

CRESCIMENTO E RESISTÊNCIA À DROGAS EM  
*Azospirillum brasilense.*

OLIVIA MARCIA NAGY ARANTES

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA  
Estado de São Paulo - Brasil  
Maio - 1979

Ao Prof. DR. JOÃO LÚCIO, orientador e amigo  
com quem aprendi também a humildade, paciência e amor  
ao trabalho,

minha homenagem especial.

À memória de

*FRANCISCA, OLÍVIA e SEBASTIÃO*

meus avós, o fruto que eles  
tanto gostariam de ver.

Ao meu avô, *JOSÉ*

Aos meus pais, *HUGO e ANNA* pelo  
amor, compreensão e constante es  
forço,

*DEDICO*

Aos meus irmãos, FRANCISCO, MARIA DE  
FÁTIMA, TEREZINHA, BEATRIZ, MARIA  
CRISTINA, HUGUINHO, PEDRO e a minha  
sobrinha, VANESSA, pela família que  
somos,

OFEREÇO

## AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho, principalmente às seguintes pessoas e entidades:

- Ao Professor Dr. *João Lúcio de Azevedo*, além de meu mestre, meu amigo, pela orientação, confiança, incentivo e exemplo de bondade e dedicação.
- Ao Professor Dr. *João Rubens Zinsly*, pela confiança demonstrada.
- À *Telma Sinício, Roberta Maria Guedini, Márcia Babilistiero e Vera Lúcia Pereira Lima*, pelo verdadeiro lar que me proporcionaram em Piracicaba.
- Ao *Peter Weigel, Alda Luiza Loureiro dos Santos e Elcio Perpétuo Guimarães*, pelos bons e difíceis momentos que passamos juntos, meus amigos de sempre.
- À Professora *Dra. Tânia Maria A.D. Zucchi*, pelos primeiros ensinamentos em Genética de Microrganismo.
- Aos Professores *Dr. José Otávio Machado, Manoel Vito F. Lemos e Dr. Edmar Chartone de Souza*, pelas valiosas sugestões.
- Às Professoras *Dras. Alaídes P. Ruschel e Elke J. Bran Nogueira Cardoso*, pela gentileza, permitindo o uso dos laboratórios, sob suas responsabilidades.

- Ao *Cláudio Costa e Maria José Valarini*, pela revisão do manuscrito.
- À Professora e tia *Iracema Arantes de Oliveira*, pela correção ortográfica.
- À *Vera Lúcia Pereira da Silva e Tereza Oda*, pela presteza na datilografia.
- Ao Professor *Dr. Peter W. Westcott*, pela ajuda na confecção do summary.
- Ao Instituto de Genética da ESALQ/USP, na pessoa de seu Diretor Professor *Dr. Ernesto Paterniani*, pela utilização de instalações e equipamentos.
- Aos Professores do curso de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento de Plantas, pela contribuição para nossa formação científica.
- Aos funcionários do Instituto de Genética, representados na pessoa de sua secretária, *Érica Spruck*, pelo excelente atendimento.
- Aos funcionários do Setor de Genética de Microrganismo: *Antônio José R. Campos, Luis Próspero, Rodolfo Fulini, Orlando Bueno Cardoso e Salvador Peixe*, pela importância e eficiência dos serviços técnicos prestados.
- À todos os colegas do curso de Pós-Graduação pela convivência e constante estímulo.
- À Universidade Estadual de Londrina, na pessoa do Magnífico Reitor Prof. *José Carlos Pinotti*, pelas facilidades oferecidas para conclusão deste trabalho.

- Aos Professores e funcionários do Departamento de Biologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, na pessoa do Diretor do Centro de Ciências Biológicas, Prof. *Manoel Barros de Azevedo*, pela compreensão e estímulo.
- Aos Professores do Departamento de Patologia Geral da Universidade Estadual de Londrina, pela utilização de equipamento.
- Conselho Nacional do Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro concedido para a realização desse trabalho.
- Ao Professor *José Hernán Fandiño M.*, pela compreensão, incentivo e ajuda.



BIOGRAFIA DA AUTORA

*OLIVIA MARCIA NAGY ARANTES*, de nacionalidade brasileira, nasceu aos 27 de junho de 1954, na cidade de Ribeirão Preto, sob a filiação de Hugo Edmur Paiva Arantes e Anna Nagy Arantes.

Cursou a Faculdade de Farmácia e Bioquímica - USP - Ribeirão Preto, obtendo o grau em 19 de dezembro de 1975.

Em março de 1976 iniciou o curso de Pós-graduação, para obtenção do título de mestre em Genética e Melhoria de Plantas, na Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

Aos 13 de fevereiro de 1978 foi contratada na qualidade de professor, na Fundação Universidade Estadual de Londrina - Paraná.

