responsável por 90% destes compostos com grande aplicação prática na medicina humana ou veterinária, na agricultura e na indústria de alimentos.

As actinomicinas pertencem ao grupo dos antibióticos antitumorais com atividade relevante. Este

grupo de antibióticos é constituído de cromopeptídeo vermelho com diferença na parte peptídica da molécula.

Em decorrência da importância destes metabólitos secundários, estudos básicos de microbiologia e genética têm sido conduzidos visando o melhoramento de linhagens produtoras. Por conseguinte, o conhecimento da localização, estrutura e função de genes que determinam a produção, a regulação e a resistência a antibióticos é indispensável para o desenvolvimento de eficientes programas de melhoramento.

Com vistas ao melhoramento de linhagens de Streptomyces produtoras de antibióticos, este trabalho teve como objetivos: 1) determinar a ocorrência de plasmídios em Streptomyces felleus IA-M3079, S. parvulus IA-M3042 e S. regensis IA-M3053, verificando a instabilidade da produção de actinomicina por tratamento com agente intercalante; 2) através de cruzamento com S. lividans TK24, caracterizar a presença de plasmídio conjugativo pela formação de zigose letal; 3) verificar, por fusão de protoplastos entre a linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079 produtora de actinomicina e a variante AF-3079(90/57) não produtora de actinomicina, a transferência do caráter produção de actinomicina pela formação do halo de inibição para Bacillus subtilis ; 4) realizar ensaios antimicrobianos dos

setores segregantes obtidos por fusão de protoplastos, visando determinar o tipo de antibiótico produzido.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Actinomycetales: características gerais

Actinomicetos é o nome genérico atribuído a um grupo de bactérias pertencentes à ordem Actinomycetales (BUCHANAN, 1917), cuja característica comum é a formação de hifas em algum estágio do seu desenvolvimento. Estes microrganismos começaram a ser estudados em 1872 com o isolamento de Streptotrix foersteri e Actinomyces bovis por F. Cohn e C.O. Harz, respectivamente, sendo atribuído a C.O. Harz a denominação de Actinomyces para designar as formas anaeróbicas, originalmente estudadas por ele. O termo Actinomyces surgiu na época de Pasteur e Koch e em grego significa "fungos radiados" ("ray-fungi"), sugerindo que estes microrganismos eram cultivados e estudados como fungos. Segundo o Bergey's Manual 7ª edição, na ordem Actinomycetales são encontrados diversos gêneros que apresentam características associadas a fungos, como pleomorfismo e formação de micélio aéreo. A formação de hifas em alguns gêneros é rudimentar, havendo rápida fragmentação. A ocorrência de uma densa população de actinomicetos no solo foi muito cedo evidenciada por WAKSMAN & CURTIS (1916), sendo mais tarde adotado o nome

genérico de Streptomyces (WAKSMAN & HENRICI, 1943) para designar o grupo predominante desses microrganismos cuja característica fundamental é a produção de micélio aéreo.

Atualmente, a posição taxonômica destes microrganismos está bem definida dentro do reino Procarioto, baseada na proposta de Chattoni¹, 1937 (citado por MURRAY, 1974), que classifica os microrganismos quanto à sua organização celular, levando em consideração evidências bioquímicas, fisiológicas e microscópicas. Fundamentados nestes critérios é que vários estudos foram realizados com os actinomicetos, comprovando sua natureza procariótica.

As características essenciais de natureza procariótica dos actinomicetos são: ausência de membrana nuclear, ausência de organelas citoplasmáticas e presença de ribossomos do tipo 70S.

2.1.1. Posição taxonômica de Streptomyces

Os Streptomyces são bactérias filamentosas, Gram-positivas, encontradas principalmente no solo em condições de aerobiose estrita.

Do ponto de vista biotecnológico, os estreptomicetos são morfológica e quimicamente mais

¹ CHATTON, E. (1937) Titres et Travaux Scientifiques, Sète, Soltano

versáteis do que a bactéria Escherichia coli. O crescimento de Streptomyces em meio sólido sofre um ciclo de desenvolvimento que inclui uma fase de micélio vegetativo, seguida de formação de micélio aéreo e esporulação reprodutiva.

Além desta complexidade morfológica, os Streptomyces são diferentes da E. coli ou de Bacillus subtilis pela riqueza do conteúdo de seu DNA em guanina e citosina (G+C), além de possuírem genoma 3 vezes maior que os dessas bactérias (BENIGNI et alii, 1975).

A diferenciação morfológica nestes microrganismos é de interesse relevante por causa da ligação regulatória existente entre esporulação e produção de antibióticos (HOPWOOD, 1981b).

O gênero Streptomyces era incluído na família Streptomycetaceae e podia ser distinguido de uma variedade de outros gêneros de actinomicetos por meio de propriedades quimiotaxonômicas e micromorfológicas.

O critério químico utilizado para a classificação de actinomicetos aeróbicos está fundamentado nos estudos realizados por BECKER et alii (1964) e por YAMAGUCHI (1965), os quais caracterizam quatro tipos de parede celular para os actinomicetos. Estes tipos de parede são diferentes em seus conteúdos de açúcares e aminoácidos. Nos Streptomyces a parede celular é do tipo I, com a

ocorrência de ácido-2-6-diaminopimélico (DAP) em suas formas LL e DL, além de conter alanina, ácido glutâmico e glicina. Entre as bactérias Gram-positivas, os estreptomicetos são as únicas que apresentam micélio aéreo bem desenvolvido em decorrência do alto conteúdo de DAP (LECHEVALIER & LECHEVALIER, 1970).

Em recente revisão, DIETZ (1986) enfatiza que a composição química do hidrolisado celular total constitui um excelente critério taxonômico para diferenciar Nocardia de Streptomyces.

Micromorfológicamente, este gênero mostra cadeias de esporos (esporóforos) que se apresentam longas ou curtas, em espirais ou retas. Baseadas nesta micromorfologia, várias chaves de classificação foram sugeridas (KUSTER, 1972).

Em decorrência de Streptomyces produzir uma grande variedade de antibióticos de interesse comercial, durante muito tempo a descrição de espécies era arbitrária e nem todas as culturas descritas na literatura eram encontradas nas chaves de classificação de Streptomyces. Por causa da "criação" de várias espécies, foram padronizados métodos para caracterizar as espécies de Streptomyces e, entre 1966 e 1974, o "International Streptomyces Project" (ISP) redescreveu cerca de 450

espécies, homogeneizando os critérios para a determinação das mesmas (SHIRLING & GOTTLIEB, 1968a,b, 1969, 1972).

Os critérios adotados pelo ISP para os Streptomyces levam em consideração características de micélio aéreo, reverso e pigmento, quando crescidos sobre vários meios contendo ágar, a micromorfologia da cadeia de esporos e a superfície dos mesmos revelada ao microscópio eletrônico. Estas características, adicionadas da capacidade de crescimento em meio sintético com fontes de carbono diversas e a metabolização de certos substratos, foram a base para a distinção entre espécies neste gênero, proposta por SHIRLING & GOTTLIEB (1966).

Segundo DIETZ (1986), os métodos adotados pelo ISP, associados a critérios quimiotaxonômicos e a diferentes chaves de classificação morfológica (NONOMURA, 1974; KUSTER, 1972; SZABO et alii, 1975) e chave de classificação numérica (WILLIAMS et alii, 1983; KURYLOWICZ et alii, 1976), possibilitam a descrição de uma espécie.

Atualmente, métodos moleculares envolvendo sequenciamento e reassociação de macromoléculas, especialmente ácidos nucleicos, estão revolucionando a classificação de Procariótos, incluindo os Streptomyces (SCHLEIFER & STACKEBRANDT, 1983).

A última edição do Bergey's Manual (1989) divide os actinomicetos em dez grupos através da

classificação supragenérica. Esta classificação foi baseada na distância fenética entre diferentes linhagens de bactérias filamentosas, calculada através da análise comparativa dos oligonucleotídeos da fração ribossomal 16S resistentes a ribonucleases (SCHLEIFER & STACKEBRANDT, 1983). Esta macromolécula foi utilizada por apresentar sequência altamente conservada e elevada estabilidade genética (STACKEBRANDT & WOESE, 1981).

Dentro destes grupos supragenéricos encontram-se os estreptomicetos com cinco gêneros diferentes que têm entre si tipos de parede e peptidoglicano semelhantes, porém diferem nos seus conteúdos de ácidos graxos, menaquinonas e fosfolipídeos.

No Bergey's Manual (1989) são descritas 142 espécies de Streptomyces, 68 resultantes de um estudo de taxonomia numérica feito por WILLIAMS et alii (1983) e 74 baseadas no "International Streptomyces Project" (ISP) (SHIRLING & GOTTLIEB, 1968a,b, 1969, 1972).

Os dados resultantes da taxonomia numérica e da taxonomia molecular vieram fortalecer a taxonomia convencional utilizada desde WAKSMAN (1961) e reforçada pela quimiotaxonomia, como foi enfatizado por DIETZ (1986).

2.2. Genética de Streptomyces

A engenharia genética de microrganismos industriais alcança hoje um grande desenvolvimento, graças às técnicas de genética desenvolvidas nos microrganismos utilizados nos trabalhos de interesse acadêmico, como E. coli e Bacillus subtilis, que são importantes hospedeiros nas pesquisas que utilizam a técnica com o DNA recombinante.

As linhagens S. coelicolor A3 (2) e S. lividans, pertencem ao seletivo grupo de microrganismos com uma genética experimental bem definida, sendo bastante utilizados nos trabalhos para estudos moleculares e de clonagens.

Até 1955, os estudos genéticos com Streptomyces eram relacionados com as observações sobre mutagênese. Somente, após a descoberta da recombinação genética em Streptomyces coelicolor A3(2) por SERMONTI & SPADA-SERMONTI (1955) e HOPWOOD (1957), intensificaram-se as pesquisas na área da genética desses microrganismos. Entretanto, os avanços só foram atingidos quando HOPWOOD (1959); HOPWOOD & SERMONTI (1962) determinaram o grupo de ligação genética de S. coelicolor A3(2) e, posteriormente, a análise genética mostrou que este grupo de ligação era circular (HOPWOOD, 1967).

2.2.1. Estrutura genômica

Observações feitas ao microscópio eletrônico em S. coelicolor A3(2) mostraram que, como em outras bactérias, o DNA está presente na célula em forma condensada, frequentemente em múltiplas cópias por célula hifal, porém somente em única cópia nos esporos haplóides (HOPWOOD & GLAUERT, 1960). Segundo WESTPHELING (1980), a molécula circular de DNA em S. coelicolor está organizada em estrutura superhelicoidal associada com proteínas e outras moléculas necessárias para estabilização da estrutura, igualmente, como foi observado em nucleóides isolados de Escherichia coli e Bacillus subtilis por WORCEL & BURGI (1974) e GUILLEN et alii (1978).

A quantidade de DNA em microrganismos, geralmente, é determinada através da cinética de reassociação e, segundo BENIGNI et alii (1975), o conteúdo de DNA no genoma de E. coli está em torno de $(2,28 \pm 0,19) \times 10^9$ daltons, enquanto que, no genoma de S. coelicolor este valor é cerca de três vezes maior, isto é: $(7,23 \pm 0,51) \times 10^9$ daltons.

Experimentos realizados por vários pesquisadores, mostram que o tamanho do genoma em Streptomyces variou de $3,69 \times 10^9$ a $7,3 \times 10^9$ daltons (Tabela 1).

Estes experimentos eram diferentes quanto ao método utilizado e quanto ao cálculo do conteúdo de DNA.

Entretanto, vale salientar que esta heterogeneidade no conteúdo de DNA no esporo e no micélio pode decorrer da ausência de segregação nos nucleóides irmãos após repetidas duplicações da região hifal ou, possivelmente, ausência ou presença de DNA extracromossomal (KRETSCHMER & KUMMER, 1987). A análise dos resultados constantes da Tabela 1, realizada por HUNTER & ECKHARDT (1988), mostra que o DNA genômico em Streptomyces variou de $3,69 \times 10^9$ a $7,3 \times 10^9$ daltons, significando um aumento de 1,5 a 2 vezes em relação a E. coli e não três vezes, como foi sugerido por BENIGNI (1975).

Tabela 1

Determinação do DNA genômico em Streptomyces (HUNTER & ECKHARDT, 1988)

Linagem	Tamanho do genoma (dalton) x 10^9	Referência
<u>S. coelicolor</u> A3(2)	7,09 \pm 0,73 (micélio) 7,23 \pm 0,51 (esporos)	BENIGNI et alii (1975)
<u>S. rimosus</u> ATCC 10970	6,77 \pm 0,26 (micélio) 6,33 \pm 0,30 (esporos)	BENIGNI et alii (1975)
<u>S. coelicolor</u> A3(2)	5,2 a 7,3	ANTONOV et alii (1978)
<u>Streptomyces</u> (13 linhagens) e <u>Streptoverticillium</u> (2 linhagens)	3,69 a 5,15	GLADEK & ZAKRZEWSKA (1984)
<u>S. coelicolor</u> ISP 5049	3,28	GENTHNER et alii (1985)
<u>S. chrysomallus</u> A590	5,54	KURDEDOV et alii (1985)

2.2.2. Complexidade genômica

A distribuição irregular dos diferentes tipos de nucleotídeos ao longo do DNA cromossomal em Streptomyces constitui uma característica marcante nestes microrganismos. Esta irregularidade pode influenciar a cinética de reassociação, sendo um fator que dificulta a determinação do tamanho do genoma em Streptomyces.

O conteúdo de guanina mais citosina (G+C) em Streptomyces varia de 70 a 74%, (TEWFICH & BRADLEY, 1967; BENIGNI et alii, 1975) enquanto que, em E. coli este percentual é de 51%, como observado através de vários trabalhos (FRONTALI et alii, 1965; USDIN et alii, 1984). Em actinofagos, bem como em plasmídios, a porcentagem de G+C se apresenta similar ao observado em DNA cromossomal (BIBB et alii, 1977; BIBB et alii, 1981; PERNODET & GUÉERINEAU, 1981).

Este alto conteúdo de G+C pode ter um significado evolucionário e, conseqüentemente, envolver o processo de mutação espontânea e induzida (BALTZ, 1986). Segundo SINGER & AMES (1970), esta distribuição irregular de guanina e citosina pode reduzir a probabilidade de mutação pelos raios ultravioleta (UV) em decorrência da baixa frequência de timina adjacente. Outra consequência do alto percentual de G+C é a seleção para enzimas de restrição que cortam o DNA em sítios de reconhecimento com

baixo teor destas bases nitrogenadas, como as enzimas EcoRI, Hind III, Hpa I, Kpn I que cortam o DNA em grandes fragmentos, enquanto que BamHI, PstI e Sali, cortam predominantemente em sítios ricos em G+C dando assim pequenos fragmentos (CHARTER & HOPWOOD, 1983).

Um aspecto interessante em Streptomyces é o comportamento do DNA total digerido por enzimas de restrição. Geralmente, eletroforese em gel agarose do DNA total bacteriano digerido com enzimas de restrição, mostra arrastes longos da formação de fragmentos únicos de DNA presente em única cópia no cromossomo. Entretanto, a digestão com enzimas de restrição de DNA em Streptomyces freqüentemente revela intensas bandas superpostas, indicando a presença de múltiplas seqüências repetidas (SCHREMPF, 1982a; 1982b; ONO et alii, 1982; ROBINSON et alii, 1981). Foi devido a este comportamento eletroforético que as análises de S. coelicolor A3(2) e de S. chrysomallus revelaram que cerca de 5% do genoma destas bactérias filamentosas consistem de seqüências de DNA repetido (ANTONOV et alii, 1977). O estudo realizado por USDIN et alii (1984) com 14 diferentes linhagens de Streptomyces mostrou que entre elas cerca de 4 a 11% do genoma apresenta seqüências repetidas e que estas seqüências caem dentro de uma classe distinta com baixo percentual de G+C. Entre as linhagens examinadas por USDIN, apenas S. rimosus NRRL

24455 não apresentou seqüências repetidas. A complexidade genômica em Streptomyces pode resultar em linhagens carregando extensas deleções ou ampliações de DNA.

2.2.3. Ocorrência de plasmídios

Em geral, estreptomicetos possuem elementos extracromossômicos de tamanhos variados, desde 4 kb até mais de 200 kb e o número de cópias por cromossomo varia desde uma unidade até centenas. Os plasmídios têm atraído a atenção de muitos pesquisadores em decorrência de sua larga distribuição, podendo estar envolvidos na fertilidade, na produção e resistência de antibiótico; na diferenciação e também no rearranjo do genoma. Com o rápido desenvolvimento da engenharia genética, os plasmídios têm se tornado um instrumento indispensável na clonagem e transferência de genes.

Várias investigações revelam que elevada proporção, aproximadamente 23%, das linhagens de estreptomicetos, abrigam plasmídios como revelado pela análise dos diferentes trabalhos. OKANISHI et alii (1980) mostram que das 32 linhagens analisadas, 7 (22%) possuem plasmídios; e mais, segundo HOPWOOD et alii (1981), 11 das 44 linhagens (25%) abrigam plasmídios; OMURA et alii (1981), verificaram que entre 21 linhagens analisadas, 5 (24%) tinham plasmídios; TOYAMA et alii (1982), verificaram

que 16 de 69 linhagens (23%) continham plasmídios, e DANIEL & TIRABY (1983) de 120 linhagens analisadas constataram que 21 (17.5%) abrigavam plasmídios. Estes relatos mostram a proporção média de linhagens de Streptomyces que naturalmente possuem plasmídios.

Em geral, os plasmídios são detectados na forma de DNA circular covalentemente fechado (CCC), porém ocasionalmente elementos lineares como pSLA 2 de S. rochei (HIROCHIKA et alii, 1984) com 17 kb e o SCP 1 com 340 kb (KINASHI & SHIMAJI, 1987) podem ser detectados, através da técnica de eletroforese ortogonal (OFAGE).

A linhagem selvagem de S. coelicolor A3(2) possui pelo menos dois plasmídios sexuais, SCP1 (VIVIAN, 1971) e SCP2 (BIBB et alii, 1977). Estes plasmídios se encontram em estado autônomo (SCP1 + SCP2 +), sendo que cada plasmídio é perdido espontaneamente em cerca de 0,03% a 1,0% dos esporos originados de uma cultura contendo plasmídio (VIVIAN & HOPWOOD, 1970; BIBB et alii, 1977; BIBB & HOPWOOD, 1981) ou em alta frequência (2 a 25%) após obtenção e regeneração de protoplastos (HOPWOOD, 1981a,b).

Outros plasmídios, como SLP1.1 a SLP1.6 foram identificados após cruzamento pela transferência de DNA da linhagem de S. coelicolor A3(2) SCP1 - SCP2 - para S. lividans 66. Essa família de plasmídios autônomos SLP1.1 a SLP1.6 foi revelada em S. lividans 66 e se origina de uma

seqüência cromossômica de S. coelicolor (BIBB et alii, 1981a). Igualmente os plasmídios autônomos piJ110 e piJ408 provavelmente se originam dos cromossomos de S. parvulus e S. glaucescens respectivamente após cruzamento dessas linhagens com S. lividans 66 (HOPWOOD et alii, 1984a).

Esses plasmídios e talvez outras seqüências de DNA, ocorrem naturalmente em forma integrada no cromossomo, ocasionalmente formam alças ("loop out"), duplicam-se autonomamente e são detectados em hospedeiros como S. lividans 66.

2.2.3.1. Transferência de plasmídios

Muitos dos plasmídios isolados ou detectados em estreptomicetos são "cripticos", isto é, não estão ainda associados a um fenótipo. Entretanto, na maioria das vezes, os plasmídios podem estar associados a fertilidade, assegurando sua própria transferência e a mobilização de marcas cromossômicas no cruzamento.

Os plasmídios de S. coelicolor A3(2) e de outros estreptomicetos são conjugativos e pela análise da região de transferência (tra) desses plasmídios, estas regiões podem ser geneticamente mais simples do que a região tra em E. coli. Os experimentos iniciais mostrando que plasmídios pequenos como SLP1.6 de 9,4 Kb (BIBB et alii, 1981a) e o plasmídio piJ101 de 8,9 Kb (KIESER et

alii, 1982) são autotransmissíveis, comprovam que o mecanismo de transferência em estreptomicetos é mais simples que em outras bactérias. Estudos genéticos e moleculares realizados por KIESER et alii (1982) com o plasmídio piJ101 mostram que um segmento de 2,1 Kb compreende a região de transferência desse plasmídio, enquanto que no plasmídio F de *E. coli* a região tra tem 35 Kb (WILLETS & SKURRAY, 1980). Os plasmídios pequenos mostram grande vantagem para serem utilizados como vetores de clonagem.

Além destes plasmídios, outros, isolados de Streptomyces são autotransmissíveis e incluem pSF689 e pSF765 com 13,7 e 7,2 kb, respectivamente (MURAKAMI et alii, 1983); piJ110 e piJ408 têm 13,6 kb e 15 kb, respectivamente (HOPWOOD et alii, 1984a); e pTA 4001 (5,9 kb) (KOBAYASHI et alii, 1984). Todos estes plasmídios são transferíveis quando ensaiados em S. lividans 66 SLP2 - SLP3 - e também em outras linhagens como S. coelicolor A3(2) e S. chartreusis. Em decorrência da elevada frequência de plasmídios conjugativos entre os estreptomicetos, foi sugerido por HOPWOOD et alii (1986) que algumas funções do hospedeiro necessárias para a transferência de plasmídios encontram-se espalhadas entre estas bactérias filamentosas.

2.2.3.2. Zigose letal

Observações iniciais realizadas por BIBB et alii (1977) mostraram que o desenvolvimento confluyente de uma linhagem de S. coelicolor A3(2) SCP2 - era retardado, principalmente o micélio aéreo, por um ou dois milímetros a partir do ponto de contacto com uma colônia contendo o plasmídeo SCP2* (variante do plasmídeo SCP2 com elevada frequência de transferência). Este fenômeno foi chamado de "zigose letal" por analogia com o plasmídeo F de E. coli K-12 em que as células F - podem ser mortas por conjugação simultânea com linhagens Hfr. (SKURRAY & REEVES, 1973). Segundo BIBB et alii (1977), um inibidor difusível poderia ser a causa desta zona de inibição. Visando esclarecer este fato, BIBB et alii (1978) obtiveram esporos únicos de uma linhagem SCP2* e espalharam dentro de uma cultura confluyente da SCP2 - tendo observado pequenas colônias com zonas circulares de inibição, as quais foram chamadas de "colônias pock".

Os plasmídios de Streptomyces que mostram este efeito, atualmente são descritos como fenótipo zigose letal (Ltz). Este fenótipo não é confinado apenas a SCP1 e SCP2*, mas a inúmeros plasmídios que se mostram conjugativos.

A mudança fisiológica responsável pela reação "pock" visível ainda não é entendida, porém, segundo

HOPWOOD et alii (1986), uma hipótese favorável seria que possivelmente ocorre uma desrepressão temporária de algumas funções de transferência dentro do micélio livre de plasmídeo.

O uso deste fenótipo Ltz é muito útil para a Genética de Streptomyces apresentando-se como um instrumento importante no sistema de transformação por DNA plasmidiál em protoplastos de Streptomyces

2.3. Produção de antibióticos

A distinção entre antibióticos "sensu strictu" e bacteriocinas de E. coli ou toxinas "killer" de levedura, baseia-se sobretudo na formação dos antibióticos que é mais de natureza genética (HOPWOOD, 1978). Enquanto a síntese das tetraciclinas ou de um antibiótico macrólido é codificada por vários genes, as colicinas e as toxinas "killer" são proteínas que se originam da informação de um único gene estrutural.

Os antibióticos são produzidos por diferentes grupos de microrganismos cujo processo regulatório ainda não é completamente entendido. Estes metabólitos secundários surgem a partir da modificação dos intermediários do metabolismo primário que reúnem metabólitos primários e formam estruturas complexas pela

ação de enzimas específicas, as quais são expressadas sob determinadas condições de crescimento.

A transformação da população de crescimento celular (tropofase) em população produtora de antibiótico (idiofase) é um tipo de diferenciação celular análogo à diferenciação morfológica do micélio a esporos que ocorre em meio sólido (SENO & HUTCHINSON, 1986).

O estudo genético do processo biossintético constitui um sistema muito bom para a investigação do mecanismo regulatório envolvido na diferenciação celular destas bactérias filamentosas.

2.3.1. Importância de Streptomyces na produção de antibióticos - Actinomicina

Uma das propriedades mais importantes em Streptomyces é sua capacidade em elaborar uma variedade de estruturas químicas com grande valor social e econômico.

Estas bactérias comumente isoladas do solo, têm atraído a atenção de muitos microbiologistas, porque cerca de 50% das linhagens isoladas apresentam ação antimicrobiana.

Na década de 1940 o microbiologista Selman Waksman, realizando isolamento de bactérias a partir de solo, descobriu o primeiro antibiótico - actinomicina - produzido por um estreptomiceto que foi denominado

Streptomyces antibioticus por causa da sua potente atividade antibacteriana. Entretanto, em decorrência de sua elevada toxicidade, a substância não mereceu atenção na época. Posteriormente, foi isolado S. griseus, produtor da estreptomicina, o qual causou um grande impacto porque não era tóxico e apresentava ação antimicrobiana para Mycobacterium tuberculosis, sendo utilizado com eficácia na cura da tuberculose (WAKSMAN & WOODRUFF, 1941).

Em decorrência desse sucesso, as pesquisas se intensificaram na busca do isolamento de amostras de Streptomyces que produzissem outras substâncias ativas. A versatilidade desse gênero foi surpreendente e diversas linhagens foram isoladas visando à produção de antibióticos com diferentes estruturas químicas.

Em recente revisão, QUEENER & DAY (1986) enfatizam que aproximadamente 6000 antibióticos de origem microbiana foram caracterizados e cerca de 60% destes são produzidos por actinomicetos, enquanto que os restantes são metabólitos de fungos e ou eubactérias. Entre os antibióticos isolados de actinomicetos, 90% são originários de Streptomyces e encontram aplicação na medicina veterinária e humana, na agricultura e na indústria de alimentos.