## ÍNDICE

	<u>página</u>
1. RESUMO .....	1
2. INTRODUÇÃO .....	3
3. REVISÃO DE LITERATURA .....	7
3.1. Nitrogenase .....	8
3.2. Fatores que afetam a fixação de nitrogênio ..	9
3.3. <i>Spirillum lipoferum</i> .....	14
3.4. Experimento de campo com <i>S. lipoferum</i> .....	17
3.5. Alguns aspectos da genética da fixação de ni- trogênio .....	20
3.6. Antibióticos .....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1. Material .....	25
4.1.1. Linhagem .....	25
4.1.2. Drogas e sua origem .....	25
4.1.3. Meios de cultura .....	26
4.1.3.1. Meio de ágar batata .....	26
4.1.3.2. Meio mínimo .....	27
4.1.3.3. Meio mínimo citrato .....	27
4.1.3.4. Meio completo .....	28
4.1.3.5. Nutriente líquido .....	28
4.1.3.6. Caldo infusão cérebro e cora- ção .....	28

4.1.4. Solução salina .....	29
4.2. Métodos .....	29
4.2.1. Esterilização e incubação .....	29
4.2.2. Determinação do meio de cultura .....	29
4.2.3. Curva de crescimento .....	30
4.2.4. Determinação dos níveis de resistência	30
4.2.5. Obtenção e isolamento de mutantes re-	
sistentes às drogas .....	32
4.2.5.1. Isolamento de mutantes resis-	
tentes à penicilina, cloranfe-	
nicol e tetraciclina .....	32
4.2.5.2. Isolamento de mutantes resis-	
tentes à estreptomicina .....	34
4.2.6. Comparação do crescimento da linhagem	
original com as linhagens mutantes re-	
sistentes .....	35
5. RESULTADOS .....	37
5.1. Determinação do meio de cultura .....	37
5.2. Curva de crescimento .....	39
5.3. Níveis de resistência .....	42
5.4. Isolamento de mutantes resistentes .....	48
5.4.1. Isolamento de mutantes resistentes à	
penicilina, cloranfenicol e tetracicli-	
na .....	48

5.4.2. Isolamento e frequência de mutantes re-	
sistentes à estreptomicina .....	50
5.4.3. Comparação do crescimento da linhagem	
original com as linhagens mutantes re-	
sistentes .....	53
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES .....	58
6.1. Meios de cultura e curva de crescimento .....	58
6.2. Níveis de resistência e isolamento de mutan-	
tes resistentes .....	59
6.3. Comparação do crescimento da linhagem origi-	
nal com as linhagens mutantes resistentes ...	61
7. SUMMARY .....	65
8. BIBLIOGRAFIA CITADA .....	67

LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS

	<u>página</u>
Tabela 1. Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes meios de cultura .....	38
Tabela 2. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em diversos tempos ...	40
Gráfico 1. Curva de crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> .	41
Tabela 3. Crescimento do <i>Azospirillum brasilense</i> em diferentes concentrações das drogas, em meio sólido (NA) .....	43
Tabela 4. Crescimento do <i>A. brasilense</i> em concentrações menores que 1,0 mcg/ml de tetraciclina .....	44
Tabela 5. Crescimento do <i>A. brasilense</i> em diferentes concentrações das drogas, em meio líquido (NL) .....	46
Tabela 6. Crescimento do <i>A. brasilense</i> em concentrações menores que 1,0 mcg/ml de tetraciclina .....	47
Tabela 7. Mutantes resistentes obtidos em placa gradiente .....	49

Tabela 8. Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina .....	51
Tabela 9. Crescimento das linhagens original e resistentes na presença de estreptomicina .....	52
Tabela 10. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em três tempos diferentes .....	54
Gráfico 2. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em função de dois tempos ( $t_8$ e $t_{13}$ ), para as linhagens original e mutantes resistentes à estreptomicina ( $Sm^R$ ), penicilina ( $Pc^R$ ), tetraciclina ( $Tc^R$ ) e cloranfenicol ( $Cm^R$ ) .....	55
Tabela 11. Tempos de geração, da linhagem original e das linhagens mutantes resistentes à antibióticos em <i>A. brasíle</i> se .....	56
Tabela 12. M <sub>Vr</sub> das linhagens mutantes resistentes ...	57

## 1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo o estudo do crescimento do *Azospirillum brasilense*, bactéria fixadora de nitrogênio. Também foram determinados os níveis de resistência da bactéria à dez drogas sendo que algumas delas foram utilizadas para obtenção de mutantes resistentes.

Posteriormente comparou-se o tempo de geração da linhagem original com as linhagens mutantes resistentes.

Com relação ao uso de meios de cultura para o *Azospirillum brasilense*, ressalta-se o crescimento em meio mínimo modificado, um meio mínimo com maior quantidade de citrato de sódio, que age como fonte de carbono para a bactéria.

Os níveis de resistência foram determinados pelo método da diluição em placas.

Para obtenção de mutantes resistentes usou-se

a técnica seletiva em placas e a técnica da placa gradiente.

A linhagem original mostrou-se naturalmente resistente à penicilina, eritromicina e hetacilina. O tempo de geração dessa linhagem foi de 66 minutos. Nas linhagens resistentes à estreptomicina, tetraciclina e penicilina o tempo de geração foi maior do que da linhagem original, sendo respectivamente 71, 90 e 78 minutos. No entanto a linhagem resistente ao cloranfenicol teve um tempo de geração de 64 minutos, portanto menor do que o da linhagem original.

A frequência de mutação para resistência à estreptomicina foi de 2,5 mutantes em  $10^6$  células.

Através do tempo de geração das linhagens original e resistentes e da obtenção de suas meias vidas relativas (MVR), chegamos à conclusão de que a estreptomicina, penicilina e tetraciclina comportaram-se como drogas fortes e o cloranfenicol como droga fraca para o *Azospirillum brasilense*.



## 2. INTRODUÇÃO

Toda a vida na terra depende da energia solar. Essa energia é usada na redução do dióxido de carbono para substâncias orgânicas. Esse processo está ligado, também, à quantidade de organismos verdes que desenvolvem a fotossíntese. O crescimento desses organismos depende do uso de dióxido de carbono na fotossíntese, mas outros elementos são também essenciais para esse desenvolvimento.

O elemento que é considerado o maior fator limitante para o crescimento desses organismos é o nitrogênio. Diferente de outros elementos limitantes, que são encontrados na água ou no solo e cujo deficit é controlado simplesmente pelo processo de reciclagem, o nitrogênio é encontrado em grande parte na atmosfera em quantidades consideráveis, entretanto somente alguns organismos são capazes de usar reservas de nitrogênio elementar.

Nos ecossistemas naturais e formas antigas de agricultura, o ciclo do nitrogênio era suficiente para manter as quantidades necessárias desse elemento no solo. A medida que a população humana mundial cresce, assustadoramente, maior produção de alimentos se faz necessária. A quantidade de nitrogênio disponível passa então a ser insuficiente,

Há muitos anos os fertilizantes artificiais nitrogenados têm sido largamente usados em solos onde o aumento da produção de alimentos tornou-se necessário. O uso desses fertilizantes nitrogenados em grande escala é dispendioso para a economia de um país, devido a vultuosa quantidade de energia utilizada na produção. Estima-se que a energia requerida para a produção de fertilizantes de amônia é equivalente a dois milhões de barris de óleo por dia.

O processo básico para a obtenção da amônia consiste numa reação catalítica de nitrogênio com hidrogênio sob alta temperatura e pressão. O petróleo, que é a fonte do hidrogênio, encontra-se em dramática crise, além de outras limitações econômicas e ecológicas. Assim vem-se estimulando muito o interesse na fixação de nitrogênio por microrganismos. Trata-se de um processo menos oneroso e que tem uma grande vantagem sobre os fertilizantes nitrogenados por não ser poluente. Portanto um crescente conhecimento da natureza e manipulação do sistema biológico de fixação de nitrogênio deverá

levar a meios mais eficientes e menos dispendiosos de produção de alimentos.

Foi Frank em 1890 quem primeiro cultivou e isolou bactérias dos nódulos de ervilha e soja; o microrganismo encontrado foi denominado *Rhizobium leguminosarum*. Sem dúvida, a fixação de nitrogênio em leguminosas pelo *Rhizobium* é a mais conhecida e estudada, mas outras plantas e outros organismos também efetuam esse processo.

Foi demonstrado que nas sementes de leguminosas as proteínas estão numa porcentagem de 20 a 45% e nas sementes dos cereais na porcentagem de 8 a 20% e que apesar disso a produção de leguminosas é somente 10% da produção de cereais. Esse é mais um motivo pelo qual o estudo da fixação biológica de nitrogênio em gramíneas tem sido intensificado.

O isolamento e identificação da bactéria *Spirillum lipoferum* como fixadora de nitrogênio em gramíneas, por <sup>"</sup>DÖBEREINER e DAY (1976), incentivou muito as pesquisas nessa área.

Dentre os pré-requisitos básicos para que ocorra fixação de nitrogênio está a enzima nitrogenase, extraída pela primeira vez em 1960 da bactéria anaeróbica, *Clostridium pasteurianum*. É através da nitrogenase que o nitrogênio atmosférico é fixado ou reduzido à amônia.

Somente os organismos que possuem genes para a fixação de nitrogênio (*ni<sub>2</sub>*), podem fazê-la. Esses genes codificam a enzima nitrogenase.

Um objetivo de particular interesse da aplicação da Biologia Molecular ao estudo da fixação de nitrogênio em bactérias é a eventual infecção desses genes *ni<sub>2</sub>* em plantas.

Por todas essas razões citadas, conclui-se que a fixação biológica de nitrogênio é importante tanto econômica como cientificamente. Parece portanto ser indispensável o aprofundamento das pesquisas sobre a natureza e fisiologia de sistemas fixadores de nitrogênio (planta-microrganismo), para que se possa identificar os fatores limitantes e encontrar caminhos agronomicamente viáveis para aumentar a fixação biológica de nitrogênio.

Assim, o presente trabalho teve como objetivo o estudo do crescimento da bactéria fixadora de nitrogênio, *Azospirillum brasilense*. Procurou-se também determinar o nível de resistência da bactéria a várias drogas e obter mutantes resistentes às mesmas, para produção de marcos genéticos favoráveis, o que possibilitará posterior estudo genético e o melhoramento da espécie.

### 3. REVISÃO DE LITERATURA

Segundo Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (1974), as bactérias do gênero *Spirillum* são bastonetes rígidos, helicoidalmente curvados, com menos de uma volta completa. As células medem em torno de 0,7 a 1,0  $\mu$  de diâmetro e 5,0 a 7,2  $\mu$  de comprimento, apresentando flagelo polar simples em um ou ambos os polos.

BEIJERINCK (1925) foi o primeiro a citar o *Spirillum lipoferum* como bactéria fixadora de nitrogênio.

Não se deu muita importância a esse microrganismo até que DÖBEREINER e DAY (1976) identificaram e descreveram o *Spirillum lipoferum* como uma bactéria fixadora de nitrogênio em raízes de *Digitaria*. Nesse trabalho ainda verificaram os sítios de atividade da nitrogenase nas raízes dessa gramínea e experimentos com nitrogênio 15 em *Paspalum notatum*, demonstraram que possivelmente existe um tipo de simbiose pri

mitiva intracelular entre essas gramíneas tropicais e a bactéria.

### 3.1. Nitrogenase

*WILSON e BURRIS (1947)* foram uns dos pioneiros no estudo da fixação de nitrogênio, descrevendo o possível mecanismo para esse processo, os vários fatores inibidores da fixação e a ação do oxigênio.