As actinomicinas compreendem um grupo de cromopeptídeos vermelhos que diferem na parte peptídica da

molécula. A condensação de duas moléculas do ácido 4-metil-3 hidroxiantranílico origina actinocin que é o cromóforo da actinomicina (WAKSMAN, 1968). O papel terapêutico das actinomicinas foi descoberto a partir dos trabalhos de HACKMANN (1968) no tratamento da linfogranulomatose maligna (doença de Hodgkin).

As actinomicinas são produzidas por várias espécies de Streptomyces, como S. antibioticus, S. parvulus, S. chrysomallus, S. melanochromogenes, S. felleus, S. regensis, S. spadicis, entre outras. Diferentes tipos de actinomicinas são produzidos durante a fermentação, dependendo da linhagem utilizada e da composição do meio.

2.3.2. Genética da produção de antibióticos

O conhecimento da genética de Streptomyces é de fundamental importância, considerando-se principalmente a produção de metabólitos secundários cuja investigação poderá influenciar a produção de antibióticos e a obtenção de novas estruturas biossintéticas.

As observações realizadas por vários pesquisadores buscam conhecer a localização e a organização dos genes estruturais na biossíntese de antibiótico das várias linhagens produtoras (HOPWOOD, 1978; OKANISHI, 1979, 1980; SCHREMPF, 1982; HOPWOOD et alii, 1983). O

envolvimento de plasmídios em muitas linhagens produtoras de antibióticos foi sugerido em decorrência de várias observações: a) a formação de antibióticos em algumas linhagens era instável; b) a frequência de mutantes antibiótico-negativas aumentava após tratamento com corantes intercalantes; c) transferência por infecção do caráter produção de antibiótico.

Entretanto, HÜTER & ECKHARDT (1988), fazendo uma análise detalhada dos trabalhos realizados nos últimos anos mostram que genes estruturais biossintéticos estão localizados principalmente em cromossomos, como pode ser resumido na Tabela 2.

Tabela 2
Localização cromossomal e extracromossomal de genes estruturais
para a biossíntese de antibióticos (HÜTTER & ECKHARDT, 1988)

Controle genético	Antibiótico	Linhagem produtora	Referências
Cromossomo	actinorrodina	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	WRIGHT & HOPWOOD (1976b); RUDD & HOPWOOD (1979); et alii (1986b)
Cromossomo	etildimetiletil-ano-nio-brometo (CDA)	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	HOPWOOD & WRIGHT (1983)
Cromossomo	cloranfenicol	<i>S. venezuelae</i>	AKAGAWA et alii (1979); AHMED & VINING (1983)
Cromossomo	eritromicina	<i>Saccharopolyspora</i>	WEBER et alii (1985)
Cromossomo	holomicina	<i>S. clavuligerus</i>	KIRBY (1978)
Cromossomo	hidroxiestrep-tomicina	<i>S. glaucescens</i>	CRAMERI et alii (1983); UINTER-MANN et alii (1984)
Cromossomo	oxitetraciclina	<i>S. rimosus</i> (linhagem soviética)	BORONIN & WINDLIN (1971); PIJAE & ALACEVIC (1979)
Cromossomo	rifamicina	<i>S. rimosus</i> <i>Anycolopsis</i> (N.) <i>mediterranei</i>	RHODES et alii (1981, 1984) SCHOPP & WIESCH (1979); GHISALBA et alii (1984)
Cromossomo	"pigmento vermelho"	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	RUDD & HOPWOOD (1980)
Cromossomo	zorbamicina	<i>S. bikiniensis</i> var. <i>zorboensis</i>	COATS & ROESER (1971)
Plasmidio	metilenomicina	<i>S. coelicolor</i> <i>S. violaceus-ruber</i> SANK 95570	WRIGHT & HOPWOOD (1976a) KIRBY & HOPWOOD (1976a); AGUILAR & HOPWOOD (1982); KINASHI & SHIMAJI (1987)
Plasmidio* (discutível)	tilosina	<i>S. fradiae</i>	BALTZ et alii (1981, 1982); BALTZ (1982); SENO & HUTCHINSON (1986); STONESIFER et alii (1986)
Plasmidio (análise incompleta)	aureomicina e estreptomicina A e B	<i>S. coelicolor</i> A3(2)	TRODST et alii (1979)
Plasmidio (indicativo)	aureotricina e kasugamicina	<i>S. kasugaensis</i>	OKAWISHI et alii (1979); OKAWISHI & UMEZANA (1979); FURUMAI et alii 1982)
Plasmidio (indicativo)	cefamicina	<i>S. griseus</i>	PARAG (1979)
Plasmidio (indicativo)	gingfengmicina	<i>S. gingfengmyceticus</i>	ZHENG et alii (1982)
Plasmidio (indicativo)	espiramicina	<i>S. ansofaciens</i>	IKEDA et alii (1982)
Plasmidio (indicativo)	estreptomicina	<i>S. griseus</i>	ZHUANG et alii (1980); XUE et alii (1981, 1985)

* De acordo com BALTZ (1980) o gene Tyl A pode estar localizado cromossomalmente.

2.3.2.1. Papel dos plasmídios na produção de antibióticos

A única evidência genética da ocorrência de genes estruturais em plasmídio foi demonstrada na produção de metilenomicina A. O plasmídio SCP₁ foi demonstrado geneticamente em S. coelicolor A3(2) pelas suas propriedades de recombinação (VIVIAN, 1971). A linhagem SCP₁⁺ produzia uma substância difusível que inibia a linhagem SCP₁⁻; posteriormente esta substância foi caracterizada como metilenomicina A por WRIGHT & HOPWOOD, 1976a,b). Em relação ao plasmídio conjugativo as linhagens apresentam-se em três formas: SCP₁⁺ (autônomo); SCP₁['] (integrado), ou SCP₁⁻ (ausente), (HOPWOOD et alii, 1973). Fundamentados nestes estudos, KIRBY & HOPWOOD (1977) concluíram que SCP₁⁻ não produz metilenomicina e é sensível à adição exógena desse antibiótico. Igualmente, pelas propriedades conjugativas dessas linhagens, eles observaram que, cruzamentos com S. lividans 66 e S. parvulus ATCC 12434 não produtoras e sensíveis a metilenomicina A, mostravam transconjugantes resistentes e produtores desse antibiótico.

Investigação similar foi realizada por AGUILAR & HOPWOOD (1982) com a linhagem S. violaceoruber SANK 95570, também produtora de metilenomicina. Através da microscopia eletrônica, aqueles pesquisadores detectaram

nesta linhagem um plasmídio pSV1 de 110 Mdal que hibridizava com uma sonda contendo o gene para codificar metilenomicina A.

O plasmídio SCP₁ de S. coelicolor, embora tenha sido o primeiro plasmídio detectado geneticamente, foi durante muito tempo refratário ao isolamento físico, mesmo pelo uso de diferentes métodos. Entretanto, em comunicação recente, KINASHI & SHIMAJI (1987) e KINASHI et alii (1987), utilizando a técnica OFAGE, conseguiram isolar um grande plasmídio linear com cerca de 340 kb, o qual contém genes de resistência e de biossíntese a metilenomicina A.

Embora não existam ainda trabalhos conclusivos, várias linhagens de estreptomicetos produtoras de antibióticos sugerem a ocorrência de plasmídios na produção de alguns metabólitos secundários.

O plasmídio SQP₁ de S. qingfengmyceticus pode conter genes estruturais para a biossíntese de qingfengmicina (ZHENG et alii, 1982), enquanto que o plasmídio PSG1 pode ser o responsável pela síntese de estreptomicina em uma linhagem de S. griseus (ZHUANG et alii, 1980; XUE et alii, 1981), entretanto a análise ainda é incompleta.

Igualmente incompleta é a demonstração da ocorrência de plasmídios em S. antibioticus e S. parvulus,

ambos produtores de actinomicina, postulada por OCHI & KATZ (1978; 1980), após a fusão de protoplastos entre linhagens auxotróficas. Eles observaram que a fusão entre linhagens auxotróficas produtoras (act^+) e não produtoras (act^-) de actinomicina mostravam alta freqüência da transferência (84 a 95%) do caráter síntese de actinomicina entre os recombinantes prototróficos, sendo que nenhum recombinante prototrófico produtor de actinomicina foi detectado na fusão com linhagens auxotróficas e não produtoras. Em recente investigação, KINASHI & SHIMAJI (1987) isolaram, através de eletroforese ortogonal, três plasmídios lineares de 520 kb, 560 kb e 580 kb em S. parvulus ATCC 12434, entretanto ainda não é conhecido se são encontrados nestes plasmídios genes para a síntese de actinomicina.

Situação conflitante tem sido observada com os estudos realizados em S. kasugaensis, produtor de kasugamicina e aureotricina. Investigações iniciais realizadas por OKANISHI et alii (1970) e OKANISHI (1979, 1980) postulam a ocorrência de genes estruturais biossintéticos sobre elementos extracromossômicos. Contudo, trabalho realizado posteriormente por FURUMAI et alii (1982) demonstra que pelo menos em alguns clones obtidos de protoplastos regenerados, os genes estruturais para biossíntese de aureotricina são codificados cromossomalmente. Igualmente confusas são as observações

realizadas com a linhagem de S. fradiae produtora de tilosina. BALTZ (1980) atribui a ocorrência do gene Tyl A sobre cromossomo, enquanto que trabalho posterior do mesmo autor (BALTZ, 1982) postula que genes estruturais estão em plasmídeo, embora nenhum CCC (Circular Covalent Closed) DNA tenha sido detectado.

Estes estudos inconclusivos decorrem possivelmente de rearranjo cromossômico ocasionado por deleção e amplificação nestes microrganismos que alteram muitas propriedades fenotípicas.

O uso de técnicas mais sofisticadas como OFAGE e a clonagem molecular poderão avançar estas investigações e esclarecer estas questões fundamentais para o melhoramento de linhagens de importância industrial.

2.4. Novos métodos para obtenção de antibióticos

As recentes investigações da tecnologia do DNA recombinante mostram que a manipulação genética da via biossintética de microrganismos produtores de antibióticos conduz ao aparecimento de novas estruturas antimicrobianas, aumento de produtividade, estabilização de produção, alteração na regulação fisiológica e também eliminação de reações indesejáveis.

A biossíntese mutacional ou mutassíntese constitui um dos primeiros métodos para obtenção de novos antibióticos. DAUM & LEMKE (1979) observaram que linhagens mutantes bloqueadas na via biossintética foram alimentadas durante a fermentação com precursores não comuns à reação, originando a produção de novos análogos estruturais. Baseados nestas experiências, mutantes idiotróficos de S. fradiae produziram novos análogos de neomicina.

2.4.1. Fusão de protoplastos

Os protoplastos constituem um instrumento indispensável nas pesquisas genéticas de Streptomyces, não apenas pela transformação de DNA, mas também porque podem ser utilizados em processo de fusão entre parentais cujo sistema conjugacional não é conhecido ou detectável.

As técnicas de formação e regeneração de protoplastos em estreptomicetos foram utilizadas a partir dos relatos de SAGARA et alii (1971) e OKANISHI et alii (1974). Subsequentemente, técnicas e métodos melhorados para regeneração de protoplastos foram introduzidos por HOPWOOD et alii (1977), BALTZ (1978) e SHIRAHAMA et alii (1981). Esses trabalhos são fundamentados no tratamento com enzima lítica, usualmente lisozima, de células que preferencialmente são pré-cultivadas em um meio com glicina para facilitar a digestão da parede celular.

Fusão de protoplastos em células animais e de plantas foi um processo utilizado muito antes de se realizar fusão microbiana. O progresso da fusão de protoplasto foi mais rápido com células microbianas em decorrência da fácil manipulação e de crescimento rápido.

FERENCZY et alii (1972) realizaram a primeira fusão de protoplastos em condições controladas com fungo filamentoso, Geotrichum candidum, utilizando para o processo de fusão força centrífuga para aglutinação dos protoplastos.

Somente após a descoberta de que o polietileno glicol (PEG) atuava como agente fusogênico em protoplastos de plantas (KAO & MICHAYLUK, 1974; WALLIN et alii, 1974) é que este composto foi usado com sucesso em experimentos com bactérias Gram-positivas. FODOR & ASTOLFI (1976), usando mutantes auxotróficos duplos de Bacillus megaterium e usando PEG, obtiveram produtos de fusão nutricionalmente complementares. Em seguida, HOPWOOD et alii (1977) realizaram fusão de protoplastos com diferentes linhagens de Streptomyces utilizando PEG e Dimetil sulfóxido (DMSO) com sucesso. A partir de então, a transferência de genes entre Streptomyces de importância econômica tornou-se viável, principalmente entre linhagens onde o sistema de conjugação não estava bem estabelecido.

Os protoplastos também são excelentes receptores de plasmídeo exógeno ou DNA de bacteriófago, servindo como eficiente sistema de transformação e transfecção. O primeiro trabalho de transformação por DNA plasmidial em bactérias Gram-positivas foi realizado por BIBB et alii (1978) utilizando Streptomyces, seguido do relato de CHANG & COHEN (1979) com Bacillus. Estas descobertas foram de grande importância, principalmente em Streptomyces, porque nenhum sistema de transformação era conhecido em linhagens de interesse comercial.

A aplicação da fusão de protoplastos em microrganismos de interesse econômico tem se mostrado eficaz para obtenção de novos antibióticos, para os programas de melhoramento de linhagens importantes industrialmente e também tem contribuído para melhor entender as vias do metabolismo secundário na biossíntese de antibióticos.

A fusão interespecífica entre S. tenjimariensis produtor de istamicina e S. griseus produtor de estreptomina foi relatada por HOTA et alii (1985), YAMASHITA et alii (1985) e originou um recombinante que produzia um novo antibiótico, indolisomicina, que era diferente dos aminoglicosídicos produzidos pelos parentais. YOUXIA et alii (1986) também observaram um novo antibiótico em um recombinante obtido da fusão entre S.

qingfengmyceticus e S. hygrosopicus var. jinggagensis. A nova substância designada RVA18 era distinta daquelas produzidas pelos parentais, sendo sugerida pelos autores a obtenção de um antibiótico "híbrido".

IKEDA et alii (1983) observaram que linhagens de S. ambofaciens e S. fradiae produtores, respectivamente, de espiramicina e de tilosina, aumentaram a produtividade em cerca de 3,6 vezes em relação à linhagem original após regeneração de protoplastos. Igualmente ARAUJO et alii (1984/85) observaram que protoplastos regenerados de S. capoamus IA-M3122 aumentaram em cinco vezes a produção de ciclamicina em relação à linhagem parental. Segundo IKEDA et alii (1983) e KURYLOWICZ et alii (1987), o aumento da produção de antibiótico por protoplastos regenerados pode ser ocasionado por variações genéticas proporcionadas pela liberação de plasmídios ligados às proteínas das membranas, causando mudanças intracelulares que são expressas na variação da produção de antibióticos.

OCHI (1982), com o objetivo de determinar a transferência da propriedade de produção de actinomicina (act^+) em S. antibioticus e S. parvulus, realizou fusão intraespecífica dentro destas linhagens e detectou, respectivamente, 68% e 48% de transferência desta propriedade, após fusão de protoplastos.

A seleção de linhagens utilizadas para recombinação por fusão de protoplastos deve ser conduzida com base no conhecimento da via biossintética de linhagens produtoras de compostos ativos. Segundo NORMANSELL (1982), o sucesso para obtenção de um novo antibiótico por fusão de protoplastos depende do uso de linhagens que produzam antibióticos pertencentes ao mesmo grupo estrutural. Isto provavelmente aumenta a chance de que uma enzima introduzida em um novo hospedeiro encontre um substrato quimicamente diferente do seu substrato normal, porém seja capaz de convertê-lo a um análogo estrutural novo. HOPWOOD (1981b) enfatiza que a informação genética estrutural para a formação do novo produto pode se originar de uma única linhagem pela ativação de genes silenciosos ("silent genes") ou, ainda, genes estruturais procedem de ambos os parentais para produzir um antibiótico "híbrido". A hibridização entre linhagens da mesma espécie ou grupos de espécies relacionados constitui uma ótima estratégia para descobrir novos antibióticos através da eliminação da regulação do gene estrutural que passa a se expressar em outra linhagem.

2.4.2. Tecnologia do DNA recombinante

Os recentes avanços da clonagem molecular de genes biossintéticos de antibióticos em Streptomyces

mostram que é possível obter novos antibióticos através da tecnologia do DNA recombinante promovendo assim um grande avanço para a Biotecnologia.

HOPWOOD et alii (1985a) desenvolveram várias estratégias para clonagem molecular e análises de genes em Streptomyces. Os vetores foram construídos a partir de plasmídios endógenos de Streptomyces pela inserção de determinantes de resistência a antibióticos obtidos de linhagens produtoras destes metabólitos (HOTA et alii, 1985). Estes vetores com resistência a tioestrepton (tsr) de S. azureus ATCC 1492; com resistência a neomicina (aminoglicosídeofosfo-transferase) de S. fradiae ATCC 10745; com resistência a viomicina (viomicinatransferase) de S. vinaceus NCIB8852 e com resistência a higromicina de S. hygrosopicus foram desenvolvidos para seleção de clones ou para reconhecer clones pela inativação insercional quando presente como uma segunda marca (THOMPSON et alii, 1980; 1982a; 1982b; MALPARTIDA et alii, 1983).

A aplicação da genética molecular e da engenharia genética em Streptomyces tem se mostrado eficiente em levar fragmentos de DNA de uma linhagem doadora para uma linhagem receptora estável. Com o domínio de todas estas técnicas tem sido possível clonar genes biossintéticos e de resistência de vários antibióticos: bialofos, metilenomicina, estreptomina, actinorrodina,

entre outros (MURAKAMI et alii, 1986; CHATER & BRUTON, 1985); OHMUKI et alii, 1985; DISTLER et alii, 1987; TOHYAMA et alii, 1987; MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984, 1986).

Estas investigações mostraram que genes biossintéticos de antibióticos se encontram formando um agregado gênico, não estando, portanto, espalhados aleatoriamente no cromossomo, como era a idéia original.

MALPARTIDA & HOPWOOD (1984) desenvolveram um vetor piJ2303 contendo genes biossintéticos de actinorrodina de S. coelicolor que transformava e complementava mutantes não produtoras de actinorrodina, bem como dirigia a síntese desse antibiótico em S. parvulus não produtor de actinorrodina.

Actinorrodina, como granaticidina e medermicina, pertence ao grupo químico isomanequinona; os três são derivados biossinteticamente de unidades de acetato através da via poliacetídica (GORST-ALLMAN et alii, 1981).

A partir destes conhecimentos HOPWOOD et alii (1985b) utilizaram o clone piJ2303, bem como subclones que conduziam diferentes unidades transcricionais da região act e introduziram por transformação em diferentes linhagens de Streptomyces produtoras de medermicina e granaticina. Entre os clones selecionados pela transformação da linhagem produtora de medermicina observaram colônias que formavam pigmento púrpura e

produziam medermicina e um novo composto denominado mederroquina, enquanto que a transformação da linhagem produtora de granaticina originou culturas com pigmento azul-púrpura, que produziam granaticina e um novo composto, dihidrogranaticina.

Segundo HOPWOOD et alii (1985b), estes novos produtos surgem de vias biossintéticas híbridas pela interação de enzimas codificadas em genes estruturais das duas linhagens e não pela ativação de genes silenciosos na linhagem receptora.

A construção de linhagens híbridas pela engenharia genética mostra a grande utilidade desta técnica como um instrumento valioso na descoberta de novos antibióticos mais eficientes terapêuticamente.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Linhagens utilizadas

<u>Linhagens</u>	<u>Origens</u>	<u>Fenótipo relevante</u>
<u>S. felleus</u>		
IA-M3079	selvagem	produtora de actinomicina
AF-3079(90/57)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3079(88/50)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3079(114/18)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3079(1196)	tratamento por acriflavina	fenilalanina phe ⁻
AF-3079(128/32)	tratamento por acriflavina	fenilalanina phe ⁻
AF-3079(96/63)	tratamento por acriflavina	fenilalanina phe ⁻
AF-3079(1183)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁺⁺
E- 3079(53c)	espontânea	prototrófica act ⁻
E- 3079(73c)	espontânea	prototrófica act ⁻
<u>S. regensii</u>		
IA-M3053	selvagem	produtora de actinomicina
AF-3053(53/5)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3053(141/2)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3053(134/8)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3053(105/4)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3053(128B)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁺⁺
E -3053(66c)	espontânea	prototrófica act ⁻
<u>S. parvulus</u>		
IA-3042(6/1)	selvagem	produtora de actinomicina
AF-3042(6/1)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
AF-3042(48/2)	tratamento por acriflavina	prototrófica act ⁻
Recombinantes Sma, Smb, Smc, Smcd, Sme	fusão de protoplastos S. felleus IA-M3079 x AF-3079(90/57))	produz antifúngico ade-
<u>S. lividans</u>	John Innes Institute	Str ^R
<u>S. lividans</u> piJ702(5,8kb)	John Innes Institute	Thio ^R Tyr ⁺
<u>S. lividans</u> piJ943 (20,6 kb)	John Innes Institute	Thio ^R
<u>S. lividans</u> piJ303(10,7kb)	John Innes Institute	Thio ^R

act⁻ = não produtora de actinomicina
act⁺⁺ = maior produção de actinomicina
Str^R = estreptomina resistente
Thio^R Tyr⁺ = Tioestreon resistente, tirosina
Phe⁻ = Fenilalanina
ade⁻ = Adenina

3.2. Meios de Cultura

3.2.1. Meio de esporulação (ME) (KURYLOWICZ)¹

Este meio consiste de extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 0,8%, glicose 0,4%. Ajustado a pH 6,8-7,0 com solução de hidróxido de sódio.

3.2.2. Meio mínimo (PONTECORVO et alii, 1953)

O meio mínimo consiste de nitrato de sódio 0,6%, dihidrogênio fosfato de potássio 0,15%, cloreto de potássio 0,05%, sulfato de magnésio heptahidratado 0,05%, sulfato ferroso 0,001%, sulfato de zinco 0,001%, glicose 1,0%, ágar 1,5%. pH 6,8 ajustado com hidróxido de sódio a 40%.

3.2.3. Meio completo sólido (POTENCORVO et alii, 1953, modificado por AZEVEDO & COSTA, 1973)

Ao meio mínimo (item 3.2.2) foram adicionados peptona 0,2%, caseína hidrolisada 0,15%, extrato de levedura 0,05%, solução de vitaminas 0,1 ml (v/v) (item 3.3.1). Ajustado o pH para 6,8 com hidróxido de sódio a 40%.

¹ KURYLOWICZ, W. (Instituto de Higiene, Varsóvia-Polônia) Comunicação Pessoal, 1982.

3.2.4. Meio nutriente ágar (NA)(Difco)

O meio desidratado (2,3%) foi preparado, distribuído para volumes de 300 ml e autoclavado.

3.2.5. Meio "Tryptic Soya Broth" (TSB) (Difco)

O meio hidratado foi distribuído em frascos Erlenmeyer de 125 ml com 25 ml de meio e autoclavado.

3.2.6. Meio de Sabouraud

Este meio consiste de peptona 1,0%, glicose 4,0%, extrato de carne 0,35%, cloreto de sódio 0,75%. pH ajustado para 6,8-7,0 com NaOH.

3.2.7. Meio R₂YE (THOMPSON et alii, 1980)

Sacarose 0,3M, sulfato de potássio 0,025%, cloreto de magnésio 0,6M, glicose 1,0%, caseína hidrolisada 0,01%, solução de elementos traços (3.3.12) 0,2% (v/v), extrato de levedura 0,5%, tampão TES 0,25M. Em Erlenmeyer de 250 ml foram colocados 2,2 g de ágar (Difco), adicionados 100 ml da solução acima, sendo o meio autoclavado. No momento de usar, foi adicionado 1,0 ml de fosfato ácido de potássio (0,5%), 0,4 ml de cloreto de

cálcio (5M), 1,5 ml de L-prolina (20%) e 0,7 ml de hidróxido desódio (1N).

3.2.8. Meio semi-sólido (overlay) (IKEDA et alii, 1983)

Gelatina 0,1%, sacarose 0,3M, cloreto de magnésio 0,6M, cloreto de cálcio 0,02M, tampão HEBES foi substituído por tampão TES 25 mM, ágar (Difco) 0,65%.

3.2.9. Meio ISP1 Triptona-extrato de levedura (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948).

Triptona 0,5% e extrato de levedura 0,3%. O pH do meio foi ajustado para 7,0-7,2; em seguida, o meio foi distribuído em porções de 25 ml, para Erlenmeyers de 125 ml.

3.2.10. Meio ISP2 - Extrato de levedura-extrato de malte-ágar (PRIDHAM et alii, 1956-57)

Extrato de levedura 0,4%, extrato de malte 1,0%, glicose 0,4%. O pH foi ajustado para 7,3 e então adicionado ágar (Difco) 2,0%. O meio foi autoclavado e distribuído em porções de 25 ml por placa de Petri.

3.2.11. Meio ISP3 - Aveia-ágar (Difco) (KÜSTER, 1959)

O meio desidratado (2,2g%) foi preparado e o pH ajustado para 6,8-7,0 com NaOH 40%, sendo autoclavado e distribuído em porções de 25 ml por placa de Petri.

3.2.12. Meio ISP4 - Amido-sais minerais-ágar (Difco) (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

O meio desidratado (3,7 g%) foi procedido como no item 3.2.11.

3.2.13. Meio ISP5 - Glicerol-asparagina-ágar (Difco) (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

O meio desidratado (2,2g%) foi adicionado de 1g% de glicerol e procedido como no item 3.2.11.