A enzima responsável pela fixação de nitrogênio é a nitrogenase. *POSTGATE (1974)* e *ZUMFT e MORTENSON (1975)* descreveram a composição e propriedades dessa enzima. Ela é composta de duas cadeias polipeptídicas: o componente I, que é uma proteína contendo ferro e molibdênio, chamada molibdoferredoxina, e o componente II, que é uma proteína contendo ferro, denominada azoferredoxina. Esta tem baixo peso molecular, em torno de 55000 e a molibdoferredoxina tem alto peso molecular, em torno de 200.000. Por dissociação da proteína com dodecil sulfato de sódio demonstrou-se que a estrutura quaternária da molibdoferredoxina é um tetrâmero constituído por dois diferentes tipos de subunidades.

Quanto ao conteúdo de metal, a molibdoferredoxina possui dois átomos de molibdênio, 24-32 átomos de ferro e enxôfre.

A azoferredoxina é um dímero formado por duas subunidades idênticas. Este componente II contém quatro átomos de ferro e enxôfre.

O ATP (adenosina trifosfato) é descrito como a fonte de energia, para o processo da fixação de nitrogênio.

O oxigênio inativa a enzima nitrogenase e as bactérias aeróbicas fixadoras de nitrogênio possuem mecanismos próprios e diferentes para a proteção contra o oxigênio.

Os autores ressaltam o fato de não ser o nitrogênio o único substrato para a nitrogenase. Acetileno, íons hidrogênio, cianeto, nitrito e outros também são reduzidos em presença da nitrogenase e funcionam como inibidores da fixação de nitrogênio. Pela não especificidade da nitrogenase, a redução de acetileno para etileno, acoplada a análise por cromatografia gasosa é usada para medir a fixação de nitrogênio (HARDY e HAVELKA, 1975).

### 3.2. Fatores que afetam a fixação de nitrogênio.

Vários autores têm descrito as fontes de carbono utilizadas por bactérias fixadoras de nitrogênio, em particular o *Spirillum lipoferum*.

KNOWLES (1976) chama a atenção para o fato de que a fixação de nitrogênio é frequentemente limitada pela

fonte de carbono usada.

Algumas bactérias desenvolvem mais facilmente atividade de nitrogenase quando complementadas com glicose ou sacarose. A sacarose permite a fixação de nitrogênio na ausência de luz em algumas algas cianofíceas e o piruvato permite a fixação de nitrogênio sob qualquer condição, ausência ou presença de luz, aerobiose ou anaerobiose por *Rhodospseudomonas capsulatus*. Compostos simples de carbono possibilitam alta atividade de nitrogenase da *Azotobacter*.

O'TOOLE e KNOWLES (1973) descreveram o efeito de diferentes concentrações de glicose e manitol no desenvolvimento da atividade de nitrogenase em amostras de solo que continham *Clostridium* e *Azotobacter*. Houve um marcado aumento da fixação de nitrogênio com a diminuição da concentração de glicose, sugerindo que a eficiência da nitrogenase é alta quando a glicose está em pequenas quantidades. Altas concentrações de glicose e manitol inibiram a redução do acetileno. Comparando, os autores observaram que baixas concentrações de glicose possibilitam melhor atividade da nitrogenase do que a mesma concentração de manitol.

Usando diferentes pressões de oxigênio, a eficiência maior da fixação de nitrogênio foi em anaerobiose, independente da concentração de glicose ou manitol.



<sup>#</sup>  
*DOBEREINER e DAY (1976)* no seu trabalho pioneiro, ensaiaram como fonte de carbono o malato e lactato, ambos como sal de cálcio e verificaram que com baixa concentração de lactato (0,05%) ocorria uma alta eficiência na fixação de nitrogênio (aproximadamente 100 mg N<sub>2</sub> fixado/g de substrato de carbono) e com baixa concentração de malato (0,05%) a fixação de nitrogênio era aproximadamente a metade da quantidade fixada quando se usava lactato. Em concentrações mais altas de ambos substratos, a fixação de nitrogênio decrescia significativamente.

Segundo *OKON e col. (1976)* o *Spirillum lipoferum* cresce muito bem em malato, succinato, lactato e piruvato; cresce moderadamente em galactose e acetato e cresce mal em glicose e citrato.

*CHILD e KURZ (1978)* demonstraram que as exigências nutricionais, tanto do *Spirillum lipoferum* como de *Rhizobium sp 32H1* em culturas de tecido de células de plantas, foram semelhantes para a indução da atividade da nitrogenase. Na ausência de cultura de tecido ambos os organismos necessitam de pentose e ácidos tricarboxílicos para se ter altos níveis de fixação de nitrogênio. No entanto, a cultura de tecido parece ser capaz de suprir a necessidade de ácidos tricarboxílicos.

Outro fator que afeta a fixação de nitrogênio

é o pH, tanto em cultura pura como no solo. *OKON e col. (1976)* descreveram que a redução de acetileno decresce quando o pH é maior que 7,8 e que o crescimento da cultura estaciona ou declina acima desse pH, (*OKON e col. 1977a*).

*OKON e col. (1977b)* chegaram a conclusão de que o pH ótimo para a atividade da nitrogenase era de 7,1 a 7,4. Abaixo de 6,5 e acima de 8,2 a atividade cessa.