3.2.14. Meio ISP6 - Peptona-extrato de levedura-ferro-ágar (Difco) (TRESNER & DANGA, 1958)

Ao meio desidratado peptona iron-ágar (3,6 g%) foi adicionado 0,1 g% de extrato de levedura, sendo então fervido para liquefazer o ágar e, em seguida, distribuído em tubos e autoclavado.

3.2.15. Meio ISP7 - Tirosina- ágar (SHINOBU, 1958)

O meio desidratado (2,3 g%) foi fervido para liquefação do ágar, distribuído em tubos e autoclavado.

3.2.16. Meio ISP9 - Para fontes de carbono (PRIDHAM & GOTTLIEB, 1948 modificado por SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

Este meio, após autoclavação, foi adicionado assepticamente de diferentes fontes de carbono na concentração de 1%. As fontes de carbono: glicose, L-arabinose, sacarose, D-xilose, I-inositol, D-manitol, D-frutose, ramnose e rafinose foram esterilizadas com éter etílico livre de acetona durante três dias consecutivos. Após evaporação de todo o éter, cada um foi adicionado a um Erlenmeyer contendo o meio ISP-9 e distribuído em tubos.

3.2.17. Meio de tolerância a cloreto de sódio (PRIDHAM et alii, 1956/1957)

Meio ISP2 (item 3.2.10). A quatro diferentes porções deste meio foi adicionado cloreto de sódio para as concentrações de 4%, 7%, 10% e 13%.

3.2.18. Meio de gelatina- ágar

Peptona 0,5%, extrato de carne 0,3%,
gelatina 0,4%, ágar (Difco) 1,5%; pH ajustado para 7,0.

3.2.19. Meio de Produção de antibiótico (MP)

Farinha de soja 2,0%, cloreto de sódio 0,5%,
glicose 2,0%, carbonato de cálcio 0,2%, pH 6,8-7,0 ajustado
com NaOH 40%.

3.2.20. Esterilização dos meios

Todos os meios foram esterilizados por
autoclavação a 121°C durante 15 minutos.

3.3. Soluções utilizadas

3.3.1. Solução de vitaminas

Biotina	0,2 mg
Acido- p -aminobenzóico	10,0 mg
Tiamina	50,0 mg
Piridoxina	50,0 mg
Ac. nicotínico	100,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada	100,0 ml

A solução foi aquecida em banho-maria durante 15 minutos e mantida em frasco escuro no refrigerador a 4°C.

3.3.2. Solução de caseína hidrolisada

Caseína hidrolisada	100,0 mg
Água destilada esterilizada	10,0 ml

A solução foi aquecida por 15 minutos em banho-maria e mantida no refrigerador a 4°C.

3.3.3. Solução de ácido nucleico

Solução A: ácido nucleico de levedura 2,0 g
em 15 ml de ácido clorídrico 1N.

Solução B: ácido nucleico de levedura 2,0 g
em hidróxido de sódio 1N.

Cada solução foi aquecida separadamente em banho-maria durante 20 minutos. A seguir foram misturadas e o pH ajustado para 6,0 com NaOH 10%. A mistura foi filtrada e o volume completado para 40,0 ml com água destilada.

3.3.4. Soluções-estoque dos suplementos adicionados ao meio mínimo

O estoque dos suplementos foi preparado pela adição de cada um deles em água destilada esterilizada. As soluções foram aquecidas em banho-maria e conservadas no refrigerador.

3.3.5. Solução-estoque de acrilamida (30% de acrilamida e 0,8% de N',N'-metileno-bis-acrilamida) (LAEMMLI, 1970)

Acrilamida 75,0 g, bis-acrilamida 2,0 g dissolvidas em 250 ml de água desmineralizada. A solução foi filtrada e armazenada a 4°C.

3.3.6. Solução reveladora da atividade esterase (SHAW & PRASAD, 1970)

Substratos: - alfa-naftil acetato 1,0% dissolvido em acetona e água.

- beta-naftil acetato 1% dissolvido em acetona.

Ambas as soluções foram conservadas a 4°C.

Coloração: "Fast blue RR" 50 mg, tris.HCl 0,5 M (pH 7,1) 5,0 ml, alfa e beta naftilacetato a 1%, 1,5 ml, água destilada 43,5 ml.

3.3.7. Solução Fixadora PAGE

Esta solução contém 45 ml de metanol, 10 ml de ácido acético e 45 ml de água destilada.

Corante: Azul Comassie ("Brillant Blue R250") 50 mg dissolvidos em 50 ml do Fixador PAGE.

3.3.8. Solução de glicina (20%)

Glicina (10 g) foi solubilizada para 50 ml com água destilada e em seguida autoclavada.

3.3.9. Solução de sacarose 0,3M

Esta solução foi preparada, distribuída em tubos de ensaio e autoclavada.

3.3.10. Solução de lisozima (1,5 mg/ml)

No momento de usar foi preparada solução de lisozima por dissolução da mesma em tampão P (item 3.4.1.) e esterilizada por filtração.

3.3.11. Solução de PEG 1000 (50%)

Foi autoclavado 1,0 g de PEG em um tubo de ensaio e no momento de usar adicionado 1,0 ml de tampão P (item 3.4.1.).

3.3.12. Solução de elementos traços (OKANISHI et alii, 1974)

Cloreto de zinco 40 mg; cloreto férrico 200 mg; cloreto de cobre 10 mg; cloreto de manganês 10 mg; borato dissódico 10 mg; molibdato de amônio 10 mg. A solução preparada para um litro de água destilada e conservada no refrigerador.

3.3.13. Solução de dodecilsulfato de sódio (SDS) 1,5%

Solução estoque de SDS a 10% (p/v) foi diluída em tampão TE (item 3.4.3.) e ajustada a pH 12,45 com solução de hidróxido de sódio 10N.

3.3.14. Solução fenol-clorofórmio

Volumes de fenol e clorofórmio foram utilizados na proporção de 1:1 e adicionado 0,05% de 8-hidroxiquinolina. Esta solução foi saturada com tris-HCl 50 mM (pH 8,0).

3.3.15. Solução de bicloreto de mercúrio (15%)

Bicloreto de mercúrio foi dissolvido em ácido clorídrico a 20%.

3.3.16. Soluções-estoque de antibióticos utilizados

Actinomicina D 10,0 mg/ml em metanol;
Anfotericina, Eritromicina, Estreptomicina, Gentamicina,
Penicilina e Rifampicina 10,0 mg/ml em água destilada e
esterilizadas por filtração; Tetraciclina 10 mg/ml em 50%
de etanol; Tioestrepton em Dimetilsulfóxido (DMSO) 5,0
mg/ml.

3.4. Tampões

3.4.1. Tampão P (protoplastos) (OKANISHI et alii, 1974)

Sacarose 0,3M, dihidrogênio fosfato de
potássio 0,005M, sulfato de potássio 0,025M, cloreto de
magnésio 0,01M, cloreto de cálcio 0,025M, TES (N-tris
(hidroximetil)(metil-2- ácido aminoetanosulfônico) 0,25M,
solução de elementos traços 0,2% (v/v) (item 3.3.12.).

3.4.2. Tampão borato (TEB)

Tris-base 89mM, ácido bórico 89mM, EDTA 20
mM; pH 8,0.

3.4.3. Tampão TE

Tris-HCl 50mM, EDTA (pH8,0) 20 mM (pH8,0).

3.4.4. Tampão da amostra para gel agarose

Azul de bromofenol 0,1%, Ficoll 20% (p/v) dissolvido em TEB 3x.

3.4.5. Tampão do gel separador (LAEMMLI, 1970)

Tris-base 45,75% em água desmineralizada. A solução foi titulada para pH 8.9 com ácido clorídrico concentrado, em seguida o volume foi completado a 100 ml e filtrado.

3.4.6. Tampão do gel empilhador (LAEMMLI, 1970)

Tris-base 7,475% em água desmineralizada e em seguida titulada com HCl 1N para pH 6,8, procedendo-se igualmente como a solução anterior.

3.4.7. Tampão eletrólito ou tris-glicina pH 8,9 (LAEMMLI, 1970)

Tris-base 63,2 g, glicina 39,9 g foram dissolvidos para um litro de água desmineralizada. O tampão

foi filtrado e armazenado a 4°C. No momento do uso diluído 1:10 em água desmineralizada.

3.4.8. Tampão da amostra para o gel poliacrilamida

Este tampão consistiu de 5,0 ml de glicerol, 2,5 ml do tampão do gel empilhador (item 3.4.6), 2,5 mg de azul de bromofenol. O volume completado para 25 ml com água desmineralizada e armazenado a -20°C.

3.5. Manutenção

As linhagens de Streptomyces foram cultivadas em tubos inclinados com meio de esporulação (ME) (item 3.2.1), incubadas a 30°C por 5 a 7 dias. Em seguida foram conservadas a 4°C ou usadas para a preparação da suspensão de esporos.

3.5.1. Suspensão de esporos (HOPWOOD et alii, 1985a)

Suspensões foram preparadas a partir de culturas bem esporuladas, usando-se água destilada esterilizada e Tween 80 a 0,01%. Com auxílio de uma pipeta, os esporos foram desagregados e a suspensão filtrada em filtro com quatro camadas de tecido de nylon esterilizadas.

Em seguida este material foi centrifugado a 5.000 rpm/10 minutos. O sedimento ressuspenso em glicerol a 20%, de modo a conter 10^8 a 10^9 células/ml. Esta suspensão foi mantida a -20°C .

3.5.2. Manutenção dos microrganismos-teste

Para os ensaios antimicrobianos foram utilizados Bacillus subtilis 9-IA-16, Staphylococcus aureus IA-01 e Escherichia coli cultivados em tubo inclinado de nutriente ágar (Difco) (item 3.2.4) por 24 horas a 37°C , enquanto que Candida albicans IBB-50 e Neurospora crassa IA-2084 foram cultivados em tubo inclinado de Sabouraud-ágar (Difco) (item 3.2.6) a 30°C por 24 e 48 horas, respectivamente.

3.5.3. Suspensão microbiana para os ensaios

De cada amostra de bactéria, fungo ou levedura, após o período de crescimento, foi feita suspensão pela adição de 4 ml de salina e a suspensão diluída de modo a se obter uma suspensão homogênea, no momento da realização do teste.

3.5.4. Leitura de cores

A leitura das cores do micélio aéreo, reverso e pigmento solúvel foi realizada através do dicionário de cores adotado pelo International Streptomyces Project: Color Harmony Manual (JACOBSON et alii, 1948) e da Tabela de cores de Baumanns Farbtonkarte Atlas I (PRAUSER, 1964).

3.6. Tratamento com agente intercalante

3.6.1. Linhagens

S. felleus IA-M3079; S. regensis IA-M3053 e S. parvulus IA-M3042.

3.6.2. Cultivo

Frascos Erlenmeyer de 125 ml contendo 25 ml de "Tryptic Soya Broth" (item 3.2.5) foram adicionados de concentrações variadas de acriflavina (0 a 40 µg/ml) e inoculados com 0,2 ml da suspensão de esporos (item 3.5.1). Os cultivos foram mantidos sob agitação a 160-180 rpm durante 3 dias a 30°C.

A acriflavina foi utilizada com base nos trabalhos de OCHI & KATZ (1978) e OGURA et alii (1986).

3.6.3. Determinação da concentração de acriflavina

Para avaliação do efeito da acriflavina sobre o crescimento das diferentes linhagens de Streptomyces foi adotada a metodologia preconizada por OGURA et alii (1986). O percentual de inibição foi determinado através do volume de sedimentação da massa celular. Alíquotas de 5,0 ml do cultivo controle foram centrifugadas a 4.000 rpm/5 minutos (centrífuga excelsa Baby) e o volume da massa celular considerado como 100% de crescimento.

3.6.4. Ensaio antimicrobiano

A massa celular obtida do tratamento por acriflavina foi finamente homogeneizada em homogeneizador de tecido manual, seguindo-se de diluições sucessivas e plaqueamento em meio ME (item 3.2.1). Após crescimento individual das colônias, estas foram retiradas com um furador de rolha de 4 mm de diâmetro e colocadas sobre placas de NA (item 3.2.4), onde havia sido espalhada com alça de Drigalski uma suspensão bacteriana de Bacillus subtilis (item 3.5.3). Estas placas foram para estufa de 37°C por 18-24 horas, quando então foi observada a formação ou não de halos de inibição.

Usando a mesma metodologia, com modificações no meio de cultura (item 3.2.6) e utilizando discos de papel embebidos nos líquidos fermentados (item 3.2.19) pelos setores segregantes, foi ensaiada a atividade antimicrobiana para Candida albicans IBB50, Neurospora crassa IA-2084, Staphylococcus aureus IA-01, Escherichia coli N, Mycobacterium smegmatis.

3.7. Extração de DNA plasmidial

3.7.1. Linhagens utilizadas

S. felleus IA-M3079; AF-3079(90/57); IA-3079(53c) e linhagens-padrão de S. lividans piJ702 e piJ943.

3.7.2. Cultivo

O meio de cultura e as condições de cultivo como descrito no item 3.6.2. Para as linhagens-padrão de S. lividans piJ702 e piJ943 foi adicionado tioestrepton (5,0 µg/ml).

3.7.3. Obtenção de massa celular

Aproximadamente 1,0 ml do crescimento foi centrifugado em uma microcentrífuga (Spin II), para obtenção de 200 mg de células úmidas.

3.7.4. Extração (mini-preparação)

A extração foi realizada por lise alcalina segundo a metodologia de KADO & LIU (1981) modificada. Foram usados 0,2 a 0,3 g de células úmidas (item 3.7.3), lavadas com sacarose 0,3M e ressuspendidas em 100µl de tampão TE (item 3.4.3) contendo 2,0 mg/ml de lisozima. Este sistema foi incubado a 37°C por 30 minutos com agitação ocasional. Em seguida foram adicionados 400µl de dodecilsulfato de sódio (SDS) (item 3.3.13), sendo o sistema agitado em vortex e incubado a 65°C/15 minutos. Após resfriamento, o material foi tratado com fenolclorofórmio (item 3.3.14) por 3 vezes e o sobrenadante foi usado para aplicar no gel agarose.

3.7.5. Eletroforese em gel agarose (horizontal)

Minigéis foram preparados com agarose tipo II (Sigma) na concentração de 0,8% em TEB (item 3.4.2) contendo brometo de etídio na concentração de 0,5 µg/ml. As amostras misturadas ao tampão (item 3.4.4.) foram aplicadas

no gel e em seguida realizada a corrida por aproximadamente 60 minutos (15 v/cm). Para a corrida foi utilizado tampão TEB (item 3.4.2). Os géis foram revelados no transiluminador UV, fotografados com câmara acoplada com filtro alaranjado e filme panatomic X (Kodak) ASA 32.

3.8. Caracterização de plasmídeo conjugativo pela formação do fenótipo "pock"

3.8.1. Linhagens utilizadas

S. felleus IA-M3079; S. regensis IA-M3053; S. parvulus IA-M3042; S. lividans piJ303 e a linhagem testadora S. lividans TK24 (strR).

3.8.2. Cruzamento com S. lividans TK24

Os cruzamentos foram realizados a partir de culturas bem esporuladas de S. lividans TK24 strR e das linhagens em estudo, bem como de S. lividans piJ303 como controle positivo. Foram misturados 0,05 ml de uma suspensão de esporos de S. lividans com 0,05 µl da suspensão de esporos de cada linhagem. Os esporos foram espalhados sobre a superfície de agar ME inclinado (item 3.2.1) e incubados durante 5 a 7 dias. Decorrido o período

de incubação foram preparadas, a partir de cada cruzamento, suspensões esporógenas como no item 3.5.1.

3.8.3. Expressão do fenótipo "pock"

A partir das suspensões de esporos de cada cruzamento foram realizadas diluições seriadas até 10^{-3} e colocado 0,1 ml sobre a superfície de placas contendo meio R₂YE (item 3.2.7) acrescido de estreptomicina (50 µg/ml). Em seguida 0,05 ml de uma densa suspensão de esporos (10^9 esporos/ml) de S. lividans TK24 foram adicionados ao inóculo anterior e espalhados com alça de Drigalski sobre a superfície do meio, sendo as placas incubadas a 30°C por 72 horas. A cada 24 horas foram realizadas observações com lupa estereoscópica (Olympus. Modelo CHS/CHT). Zonas circulares de inibição do micélio aéreo caracterizam a expressão do fenótipo "pock".

3.9. Formação, regeneração e fusão de protoplastos (HOPWOOD et alii, 1985a)

3.9.1. Linhagens utilizadas

S. felleus IA-M3079 produtora de actinomicina (act^+) e a variante AF-3079(90/57) não produtora de actinomicina (act^-).

3.9.2. Cultivo

Meio de cultura e condições de cultivo como no item 3.6.2. Apenas foi adicionado assepticamente ao meio TSB 0,6% de glicina (item 3.3.8) e o tempo de cultivo foi de 18-20 h.

3.9.3. Formação de protoplastos (HOPWOOD et alii, 1985a)

O crescimento obtido foi centrifugado a 4.000 rpm/5 min. e lavado duas vezes com sacarose 0,3M (item 3.3.9). Em seguida foram adicionados 4,0 ml de lisozima na concentração de 1,5 mg/ml em tampão P (item 3.4.1) e o sistema levado para estufa a 37°C durante 20 a 30 min. Após o período de incubação foi adicionado tampão P e filtrado através de um funil com quatro camadas de tecido de nylon em um tubo de ensaio esterilizado. Os protoplastos

foram obtidos por sedimentação através de centrifugação (3000 rpm, 7 minutos) e ressuspensos em 10 ml de tampão P.

3.9.4. Regeneração de protoplastos

Visando verificar o percentual de regeneração dos protoplastos, foi utilizada a metodologia de IKEDA et alii (1983) que consiste em adicionar 0,1 ml da suspensão diluída em tampão P até 10^{-6} sobre placas com meio R₂YE (item 3.2.7). As placas foram deixadas na câmara de fluxo laminar por 20 minutos para evaporação das gotas de água da superfície. Em seguida os protoplastos foram recobertos com 5 ml de ágar hipertônico semi-sólido (item 3.2.8) fundido e mantido a 45°C. Igualmente, a suspensão de protoplastos foi diluída em água destilada esterilizada até 10^{-4} e 0,1 ml foi semeada sobre meio ME (item 3.2.1) para verificar a formação de células não protoplastizadas. A frequência de regeneração foi calculada pela determinação do número de colônias nas duas condições. A incubação foi a 30°C por dez dias.

3.9.5. Inativação de protoplastos

Uma suspensão de protoplastos da linhagem de S. felleus IA-M3079 contendo aproximadamente $12,1 \times 10^8$ protoplastos/ml foi inativada em banho-maria a 65°C durante

10 minutos. Em seguida os protoplastos foram semeados como no item 3.9.4.

3.9.6. Fusão de protoplastos

A fusão de protoplastos foi realizada utilizando 0,5 ml da suspensão de protoplastos inativados (item 3.9.5) mais 0,5 ml da suspensão de protoplastos da variante AF3079(90/57) contendo aproximadamente $9,8 \times 10^8$ protoplastos/ml. Para fusão foi usado polietileno glicol (PEG) 1000 a 50% (item 3.3.11) de acordo com HOPWOOD et alii (1985a). Após 2 minutos do tratamento com PEG a 30°C foi adicionado 1,0 ml de tampão P (item 3.4.1), a suspensão centrifugada e o sedimento ressuspensão suavemente em tampão P seguido da semeadura em meio R₂YE como no item 3.9.4. Após 10 dias de cultivo a 30°C as colônias regeneradas foram analisadas.

3.9.7. Caracterização dos produtos de fusão

Após a regeneração as colônias foram transferidas para placas com meio ME (item 3.2.1) e os produtos de fusão caracterizados quanto à formação de pigmento e halo de inibição para B. subtilis IA-16 (item 3.6.4).

3.10. Estabilização dos setores

Os setores observados após a fusão de protoplastos foram estabilizados em placas com meio ME (item 3.2.1) por inoculação em quatro pontos.

3.11. Caracterização do fenótipo "pock" dos setores segregantes

A metodologia utilizada seguiu a técnica descrita no item 3.8, sendo analisados os setores segregantes após cruzamento com a linhagem testadora S. lividans TK24.

3.12. Características fisiológicas e morfológicas dos setores segregantes

3.12.1. Linhagens utilizadas

Os setores segregantes Sma, Smb, Smc, Smcd, Smce e as linhagens S. felleus IA-M3079 e AF3079(90/57).

3.12.2. Suspensão de esporos

Cultivos bem esporulados de cada linhagem em tubos com 7 dias foram utilizados para preparar a suspensão

de esporos pela adição de 3,0 ml de água destilada esterilizada.

3.12.3. Características fisiológicas

3.12.3.1. Inóculo lavado para ensaio em fonte de carbono (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

Meio líquido ISP₁ (item 3.2.9) foi inoculado com 0,2 ml de uma suspensão de esporos (item 3.12.2) de cada linhagem e incubado por 48 horas sob agitação de 160-180 rpm a 30°C. Em seguida a massa celular foi centrifugada, agitada com pérolas de vidro e lavada 3 vezes com solução salina. O sedimento foi ressuspensão em 10 ml de solução salina e utilizado para inocular os tubos com diferentes fontes de carbono.

3.12.3.2. Utilização de fontes de carbono (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

Tubos contendo o meio ágar ISP-9 inclinado, com fontes de carbono diferentes (item 3.2.16), foram inoculados com uma gota do inóculo lavado (item 3.12.3.1) e incubados a 30°C, por 16 dias. As leituras foram realizadas no 10º e 16º dia de incubação.

3.12.3.3. Produção de melanina (SHIRLING & GOTTLIEB, 1966)

A produção de pigmentos melanóides foi verificada nos meios ISP-6 (item 3.2.14) e ISP-7 (item 3.2.15). Uma gota da suspensão de esporos (item 3.12.2) foi adicionada aos tubos em duplicata. Após 2 e 4 dias de cultivo a 30°C os tubos com crescimento foram comparados com tubos não inoculados, verificando-se se ocorria a formação de pigmento solúvel marrom a negro.

3.12.3.4. Hidrólise do amido

O estudo desta característica foi realizado com o meio ISP-4 (item 3.2.12). Foi feita uma única estria no centro da placa com suspensão de esporos do item 3.12.2 e após 5 e 10 dias de cultivo a hidrólise foi verificada através do vapor de iodo.

3.12.3.5. Hidrólise da gelatina

Foi utilizado o meio do item 3.2.18, inoculado como no item anterior. Após 5 e 10 dias de cultivo a hidrólise foi verificada utilizando a solução do item 3.3.15.

3.12.3.6. Teste de tolerância ao cloreto de sódio

Foi utilizado o meio do item 3.2.10 e inoculado como no item 3.12.3.3. A leitura foi realizada quanto presença de crescimento das linhagens após 7 e 14 dias de cultivo a 30°C.

3.12.3.7. Exigência nutritiva

Placas contendo meio completo (item 3.2.3) e meio mínimo (item 3.2.2) foram inoculadas pela transferência de esporos de cada linhagem em estudo seguindo-se de incubação por 7 dias a 30°C. Após o período de incubação e não sendo observado crescimento das colônias em meio mínimo, estas foram ensaiadas quanto à auxotrofia pela inoculação de esporos em placas contendo meio mínimo + 0,1 ml de caseína hidrolisada (item 3.3.2), meio mínimo + 0,1 ml de solução de vitaminas (3.3.1) e meio mínimo + 0,1 ml de solução de ácidos nucleicos (item 3.3.3). A observação de crescimento de colônias em uma destas placas sugeria a deficiência nutricional. A especificação da exigência foi realizada por técnica auxonográfica.

3.12.4. Características morfológicas

Placas contendo os meios ISP-2, ISP-3, ISP-4 e ISP-5 (itens 3.2.10, 3.2.11, 3.2.12 e 3.2.13) foram inoculadas com 0,05 ml da suspensão de esporos (item 3.12.2), sendo esta espalhada, com alça de platina, em estrias. As placas foram incubadas a 28°C e após 7, 14 e 21 dias de cultivo, realizadas leituras das cores do micélio aéreo, reverso e pigmento.

A micromorfologia foi observada ao microscópio ótico com aumento de 100x e 400x (Microscópio ótico Carl Zeiss) e classificada de acordo com o grupo morfológico preconizado por PRIDHAM et alii (1958).

3.12.5. Resistência a antibióticos

Para este teste foi utilizado o meio ME (item 3.2.1) em placas contendo concentrações variadas das diferentes soluções de antibióticos (item 3.3.16). A suspensão de esporos (item 3.12.2) foi diluída de modo a conter 10^6 células/ml e inoculada em duplicata na superfície da placa em 7 pontos, utilizando uma micropipeta de 5,0 µl.

3.12.6. Determinação dos padrões eletroforéticos em gel de poliacrilamida (PACCOLA-MEIRELLES et alii, 1988)

As linhagens foram cultivadas como no item 3.6.2. sem acriflavina. A massa celular obtida foi lavada 3 vezes com água destilada em filtro de Buchner a vácuo, retirando-se parte da umidade com papel de filtro. O micélio foi triturado em banho de gelo e homogeneizado em tampão do gel empilhador gelado (item 3.4.6) na proporção de 500 mg de micélio para 1,0 ml de tampão. Em seguida o homogeneizado foi centrifugado em centrífuga refrigerada durante 30 minutos a 18.000 rpm. O sobrenadante foi coletado, uma parte misturada ao tampão da amostra (item 3.4.8) na proporção de 1:1 para aplicação no gel de poliacrilamida e o restante foi conservado a -20°C .

3.12.6.1. Preparo dos géis

O sistema usado foi o de placas verticais de 15 cm de largura, 16 cm de altura e 0,8 mm de espessura. Inicialmente foi vertido o gel separador na placa (item 3.12.6.2); após a polimerização deste gel foi adicionado o gel empilhador (item 3.12.6.3). Antes deste gel sofrer polimerização, o pente foi introduzido com a finalidade de formar as canaletas onde posteriormente foram depositadas

as amostras. Após completa e perfeita polimerização o pente foi retirado e as canaletas do gel lavadas com tampão eletrólito (item 3.4.7). A placa foi colocada na cuba de eletroforese vertical contendo o tampão eletrólito e a seguir as amostras foram aplicadas nas canaletas (50 µl por canaleta). Com auxílio de uma pipeta Pasteur, as canaletas foram completadas com o tampão eletrólito.

A corrida foi conduzida a 4°C, inicialmente a 100 V até a frente atingir o gel separador, em seguida a voltagem foi alterada para 150 V até o final da corrida.

3.12.6.2. Gel separador a 10%

- Tampão do gel separador (item 3.4.5)	3,0	ml
- Solução de acrilamida (item 3.3.5)	10,0	ml
- Persulfato de amônio 10%	0,225	ml
- TEMED	16,80	ml

3.12.6.3. Gel empilhador a 4%

- Tampão do gel empilhador (item 3.4.6)	1,5	ml
- Solução de acrilamida (item 3.3.5)	2,0	ml
- Água desmineralizada	11,4	ml
- Persulfato de amônio 10%	0,112	ml
- TEMED	0,015	ml

3.12.6.4. Revelação das esterases

Após a corrida, o gel foi cuidadosamente retirado da placa e colocado em cuba de plástico contendo 50 ml de solução reveladora (item 3.3.6) onde permaneceu até as bandas aparecerem. Em seguida o gel foi lavado e fixado em solução aquosa de glicerol a 10%.

3.12.6.5. Revelação de proteínas totais

Após a corrida, o gel foi retirado como no item 3.12.6.4 e colocado em cuba de plástico contendo 50 ml do fixador PAGE (item 3.3.7) por uma noite à temperatura ambiente. Em seguida foi usado descorante várias vezes.

3.12.6.6. Plastificação do gel

O gel foi envolvido em papel celofane molhado e, com o auxílio de um bastidor de bordado, foi esticado ao máximo o papel que o continha. As bordas do papel foram coladas no bastidor e vários furos com agulha foram feitos a fim de escoar a água e secar rapidamente o gel. Quando completamente seco foi retirado e arquivado.

3.13. Produção de antibiótico

3.13.1. Linhagens

Setores segregantes: Sma, Smb, Smc, Smcd e Smce.

3.13.2. Inóculo

Suspensões de esporos de cada linhagem foram preparadas como no item 3.5.1.

3.13.3. Fermentação

Os cultivos foram realizados em frascos de Erlenmeyer de 250 ml contendo 50 ml de meio MP (item 3.2.19) e inoculados em triplicatas com 1,0 ml de suspensão de esporos (item 3.5.1) de cada linhagem.

A incubação foi realizada a 30°C sob agitação de 170-180 rpm (Shaker New Brunswick) por 96 horas. A cada 24 horas foi realizado ensaio antimicrobiano como descrito no item 3.6.4.

3.13.4. Extração

O caldo fermentado foi extraído com acetato de etila o qual foi evaporado sob pressão reduzida. O

extrato bruto de acetato de etila foi purificado através de cromatografia em coluna, empacotada com sílica gel e eluída por benzeno, clorofórmio e metanol.

3.13.5. Ensaio antimicrobiano do líquido fermentado

Os testes foram realizados como descrito no item 3.6.4.

3.13.6. Determinação quantitativa no líquido fermentado - Unidade Waksman

O mosto fermentado com 96 horas de cultivo foi filtrado a vácuo em funil de Buchner para separação da massa celular. Em seguida o líquido foi diluído (1:10) em água destilada esterilizada e volumes de 1 ml a 0,01 ml adicionados a placas de Petri esterilizadas. A estas placas foram adicionados de 9,0 ml até 9,99 ml de meio Sabouraud (item 3.2.6) fundido e resfriado a 45°C. Após solidificação, foram realizadas estrias com uma suspensão de crescimento de Candida albicans IBB50 (item 3.5.3). A quantificação da unidade (U/ml) arbitrária de Waksman foi determinada pela inibição das estrias do microrganismo nas diferentes diluições do líquido fermentado.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Tratamento com agente intercalante

O tratamento das linhagens selvagens de S. parvulus IA-M3042 e S. regensis IA-M3053 com acriflavina mostra que ambas respondem igualmente à mesma concentração do agente intercalante. O uso de 5,0 e 6,0 µg/ml de acriflavina (item 3.6) promoveu inibição de crescimento da ordem de 95 e 99%, respectivamente. Contudo, para a linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079, somente com 37,5 e 40,0 µg/ml foram alcançados aqueles níveis de inibição (Tabela 3).

Tabela 3

Ação das diferentes concentrações de acriflavina sobre o crescimento de três linhagens de Streptomyces

Linhagens	Concentração de acriflavina kg/ml						
	2,5	5,0	6,0	7,5	37,5	40,0	Controle
<u>S. parvulus</u> IA-M3042	+++	+	(+)	NT	NT	NT	+++
<u>S. regensis</u> IA-M3059	+++	+	(+)	NT	NT	NT	+++
<u>S. felleus</u> IA-M3079	+++	+++	NT	+++	+	(+)	+++

+++ = 100%

+ = 4 a 5% de crescimento

(+) = 1 a 2% de crescimento

NT = concentração não ensaiada

As colônias derivadas da massa celular obtida do tratamento por acriflavina apresentaram variantes sem o pigmento amarelo-laranja característico das linhagens selvagens produtoras de actinomicina e, além disso, não exibiram halo de inibição para B. subtilis IA-16.

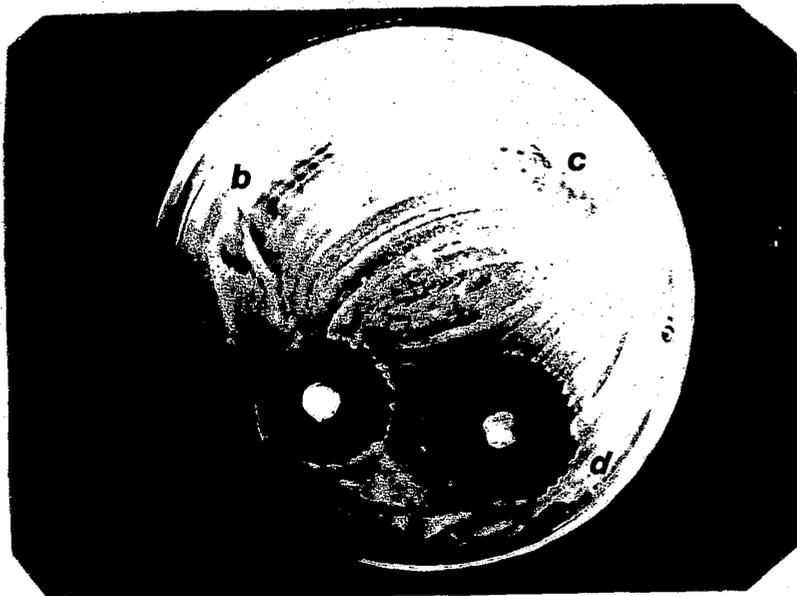


Figura 1. Halo de inibição para B. subtilis IA-16 da linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079 e de suas variantes.

- a) Streptomyces felleus IA-M3079
- b) AF-3079 (90/57)
- c) AF-3079 (84/50)
- d) AF-3079 (196)

A Tabela 4 mostra que entre as espécies ensaiadas, S. felleus IA-M3079 foi a mais instável quanto a produção de actinomicina, apresentando perda espontânea de 3,37% e, após o tratamento, 11,73% das progênes não produziam actinomicina (act⁻). Em S. regensis IA-M3053 e S. parvulus IA-M3042, 5,26% e 6,52%, respectivamente, das variantes eram act⁻, após o tratamento com acriflavina.

Tabela 4

Frequência percentual de ocorrência de progênes não produtoras de actinomicina nas diferentes espécies de Streptomyces, espontaneamente e por tratamento com acriflavina.

Linhagens	Frequência de progênes não produtora de actinomicina	
	Espontânea	Após tratamento com Acriflavina
<u>S. felleus</u> IA-M3079	3,37% 5/148*	11,73% 23/198
<u>S. parvulus</u> IA-M3042	0,0 0/52	6,52% 6/92
<u>S. regensis</u> IA-M3059	1,86% 2/107	5,26% 10/190

* Número de colônias não produtoras/número de colônias ensaiadas

Esta menor frequência percentual de variantes act⁻ em S. regensis IA-M3053 e S. parvulus IA-M3042 (Tabela 4), possivelmente está relacionada com o número de cópias de elementos extracromossômicos, como foi observado por CRAMERI et alii (1986). Estes autores, investigando a eficiência do brometo de etídio como agente eliminador de plasmídio, mostraram que S. lividans piJ61 com baixo número de cópia, apresentou 100% de eliminação deste elemento genético, não sendo observado o mesmo com S. lividans piJ702 com elevado número de cópias de plasmídios.

Alterações nas características fenotípicas de estreptomicetos pelo uso de agentes intercalantes têm sido observadas em vários estudos. Em S. hygrosopicus 358 AV2 a concentração de 0,5 µg/ml de acriflavina promove um crescimento pobre, sendo observado na população que 5% das colônias não produzem o antibiótico carriomicina, nem formam micélio (OGURA et alii, 1986). As observações de SHAW & PIWOWARSKI (1977) com S. bikiniensis ATCC11062, produtor de estreptomicina, mostram que 7,76% das colônias perderam a capacidade de produzir o antibiótico, enquanto 23% deixaram de formar micélio aéreo. Nessas linhagens observa-se que a produção de antibióticos não está relacionada com a formação de micélio aéreo, enquanto nestes experimentos apenas em S. parvulus IA-M3042 foi observado este efeito pleiotrópico.

O tratamento realizado por OCHI & KATZ (1978) em S. parvulus ATCC 12434 e S. antibioticus 3720 com 5,0 µg/ml de acriflavina mostrou que 15,0% e 20,8%, respectivamente, das colônias deixaram de produzir actinomicina, como também não foi observada qualquer relação entre a perda de micélio e a produção do antibiótico. A elevada frequência de colônias não produtoras de actinomicina decorre, possivelmente, das condições de tratamento utilizadas por aqueles autores, os quais submeteram a massa micelial obtida do tratamento com acriflavina a formação e regeneração de protoplastos. Segundo HOPWOOD et alii (1983), AGUILLAR & HOPWOOD (1982) formação e regeneração de protoplastos tem sido atribuída a eliminação de elementos extracromossômicos e alterações fenotípicas.

4.1.1. Características fenotípicas das variantes obtidas após tratamento por acriflavina

As variantes obtidas neste trabalho após tratamento com acriflavina mostram características peculiares quanto à formação do pigmento amarelo e produção de actinomicina.

A análise da Tabela 5 mostra que a perda de micélio aéreo e pigmento amarelo foi observada apenas em S.

S. parvulus IA-M3042, concordando com os resultados de OCHI e KATZ (1978) para S. parvulus ATCC 12432.

Tabela 5

Características fenotípicas das linhagens selvagens e das variantes não produtoras de actinomicina obtidas após o tratamento com acriflavina

Linhagens	Frequência de variantes act ⁻	Micélio	aéreo*	Pigmento	solúvel
		Formação	cor	Formação	cor
<u>S. parvulus</u> IA-M3042			cinza		amarelo
		Presente		Presente	laranja
Variantes	6,52%	Ausente		Ausente	
<u>S. felleus</u> IA-M3079			cinza		amarelo
		Presente	amarelado	Presente	laranja
Variantes	11,73%	Presente	branco	Ausente	
<u>S. regensis</u> IA-M3059			cinza		amarelo
		Presente	escuro	Presente	laranja
Variantes	5,26%				
134(8)		Presente	cinza escuro	Presente	marrom escuro
105(4)		Presente	amarelo claro	Ausente	
53(5)		Presente	cinza claro	Presente	marrom escuro

* Características fenotípicas observadas em meio de esporulação (ME) (item 3.2.1)

act⁻ = variantes não produtoras de actinomicina.

Em S. regensis IA-M3053 as variantes act⁻ mostraram diferentes cores para o micélio aéreo e perderam o pigmento amarelo-laranja, mas apresentaram formação de pigmento marrom-escuro (possivelmente pigmento melanínico) que não foi afetado pelo agente intercalante (Figura 2), fato igualmente observado em S. bikiniensis ATCC 11062 por SHAW & PIWOWARSKI (1977). A linhagem selvagem de S. regensis IA-M3053 se caracteriza como melanina positiva, contudo as variantes de S. felleus IA-M3079 não produtoras de actinomicina (act⁻) mostraram um único tipo morfológico - micélio aéreo branco - bem desenvolvido, sem formação de pigmento solúvel.



Figura 2. Características morfológicas das variantes de S. regensis IA-M3053 não produtoras de actinomicina obtidas após o tratamento com acriflavina:

a) AF-3053 (141/2)

b) AF-3053 (105/4)

c) AF-3053 (53/5)

d) AF-3053 (134/8)

A Tabela 6 mostra que entre as variantes de S. felleus IA-M3079 obtidas após o tratamento com acriflavina, 8,67% apresentaram ausência de micélio aéreo e pigmentação variável. Entre as variantes com formação de pig-

mento amarelo solúvel (79,59% do total) 1,02% apresentaram micélio aéreo amarelo pálido e pigmento solúvel amarelo escuro estável (Act^{++}). Em S. regensis IA-M3053 8,94% das variantes sem micélio aéreo apresentaram pigmento amarelo estável e entre estas variantes, 3,68% apresentaram maior produção de actinomicina (halo de inibição para B. subtilis IA-16 de aproximadamente 27,3 mm).

A variação e a estabilidade de pigmento e de micélio aéreo apresentadas pelas amostras act^{-} (AF-3079 (84/50) e AF-3079(90/57) e act^{++} (AF-3079(128/32) e AF-3079 (99/3) estão expressas na figura 3. Foi observada mudança na morfologia da colônia e na pigmentação das variantes AF-3079(196) e AF-3079(96/63), sendo acompanhada pela perda de resistência a actinomicina. O aumento na instabilidade fenotípica por agentes intercalantes foi inicialmente observado em S. venezuelae e S. alboniger por AKAGAWA et alii (1979) e REDSHAW et alii (1979). Investigações mais recentes sugerem que a instabilidade decorre da presença de genes instáveis no cromossoma de linhagens selvagens, enquanto que a análise de variantes fenotípicas mostra deleções de regiões cromossomais contendo os genes instáveis (USDIN et alii, 1985; SCHREMPF, 1983).

Tabela 6

Frequência percentual das características fenotípicas apresentadas pelas variantes de S. felleus IA-M3079 e S. regensis IA-M3053, obtidas por tratamento com acriflavina

Variantes	Micélio aéreo		Pigmento solúvel			Actinomicina			
	Presente	Ausente	Presente	Variável	Ausente	Act-	Actv	Act+	Act++
<u>S. felleus</u> IA-M3079	91,32%	8,67%	79,59%	8,67%	11,73%	11,73%	8,67%	78,57%	1,02%
	179/196*	17/196	156/196	17/196	23/196	23/196	17/196	154/196	2/196
<u>S. regensis</u> IA-M3053	91,05%	8,94%	94,7%	--	5,26%	5,26%	--	91,05%	3,68%
	173/190	17/190	180/190	--	10/190	10/190	--	173/190	7/190

Act- = ausência de halo de inibição;

Act+ = halo de inibição igual ao da selvagem (26,68mm para S. felleus e 25,5mm para S. regensis IA-M3053;

Act++ = halo de inibição maior que o da selvagem (29,40mm para S. felleus IA-M3079 e 27,3mm para S. regensis IA-M3053;

Actv = halo de inibição de inibição variável;

* Número de colônias variantes/número de colônias ensaiadas.

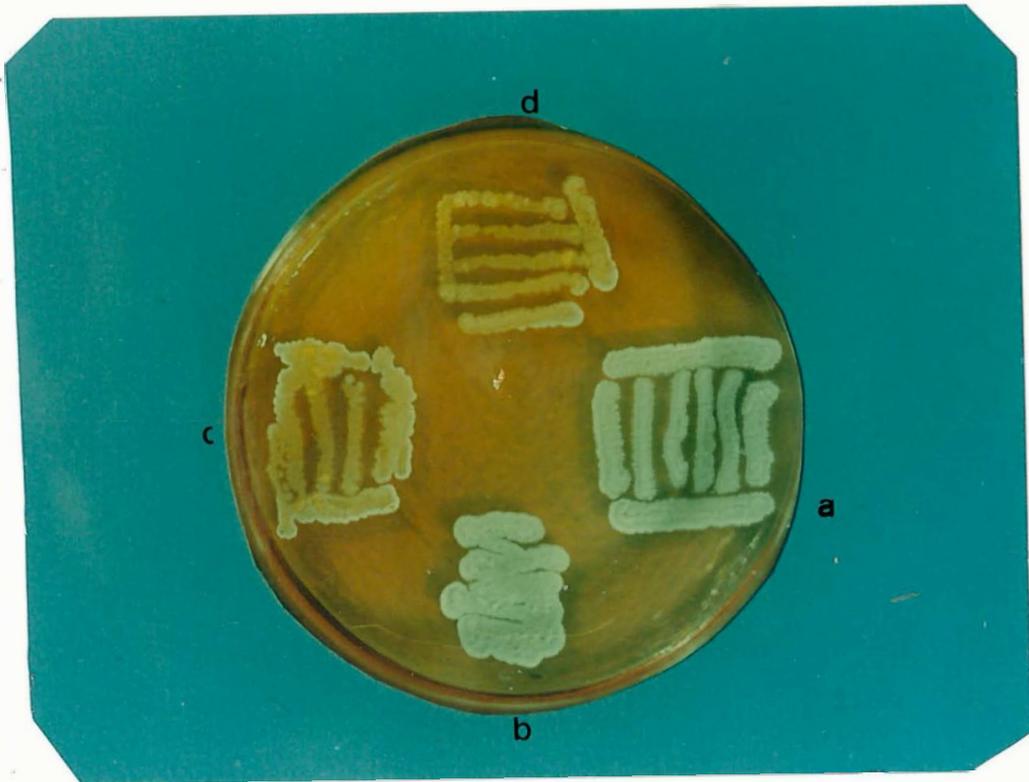


Figura 3. Características fenotípicas (produção de pigmento e micélio aéreo) das variantes de *S. felleus* IA-M3079 obtidas após o tratamento por acriflavina.

- | | | |
|----|------------------|----------------------|
| a) | AF-3079 (84/50) | (Act ⁻) |
| b) | AF-3079 (90/57) | (Act ⁻) |
| c) | AF-3079 (128/32) | (Act ⁺⁺) |
| d) | AF-3079 (99/3) | (Act ⁺⁺) |

Os três tipos morfológicos como visto na Tabela 6 (act^- , act^v e act^{++}) apresentaram características fenotípicas marcantes (Tabela 7).

Tabela 7

Características morfológicas e fisiológicas observadas entre as variantes de *S. felleus* IA-M3079 obtidas após o tratamento com acrivlafina

Variantes de <i>S. felleus</i>	Micélio aéreo	Pigmento solúvel	Produção de actinomicina*	Resistência a actinomicina $\mu\text{g/ml}$	Tipo Nutritivo
IA-M3079					
AF-3079(90/57)	Branco abundante	Ausente	-	150-200	Prototrófica
AF-3079(96/63)	Escasso a ausente	Ausente**	-	>5,0 <1	Auxotrófica***
AF-3079(183)	Amarelo cinzento	Amarelo laranja	+	>600	Prototrófica

* + = produção positiva

- = ausência de produção

** = o pigmento foi perdido após repicagens sucessivas

*** = Auxotrofia para aminoácido

A variante AF-3079(90/57) se apresentou estável em todas as características morfológicas e fisiológicas, mostrando resistência intermediária a actinomicina (150-200 µg/ml). A variante AF-3079(96/63) formou pigmento amarelo-laranja intenso variável e, após algumas transferências, tornou-se apigmentada, não produzindo actinomicina e apresentando elevada sensibilidade a este antibiótico (>5 <15 µg/ml). Esta mutante morfológica apresenta efeito pleiotrópico para a produção de actinomicina e igualmente como em S. coelicolor A3(2), mutantes bald ou Amy⁻ não produzem actinorrodina (MERRICK, 1976). O termo bald ou Amy⁻ é usado para mutantes bloqueadas na formação de micélio aéreo. Várias investigações mostram uma estreita correlação entre diferenciação - especialmente esporulação - e produção de antibióticos. Tem sido sugerido que a perda destas características fenotípicas após tratamento com agente intercalante se deva, ou à presença de plasmídios (OKANISHI, 1979; REDSHAW et alii, 1979) ou, como foi sugerido para a perda da formação de melanina em S. reticuli, rearranjo cromossomal ocasionado por amplificação de DNA (SCHREMPF, 1983; CULLUM et alii, 1986). A variante AF-3079(183) mostrou formação de pigmento amarelo intenso e alta resistência a actinomicina.

Neste trabalho a instabilidade genética observada em S. felleus IA-M3079 após o tratamento com acriflavina pode estar associada a qualquer um destes aspectos, entretanto uma conclusão só será possível após novas investigações genéticas e moleculares. As variantes AF-3079(90/57) e AF-3079(96/63) serão de grande importância na investigação da sequência metabólica para biossíntese de actinomicina em S. felleus IA-M3079 através da determinação da ocorrência das enzimas kinurenina formamidase e fenoxizanona sintetase. Estas são enzimas chaves da via biossintética de actinomicina em S. antibioticus (KATZ, 1967; KATZ & WEISSBACH, 1963).

O estudo comparativo das características fenotípicas da variante AF-3079(183) com o seu parental S. felleus IA-M3079 pode ser observado nas tabelas 8 e 9. A Tabela 8 mostra que a variante AF-3079(183) apresenta elevada estabilidade para a produção de actinomicina (98%). O halo de inibição para B. subtilis IA-16 está em torno de 29mm e 23,63% das colônias da linhagem selvagem mostram halo de inibição similar (Tabela 9).

Tabela 8

Estudo comparativo das características fenotípicas de vários clones da linhagem parental *S. felleus* IA-M3079 e da variante AF-3079(183)

Linhagens	Pigmento amarelo		Micélio aéreo		Prod. de actinomicina			
	Intenso	Ausente	Claro	Presente	Ausente	Act ⁺⁺	Act ⁺	Act ⁻
<i>S. felleus</i>	23,63%	3,64%	72,73%	92,7%	7,27%	23,63%	72,73%	3,64%
IA-M3079	13/55*	2/55	40/55	51/55	4/55	13/55	40/55	2/55
AF-3079(183)	98%	2,0%	0,0	100%	0,0	98%	0,0	2,0%
	49/50	1,50	00/50	50/50	00/50	49/50	00/50	1/50

Act⁺⁺ = halo médio 29,40mm

Act⁺ = halo médio 26,68mm

Act⁻ = sem halo de inibição

* = número de colônias variantes/número de colônias ensaiadas

Tabela 9

Estudo comparativo das características fenotípicas de vários clones da linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079 e da variante AF-3079(183)

Linhagem	Porcentagem de colônias estáveis*	Halo de inibição em (mm)
<u>S. felleus</u> IA-M3079	23,63%	29,40 ± 0,6**
	72,73%	26,68 ± 1,20
	3,64%	0,0
AF-3079(183)	98,0%	28,88 ± 1,03
	2,0%	0,0

* Média de 55 colônias ensaiadas para B. subtilis IA-16

** Desvio padrão

A variação das características fenotípicas na linhagem selvagem foi maior que aquela observada na variante AF-3079(183). Similarmente, RAMOS et alii (1986) trataram S. rimosus QBS produtor de oxitetraciclina com 80 µg/ml de acriflavina e observaram variantes alteradas em sua morfologia, que apresentavam alta produção de

oxitetraciclina associada com aumento na intensidade de pigmento solúvel, não sendo isoladas variantes não produtoras. Estas observações permitiram àqueles autores sugerirem que os genes responsáveis pela regulação da produção de oxitetraciclina foram afetados e não os genes estruturais. Entretanto, a ação de diferentes agentes intercalantes, observada por OCHI & KATZ (1978) em S. parvulus ATCC 12432 e S. antibioticus 3720 Rutgers, mostra variantes não produtoras de actinomicina, sugerindo a possibilidade de alterações em genes estruturais.

A ação de corantes intercalantes ainda é especulativa. A literatura cita inúmeros trabalhos mostrando a eficiência de agentes eliminadores de plasmídios, enquanto outros (HOPWOOD & CHATER, 1984; CHATER & HOPWOOD, 1983) sugerem que mais do que um eliminador de plasmídio, estes agentes podem causar frequentemente rearranjo cromossomal ou extracromossomal.

4.2. Caracterização física de DNA plasmidial em Streptomyces felleus IA-M3079

Através do método modificado de KADO & LIU (1981) indicado no item 3.7.4. foi possível visualizar uma banda eletroforética em S. felleus IA-M3079 que podia ser confundida com DNA cromossomal. Entretanto, extrações das

variantes não produtoras de actinomicina obtidas espontaneamente (E-3079(53c)) e também após tratamento com acriflavina (AF-3079(90/57)) não mostraram qualquer banda eletroforética. Foi observada banda eletroforética correspondente ao plasmídeo piJ702 (5,6 kb) com elevado número de cópias, enquanto que o plasmídeo piJ943 (20,6 kb) com baixo número de cópias não foi detectado (Figura 5).

Estes resultados sugerem que o método pode ser inadequado para plasmídeo de baixo número de cópias e/ou para elementos de alto peso molecular.

As investigações da literatura mostram que o primeiro plasmídeo, SCP₁ de S. coelicolor A3(2), determinado geneticamente por VIVIAN (1971) e responsável pela resistência e produção de metilenomicina A foi durante muito tempo refratário ao isolamento físico. Entretanto, só recentemente, KINASHI et alii (1987) isolaram de S. coelicolor A3(2) um elemento linear de 340 kb, através da eletroforese ortogonal (OFAGE), visto como SCP₁.