Quanto ao efeito da temperatura, *NEVES e col. (1976)* conseguiram os seguintes resultados: à 28°C o crescimento das culturas foi lento, atingindo a atividade da nitrogenase máxima após 41 horas de incubação. À 34°C a atividade da nitrogenase em apenas 23 horas de incubação chegava próximo ao ponto máximo. À 22 e 39°C algumas estirpes estudadas tinham uma pequena atividade de nitrogenase após 41 horas de incubação. À 10°C e acima de 40°C a redução de acetileno teve uma súbita diminuição.

A exigência de temperaturas relativamente altas pelo *Spirillum lipoferum* demonstra que estas bactérias estão bem adaptadas ao clima tropical, onde as temperaturas ótimas para a atividade da nitrogenase ocorrem quase o ano inteiro.

"*DÖBEREINER e DAY (1976)* relataram ser o *Spirillum lipoferum* aeróbico ou microaeróbico e demonstraram

que a eficiência da fixação de nitrogênio aumenta quando a tensão de oxigênio é baixa. O máximo de eficiência foi a uma  $pO_2$  de 0,005 atm com 0,05% de substrato de carbono.

Segundo ZUMFT e MORTENSON (1975) a azoferredoxina da nitrogenase é completamente inativada após cinco minutos de exposição ao ar.

POSTGATE (1974) enumera algumas associações, planta-microrganismo, fixadoras de nitrogênio, demonstrando como esses microrganismos protegem a nitrogenase aos danos do oxigênio, mecanismos esses que são resultados de uma evolução para que mesmo microrganismos aeróbicos possam fixar nitrogênio.

Segundo OKON e col (1976) o *S. lipoferum* sob condições microaerófilas reduz bem o nitrogênio. O ótimo de  $pO_2$  foi de 0,006 a 0,02 atm, acima de 0,04 atm não há redução de acetileno, mostrando que a  $pO_2$  ótima para fixação de nitrogênio inclui limites muito restritos.

Outro fator que interfere na fixação de nitrogênio é o teor de amônia. A repressão da atividade da nitrogenase pela amônia foi relatada por vários autores (OKON e col, 1976; ABRANTES e col, 1976a; ZUMFT e MORTENSON, 1975; KNOWLES, 1976; SHANMUGAM e col, 1976; HARDY e HAVELKA, 1975).

Além destes fatores, LINDSTROM e col. (1952)

usando a associação *Rhodospirillum rubrum* e *Trifolium pratense*, demonstraram que existe uma interdependência definida entre fixação de nitrogênio e fotossíntese, sendo que a fixação de nitrogênio no escuro foi bem menor do que no claro. Também *HARDY e HAVELKA (1975)* relatam que associações fixadoras de nitrogênio enriquecidas com dióxido de carbono, em presença de luz, fixam uma quantidade maior de nitrogênio.

*PEÑA e DÖBEREINER (1974)* fizeram um experimento usando *Azotobacter paspali*, *Beijerinckia indica*, *B. fluminensis* e *Beijerinckia* sp e deduziram que o efeito do nitrato na atividade da nitrogenase é de repressão parcial, diminuindo a redução de acetileno.

### 3.3. *Spirillum lipoferum*

*DÖBEREINER e DAY (1976)*, citam as seguintes características do *S. lipoferum*: células em espiral, com grande motilidade, contendo inclusões lipídicas. O tamanho da célula varia com o meio de cultura. O *S. lipoferum* é Gram negativo, catalase positiva, Voges Proskauer, indol e metil red negativo, não produz  $H_2S$ , hidrolisa uréia, não forma cistos e tem pigmentação rosa em culturas velhas. Em meio sólido, as colônias são brancas e translúcidas.

Nesse mesmo trabalho os autores determinaram a temperatura ótima para o crescimento da bactéria entre 36 a

399C.

Através da técnica da redução do tetrazólio foi detectado *S. lipoferum* no interior do córtex e ocasionalmente no endoderma.

A extrema sensibilidade a mudanças de tensão de oxigênio talvez ocorra como consequência do mecanismo de proteção contra o oxigênio, por ser este muito primitivo ou não existir.

Nesse mesmo trabalho descreve-se um meio de cultura sem nitrogênio, apropriado para o crescimento do *S. lipoferum*.

PATRIQUIN e DOBEREINER (1978) confirmando os dados já citados, observaram, pela redução do tetrazólio, que o *S. lipoferum* é capaz de colonizar os espaços intercelulares da raiz e o interior do córtex, sendo que células endodérmicas raramente contêm a bactéria.

NEYRA e VAN BERKUM (1977) verificaram a importância da redução do nitrato pelo *S. lipoferum* em condições anaeróbicas, como produtora de energia (ATP) suficiente para que haja atividade da nitrogenase.

NEYRA e col. (1977) demonstraram que o *S. lipoferum* além de reduzir o nitrato é capaz de fazer a de-

nitrificação, com conseqüente liberação de gás, concluindo que estudos para aumentar a fixação de nitrogênio e diminuir a denitrificação são importantes agrônômica e economicamente.

Dados sobre a ecologia do *S. lipoferum* revelam que mais da metade das amostras de raízes de gramíneas coletadas em quatro países africanos, Hawaii, Filipinas e Brasil continham grande quantidade de *S. lipoferum*. Já em menos de 10% das amostras de regiões temperadas (Europa e USA) ocorria esta bactéria. No Rio Grande do Sul, talvez por não ser uma região tropical, o aparecimento desta bactéria foi de 20% (DÖBEREINER e col, 1976).