Outros plasmídios como SLP₂, SLP₃ e SLP₄ de S. lividans 66, SRP₁ e SRP₂ de S. rimosus são refratários ao isolamento físico (HOPWOOD et alii, 1983; FRIEND et alii, 1978 e RHODES et alii, 1984).

Um paralelo entre os dados da literatura e os obtidos neste trabalho sugere que o determinante genético de S. felleus IA-M3079 faça parte deste elenco de

plasmídios difíceis de serem isolados, possivelmente pelo baixo número de cópias ou, ainda, por ser de alto peso molecular.



Figura 4. Eletroforese de DNA plasmidial obtido pelo método de KADO & LIU (1981) modificado

- a) IA-M3079
- b) piJ943
- c) piJ702
- d) E-3079(53c)
- e) AF-3079(90/57)

Neste trabalho, nas três linhagens em estudo, foram observadas variantes não produtoras de

actinomicina, o que sugere a possibilidade do envolvimento de elementos extracromossômicos. Contudo, estudos genético-moleculares poderão posteriormente trazer maiores esclarecimentos, uma vez que corantes intercalantes podem causar mutação.

4.3. Caracterização do fenótipo "pock" após cruzamento com S. lividans TK24

Em decorrência da elevada instabilidade observada na formação de pigmento amarelo-laranja ligada à produção de actinomicina e pela não caracterização física de elementos extracromossômicos em S. felleus IA-M3079, foi investigada a presença de plasmídio conjugativo através da formação de zigose letal também designada de fenótipo "pock".

Os cruzamentos com a linhagem testadora (S. lividans TK24) e a visualização do fenótipo "pock" foram realizados como descrito no item 3.8.

O plasmídio conjugativo piJ303 utilizado como controle positivo mostra a reação zigose letal (indicada por flexa) como zonas claras de inibição designada Ltz⁺ por KIESER et alii (1982) (Figura 5).

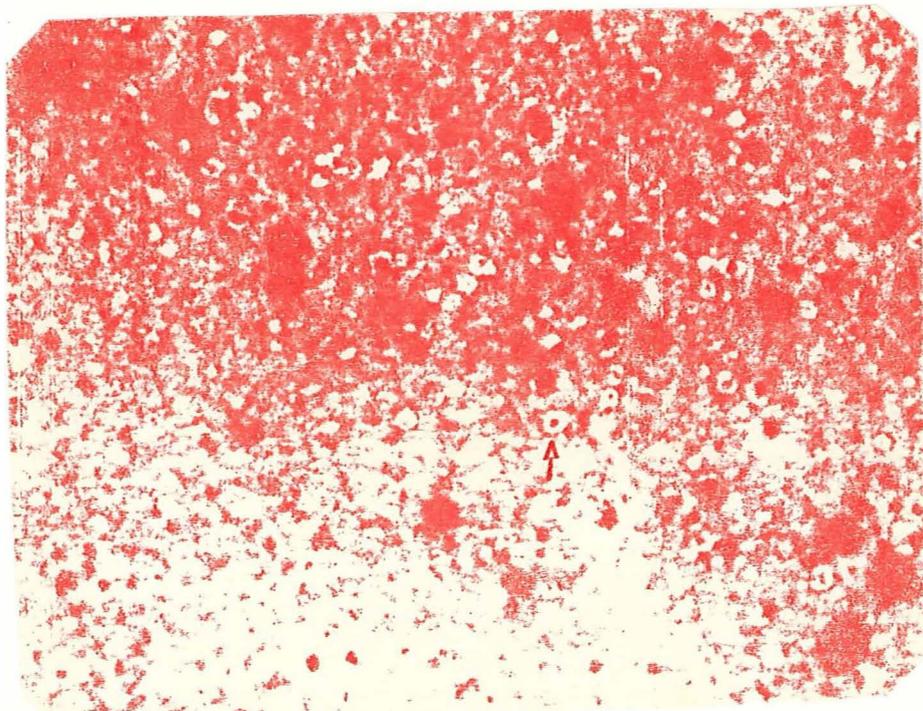


Figura 5. Fenótipo "pock" produzido pelo plasmídio piJ303 em um "background" de S. lividans TK24 livre de plasmídio (aumento 40x).

Em S. felleus IA-M3079 foram observados diferentes tipos de zigose letal (Figura 7). O tipo A com grande zona clara de inibição se apresenta diferente da reação Ltz^+ de piJ303, porém similar ao fenótipo dos plasmídios pSCy3 e pSCy5 de S. noursei B3 (KOJIMA et alii, 1985), enquanto o tipo B mostra zona de inibição pequena, turva ou opaca, se assemelhando reação $Ltz +/-$ do plasmídio

variante piJ224 (KIESER et alii, 1982) e o fenótipo do plasmídio pSCy6 de S. noursei P251 (KOJIMA et alii, 1985).

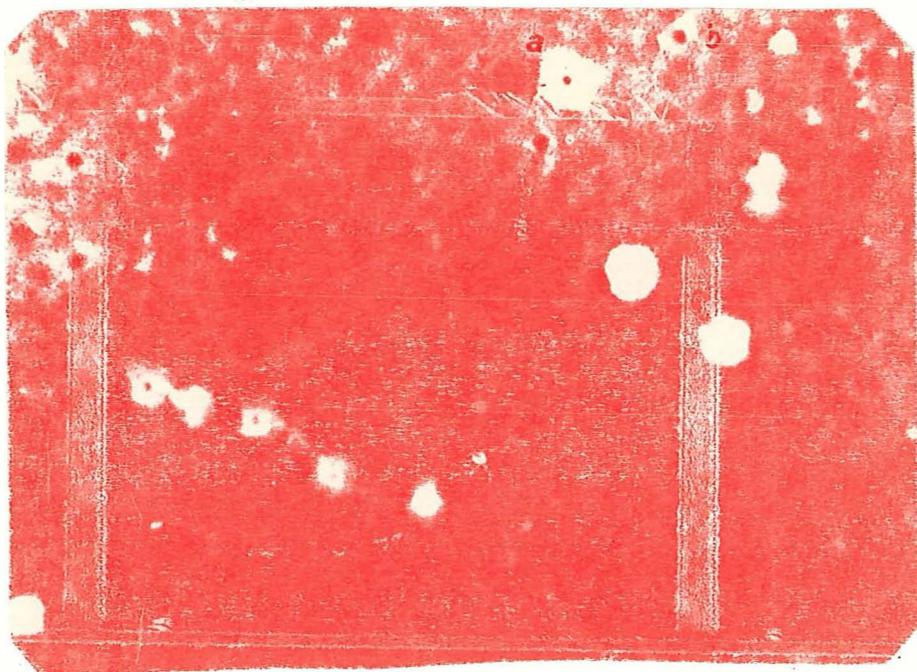


Figura 6. Fenótipo "pock" produzido pelo plasmídio de S. felleus IA-M3079 em um "background" de S. lividans TK24 livre de plasmídio (aumento 15x).

SHINDOH et alii (1984) observaram em S. roseochromogenes S264 por transformação e formação do fenótipo "pock" a presença de dois plasmídios pSCR1a e pSCRb com pesos moleculares diferentes. Em S. lividans 66 (HOPWOOD et alii, 1983) os plasmídios SLP₂ e SLP₄; em S. rimosus Pfizer SRP1 (FRIEND et alii, 1978) e SRP₂ (RHODES

et alii, 1984) em S. erythreus SEP₁ (DE WITT, 1985) são detectáveis somente através do fenótipo "pock". Estas investigações demonstram que a ocorrência do fenótipo "pock" tem facilitado a determinação de mais de um plasmídeo em Streptomyces, através de diferentes tipos morfológicos de "pock". KIESER et alii (1982), procurando determinar a provável região que determina o fenótipo Ltz + em piJ101, observaram "in vitro" que variantes desse plasmídeo com fenótipo reduzido, Ltz +/- estavam associadas a uma série de inserções de uma região específica de piJ101. Segundo estes autores esta região é responsável pela função de espalhamento intramicelial envolvendo a migração de cópias de plasmídios e não a transferência intermicelial.

As linhagens de S. parvulus IA-M3042 e S. regensis IA-M3053 que apresentaram instabilidade fenotípica após o tratamento com acriflavina foram ensaiadas quanto à presença do fenótipo "pock" (Figuras 8 e 9). Em S. parvulus IA-M3042 foi observado fenótipo "pock" similar ao tipo de piJ303, enquanto que em S. regensis IA-M3053 as colônias "pock" mostram características intermediárias de zigose letal (Ltz +/-). Estas linhagens posteriormente serão investigadas em maior detalhe.

Houve uma tentativa de isolar e purificar a colônia "pock" tipo A de S. felleus IA-M3079, visando

caracterizar fisicamente o determinante extracromossômico, sem êxito, entretanto.

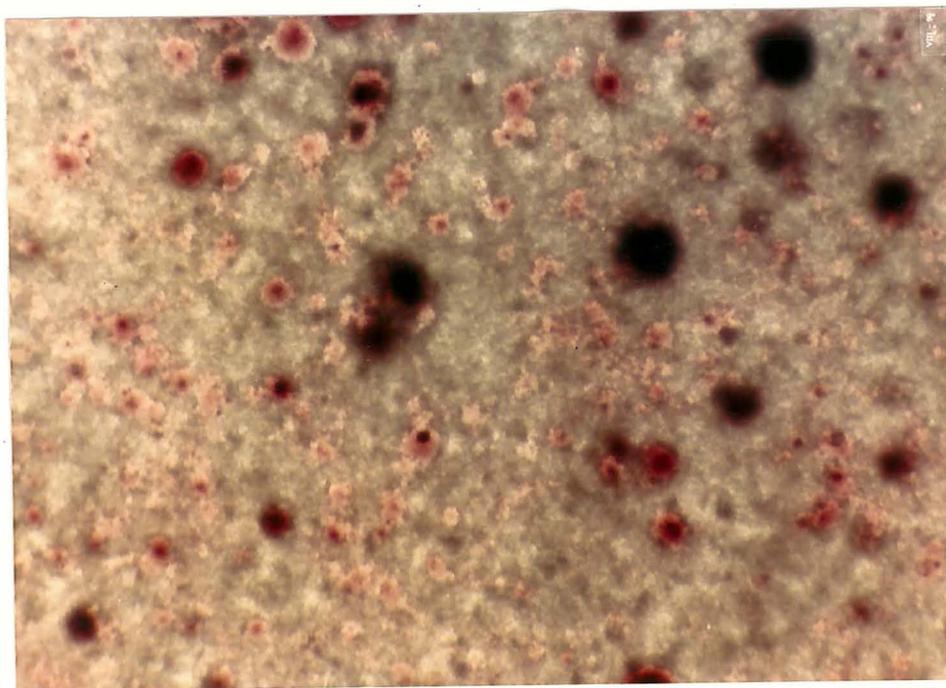


Figura 7. Fenótipo "pock" produzido pelo plasmídio de S. regensis IA-M3053 sobre um "background" de S. lividans TK24 livre de plasmídio (aumento 15x).

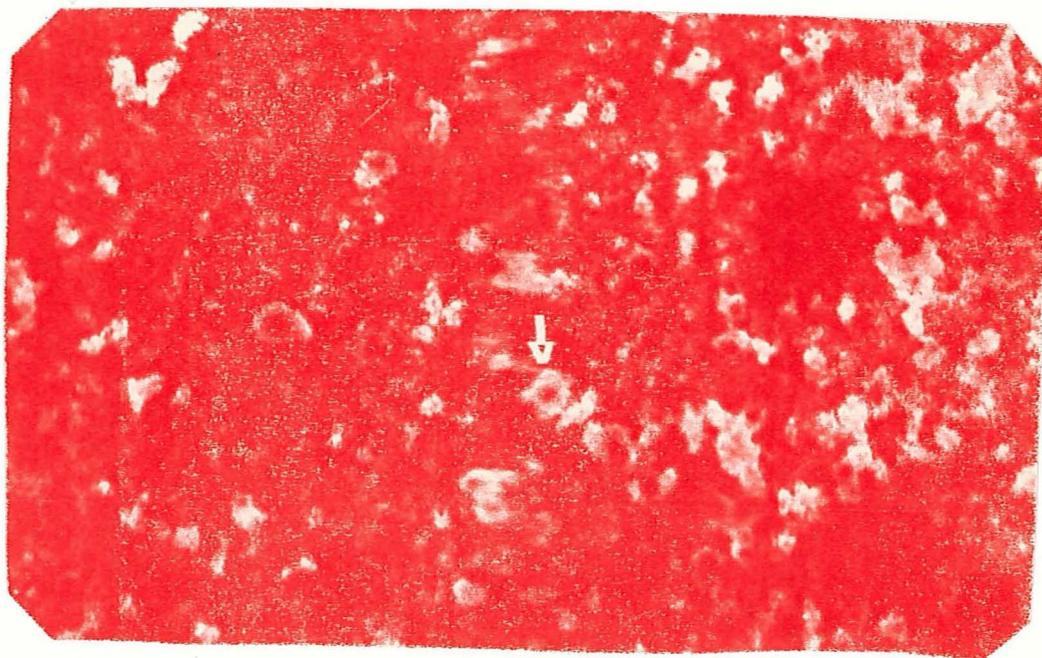


Figura 8. Fenótipo "pock" produzido pelo plasmídio de S. parvulus IA-M3042 sobre um "background" de S. lividans TK24 livre de plasmídio (aumento 25x).

Neste trabalho, a formação de dois tipos de fenótipo "pock" em S. felleus IA-M3079 indica provavelmente a presença de dois elementos extracromossômicos que poderão estar relacionados com a instabilidade fenotípica dessa linhagem, enquanto que S. parvulus IA-M3042 e S. regensis IA-M3053 apresentam um único tipo de fenótipo.

Os cruzamentos entre AF-3079(90/57), E-3079(53c) e S. lividans TK24 não mostraram fenótipo "pock", sugerindo que a perda da produção de actinomicina possa estar relacionada a este fator sexual. Entretanto, conclusão definitiva somente após análise genética detalhada entre linhagens geneticamente marcadas para verificar a localização de genes biossintéticos. Investigações realizadas por HAESE & KELLER (1988) determinaram que genes para produção de actinomicina em S. chrysomallus estão no cromossoma, enquanto OCHI (1982) sugere o envolvimento de plasmídios na produção de actinomicina em S. parvulus ATCC 12434.

A observação do fenótipo "pock" pode não significar presença de plasmídio autônomo nas linhagens em estudo, uma vez que plasmídios podem se originar pela formação de alças a partir de sequências cromossomais da linhagem testadora, como observado para os plasmídios piJ110 de S. parvulus e piJ408 de S. glaucescens após cruzamento com S. lividans (HOPWOOD et alii, 1984).

4.4. Fusão de protoplastos

Pelos estudos realizados neste trabalho, foi verificado que a formação de pigmento amarelo e a produção de actinomicina nas linhagens em estudo são características fenotípicas instáveis que, após tratamento com acriflavina, foram acentuadas.

Visando determinar se estas características fenotípicas são transferidas em alta frequência, foi realizada fusão de protoplastos intraespecífica com S. felleus IA-M3079, em decorrência da obtenção de mutantes morfológicos nesta linhagem.

A variante AF3079(90/57), por ser estável e não produzir pigmento, foi usada como receptora, enquanto que a linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079 produtora de pigmento amarelo foi inativada pelo calor e utilizada como doadora.

4.4.1. Formação e regeneração de protoplastos de linhagens para a fusão

Foram obtidos protoplastos de S. felleus IA-M3079 produtora de actinomicina (act^+) e da variante AF-3079(90/57) não produtora de actinomicina (act^-). As frequências de regeneração das duas linhagens estão expressadas na Tabela 10.

Tabela 10

Formação e frequência de regeneração dos protoplastos das
linhagens de S. felleus IA-M3079 e AF-3079(90/57)

Linhagem	Número de protoplastos*/ml	Frequência de regeneração (%)
<u>S. felleus</u> IA-M3079	12,2 x 10 ⁸	18,5
AF-3079(90/57)	9,8 x 10 ⁸	15,9

* Média de dois experimentos

A frequência de regeneração de protoplastos obtidos neste trabalho (18,5 e 15,9%) pode ser atribuída à concentração de glicina usada (0,6%). Esta concentração permitiu a obtenção de microcolônias com formação de protoplastos dentro de 20 a 30 minutos e células não protoplastizadas na ordem de 0,6 a 0,8% em ambas as linhagens.

OKANISHI et alii (1974) cultivaram S. griseus ISP 5236 e S. venezuelae ISP 5230 em meio líquido S com 0,8% e 2,0% de glicina, respectivamente, e após tratamento com lisozima e enzima lítica nº 2 por 1 a 2

horas obtiveram suspensão de protoplastos contendo de 15×10^8 a 17×10^8 protoplastos/ml e regeneração de 41% e 51%. OGAWA et alii (1983), utilizando o meio S16 com 0,3% de glicina, cultivaram S. hygrosopicus ATCC 21705 por 20-24 horas e realizaram tratamento combinado com lisozima mais acromopeptidase e observaram frequência de regeneração em torno de 15%. BALTZ (1978), além da adição de glicina ao meio de germinação para cultivo de S. fradiae e S. griseofuscus, utilizou como inóculo fragmentos de micélio tratado por ultrassom e observou boa formação de protoplastos no fim da fase exponencial de crescimento, enquanto era evidente um declínio na regeneração quando os protoplastos eram obtidos na fase estacionária. Adicionalmente, HOOLEY & WELLINGTON (1985), cultivando sete diferentes isolados de S. hygrosopicus em meio líquido complexo por sete dias e tratamento com lisozima (1-2 horas), obtiveram suspensão de protoplastos em torno de 10^6 a 10^8 /ml, enquanto a frequência de regeneração ficou abaixo de 5% para cinco isolados e, em torno de 28% e 15%, para os demais. ARAUJO et alii (1984/85) cultivaram S. melanochromogenes IA-M3183 em meio S (OKANISHI et alii, 1974) com 0,5% de glicina e S. capoamus IA-M3122 em meio líquido complexo com 0,3% de glicina por 18 e 24 horas, respectivamente, e após tratamento com lisozima (30-40 minutos) obtiveram suspensão contendo em torno de 10^8

protoplastos/ml. SHIRAHAMA et alii (1981), procurando estabelecer melhores condições para regeneração de protoplastos de S. kanamyceticus AT-533 e S. humidus ISP 5263, observaram regeneração em torno de 30% e 10%, respectivamente.

Ficou muito difícil estabelecer comparações entre aqueles trabalhos e este, uma vez que as condições para formação e regeneração de protoplastos são específicas para cada linhagem, como foi constatado pelo trabalho de HOOLEY & WELLINGTON (1985) com diferentes isolados de S. hygrosopicus.

Pela análise destes trabalhos, fica clara a importância da formação de microcolônias na fase exponencial de crescimento, que facilita a ação da lisozima e as células encontram-se em estado fisiológico ativo, promovendo, conseqüentemente, uma eficiente regeneração.

4.4.2. Processo de fusão de protoplastos

Neste trabalho, após regeneração da mistura de fusão, 175 clones foram isolados e analisados quanto à formação de pigmento e halo de inibição para B. subtilis IA-16, como descrito no item 3.9.7.

Os resultados apresentados na tabela 11 mostram a ocorrência de 0,57% de produto de fusão. A transferência de pigmento amarelo não foi observada entre

os clones analisados, como era esperado. Entretanto, foi isolada uma colônia com maior diâmetro, que produziu pigmento azul-violáceo e halo de inibição para B. subtilis IA-16. Após subculturas, esta colônia deixou de apresentar halo de inibição.

Tabela 11

Colônias isoladas após fusão de protoplastos e ensaiadas quanto à formação de pigmento e halo de inibição para Bacillus subtilis IA-16

Fusão de Protoplastos	Número de Colônias			
	Isoladas	Produtoras de pigmento solúvel	Com halo de inibição	Frequência de produto de fusão
IA-M3079 x AF3079 (90/57)	175	1	1	0,57%

Tabela 12

Características fenotípicas dos clones obtidos após fusão de protoplastos

Clones %	Micélio aéreo	Formação de pigmento solúvel	Diâmetro das colônias (mm)	Halo de inibição para <u>B. subtilis</u> (em mm)
99,4	Branco	Ausente	3 a 5	Ausente
0,6	Cinza	Azul violáceo	8,0	12-18

Pela análise da literatura, depreende-se que a frequência de produto de fusão está diretamente relacionada à concentração de PEG utilizada, sendo esta concentração independente do peso molecular.

A fusão com S. coelicolor A3(2) usando PEG 15% a 42% (peso/volume) adicionado de DMSO (dimetil sulfóxido) rendeu 5% a 6% de recombinantes prototróficos, como foi relatado por HOPWOOD et alii (1977). Posteriormente, HOPWOOD & WRIGHT (1979) comprovaram que PEG 1000 a 50% sem DMSO promove recombinação superior a 20% em S. coelicolor, enquanto PEG 6000 tem originado baixa frequência de recombinação (BALTZ, 1978; BALTZ & MATSUSHIMA, 1981; HRANUELI, 1983), possivelmente pela sua alta viscosidade, como sugerido por HOPWOOD (1981).

Segundo HOPWOOD et alii (1985b) em torno de 50% é uma ótima concentração para a fusão em Streptomyces, sendo verificada baixa frequência de fusão em concentrações abaixo de 40% e acima de 60%. Afirmam, ainda, aqueles autores, que o PEG 6000 mostra desvantagem por sua alta viscosidade e dificuldade em sua eliminação após o tratamento de fusão, o que é prejudicial, pois o PEG é tóxico.

A perda de caracteres apresentada pelo clone azul-violáceo não é ímpar na literatura. HOTA et alii (1985) trabalhando com fusão de protoplastos

interespecífica de mutantes não produtores de antibióticos aminoglicosídicos - *S. griseus* (EST^R) e *S. tenimariensis* (KM^R) - mostraram que o clone SK52-52(EST^R KM^R) produzia um novo antibiótico, entretanto após algumas transferências ocorria segregação de colônias grandes, as quais progressivamente deixavam de produzir o antibiótico. Contudo o clone SK52-52(EST^R KM^R) permanecia com a mesma resistência a estreptomicina e a kanamicina induzida pela fusão de protoplastos, mostrando-se instável para a produção do novo antibiótico, possivelmente devido a pouca homologia entre as espécies.

HOPWOOD et alii (1977) e HOPWOOD & WRIGHT (1978) afirmam que a regeneração pós-fusão de protoplastos em condições não seletivas, ainda que com linhagem auxotrófica, aumenta o número de eventos de fusão e proporciona maior frequência de recombinação. Isso decorre de múltiplas permutas, ocasionadas pela união de genomas completos em uma mesma unidade celular, seguidas de fragmentação e perda de segmentos de um ou ambos os genomas, resultantes de um estado diplóide transitório.

4.5. Estabilização dos setores

O clone heterocariótico que mostrava halo de inibição para B. subtilis IA-16 foi semeado em quatro pontos em placas com meio de esporulação (ME) e, até cinco dias de cultivo, as colônias apresentavam formação de pigmento azul-violáceo (Figura 9).

Após 14 dias de cultivo, as colônias resultantes da semeadura em quatro pontos, Pf₁, Pf₂, Pf₃ e Pf₄, segregaram vários setores (Figura 10), os quais foram estabilizados através de semeadura em meio ME e designados de acordo com o fenótipo (Tabela 13).

A análise dos clones estabilizados está contida na Tabela 14 e mostra que o setor Smb é o mais frequente, uma vez que entre 24 colônias de Pf₃ analisadas, 16 (66%) mostraram este setor.

A segregação de setores observada neste trabalho possivelmente resulta do estado diplóide transitório observado por HOPWOOD (1981) em fusão de protoplastos de mutantes auxotróficos de S. coelicolor A3(2).

Estado heterocariótico foi observado por OCHI (1982) após fusão de protoplastos intraespecífica com linhagens auxotróficas de S. antibioticus 3720. A regeneração em meio mínimo revelou colônias pequenas que segregavam um dos genótipos parentais, enquanto as colônias

grandes heterocarióticas eram prototróficas. Similarmente, HRANUELI et alii (1983) verificaram fenômeno igual em fusão de protoplastos de S. rimosus ATCC 10970.

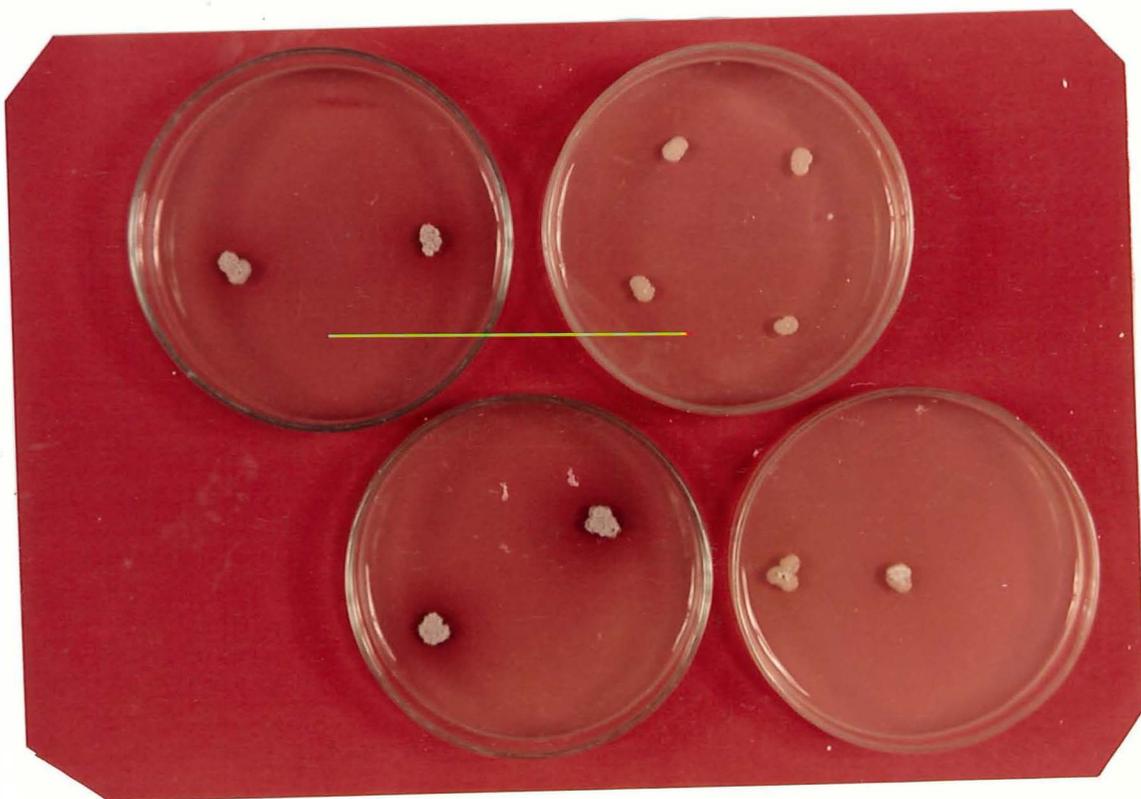


Figura 9. Colônias isoladas a partir do clone recombinante obtido da fusão de protoplastos entre a linhagem selvagem de S. felleus IA- M3079 e a variante AF-3079(90/57)



Figura 10. Clones isolados do produto de fusão apresentando formação de vários setores (14 dias de cultivo)

Tabela 13

Características morfológicas dos setores segregantes obtidos da fusão de protoplastos de *S. felleus* IA-M3079 x AF-3079 (90/57)

Setores Segregantes	Características morfológicas
Sma	Micélio aéreo amarelo acinzentado e reverso amarelo amarronzado, sem formação de pigmento solúvel.
Smb	Micélio aéreo marrom-amarelado e reverso marrom escuro enegrecido. Pigmento solúvel azul-violáceo é observado até 5 dias de cultivo.
Smc	Micélio aéreo cinza-creme e reverso marrom sem pigmento solúvel.
Smcd	Micélio aéreo cinza e reverso marrom escuro, sem formação de pigmento solúvel.
Smce	Micélio aéreo cinza-esverdeado, reverso marrom-negro.

Tabela 14

Frequência de setores recombinantes da fusão de S. felleus

IA-M3079 x AF3079 (90/57) após 14 dias de cultivo em meio ME

Setores	T I P O S				
	Sma	Smb	Smc	Smcd	Smce
Prod. fusão					
PF ₁	-	33%	-	-	50%
		4/12*	-	-	6/12*
PF ₂	33%	-	33%	-	-
	8/24	-	8/24	-	-
PF ₃	-	66%	33%	33%	-
	-	16/24*	8/24	8/24	-
PF ₄	33%	25%	-	-	-
	4/12	3/12	-	-	-

* Número de colônias ensaiadas/número de colônias observadas

4.6. Caracterização dos setores segregantes

4.6.1. Análise dos segregantes quanto a formação fenótipo "pock"

Uma vez que a linhagem selvagem de S. felleus IA-M3079 mostra a ocorrência de dois elementos

conjugativos, caracterizados neste trabalho através da morfologia "pock", tornou-se necessário verificar se os setores segregantes obtidos pela fusão de protoplastos são portadores de algum plasmídio conjugativo.

Todos os setores mostraram o mesmo tipo morfológico do fenótipo "pock" (Figura 11), não sendo evidenciado "pock" com grandes zonas de inibição como o observado em S. felleus IA-M3079 (Figura 6).

Estes resultados possivelmente mostram a transferência de um dos plasmídios conjugativos de S. felleus IA-M3079, produtor de actinomicina, para o mutante AF-3079(90/57), não produtor de actinomicina, através da fusão de protoplastos; entretanto não foi observada elevada transferência de pigmento amarelo-laranja.

Pode acontecer que estas características fenotópicas não estejam relacionadas com elemento extracromossômico ou, ainda, este elemento pode conter apenas genes reguladores da produção de actinomicina.

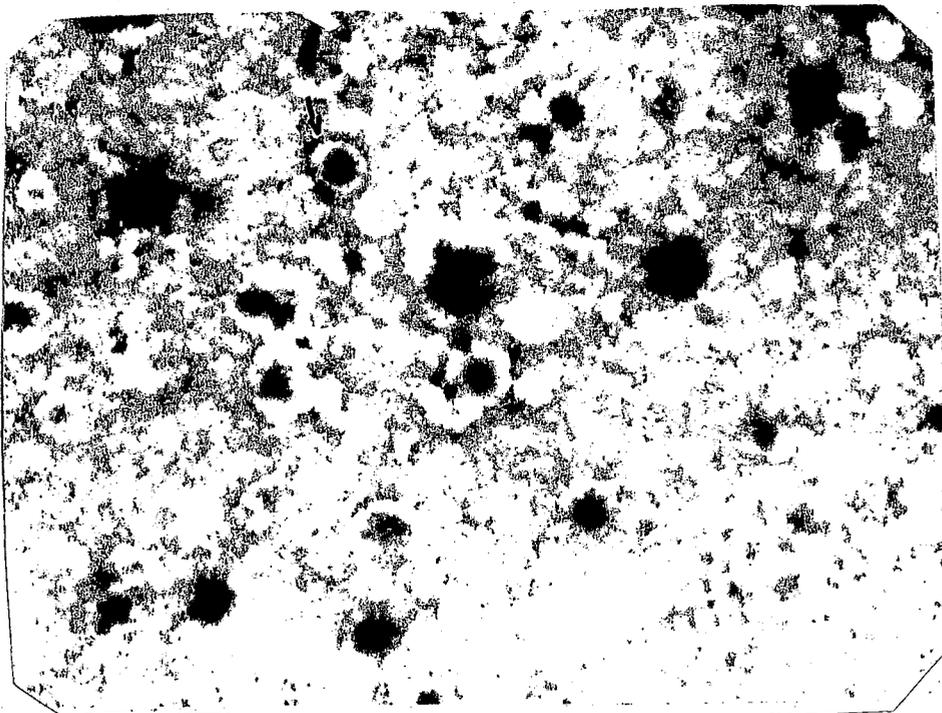


Figura 11. Fenótipo "pock" do setor recombinante Smc em um "background" de S. lividans TK24 livre de plasmídios (aumento 40x)

O mecanismo de produção e de regulação de actinomicina ainda não é completamente entendido. Em S. antibioticus e S. parvulus tem sido sugerido o envolvimento de plasmídios na biossíntese da actinomicina, enquanto que em S. chrysomallus ATCC 11523 estudos realizados por HAESE

& KELLER (1988) revelam que genes biossintéticos de actinomicina estão localizados no cromossomo.

Neste trabalho, a obtenção de setores segregantes que não produzem actinomicina decorre possivelmente da inativação de genes estruturais ou genes reguladores localizados sobre plasmídio e, quando transferidos, ativam genes cromossomais para produção de outro pigmento - o azul-violáceo - e não o pigmento amarelo relacionado com actinomicina. Segundo HOPWOOD (1981c), a transferência de plasmídios nativos contendo genes reguladores para um novo hospedeiro poderá levar expressão de novas vias biossintéticas.

4.6.2. Análises dos setores segregantes quanto às características fisiológicas e morfológicas

Em decorrência dos setores segregantes obtidos da fusão de protoplastos apresentarem formação de pigmento distinto daquele do parental - S. felleus IA-M3079 - foram analisadas as características fisiológicas e morfológicas destes setores, visando determinar similaridades ou diferenças entre os mesmos.

Streptomyces felleus (Lindenbein) foi descrito inicialmente em 1952 por Lindenbein e redescrito por SHIRLING & GOTTLIEB (1968a) através do "International

"Streptomyces Project" e, de acordo com a cor do micélio aéreo, esta linhagem pertence à Série Amarela.

A linhagem IA-M3079, utilizada neste trabalho foi isolada de amostras de solo da cidade do Recife e classificada como S. felleus (FALCÃO DE MORAIS¹).

A observação da Tabela 15 mostra que manitol e ramnose são utilizados por S. felleus IA-M3079, enquanto a sua variante AF-3079(90/57) não utiliza estes açúcares, não sendo detectadas diferenças para os outros açúcares nestas linhagens. Para os setores recombinantes, manitol é utilizado como fonte de carbono, o que não ocorre em ramnose. Estes resultados mostram que os recombinantes adquiriram a propriedade de assimilação de manitol do parental "doador" S. felleus IA-M3079.

Outras propriedades bioquímicas ensaiadas, como hidrólise da gelatina e do amido, mostraram comportamentos iguais para todas as linhagens, do mesmo modo que pigmentos melanóides não foram formados em meios padronizados (Tabela 16).

1 FALCÃO DE MORAIS, J. O. (Departamento de Antibióticos - UFPE, Recife - PE) Comunicação pessoal, 1980.

Tabela 15

Utilização de fontes de carbono nas linhagens parentais de *S. felleus* IA-M3079 e M3079 (90/57) e dos setores segregantes obtidos por fusão de protoplastos

LINHAGENS	A Ç U C A R E S									
	Controle Negativo	Gli- cose	Xilo- se	Fru- tose	Arabi- nose	Saca- rose	Inosi- tol	Rafi- nose	Mani- tol	Ram- nose
<u><i>S. felleus</i></u>										
IA-M3079	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+
AF-3079(90/57)	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
Sma	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Smb	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Smc	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Smcd	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-
Smce	-	+	+	+	+	-	-	-	+	-

+ = Crescimento igual ao controle positivo (glicose).

- = Não houve crescimento ou apenas igual ao controle negativo sem qualquer fonte de carbono.

Tabela 16

Propriedades bioquímicas das linhagens parentais de S. felleus
 IA-M3079 x 3079(90/57) e dos setores segregantes obtidos
 por fusão de protoplastos

LINHAGENS	CARACTERISTICAS BIOQUIMICAS		PRODUÇÃO DE MELANINA	
	Gelatinase	Amilase	Meio ISP-6	Meio ISP-7
<u>S. felleus</u>				
IA-M3079	+	+	-	-
AF-3079(90/57)	+	+	-	-
Sma	+	+	-	-
Smb	+	+	-	-
Smc	+	+	-	-
Smcd	+	+	-	-
Smce	+	+	-	-

+ = degradação enzimática

- = não produtora de pigmento melanínico

A tolerância a cloreto de sódio observada na Tabela 17 mostra que na concentração de 10% não ocorre crescimento das linhagens parentais, enquanto que os

setores recombinantes crescem fracamente nesta concentração, possivelmente em decorrência de alterações na permeabilidade da membrana.

As propriedades fisiológicas dos setores também mostram estreita similaridade com aquelas dos seus parentais S. felleus IA-M3079 e AF3079(90/57). Adicionalmente, não foi observada qualquer diferença marcante entre estas linhagens. Investigação similar foi realizada por HOTTA et alii (1985) na caracterização do clone SK2-52 obtido por fusão de protoplastos interespecífica entre S. griseus (Str^R) e S. tenjimariensis (KM^R). As propriedades morfológicas e bioquímicas de SK2-52 eram similares às do S. griseus (Str^R). Do mesmo modo, as resistências à estreptomicina e a outros aminoglicosídeos se originaram, segundo aqueles autores, da linhagem de S. griseus (EST^R).

Estas observações corroboram as decorrentes deste trabalho, onde foi constatado, pelas características bioquímicas dos setores segregantes, elevado grau de similaridade com os parentais.

Tabela 17

Tolerância a cloreto de sódio apresentada pelas linhagens parentais

S. felleus IA-M3079 x AF3079 (90/57) e dos setores segregantes

obtidos por fusão de protoplastos

LINHAGENS	CONCENTRAÇÃO DE NaCl (g%)				
	0,0	4,0	7,0	10,0	13,0
<u>S. felleus</u>					
IA-M3079	++	++	++	-	-
AF-3079(90/57)	++	++	++	-	-
Sma	++	++	++	+	-
Smb	++	++	++	+	-
Smc	++	++	++	+	-
Smcd	++	++	++	+	-
Smce	++	++	++	+	-

++ = Bom crescimento

+ = Crescimento regular

- = Sem crescimento

Com o objetivo de verificar se a fusão de protoplastos intraespecífica em S. felleus IA-M3079

originou a formação de novos genótipos, foram realizados testes auxotróficos com os setores segregantes. Os parentais são prototróficos, enquanto os setores exibiram auxotrofia para adenina. Estes resultados comprovam que a recombinação por fusão de protoplastos permitiu aumentar a variedade genética nesta linhagem sem a utilização de agentes mutagênicos (Tabela 18).

Tabela 18

Auxonografia dos parentais *S. felleus* IA-M3079 x AF-3079(90/57) e dos setores segregantes, obtidos por fusão de protoplastos

LINHAGENS	EXIGENCIA NUTRICIONAL
<i>S. felleus</i> IA-M3079	Prototrófica
AF-3079(90/57)	Prototrófica
Sna	Adenina
Snb	Adenina
Snc	Adenina
Sncd	Adenina
Snce	Adenina

Isto só foi possível utilizando a inativação de um dos parentais (doador morto) no processo de fusão, permitindo seleção de recombinantes. Segundo BALTZ (1978), não é aconselhável a indução de mutantes em linhagem de interesse econômico, em decorrência da acumulação de mutações crípticas que mostram efeito pleiotrópico negativo sobre a produção de antibióticos, além de mascarar o efeito benéfico das novas combinações de genes (QUEENER & BALTZ, 1979; NORMANSELL, 1982).

Estudo comparativo das características morfológicas de S. felleus IA-M3079, da variante AF-3079(90/57) e dos setores segregantes Sma e Smcd está contido na Tabela 19.

Através destes estudos pode ser observado que as nuances de coloração do micélio aéreo dos setores (amarelo-cinza) estão próximas da cor da massa micelial da linhagem parental (amarelo-cinza pálido). A cor do reverso dos setores segregantes no meio ISP-5 apresenta uma tonalidade amarelo-ferruginosa mais intensa que a observada nos parentais.

A observação micromorfológica de S. felleus IA-M3079 mostra cadeias de esporos da Secção Rectiflexibiles (RF) (PRIDHAM et alii, 1958), igualmente como a variante e os setores recombinantes, que apresentam esporóforos com 10 a 30 esporos.

Tabela 19

Característica morfológica dos parentais e dos setores segregantes Sna e Sncd obtidos por fusão de protoplastos.

MEIOS DE CULTURA	CARACTERÍSTICA*	L I R R A G E N S			
		IA-M3079 S.felleus	Variante AF 3079(90/57)	Sna	Sncd
ISP-2 Extrato de levedura- ágar	Crescimento	Bom	Bom	Bom	Bom
	Micélio aéreo	Abundante	Abundante	Fraco	Fraco
	reverso	Amarelo/Cinza (2ba 1 1/2db)	Branco a creme (2 ba)	Amar.-cinz-cr. (2ba 1ba)	Cr.cinza/amar. (1ba-1 1/2db)
	pigm. solúvel	Amar. amarronz. (Co3b)	Amar.cinz.esv. (Co3b)	Amar.esverd. (Co3b Co3s)	Amarelo-narroz
		Amarelo claro	Ausente	Amarelo claro	Amarelo claro
ISP-3 Aveia-ágar	Crescimento	Bom	Bom	Bom	Bom
	Micélio aéreo	Amar.cinz.esv. (1 1/2db)	Amar.cinz.esv. (1.cb)	Amar.cinz.esv. (1ba-a 1/2 db)	Amar.cinz.pál. (2db-1ba)
	Reverso	Amar.esverd. (Co3b)	Creme pálido (Co a)	Amarelo claro (Co a)	Amar.amarronz. (Co a)
	Pigm. solúvel	Amarelo linão (Co3b)	Ausente	Amarelo claro	Creme
ISP-4 Amido-sais inorgânicos- ágar	Crescimento	Bom	Bom	Bom	Bom
	Micélio aéreo	Amar. pálido (2db-2ba)	Amar.esverd. (2ab-2ba)	Amar.esverd. (1cb/2db)	Amar.esverd. (2db-1cb)
	Reverso	Amarelo claro (Co a)	Creme (Co a)	Amar. narroz (Coor)	Amarelo narroz (Coos)
	Pigm. solúvel	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
ISP-5 Glicerol- asparagina- ágar	Crescimento	Bom	Bom	Bom	Regular
	Micélio aéreo	Amar. esverd. (1cb)	Cinz.esbranq. (1ba)	Amar.cinz.palh (2ba-2fb)	Amar.cinz.palha (2ba-1 1/2db)
	Reverso	Cr-amarelado (Co5b)	Branco	Amar.ferrug. (Ocr)	Amar.ferrug.
	Pigm. solúvel				

* Classificação das cores de acordo com o Método adotado pelo ISP (item 3.5.4).

A microscopia eletrônica de transmissão da superfície dos esporos foi realizada no Laboratório de

Imunopatologia Prof. Keizo Asami (UFPE) e mostrou superfície lisa para as linhagens parentais e para os setores segregantes (Figura 12).

Estas propriedades morfológicas são consistentes com aquelas observadas em S. felleus IA-M3079 e em AF3079(90/57).

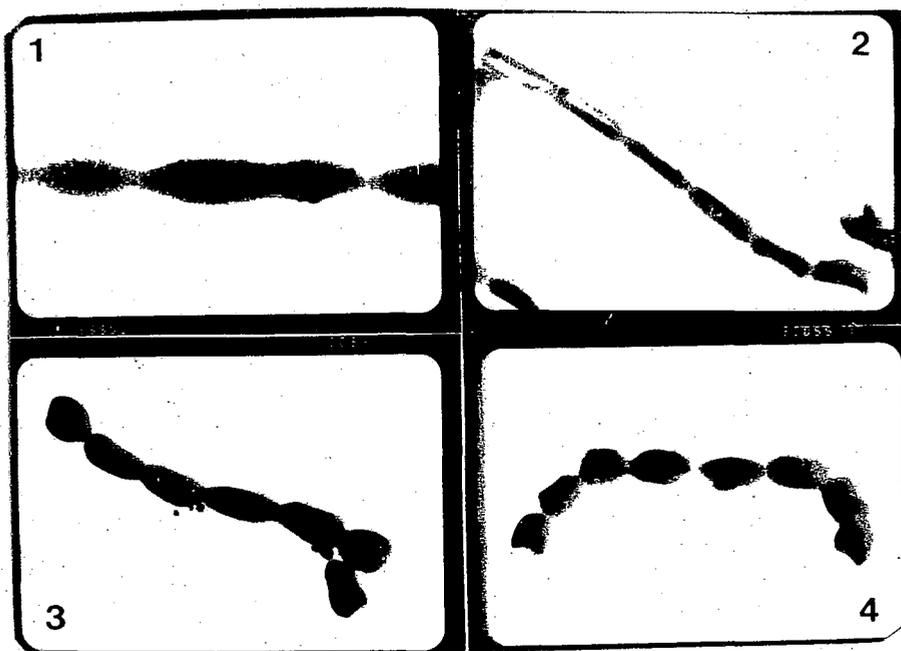


Figura 12. Microscopia eletrônica de transmissão da superfície dos esporos das linhagens parentais e dos setores recombinantes: 1 = S. felleus IA-M3079; 2 = AF3079(90/57); 3 = Sma; 4 = Smc

4.6.3. Teste de resistência a antibióticos

Os níveis de resistência aos diferentes antibióticos apresentados na Tabela 20 mostram que os setores recombinantes são altamente sensíveis a actinomicina (<5 >1 µg/ml), enquanto S. felleus IA-M3079, produtor deste antibiótico, apresenta elevada resistência (>400 µg/ml) e a variante AF-3079(90/57) possui uma resistência intermediária (>150 <200 µg/ml). Para rifamicina foi observada maior resistência dos recombinantes (<50 >10 µg/ml), enquanto os parentais mostraram alta sensibilidade, sendo que a variante AF-3079(90/57) foi mais sensível que o parental selvagem S. felleus IA-M3079.

A elevada resistência observada em S. felleus IA-M3079 para actinomicina demonstra que esta linhagem é produtora desse antibiótico, enquanto que a resistência à penicilina e à anfotericina mostra a potencialidade desta linhagem para a produção de outros antibióticos, como foi demonstrado por YAMASHITA et alii (1985) para linhagens de actinomicetos produtores de antibióticos aminoglicosídicos. Segundo aqueles autores, os actinomicetos possuem um padrão individual de resistência a antibióticos, sendo que linhagens com múltipla resistência apresentam potencialidades para produção de outros antibióticos.

Tabela 20

Determinação de resistência a diferentes antibióticos pelas linhagens parentais

S. felleus IA-M3079 x AF-3079(90/57) e dos recombinantes da fusão de protoplastos

LINHAGENS	A N T I B I O T I C O S (g/ml)							
	Gem.*	Tet.	Str.	Rif.	Eri.	Anf.	Pen.	Act.
IA-M3079	>1<5	<1	>1<5	>1<5	>50<100	>100	>100	>400
AF-3079 (90/57)	>1<5	<1	>1<5	<1	>50<10	>100	>100	<200>150
Sma	<1	<1	<1	<50>10	<50>10	>100	>100	<5>1
Smb	<1	<1	<1	<50>10	<50>10	>100	>100	<5>1
Smc	<1	<1	<1	<50>10	<50>10	>100	>100	<5>1
Smcd	<1	<1	<1	<50>10	<50>10	>100	>100	<5>1
Smce	<1	<1	<1	<50>10	<50>10	>100	>100	<5>1

Gem. = Gentamicina

Tet. = Tetraciclina

Str. = Estreptomicina

Rif. = Rifampicina

Eri. = Eritromicina

Anf. = Anfotericina

Pen. = Penicilina

Act. = Actinomicina

Corroborando estes argumentos, a biologia molecular tem demonstrado através de clonagens que genes biossintéticos, regulatórios e de resistência estão organizados em um conjunto (cluster), como foi visto para: estreptomicina, bialofos, eritromicina e actinorrodina (OHNUKI et alii, 1985; DISTLER et alii, 1987; TOYAMA et alii, 1987; MURAKAMI et alii, 1986; STANZAK et alii, 1986; MALPARTIDA & HOPWOOD, 1984 e 1986).

Neste trabalho, os setores segregantes obtidos da fusão de protoplastos apresentam elevada sensibilidade à actinomicina, entretanto continuam com o mesmo padrão de resistência à penicilina e à anfotericina que os parentais.

4.6.4. Comportamento eletroforético

Embora o comportamento eletroforético do padrão de bandas proteicas ainda não tenha sido utilizado como uma técnica auxiliar para detectar similaridades e diferenças entre espécies de Streptomyces, esta técnica já foi usada com êxito para a classificação e identificação de Zymomonas (KERSTERS & DE LEY, 1975), bem como de Verticillium e Fusarium (WHITNEY et alii, 1968). No presente trabalho foram comparados os padrões de bandas de proteínas para melhor caracterizar os recombinantes.

Segundo PACCOLA-MEIRELLES (1988), a caracterização eletroforética é um instrumento indispensável em programas de melhoramento, uma vez que possibilita verificar diferenças entre isolados morfológicamente semelhantes com muita facilidade.

As Figuras 13 e 14 mostram o padrão eletroforético para esterases e proteínas totais dos parentais - S. felleus IA-M3079, AF-M3079(90/57) e dos setores segregantes.

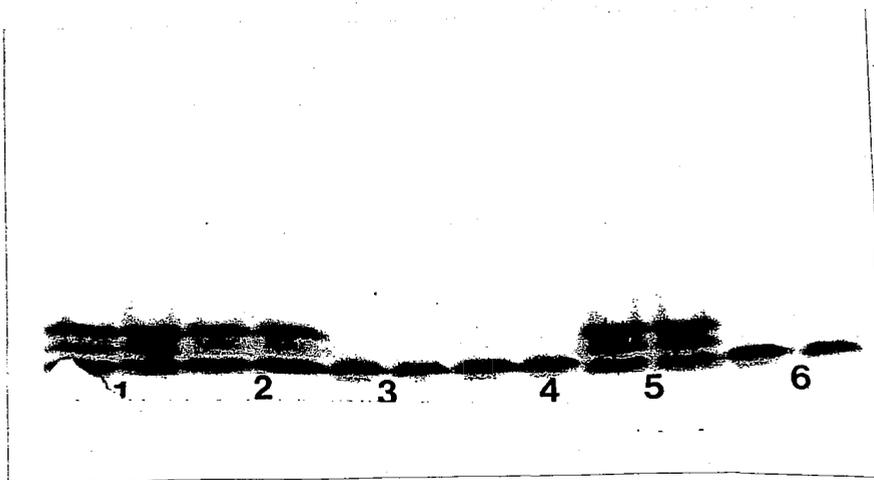


Figura 13. Padrão eletroforético para esterases dos parentais S. felleus IA-M3079 x AF-3079(90/57) e dos setores segregantes Sma, Smb e Smc em gel de poliacrilamida

- 1) S. felleus IA-M3079
- 2) S. felleus AF-3079(90/57)
- 3) Sma
- 4) Smb
- 5) S. felleus AF-3079(84/50)
- 6) Smc

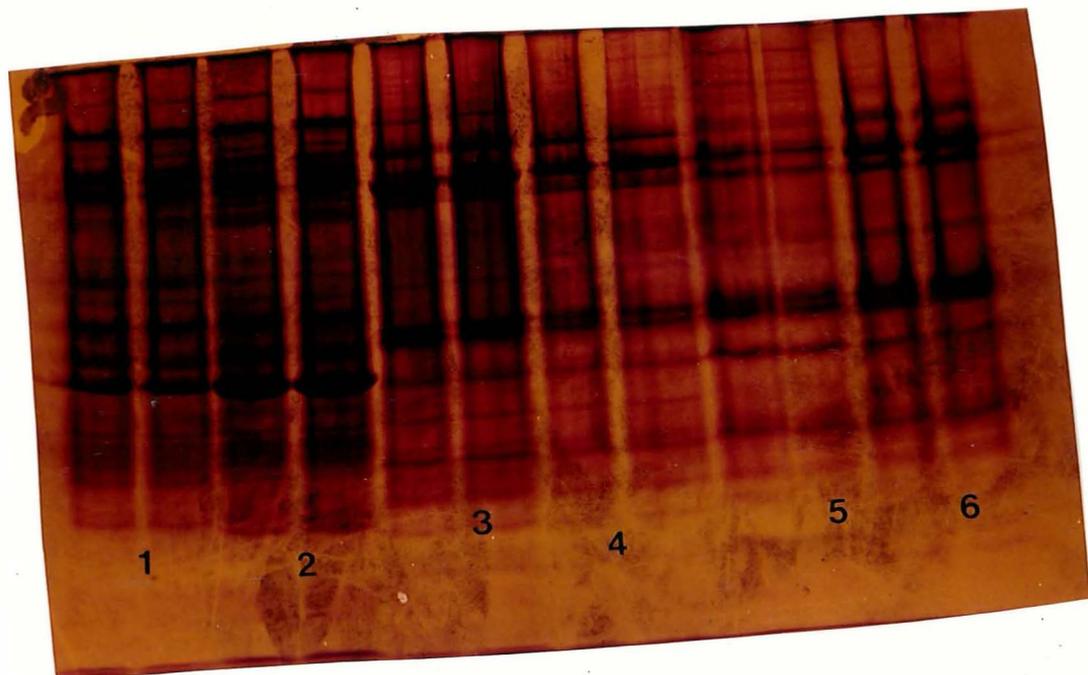


Figura 14. Padrão eletroforético em gel de poliacrilamida para proteínas totais dos parentais S. felleus IA-M3079 x AF-3079(90/57) e dos setores segregantes

- 1) S. felleus IA-M3079
- 2) S. felleus AF-3079(90/57)
- 3) Sma
- 4) Smb
- 5) Smc
- 6) Smcd

A análise do perfil eletroforético para esterases dos parentais mostra a perda de uma banda muito fraca no parental AF3079(90/57) que corresponde à banda com

R_f 0,94 de S. felleus IA-M3079. As bandas mais densas com R_f 0,8 e 0,86 são comuns nas duas linhagens. Os setores segregantes apresentam apenas as bandas de R_f 0,99 e 0,98 similares ao observado em S. felleus IA-3079, indicando ter adquirido estas características do parental "doador".