Neste mesmo trabalho os autores citam uma modificação no meio de cultura livre de nitrogênio para crescimento de *S. lipoferum*, descrito por DÖBEREINER e DAY (1976), o qual ficou com o nome de NFb.

DÖBEREINER (1977) conclui que a técnica de inoculação no solo de *S. lipoferum*, não é uma maneira muito promissora de aumentar a fixação de nitrogênio em gramíneas nas regiões onde ela já existe, talvez pela competição. Esse aumento da fixação de nitrogênio poderá ocorrer, mas somente em solos onde não existe esta bactéria.

O nome *Spirillum lipoferum* foi usado para estas bactérias fixadoras até 1977 quando KRIEG e TARRAND atra-

do estudo de homologia do DNA mostraram que provavelmente existem duas espécies distintas no grupo *Spirillum lipoferum*, sendo que estas duas espécies são do mesmo gênero. O *S. lipoferum* foi dividido em dois grupos: grupo I, onde o tipo padrão é o *Spirillum* sp7 e o grupo II, onde o tipo padrão é o *Spirillum* sp59b. Estes dois grupos têm características fisiológicas diferentes entre si e entre os outros *Spirillum*. Como consequência, o *Spirillum lipoferum* passou para o gênero *Azospirillum*, sendo que as espécies do grupo II (sp59b) passaram a chamar *Azospirillum lipoferum* e as espécies do grupo I (sp7), *Azospirillum brasilense*, por terem sido isoladas pela primeira vez no Brasil.

#### 3.4. Experimento de campo com *S. lipoferum*

"*DÖBEREINER e DAY (1976)* pela primeira vez, descreveram o *Spirillum lipoferum* como uma bactéria fixadora de nitrogênio em raízes de *Digitaria*, sendo que a *Digitaria decumbens* cv *transvala* foi a que apresentou maior fixação de nitrogênio.

Para análise da atividade da nitrogenase em raízes de gramíneas colhidas no campo, *ABRANTES e cols. (1976b)*, propuseram um método que tem o objetivo de manter o melhor possível as condições do solo. Essa técnica foi chamada de micropastagens em tubo de aço, que consiste em amostras de gra-

neas coletadas pela introdução de um tubo de aço de 10 x 15 cm no solo, retirando um sistema solo-planta, que constitui um bloco intacto ou uma micropastagem. A análise da atividade da nitrogenase é feita normalmente pela infecção de acetileno ( $C_2H_2$ ) no sistema e posterior incubação. Após três a quatro horas a produção de etileno ( $C_2H_4$ ) é medida.

Esse método não é muito eficiente porque usa um número muito pequeno de amostras, por ser difícil o manuseio desses tubos. Outro problema é que plantas de porte alto dificultam o uso desse método.

SMITH e col. (1976) realizaram um experimento com *Pennisetum americanum* e *Panicum maximum*, sendo que estas duas gramíneas foram plantadas e fertilizadas com nitrogênio na forma de nitrato de amônia e inoculadas com *Spirillum lipoferum*. Quantidades diferentes de fertilizante foram aplicadas. O *S. lipoferum* foi inoculado no solo e foi feito um controle onde foi inoculado somente meio de cultura sem a bactéria. Concluíram que para se obter a mesma produção das plantas inoculadas e fertilizadas com 30 a 60 Kg/ha é necessário a fertilização com 55 a 99 Kg/ha nas não inoculadas. Segundo os autores o fertilizante nitrogenado é necessário para induzir resposta à inoculação.

NAYAK e RAJARAMAMOHAN RAO (1977) cultivaram arroz inoculado com *Spirillum* sp fertilizado com diferentes



quantidades de nitrogênio (sulfato de amônia). *Spirillum* sp isolado de raízes onde foram usados baixos níveis de fertilizante nitrogenado (20-40 Kg/ha) teve maior eficiência na fixação do que quando isolados de raízes que receberam altas doses de nitrogênio combinado (60-100 Kg/ha). Altas doses de fertilizante nitrogenado suprime o potencial de fixação de nitrogênio do *Spirillum* sp.

*BARBER e col. (1976)* trabalhando com milho, e *ALBRECHT e col. (1977)* trabalhando com sorgo e milho, medindo a fixação de nitrogênio através do método da redução de acetileno, em plantas inoculadas com *S. lipoferum* e plantas sem inoculação, não demonstraram aumento significativo na quantidade de nitrogênio fixado em plantas inoculadas.

*ALBRECHT e col (1977)* no mesmo experimento usaram diferentes temperaturas (28, 32, 36 e 40°C) e diferentes intensidades de luz (500, 1250, 2400 e 3000 ft-c) e verificaram que essas variações de temperatura e luz têm pequena influência na fixação de nitrogênio.

*ABRANTES e col (1975)* citam como fatores limitantes da fixação de nitrogênio da associação de *Digitaria decumbens* cv *transvala* com *S. lipoferum*: quando no campo, a temperatura do solo e o teor de amônia na solução do solo, sendo que concentrações até 200ppm de amônia na solução do solo ainda permitiram atividade da nitrogenase indicando a

possibilidade do aproveitamento simultâneo de baixas dosagens de adubo nitrogenado e da fixação de nitrogênio.

VON BÜLOW e DÖBEREINER (1975) isolaram *S. lipoferum* de milho e observaram como a variação genética em linhagens diferentes de milho e as diferentes fases do crescimento da planta influenciam na fixação de nitrogênio.