O padrão eletroforético de proteínas totais dos setores segregantes é muito similar ao observado nos parentais. Apenas a banda com R_f em torno de 0,45 nos parentais não é vista nos setores segregantes e duas bandas muito densas com R_f 0,65 nos parentais se apresentam nos setores com menor mobilidade eletroforética. Apesar destas pequenas diferenças, estes padrões eletroforéticos mostram estreita similaridade dos setores segregantes com os parentais.

4.7. Análise dos setores segregantes quanto à produção de antibióticos

Em razão da formação de outro pigmento que não o pigmento amarelo do parental ("doador") S. felleus IA-M3079, da presença de um elemento conjugativo e, ainda, da variação genética observada na análise da exigência nutritiva, surge a perspectiva de que esta nova linhagem possa estar associada à produção de um outro antibiótico.

Com base nestas observações, os setores segregantes foram inicialmente ensaiados para diferentes grupos de microrganismos, como descrito no item 3.6.4. O teste preliminar em bloco de gelose de todos os setores mostrou halo de inibição apenas para Candida albicans IBB50.

Na Tabela 21 estão contidos os halos de inibição dos líquidos fermentados com 96 horas de cultivo que corresponde ao pico máximo de atividade antagonista nos diferentes grupos de microrganismos. A análise desta Tabela mostra que os setores Smc e Smcd apresentam halo de inibição de 12,5 e 19,5 mm, respectivamente, para B. subtilis, bem inferior que o halo mostrado pelo parental S. felleus IA-M3079.

Tabela 21

Testes antimicrobianos dos líquidos fermentados pelos setores segregantes
cultivados por 96 horas em meio de produção de antibióticos

MICROORGANISMO- TESTE	L I N H A G E N S						
	Sma	Smb	Smc	Smcd	Smce	IA-M3079	AF-3079(90/57)
	(Halo de inibição em mm)						
<u>S. aureus</u> W	-	-	-	-	-	15,0	-
<u>B. subtilis</u> IZ	-	-	12,5	19,5	-	29,0	-
<u>E. coli</u> N	-	-	-	-	-	-	-
<u>C. albicans</u> IBB50	20,0	25,0	20,0	20,0	20,0	-	-
<u>N. crassa</u>	24,0	30,0	25,0	26,0	28,0	-	-
<u>Myc. smegmatis</u>	-	-	-	-	-	-	-

Obs.: Média de três repetições

Nas Figuras 15 e 16 são mostrados os halos de inibição dos setores e dos parentais para Neurospora crassa e Candida albicans IBB50.

Estes resultados indicam que a fusão de protoplastos entre S. felleus IA-M3079 (inativo), produtor de actinomicina, e AF-3079(90/57) (viável), não produtor de actinomicina, promoveu a formação de setores recombinantes com capacidade para a produção de um antifúngico.

Similarmente, OGURA et alii (1986) observaram que a variante EB-32 de S. hygrosopicus 358AV2, produtor de carriomicina, passou a produzir um outro antibiótico após o tratamento com brometo de etídio. A variante ED32 produziu curromicina A e B, com estrutura química diferente de carriomicina, sugerindo aqueles autores que agente intercalante pode induzir o aparecimento de sequências repetidas de DNA, que influencia a produção de antibióticos pela ativação de genes silenciosos. A ativação de "genes silenciosos" foi demonstrada por JONES & HOPWOOD (1984), através da clonagem molecular de plasmídeo recombinante contendo gene estrutural da fenoxazinona sintetase (PHS 1,8 e PHS 4,3) de S. antibioticus, produtor de actinomicina. A transformação de S. lividans TK24 (não produtor da actinomicinas) pelos plasmídios recombinantes PHS 1,8 e PHS 4,3 resultou em clones com elevada atividade fenoxazinona sintetase, demonstrando, assim, que estes

plasmídios interagem com o DNA de S. lividans, ativando genes normalmente silenciosos nesta linhagem. Segundo aqueles autores, o mecanismo de ativação do gene ainda não é conhecido, entretanto uma explicação seria que aqueles plasmídios recombinantes funcionam como um operador, o qual se liga ao repressor responsável pelo "gene silencioso" da fenoxazinona sintetase em S. lividans.

Os resultados obtidos neste trabalho encontram apoio nestes argumentos da literatura quando se recorda que o mutante AF3079(90/57), não produtor de actinomicina, foi obtido pelo tratamento com acriflavina, que pode induzir perda de plasmídio e/ou mutação.

A fusão de protoplastos com a linhagem selvagem produtora de actinomicina, provavelmente possibilitou a recombinação entre genes estruturais e regulatórios, passando a expressar uma via biossintética reprimida.

Com base na análise das características bioquímicas dos setores em que a utilização de manitol originou-se do parental "doador" (IA-M3079), associada à perda da produção de actinomicina, à sensibilidade a este antibiótico e, ainda, em decorrência da exigência nutricional para adenina, todos estes dados oferecem evidências da variação genética obtida pela recombinação cromossomal. O surgimento de variantes genéticas com

habilidade para produção de outro antibiótico, possivelmente decorre, como enfatiza HOPWOOD (1981a), da inativação de genes regulatórios e expressão de vias biossintéticas normalmente reprimidas ocasionando o surgimento de outros antibióticos pela revelação de produtos de "genes silenciosos".



Figura 15. Halo de inibição do líquido fermentado com 96 horas de cultivo dos setores Sma, Smb e Smcd e dos parentais para Neurospora crassa: P₁: S. felleus; P₂: AF-3079(90/57); 1: Sma; 2: Smb; 3: Smc



Figura 16. Halo de inibição do líquido fermentado com 96 horas de cultivo dos setores Sma, Smb e Smcd e dos parentais para Candida albicans: P₁: S. felleus; P₂: AF-3079(90/57); 1: Sma; 2: Smb; 3: Smc

4.7.1. Caracterização do antifúngico

O antifúngico produzido pelo setor Sma no caldo fermentado apresentava atividade para C. albicans IBB50 de 10.000 U/ml.

O extrato de acetato de etila foi purificado em coluna cromatográfica e das seis frações recolhidas, apenas três apresentaram halo de inibição em torno de 20 mm para C. albicans IBB50. Uma fração, de cor amarela palha solúvel em metanol, foi caracterizada através do espectro ultravioleta como não pertencente ao grupo dos antibióticos poliênicos e, através da determinação da concentração mínima inibitória (CMI), foi verificada elevada atividade antimicrobiana de 0,05 a 0,1 mcg/ml para C. albicans IBB50.

Esta atividade antifúngica apresentada pelos setores recombinantes possivelmente revela a recombinação entre genes estruturais e regulatórios.

5. CONCLUSÕES

Os resultados obtidos neste trabalho permitem as seguintes conclusões:

1. Streptomyces felleus IA-M3079, Streptomyces regensis IA-M3053 e Streptomyces parvulus IA-M3042 apresentaram grande instabilidade fenotípica após o tratamento com a acriflavina como agente intercalante.
2. A acriflavina alterou a produção de actinomicina e a formação de pigmento amarelo nas linhagens estudadas.
3. As variantes não produtoras de actinomicina (act^-) de Streptomyces felleus IA-M3079 e de Streptomyces regensis IA-M3053 mostraram-se estáveis na formação de micélio aéreo e ausência de pigmento solúvel.
4. Foi observada a presença de plasmídios conjugativos por fenótipo "pock" em Streptomyces felleus IA-M3079, Streptomyces regensis IA-M3053 e Streptomyces parvulus IA-M3042 e também nos setores recombinantes, após cruzamento com Streptomyces lividans TK24.

5. Os setores recombinantes obtidos por fusão de protoplas-
tos intraespecífica do Streptomyces felleus IA-M3079
act⁺ e suas variantes act⁻ não mostraram transferência
de pigmento amarelo ou produção de actinomicina.

6. Estes setores recombinantes, assim obtidos, apresentaram
ação antimicrobiana para Candida albicans IBB50 e
exigência nutricional para adenina.

7. O antifúngico produzido por estes setores recombinantes
não pertence ao grupo dos antibióticos poliênicos, uma
vez que apresenta apenas dois picos máximos no espectro
ultravioleta, 222 e 323 mμ.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, A. & HOPWOOD, D.A. Determination of methylenomycin A synthesis by the pSVI plasmid from Streptomyces violaceus-ruber SANK 95570. Journal of General Microbiology, London, 128: 1893-1901, 1982.

AKAGAWA, H.; OKANISHI, M.; UMEZAWA, H. Genetic and biochemical studies of chloramphenicol-non-producing mutants of Streptomyces venezuelae carrying plasmid. Journal of Antibiotics, Tokyo, 32: 610-620, 1979.

→ ANTONOV, P.P.; IVANOV, J.G.; MARKOV, G.G. Heterogeneity of Streptomyces DNA. FEBS Letters, 79: 151-4, 1977.

ANZAI, H.; MURAKAMI, T.; IMAI, S.; SATOH, A.; NAGAOKA, K.; THOMPSON, C. J. Transcriptional regulation of bialophos biosynthesis in Streptomyces hygrosopicus. Journal of Bacteriology, Baltimore, 169: 3482-3488, 1987.

ARAUJO, J.M.; RAMALHO DE MELLO, B.; FALCÃO DE MORAIS, J.O.; SILVA, E.C.; MORAIS E SOUZA, M.A.; KURYLOWICZ, W. Fusão de protoplastos de Streptomyces capoamus, visando a obtenção de cepas produtoras de antibióticos "híbridos". Revista do Instituto de Antibióticos, Recife, 22(1/2): 53-64, 1984/85.

ASTOLFI, FILHO, S.; ZAHA, A.; FERREIRA, H.B.; MARCELINO, L.H. Introdução tecnologia do DNA recombinante. 2º Curso de Fundamentos de Biotecnologia, ESALQ/USP, Piracicaba-SP. 1986. 30p.

AZEVEDO, J.L. & COSTA, S.O.P. Exercícios Práticos de Genética, Ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, EDUSP, 1973. 288p.

BALTZ, R.H. Genetic recombination in Streptomyces fradiae by protoplast fusion and cell regeneration. Journal of General Microbiology, London, 107: 93-102, 1978.

BALTZ, R.H. Genetic recombination by protoplast fusion in Streptomyces. Developments in Industrial Microbiology, 21: 43-54, 1980.

BALTZ, R.H. Genetic and biochemistry of tylosin production: A model for genetic engineering in antibiotic-producing Streptomyces. In HOLLAENDER, A.; DEMOSS, R.D.; KAPLAN, S.; KONISKI, J.; SAVAGE, D. WOLFE, R.S. ed. Genetic Engineering of Microorganisms for Chemicals, London, Plenum Press, 1982. p.431-444.

BALTZ, R.H. Mutation in Streptomyces. In: QUEENER, S.W. & DAY, L.E. ed. Antibiotic producing Streptomyces, London, Academic Press, 1986. p.61-94.

BALTZ, R.H. & MATSUSHIMA, P. Protoplast fusion in Streptomyces: conditions for efficient genetic recombination and cell regeneration. Journal of General Microbiology, London, 127: 137-146, 1981.

BECKER, B.; LECHEVALIER, M.P.; GORDON, R.E.; LECHEVALIER, H.A. Rapid differentiation between Nocardia and Streptomyces by paper chromatography of whole-cell hydrolysates. Applied Microbiology, Baltimore, 12: 421-423, 1964.

BENIGNI, R.; ANTONOV, P.P.; CARERE, A. Estimate of the genome size by renaturation studies in Streptomyces. Applied Microbiology, Baltimore, 30: 324-326, 1975.

BIBB, M.J. Genetic and physical studies of a Streptomyces coelicolor plasmid. PhD Thesis: University of East Anglia, Norwich, 1978.

BIBB, M.J. & HOPWOOD, D.A. Genetic studies of the fertility plasmid and its SCP2* variants in S. coelicolor A3(2). Journal of General Microbiology, London, 126: 427-42, 1981.

BIBB, M.J.; PREMAN, R.F.; HOPWOOD, D.A. Physical and genetical characterization of a second sex-factor. SCP2, for Streptomyces coelicolor A3(2). Molecular & General Genetics, Berlin, 154: 155-156, 1977.

BIBB, M.J.; SCHOTTEL, J.L.; COHEN, S.N. A DNA cloning system for interspecies gene transfer in antibiotic-producing Streptomyces. Nature, London, 284: 526-531, 1980.

BIBB, M.J.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. Transformation of plasmid DNA into streptomycetes at high frequency. Nature, London, 274: 398-400, 1978.

BIBB, M.J.; WARD, J.M.; KIESER, T.; COHEN, S.N.; HOPWOOD, D.A. Excision of chromosomal DNA sequences from Streptomyces coelicolor forms a novel family of plasmid detectable in Streptomyces lividans. Molecular & General Genetics, Berlin, 184: 230-240, 1981a.

BUCHANAN, R.E. Studies on the nomenclature and classification of the bacteria; II. The primary subdivision of the Schizomycetes. Journal of Bacteriology, Baltimore, 2: 155-64, 1917.

CHANG, S. & COHEN, S.N. High-frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA. Molecular & General Genetics, Berlin, 168: 111-115, 1979.

CHATER, K.F. & BRUTON, C.J. Resistance, regulatory and production genes for the antibiotic methylenomycin are clustered. EMBO Journal, Oxford 4: 1893-1898, 1985.

CHATER, K.F. & HOPWOOD, D.A. Streptomyces genetics. In: GOODFELLOW, M.; MODARSKI, M. & WILLIAMS, S.T., ed. The Biology of the Actinomycetes. London, Academic Press, 1983. p.229-286.

COX, K.L.; FISHMAN, S.E.; LARSON, J.L.; STANZAR, R.; REYNOLDS, P.A.; YEH, W.K.; VAN FRANK, R.M.; BIRMINGHAM, V.S.; HERSHBERGER, C.L.; SENO, E.T. The use of recombinant DNA techniques to study tylosin biosynthesis and resistance in Streptomyces fradiae. Natural Products (Lloydia), 49: 971-980, 1986.

CRAMERI, R.; DAVIES, J.E.; H TTER, R. Plasmid curing and generation of mutations induced with ethidium bromide in streptomycetes. Journal of General Microbiology, London, 132: 819-824, 1986.

CULLUM, J.; ALTENBUCHNER, J.; FLETT, F.; PIENDL, W. DNA amplification and genetic instability in Streptomyces. Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 4: 59-78, 1986.

DANIEL, D. & TIRABY, G. A survey of plasmids among natural isolates of Streptomyces. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 36(2): 181-183, 1983.

DAUM, S.J. & LEMKE, J.R. Mutational biosynthesis of new antibiotics. Annual Review Microbiological, Baltimore, 33: 241-265, 1979.

DIETZ, A. Structure and taxonomy of Streptomyces. In: QUEENER, S.W. & DAY, L.E., ed. Antibiotic-producing Streptomyces. London, Academic Press, 1986. p. 1-25.

DISTLER, J.; BRAUN, C.; EBERT, A.; PIEPERSBERG, W. Gene cluster for streptomycin biosynthesis in Streptomyces griseus. Analysis of essential regions including the major resistance gene. Molecular General Genetics, Berlin, 208: 204-210, 1987.

DYSON, P. & SCHREMPF, H. Genetic instability and DNA amplification in Streptomyces lividans 66. Journal of Bacteriology, Baltimore, 169: 4796-4803, 1987.

FERENCZI, L. Microbial protoplast fusion. In: S.W. GLOVER & HOPWOOD, D.A. ed. Genetics as a tool in Microbiology. London, Cambridge University Press, 1981. p. 1-34.

FERENCZY, L.; ZSOLT, J.; KEVEI, F. Forced heterokaryon formation in auxotrophic Geotrichum strains by protoplast fusion. In Third International Protoplast Symposium on Yeast Protoplast, p. 74. October 2-5. 1972. Salamanca. Spain: Abstracts.

FODOR, K. & ASFOLDI, L. Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 73: 2147-50, 1976.

FODOR, K.; DEMIRI, E.; ASFOLDI, L. Polyethylene glycol-induced fusion of heat-inactivated and living protoplasts of Bacillus megaterium. Journal of Bacteriology, Baltimore, 135: 68-70, 1978.

FRIEND, E.J.; WARREN, M.; HOPWOOD, D.A. Genetic evidence for a plasmid controlling fertility in an industrial strain of Streptomyces rimosus. Journal of General Microbiology, London, 106: 201-206, 1978.

FRIGO, S.M. Variabilidade e fusão de protoplastos em Metarrhizium anisopliae (Metsch) Sorokin. Piracicaba, 1983. 119 p. (Tese-doutorado - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"/USP).

FRONTALI, G.; HILL, L.R.; SILVESTRI, L.G. The base composition of deoxyribonucleic acid of Streptomyces. Journal of General Microbiology, London, 38: 243-50, 1965.

FURUMAI, T.; TAKEDA, K. & OKANISHI, M. Function of plasmids in the production of aureothricin. I. Elimination of plasmid and alteration of phenotypes caused by protoplast regeneration in Streptomyces kasugaensis. Journal Antibiotics, Tokyo, 35: 1367-1373, 1982.

GENTHNER, F.J.; HOOK, L.A. & STROHL, W.R. Determination of the molecular mass of bacterial genomic DNA and plasmid copy number by high pressure liquid chromatography. Applied & Environmental Microbiology, 50: 1007-1013, 1985.

GLADEK, A. & ZAKRZEWSKA, J. Genome size of Streptomyces.
FEMS Microbiology Letters, 24: 73-76, 1984.

GORST-ALLMAN, C.; RUDD, B.A.M.; CHANG, C. & FROSS, H.G.
Biosynthesis of actinorrhodin. Determination of the
point of dimerization. J. Organic Chemistry, 46: 455-
456, 1981.

GUILLEN, N.; LE HEGARAT, F.; FLEURY, A.M.; HIRSCHBEIN, L.
Folded chromosomes of vegetative Bacillus subtilis:
composition and properties. Nucleic Acids Research, 5:
475-489, 1978.

HACKMANN, C. Action of actinomycin in experimental tumors.
In: WAKSMAN, S., ed. Antinomycin, John Wiley & Sons.
N.Y. 1968. p.123-136.

HAESE, A. & KELLER, U. Genetics of actinomycin C production
in Streptomyces chrysomallus. Journal of Bacteriology,
Baltimore, 170: 1360-1368, 1988.

HIROCHIKA, H.; NAKAMURA, K.; SAKAGUCHI, K.A. Linear DNA
plasmid from Streptomyces rochei with an inverted

terminal repetition of 614 base pairs. EMBO Journal, Oxford: 761-766, 1984.

HOOLEY, P. & WELLINGTON, A.M.H. Formation and regeneration of protoplasts of Streptomyces hygrosopicus. Letters in Applied Microbiology, London, 1: 77-80, 1985.

HOPWOOD, D.A. Genetic recombination in Streptomyces coelicolor. Journal of General Microbiology, London, 16(1): ii-iii, 1957.

HOPWOOD, D.A. Linkage and the mechanism of recombination in Streptomyces coelicolor. Annals of the New York Academy of Sciences, New York, 81: 887-98, 1959.

HOPWOOD, D.A. Genetic analysis and genome structure in Streptomyces coelicolor. Bacteriological Reviews, Baltimore, 31(4): 373-403, 1967.

HOPWOOD, D.A. Extrachromosomally determined antibiotic production. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 32: 373-392, 1978.

HOPWOOD, D.A. Genetic studies of antibiotics and other secondary metabolites. In GLOVER, S.W. & HOPWOOD, D.A. ed., Genetics as a tool in Microbiology. Cambridge University Press. London, 1981a.p. 187-218.

HOPWOOD, D.A. Genetic studies with bacterial protoplasts. Annual Review of Microbiology, Palo Alto, 35: 237-272, 1981b.

HOPWOOD, D.A. Possible applications of genetic recombination in the discovery of new antibiotics in actinomycetes. In: NINET, L.; BOST, P.E.; BOUANCHAUD, D.H.; FLORENT, J., ed. The Future of Antibiotherapy and Antibiotic Research. London, Academic Press, 1981a. p.407-416.

HOPWOOD, D.A.; BIBB, M.J.; BRUTON, C.J.; CHATER, K.F.; FEITELSON, J.S.; GIL, J.A. Cloning Streptomyces genes for antibiotic production. Trends in Biotechnology, 1: 42-48, 1983.

HOPWOOD, D.A.; BIBB, M.J.; CHATER, .F.; KIESER, T.; GRUTON, C.J.; KIESER, H.M.; LYDIATE, D.J.; SMITH, C.P.; WARD,

J.M.; SCHIREMPE, H. Genetic Manipulation of Streptomyces a Laboratory Manual. John Innes Institute, 1985a. Norwich.

HOPWOOD, D.A. & CHATER, K.F. Streptomyces. In BALL, C. Genetics and Breeding of Industrial Microorganisms. Florida, CRC Press. 1984. p. 7-42.

HOPWOOD, D.A.; CHATER, K.F.; DOWDING, J.E.; VIVAN, A. Recent advances in Streptomyces coelicolor genetics. Bacteriological Reviews, Baltimore, 37: 371-405, 1973.

HOPWOOD, D.A. & GLAUERT, A.M. The fine structure of Streptomyces coelicolor. II The nuclear material. Journal Biophysical Biochemical Cytology, 8: 267-278, 1960.

HOPWOOD, D.A.; HINTERMANN, G.; KIESER, T.; WRIGHT, H.M. Integrated DNA sequences in three streptomycetes form related autonomous plasmids after transfer to Streptomyces lividans. Plasmid, New York, 11: 1-16, 1984a.

HOPWOOD, D.A.; KIESER, T.; LYDIATE, D.J.; BIBB, M.J.
Streptomyces plasmids: their biology and use as cloning
vectors. In: QUEENER, S.W. & DAY, L.E., ed. Antibiotic-
producing Streptomyces. London, Academic Press, 1986.
p.159-230.

HOPWOOD, D.A.; KIESER, T.; WRIGHT, H.M.; BIBB, M.J.
Plasmids, recombination and chromosome mapping in
Streptomyces lividans 66. Journal of General
Microbiology, London, 129: 2257-2269, 1983a.

HOPWOOD, D.A.; LYDIATE, D.J.; MALPARTIDA, F.; WRIGHT, H.M.
Conjugative sex plasmids of Streptomyces. In: HELINSKI,
D.; COHEN, S.N.; CLEWELL, D.B.; JACKSON, D.A.; HOLANDER,
A., ed. Plasmid in Bacteria. New York, Plenum Press,
1984. p.615-634.

HOPWOOD, D.A.; MALPARTIDA, F.; KIESER, H.M.; IKEDA, H.;
DUNCAN, J.; FUJII, I.; RUDD, B.A.; FLOSS, H.G.; OMURA,
S. Production of "hybrid" antibiotics by genetic
engineering. Nature, London, 314: 642-644, 1985b.

HOPWOOD, D.A. & MERRICK, M.J. Genetics of antibiotic production. Bacteriological Reviews, Baltimore, 41(3): 595-635, 1977.

HOPWOOD, D.A. & SERMONTI, G. The genetics of Streptomyces coelicolor. Advances in Genetics, 11: 273-342, 1962.

HOPWOOD, D.A.; THOMPSON, C.J.; KIESER, T.; WARD, J.M. & WRIGHT, H.M. Progress in the development of plasmid cloning vectors for Streptomyces. In: SCHLESSIGER, D. ed., "Microbiology-1981". American Society Microbiology. Washington. 1981. p. 376-379.

HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Bacterial protoplast fusion: recombination in fused protoplasts of Streptomyces coelicolor. Molecular & General Genetic, Berlin, 162: 307-317, 1978.

HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Factors affecting recombinant frequency in protoplast fusion of Streptomyces coelicolor. Journal of General Microbiology, London, 111: 137-143, 1979.

HOPWOOD, D.A. & WRIGHT, H.M. Protoplast fusion in Streptomyces fusions involving ultraviolet-irradiated protoplasts. Journal of General Microbiology, London, 126: 21-27, 1981.

HOPWOOD, D.A.; WRIGHT, H.M.; BIBB, M.J.; COHEN, S.N. Genetic recombination through protoplast fusion in Streptomyces. Nature, London, 268: 171-174, 1977.

HOTTA, K.; YAMASHITA, F.; OKAMI, Y. & UMEZAWA, H. New antibiotic-producing streptomycetes selected by antibiotic resistance as a marker. II. Features of a new antibiotic-producing clone obtained after fusion treatment. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 38: 64-69, 1985.

HRANUELI, D.; PIGAC, J.; SMOKVINA, T.; ALACEVIC, M. Genetic interactions in Streptomyces rimosus mediated by conjugation and by protoplast fusion. Journal of General Microbiology, London, 129: 1415-1422, 1983.

HÜTTER, R. & ECKHARDT, T. Genetic manipulation. In: M. GOODFELLOW, ed. *Actinomycetes in Biotechnology*. London. Academic Press, 1988. p.89-184.

ICHIKAWA, T.; ISHIKURA, T.; OZAKI, A. Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method. Folia Microbiol., 16: 218-224, 1971.

IKEDA, H.; INOUE, M.; OMURA, S. Improvement of macrolide antibiotic-producing streptomycete strains by the regeneration of protoplasts. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 36(3): 283-288, 1983.

IKEDA, H.; TANAKA, H.; OMURA, S. Genetic and biochemical features of spiramycin biosynthesis in Streptomyces ambofaciens. Curing, protoplast regeneration and plasmid transfer. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 35(4): 507-516, 1982.

JACOBSON, E.; GRANVILLE, W.C.; FOSS, C.E. *Color Harmony Manual*, 3rd ed. Container Corp. of America, Chicago, 1948. JONES, G.H. & HOPWOOD, D.A. Activation of

- phenoxazinone synthase expression in Streptomyces lividans by cloned DNA sequences from Streptomyces antibioticus. The Journal of Biological Chemistry, 259(22): 14158-14164, 1984.
- JONES, G.H. & HOPWOOD, D.A. Activation of phenoxazinone synthase expression in Streptomyces lividans by cloned DNA sequences from Streptomyces antibioticus. The Journal of Biological Chemistry, 259(22): 14158-14164, 1984.
- KADO, C.I. & LIU, S.T. Rapid procedure for detection and isolation of large and small plasmids. Journal of Bacteriology, Baltimore, 145 (3): 1365-1373, 1981.
- KAO, K.N. & MICHAYLUK, M.R. A method for high-frequency intergeneric fusion of plant protoplasts. Planta, 115: 355-367, 1974.
- KATZ, E. Actinomycin. In: GOTTLIEB, D. & SHAWED, P.D.B Antibiotics II. New York. Springer-Verlag. 1967. p.276-341.

KATZ, E. & WEISSBACH, H. Biosynthesis of the actinomycin chromophore; enzymatic conversion of 4-methyl-3-hydroxyanthranilic acid to actinocin. The Journal of Biological Chemistry, 237(3): 882-886, 1962.

KERSTERS, K. & DE LEY, J. Identification and grouping of bacteria by numerical analysis of their electrophoretic protein patterns. Journal of General Microbiology, London, 87: 333-342, 1975.

KIESER, T. Factors affecting the isolation of CCC DNA from Streptomyces lividans and Escherichia coli. Plasmid, New York, 12: 19-36, 1984.

KIESER, T.; HOPWOOD, D.A. ; WRIGHT, H.M.; THMPSON, C.J. pIJ101, a multi-copy broad host-range Streptomyces plasmid: functional analysis and development of DNA cloning vectors. Molecular & General Genetics, Berlin, 185: 223-38, 1982.

KINASHI, H. & SHIMAJI, M. Detection of giant linear plasmids in antibiotic producing strains of Streptomyces

by the OFAGE technique. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 40(6): 913-6, 1987.

KINASHI, H.; SHIMASI, M.; SAKAI, A. Giant linear plasmids in Streptomyces which code for antibiotic biosynthesis genes. Nature, London, 328: 454-456, 1987.

KIRBY, R. & HOPWOOD, D.A. Genetic determination of methylenomycin biosynthesis by the SCP1 plasmid of Streptomyces coelicolor A3 (2). Journal of General Microbiology, London, 98: 239-252, 1977.

KOBAYASHI, T.; SHIMOTSU, H.; HORINOUCI, S. ; VOGUMI, T.; BEPPU, T. Isolation and characterization of a pock-forming plasmid pTA4001 from Streptomyces lavendulae. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 37: 368-75, 1984.

KOJIMA, I. ; NANJYO, T. & OKANISHI, M. Mutual relation of three pock-forming plasmids resident in Streptomyces noursei. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 38(3): 390-400, 1985.

KRETSCHMER, S. & KUMMER, C. Increase of nucleoid size with increasing age of hyphal region in vegetative mycelia of Streptomyces gránaticolor. Journal of Basic Microbiology, 27: 23-7, 1987.

KURYLOWICZ, W.; KURZATKOWSKI, W.; SOLECKA, J. Improvement of industrially important Streptomycetes by protoplast fusion and regeneration. In: DA SILVA, E.J.; DOMMERGHES, Y.R.; NYNS, E.J.; RATLEDGE, C. Microbial Technology in the Developing World. Oxford University Press, 1987 p.185-195.

KURYLOWICZ, W.; PASZKIEWICZ, A.; KURZATOWSKI, W.; SZULGA, T. Numerical taxonomy of streptomycetes (ISP strains). In: ARAI, T., ed. Actinomycetes; The Boundary Microorganisms. Tokyo, Toppan Company, 1976. p.323-40.

KÜSTER, E. Outline of a comparative study of criteria used in characterization of the actinomycetes. International Bulletin Bacterial Nomenclature and Taxonomia 9: 98-104, 1959.

KÜSTER, E. Simple working key for the classification and identification of named taxa included in the International Streptomyces Project. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 22: 139-48, 1972.

LAEMMLI, V.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage TH. Nature, London, 227: 681-685, 1970.

LECHEVALIER, H.A. & LECHEVALIER, M.P. Chemical composition as a criterion in the classification of aerobic actinomycetes. International Journal Systematic Bacteriology, Washington, 20: 435, 1979.

MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D.A. Molecular cloning of the whole biosynthetic pathway of a Streptomyces antibiotic and its expression in a heterologous host. Nature, London, 309: 462-464, 1984.

MALPARTIDA, F. & HOPWOOD, D.A. Physical and genetic characterization of the gene cluster for the antibiotic

actinorhodin in Streptomyces coelicolor A3(2). Molecular & General Genetics, Berlin, 205: 66-73, 1986.

MALPARTIDA, F.; ZALACAIN, N.; JIMENEZ, A.; DAVIES, J.
Molecular cloning and expression in Streptomyces lividans of a hygromycin B phosphotransferase gene from Streptomyces hygrosopicus. Biochemical and Biophysical Research Communications, 117: 6-12, 1983.

MERRICK, M.J. A morphological and genetic mapping study of bald colony mutants of Streptomyces coelicolor. Journal General Microbiology, London, 96: 299-315, 1976.

MURAKAMI, T.; ANZAI, H.; IMAI, S.; SATOH, A.; NAGAOKA, K.; THOMPSON, C.J. The bialaphos biosynthetic genes of Streptomyces hygrosopicus; Molecular cloning and characterization of the gene cluster. Molecular & General Genetics, Berlin, 205: 42-50, 1986.

MURAKAMI, T.; NOJIRI, C.; TOYAMA, H.; HAYASHI, E.; YAMADA, Y.; NAGAOKA, K. Pock forming plasmids from antibiotic-producing Streptomyces. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 36(4): 429-34, 1983.

MURRAY, R.G.E. -A place for bacteria in the living world.
BUCHANAN, R.E.; GIBBONS, N.E.; COWAN, S.T.; HOLT, J.G.;
MURRAY, R.G.E.; NIVEN, C.F.; RAVIN, A.W.; STANIER, R.Y.,
ed. In: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology.
Williams Wilkins, Baltimore, p.4-13, 1974.

NONOMURA, H. Key classification and identification of 458
species of the streptomycetes included in ISP. Journal
of Fermentation Technology, Osaka, 52: 78-92, 1974.

NORMANSELL, I.D. Strain improvement in antibiotic-
producing microorganisms. Journal Chemical Technology
Biotechnology, 32: 296-303, 1982.

OCHI, K. Protoplast fusion permits high-frequency transfer
of a Streptomyces determinant which mediates actinomycin
synthesis. Journal Bacteriology, Baltimore, 150: 592-
597, 1982.

OCHI, K. & KATZ, E. The possible involvement of a
plasmid(s) in actinomycin synthesis by Streptomyces
parvulus and Streptomyces antibioticus. The Journal of
Antibiotics, Tokyo, 31(11): 1143-1148, 1978.

OCHI, K. & KATZ, E. Genetic analysis of the actinomycin-producing determinants (plasmid) in Streptomyces parvulus using the protoplast fusion technique. Canadian Journal Microbiology, 26: 1460-1464, 1980.

OGAWA, H.; IMAI, S.; SATOH, A.; KOJIMA, M. An improved method for the preparation of streptomycetes and Micromonospora protoplasts. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 36(2): 184-186, 1983.

OGURA, M.; TANAKA, T.; FURIHATA, K.; SHIMAZU, A.; OTAKE, N. Induction of antibiotic production with ethidium bromide in Streptomyces hygrosopicus. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 39(10): 1443-1449, 1986.

OHNUKI, T.; IMANAKA, T.; AIBA, S. Self-cloning in Streptomyces griseus of an str gene cluster for streptomycin biosynthesis and streptomycin resistances. Journal Bacteriology, Baltimore, 164: 85-94, 1985.

OKANISHI, M. Plasmids and antibiotic synthesis in streptomycetes. In: SEBEK, O.K. & LASKIN, A.I., ed. Genetics of Industrial Microorganisms, Proceedings of

the 3rd International Symposium GIM78. American Society for Microbiology, Washington DC, 1979. p.134-140.

OKANISHI, M. Plasmid involvement in antibiotics production. In: SAKAGUCHI, K. & OKANISHI, M. ed. Molecular Breeding and Genetics of Applied Microorganisms. London, Academic Press, 1980. p.29-46. .

OKANISHI, M.; MANOME, T.; UMEZAWA, H. Isolation and characterization of plasmid DNAs in actinomycetes. The Journal of Antibiotics, 33: 88-91, 1980.

OKANISHI, M.; OHTA, T.; UMEZAWA, H. Possible control of formation of aerial mycelium and antibiotic production in Streptomyces by episomic factors. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 23: 45-47, 1970.

OKANISHI, M.; SUZUKI, K.; UMEZAWA, H. Formation and reversion of streptomycete protoplasts: cultural condition and morphological study. Journal of General Microbiology, London, 80: 389-400, 1974.

OMURA, S.; IKEDA, H.; TANAKA, H. Extraction and characterization of plasmids from macrolide antibiotic-producing streptomycetes. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 34: 478-482, 1981.

ONO, H.; HINTERMANN, G.; CRAMERI, R.; WALLIS, G; HÜTTER, R. Reiterated DNA sequences in a mutant strain of Streptomyces glaucescens and cloning of the sequence in Escherichia coli. Molecular & General Genetics, Berlin, 186: 106-110, 1982.

PACCOLA-MEIRELLES, L.D.; VALARINI, M.J.; AZEVEDO, J.L.; ALFENAS, A.C. Manual de Técnicas Eletroforéticas em Microrganismos. ESALQ/FEALQ-Piracicaba. 1988. 54p.

PERNODET, J.L. & GUERINEAU, M. Isolation and physical characterization of streptomycete plasmids. Molecular & General Genetics, Berlin, 182: 53-59, 1981.

POGELL, B.M. Regulation of aerial mycelium formation in streptomycetes. In: SEBEK, O.K. & LASKIN, A.I. Genetics of Industrial Microorganisms. Washington. American Society for Microbiology. 1979. p.218-224.

PONTECORVO, G.; ROPER, J.A.; HEMMONS, L.M.; McDONALD, K.D.;
BUFTON, A.W.J. The genetics of Aspergillus nidulans.
Advances Genetic, 5: 141-238. 1953.

PRAUSER, H. Aptness and application of colour codes for
exact description of colours of streptomycetes.
Zeitschrift Allg. Mikrobiologie, 4: 95-98, 1964.

PRIDHAM, T.G.; ANDERSON, P.; FOLEY, C.; LINDENFELSER,
L.A.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. A selection of
media for maintenance and taxonomic study of
streptomycetes. Antibiotics Annual, 1956/57, p.947-953.

PRIDHAM, T.G. & GOTTLIEB, D. The utilization of carbon
compounds by some Actinomycetales as an aid for species
determination. Journal Bacteriology, Baltimore, 56: 107-
114. 1948.

PRIDHAM, T.G.; HESSELTINE, C.W.; BENEDICT, R.G. A guide for
the classification of streptomycetes according to
selected groups: placement of strains in morphological
section. Applied Microbiological, 6: 52-61, 1958.

PRIDHAM, T.G. & TRESNER, H.D. Family VII. Streptomycetaceae
Waksman and Henrici 1943. In: BUCHANAN, R.E. & GIBBONS,
N.E. ed. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology,
8th ed. Williams and Wilkins, Baltimore, 1974.

QUEENER, S.W. & BALTZ, H. Genetics of industrial
microorganisms. In: PERLMAN, D. ed. Annual Reports on
Fermentation Process. Academic Press, London, 1979. p.
5-45.

QUEENER, S.W. & DAY, L.E. In: Antibiotic: Producing
Streptomyces, London, Academic Press, 1986.

RAMOS, A.; VALIN, C.; JOSEPH, N.; VISOZO, A.; PEREZ, D.;
ALONSO, E.; VILLANUEVA, S.; RODRIGUEZ, R. Enhancement of
oxytetracycline production in a Streptomyces rimosus
strain after treatment with acriflavine. Biotechnology
Letters, 8(3): 161-162, 1986.

REDSHAW, P.A.; McCANN, PENTELLA, M.A.; POGELL, B.M.
Simultaneous loss of multiple differentiated functions in
aerial mycelium-negative isolates of streptomycetes.
Journal of Bacteriology, Baltimore, 137: 891-899, 1979.

RHODES, P.M.; HUNTER, I.S.; FRIEND, E.J.; WARREN, M.
Recombinant DNA methods for the oxytetracycline producer
Streptomyces rimosus. Biochemical Society Transactions,
12: 586-588, 1984.

ROBINSON, M.; LEWIS, E.; NAPIER, E. Occurrence of reiterated
DNA sequences in strains of Streptomyces produced by an
interspecific protoplast fusion. Molecular & General
Genetics, Berlin, 182: 336-340, 1981.

SAGARA, Y.; FUKUI, K.; OTA, F.; YOSHIDA, N.; KASHIYAMA, T.;
FUJIMOTO, M. Rapid formation of protoplasts of
Streptomyces griseoflavus and their fine structure.
Japanese Journal of Microbiology, 15: 73-84, 1971.

SCHLEIFER, K.H. & STACKEBRANDT, E. Molecular Systematics of
prokaryotes. Annual Review Microbiological, Baltimore,
37: 143-187, 1983.

SCHREMPF, H. Plasmid loss and changes within the
chromosomal DNA of Streptomyces reticuli. Journal of
Bacteriology, Baltimore, 151(2): 701-707, 1982a.

SCHREMPF, H. Role of plasmids in producers of macrolides.
Journal of Chemical Technology and Biotechnology,
London, 32: 292-295, 1982b.

SCHREMPF, H. Deletion and amplification of DNA sequences in
melanin-negative variants of Streptomyces reticuli.
Molecular & General Genetics, Berlin, 189: 501-505,
1983.

SCHREMPF, H. & GOEBEL, W. Function of plasmid genes in
Streptomyces reticuli. In: TIMMIS, K.N. & PUHLER, A. ed.
Plasmids of Medical Environmental and Commercial
Importance. Elsevier, Amsterdam North Holland Biomedical
Press, 1979. p.259-268.

SENO, E.T. & HUTCHINSON, C.R. The biosynthesis of Tylosin
and erythromycin: model system for studies of the
genetics and biochemistry of antibiotic formation. In:
QUEENER, S.W. & DAY, L.E. ed. Antibiotics: producing
Streptomyces. London, Academic Press, 1986. p.231-280.

SERMONTI, G. & SPADA-SERMONTI, J. Genetic recombination in
Streptomyces. Nature, London, 176: 121-1955.

SHAW, C.R. & PRASAD, R. Starch gel electrophoresis of enzymes a compilation of recipes. Biochem. Genetic, 4: 297-320, 1970.

SHAW, P.D. & PIWOWARSKI, J. Effects of ethidium bromide and acriflavine on streptomycin production by Streptomyces bikiniensis. The Journal of Antibiotics, 30: 404-408, 1977.

SHIER, W.T.; RINEHART, K.L.Jr.; GOTTLIEB, D. Proceeding National Academia Society, USA, 63: 138-204, 1969.

SHINDOH, Y.; NAKANO, M.M.; OGAWARA, H. Pock-forming plasmids isolated from Streptomyces roscochromogenus. The Journal Antibiotics, Tokyo, 37: 512-517, 1984.

SHINOBU, R. Physiological and cultural study for the identification of soil actinomycete species. Mem. Osaka Univ. B. Nat. Sci. 7: 1-76, 1958.

SHIRAHAMA, T.; FURUMAI, T.; OKANISHI, M. A modified regeneration method for streptomycete protoplasts.

Agricultural and Biological Chemistry, 45(5): 1271-1273, 1981.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Methods for characterization of Streptomyces species. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 16(3): 313-340, 1966.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces; II. Species descriptions from first study. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 18: 69-189, 1968a.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces; III. Additional species descriptions from first and second studies. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 18: 279-399, 1968b.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Cooperative description of type cultures of Streptomyces; IV. Species descriptions from the second, third and fourth studies. International

Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 19: 391-512, 1969.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Cooperative description of type strain of Streptomyces; V. Additional descriptions. International Journal of Systematic Bacteriology, Washington, 22: 265-394, 1972.

SHIRLING, E.B. & GOTTLIEB, D. Retrospective evaluation of International Streptomyces Project taxonomic criteria. In: ARAI, T., ed. Actinomycetes; the boundary microorganisms, Tokyo, Toppan Company, 1976. p.9-41.

SINGER, C.E. & AMES, B.N. Sunlight ultraviolet and bacterial DNA base ratios. Science, 170: 822-826, 1970.

SKURRAY, R.A. & REEVES, P. Characterization of lethal zygosis associated with conjugation in Escherichia coli K-12. Journal of Bacteriology, Baltimore, 113: 58-70, 1973.

STACKEBRANDT, E. & WOESE, C.E. Towards a phylogeny of the actinomycetes and related organisms. Current Microbiological, 32: 1-31, 1981.

STANZAK, R.; MATSUSHIMA, P.; BALTZ, R.H.; RAO, R.N. Cloning and expression in Streptomyces lividans of clustered erythromycin biosynthesis genes from Streptomyces erythreus. Bio/Technology, 4: 222-232, 1986.

SZABO, J.M.; MARTON, M.; BUTI, J.; FERNANDEZ, C. A diagnostic key for the identification of "species" of Streptomyces and Streptoverticillium included in the International Streptomyces Project. Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungaricae, 21: 387-418, 1975.

TEWFICK, E.M. & BRADLEY, S.G. Characterization of deoxyribonucleic acids from streptomycetes and nocardiae. Journal of Bacteriology, Baltimore, 94: 1994-2000, 1967.

THOMPSON, C.J.; KIESER, T.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. Physical analysis of antibiotic resistance genes from

Streptomyces and their use in vector construction. Gene, 20: 51-62, 1982a.

THOMPSON, C.J.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. DNA cloning in Streptomyces resistance genes from antibiotic-producing species. Nature, London, 286: 525-527, 1980.

THOMPSON, C.J.; WARD, J.M.; HOPWOOD, D.A. Cloning of antibiotic resistance and nutritional genes in streptomycetes. Journal of Bacteriology, Baltimore, 151(2): 668-677, 1982b.

TOYAMA, H.; HAYASHI, E.; NOJIRI, C.; KATSUMATA, K; MIYATA, A.; YAMADA, Y. Isolation and characterization of small plasmids from Streptomyces. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 35: 369-73, 1982.

TOHYAMA, H.; OKAMI, Y.; UMEZAWA, H. Nucleotide sequence of streptomycin phosphotransferase and amidinotransferase genes in a gene cluster cloned from Streptomyces griseus. Nucleic Acids Research, 15: 1819-1833, 1987.

TRESNER, H.D. & DANGA, F. Hydrogen sulfide production by Streptomyces as a criterion for species differentiation. Journal Bacteriology, Baltimore, 76: 239-244. 1958.

USDIN, K.; CHRISTIANS, K.M.; DEWET, C.A.; POTGIETER, T.D.; SHAW, C.B.; KIRBY, R. The loss of a large DNA fragment is associated with an aerial mycelium negative (Amy⁻) phenotype, of Streptomyces cattleya. Journal of General Microbiology, London, 131: 979-981, 1985.

USDIN, K.; GERTSCH, K.; KIRBY, R. Evidence for the wide distribution of repetitive DNA sequences in the genus Streptomyces. Journal of Molecular Evolution, New York, 20: 25-30, 1984.

VIVIAN, A. Genetic control of fertility in Streptomyces coelicolor A3(2): plasmid involvement in the interconversion of UF and IF strains. Journal of General Microbiology, London, 69: 353-64, 1971.

VIVIAN, A. & HOPWOOD, D.A. Genetic control of fertility in Streptomyces coelicolor A3(2): the IF fertility type.

Journal of General Microbiology, London, 64: 101-17,
1970.

WAKSMAN, S.A. The Actinomycetes. Vol. II. Classification, identification and descriptions of genera and species. Williams et Wilkins - Baltimore, 1961.

WAKSMAN, S.A. Actinomycin. Nature, Formation and Activities. Interscience Publishers, 1968. 231p.

WAKSMAN, S.A. & CURTIS, R.E. The actinomycetes of the soil. Soil Science, 1: 99-134, 1916.

WAKSMAN, S.A. & HENRICI, A.T. The nomenclature and classification of the actinomycetes. Journal of Bacteriology, Baltimore, 46: 337-41, 1943.

WAKSMAN, S.A. & WOODRUFF, H.B. Actinomyces antibioticus a new soil organism antagonistic to pathogenic and nonpathogenic bacteria. Journal of Bacteriology, Baltimore, 42: 231-249, 1941.

WALLIN, A.; GLIMELIUS, K.; ERIKSSON, T. The induction and aggregation and fusion of *Daucus carota* protoplasts by polyethylene glycol. Zeitschrift für Pflanzenphysiologie, 74: 64-80, 1974.

WESTPHELING, J. Physical studies of Streptomyces plasmids. PhD Thesis. University of East Anglia, Norwich, 1980.

WHITNEY, P.J.; VAUGHAN, J.G & HEALE, J.B. A disc electrophoretic study of the proteins of Verticillium albo-atrum, Verticillium dahliae and Fusarium oxysporum with reference to their taxonomy. Journal of Experimental Botany, 19: 415-426, 1968.

WILLETS, N. & SKURRAY, R. The conjugation system of F-like plasmids. Annual Review of Genetics, Palo Alto, 14: 41-76, 1980.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G. Genus Streptomyces Waksman & Henrici. In: WILLIAMS, S.; SHARPE, M.E.; HOLT, J.G., ed. Bergey's Manual of Systematic Bacteriology. Williams & Wilkins, Baltimore, 1989.

WILLIAMS, S.T.; GOODFELLOW, M.; ALDERSON, G.; WELLINGTON, E.M.G.; SNEATH, P.H.A.; SAKIN, M.J. Numerical classification of Streptomyces and related genera. Journal of General Microbiology, London, 129: 1743-813, 1983.

WORCEL, A. & BURGI, E. Properties of a membrane attached form of the folded chromosome of Escherichia coli. Journal Molecular Biology, 82: 91-105, 1974.

WRIGHT, L.F. & HOPWOOD, D.A. Actinorhodin is a chromasomally-determined antibiotic in Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of General Microbiology, London, 96: 289-297, 1976a.

WRIGHT, L.F. & HOPWOOD, D.A. Identification of the antibiotic determined by the SCP¹ plasmid of Streptomyces coelicolor A3(2). Journal of General Microbiology, London 95: 96-106, 1976b.

XUE, Y.; ZHU, Y.; ZHUANG, Z. & TAN, H. Streptomyces griseus plasmid codes some genes involved in streptomycin biosynthesis. Acta Genetica Sinica, 8: 14-20, 1981.

YAMAGUCHI, T. Comparison of cell wall composition of morphologically distinct actinomycetes. Journal of Bacteriology, 89: 444-451, 1965.

YAMASHITA, F.; HOTTA, K.; KURASAWA, S.; OKAMI, Y.; UMEZAWA, H. New antibiotic-producing streptomycetes, selected by antibiotic resistance as a marker. I. New antibiotic production generated by protoplast fusion treatment between Streptomyces griseus and S. tenimariensis. The Journal of Antibiotics, Tokyo, 38(1): 58-63, 1985.

YOUXIA, Z.; XIAOXUE, X.; TINLAN, Z. A new compound generated from interspecific protoplast fusion in Streptomycetes. "Fifth International Symposium on the Genetics of Industrial Microorganisms". GIM 86. Abstracts, 1986. p.185.

ZHENG, Y.; XU, X.; ZHANG, T. Interspecific transfer and expression of SQP1 plasmid of Streptomyces gingfengmyceticus. Acta Genetica Sinica, 9: 423-430, 1982.

ZHUANG, Z.; TAN, H.; XU, Y.; ZHU, Y.; XUE, Y. A study on transformation of Streptomyces griseus plasmid DNA. Acta Genetica Sinica, 7: 291-298, 1980.