### 3.5. Alguns aspectos da genética da fixação de nitrogênio

Foram DIXON e POSTGATE (1971) na Inglaterra e STREICHER e col (1971) no Estados Unidos, que relataram a existência e posição dos genes que codificam a nitrogenase, os chamados genes *nif*. Esses utilizaram *Klebsiella pneumoniae* por ter uma relação genética com a *Escherichia coli*. Com a descoberta de que o fago P<sub>1</sub> da *E. coli* faz transdução desses genes *nif*, as pesquisas foram facilitadas. Foi através da transdução por esse fago que os autores verificaram que os genes *nif* estão entre o gene *his* (histidina) e *shi* A (shiquimato permease) e foi observado também serem marcas ligadas por apresentarem co-transdução.

CANNON e col (1976) produziram híbridos entre *K. pneumoniae* fixadora de nitrogênio, usada como doadora e *E. Coli* não fixadora de nitrogênio, portanto usada como receptora. Esses híbridos eram geneticamente instáveis, mas fixavam nitrogênio.

Para os genes *nif*, observaram-se duas variações que permitem a ocorrência de conjugação:

1. quando os genes *nif* estão numa célula que carrega um plasmídeo R, que é um plasmídeo conjugativo.

2. quando no organismo existe um plasmídeo F que pode se integrar no cromossomo e ao desintegrar leva os genes *nif*, formando o plasmídeo F'. Posteriormente esses genes *nif* podem ser facilmente transferidos durante o contato de células de uma doadora fixadora de nitrogênio F' para uma receptora não fixadora.

Esses genes *nif*, como qualquer gene, estão sujeitos a um mecanismo de regulação. SHANMUGAM e col (1976) propuseram um sistema regulador que é tido como um dos mais sofisticados em bactérias. Os genes *nif* codificam a síntese da nitrogenase que catalisa a fixação do nitrogênio atmosférico. A glutamina sintetase é a enzima que regula indiretamente a síntese da nitrogenase. Altas concentrações de glutamina e outros aminoácidos regulam a atividade da glutamina sintetase por retroinibição e a ausência de glutamina sintetase ativa, suprime a fixação, pois nessas células não há necessidade de nitrogênio fixado para produção de aminoácido.

Sabe-se também que a amônia, talvez por ser uma forma combinada de nitrogênio, cessa a fixação de nitrogê

nio.

Os mesmos autores descreveram alguns mutantes relacionados com o sistema de regulação. O primeiro foi o mutante chamado de *gln A<sup>-</sup>*, que falha na síntese da glutamina sintetase, não podendo portanto sintetizar nitrogenase. Outro mutante isolado foi o mutante *nif C<sup>-</sup>*, no qual a síntese da nitrogenase é constitutiva.

*CANNON e POSTGATE (1976)* fizeram a transferência intergenérica de genes *nif* da *K. pneumoniae*, carregado pelo plasmídeo RP41, para *Azotobacter vinelandii*.

*KENNEDY (1977)* por análise genética em *K. pneumoniae*, descreveu sete cistrons especificamente ligados com a fixação de nitrogênio: *nif B nif A (nif L) nif F nif E nif K nif D nif H*, divididos respectivamente em dois grupos: um grupo proximal do locus da histidina, que compreende *nif BA(L)F* e um grupo distal do locus da histidina, que compreende *nif EKD H*. *Nif A* e *nif F* são responsáveis pela regulação da fixação de nitrogênio e os *nif K, nif D e nif H*, determinam os polipeptídeos da nitrogenase. A função do *nif E* não é conhecida. Entre *nif F* e *nif E* há uma sequência de DNA que talvez não esteja relacionada com a fixação de nitrogênio.

*SHANMUGAM e VALENTINE (1975)* propuseram uma hipótese para a produção de grande quantidade de plasmídeo *nif*

que seriam posteriormente inseridos, por técnicas não conhecidas, em células de plantas.

*OKON e col (1976)* demonstraram, usando cloranfenicol em culturas de *S. lipoferum*, a necessidade de ocorrer síntese protéica para haver restauração da atividade da nitrogenase.

As seguintes possibilidades das aplicações práticas de organismos fixadores de nitrogênio foram citadas por *AZEVEDO (1979)*:

1. aumento de eficiência-mutantes com alta capacidade de fixação de nitrogênio.

2. uso de marcos genéticos para estudos ecológicos, como marcas para resistência a drogas.

3. mutantes constitutivos para o sistema de regulação, já que esses mutantes continuam a fixar nitrogênio mesmo na presença de nitrogênio já fixado.

4. engenharia genética, transferência de genes *nif* tanto para bactérias não fixadoras como para plantas.

### 3.6. Antibióticos

O estudo genético de resistência a drogas foi impulsionado quando *LURIA e DELBRUCK (1943)*, *DEMEREK (1948)*,

*NEWCOMBE (1949)*, *LEDERBERG e LEDERBERG (1952)* e *CAVALLI-SFORZA e LEDERBERG (1956)* provaram que o fenômeno da resistência era causado por mutação, mas que a droga não induzia a mutação, apenas seleciona os mutantes resistentes, eliminando as bactérias sensíveis. Assim foi abandonada a teoria da adaptação fenotípica, que dizia que a mutação ocorria somente na presença da droga e foi aceita a teoria genética onde a mutação ocorre espontaneamente e ao acaso.

Com isto várias técnicas de seleção desses mutantes foram aparecendo e destas técnicas, a placa gradiente (*BRYSON e SZYBALSKI, 1952*) é usada até hoje para isolar mutantes resistentes a drogas que tenham resistência obtida através do mecanismo de múltiplos passos.

Revisões sobre a genética e mecanismos de resistência aos antibióticos são numerosas, incluindo aspectos de resistência cromossômica e extra-cromossômicas a drogas antimicrobianas. Entre elas podem citar *LACAZ (1975)* e *AZEVEDO (1977)*.

#### 4. MATERIAL E MÉTODOS

##### 4.1. Material

###### 4.1.1. Linhagem

Foi usada a bactéria fixadora de nitrogênio, em gramíneas, *Azospirillum brasilense*, cedida pelo Dr. José Otávio Machado (Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, UNESP, Jaboticabal).

###### 4.1.2. Drogas e sua origem

Penicilina G Potássica (Pc)	Squibb Indústria Química S.A.
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	Indústrias Farmacêuticas Fontoura-Wyeth S.A.
Estrolato de Eritromicina (Em)	Eli Lilly Laboratório Farmacêutico.
Cloranfenicol (Cm)	Parker Davis Ltda.

Tetraciclina (Tc)	Laborterápica Bristol S.A.
Ácido Nalidíxico (Nx)	Winthrop Products Inc.
Bicloreto de Mercúrio (Hg)	E. Merck.
Hetacilina Potássica (He)	Laborterápica Bristol S.A.
Sulfato de Canamicina (Km)	Laborterápica Bristol S.A.
Sulfato de Gentamicina (Gm)	Schering.

#### 4.1.3. Meios de Cultura

##### 4.1.3.1. Meio de ágar batata (*VON BULOW* e *DÖBEREINER, 1975* modificado)

Batata .....	200,0
Ácido Málico .....	2,5g
Sacarose .....	2,5g
Solução alcoólica de azul de bromoti- mol à 0,5% .....	2 gôtas.
pH ajustado para 6,8 - 7,0 com KOH.	

Esse meio de cultura foi usado para estoque. Após incubação, a superfície do meio foi coberto com nujol esterilizado.



4.1.3.2. Meio Mínimo (AZEVEDO e COSTA, 1973 - MM).

$K_2HPO_4$ .....	7,0g
$KH_2PO_4$ .....	3,0g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	1,0g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,1g
Citrato de Sódio .....	0,5g
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000,0ml
Glicose - concentração final .....	0,2%
pH ajustado para 7,2 com NaOH 4%	

4.1.3.3. Meio Mínimo Citrato (AZEVEDO e COSTA, 1973 modificado - MMm).

$K_2HPO_4$ .....	7,0g
$KH_2PO_4$ .....	3,0g
$(NH_4)_2SO_4$ .....	1,0g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$ .....	0,1g
Citrato de Sódio .....	5,0g
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000,0ml
pH ajustado para 7,2 com NaOH 4%	

4.1.3.4. Meio Completo (Nutrient Agar - Difco-NA).

Extrato de carne .....	3,0g
Peptona .....	5,0g
Ágar .....	15,0g
Água destilada .....	1000,0ml

4.1.3.5. Nutriente Líquido (Nutriente Broth - Difco - NL).

Extrato de carne .....	3,0g
Peptona .....	5,0g
Água destilada .....	1000,0ml

4.1.3.6. Caldo Infusão Cérebro e Coração  
(Brain Heart Infusion - Difco. BHI)

Infusão de cérebro .....	200,0g
Infusão de coração .....	250,0g
Proteose peptona .....	10,0g
Dextrose .....	2,0g
NaCl .....	5,0g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> .....	2,5g
Água destilada .....	1000,0ml

#### 4.1.4. Solução Salina

NaCl ..... 9,0g  
Água destilada ..... 1000,0ml

9,0 ml da solução salina foram distribuídos em frascos e autoclavados.

#### 4.2. Métodos

##### 4.2.1. Esterilização e incubação

Os meios de cultura e as soluções foram esterilizados em autoclave à 120°C por 20 minutos.

A temperatura de incubação foi de 30°C.

##### 4.2.2. Determinação do meio de cultura

Com alça de níquel-cromo, o *Azospirillum brasilense*, foi semeado do estoque para placas contendo ágar batata sólido.

As bactérias crescidas nestas placas foram repicadas nos seguintes meios de cultura: meio mínimo (sólido e líquido), meio mínimo modificado, nutriente ágar, nutriente líquido, BHI (sólido e líquido).

Após incubação à 30°C por 48 horas os resultados foram observados.

#### 4.2.3. Curva de crescimento

O crescimento das bactérias foi medido pelo método de contagem de colônias em placas.

*A. brasilense* foi crescido em NL por 48 horas, depois foi diluído até obter-se aproximadamente  $10^3$  células.

Da última diluição foram inoculados tubos de NL com 1 ml de inóculo cada tubo e incubados à 37°C por diferentes intervalos de tempo, que seguem: 0, 1, 2, 4, 6, 12, 18 e 20 horas.

Passados os tempos respectivos foi semeado 0,1 ml em placas com ágar nutriente. As células que cresceram quatro horas ou mais, foram diluídas antes de serem colocadas nas placas para permitir a contagem de colônias.

Após incubação por 72 horas, à 37°C procedeu-se a contagem das colônias.

#### 4.2.4. Determinação dos níveis de resistência

As soluções das drogas foram preparadas nos seguintes diluentes:

a. água destilada esterilizada para: penicilina, estreptomicina, bicloreto de mercúrio, gentamicina e heptacilina.

b. 0,5 ml de NaOH 0,1 N para ácido nalidíxico, completado com água destilada esterilizada.

c. 0,5 ml de álcool metílico para: cloranfenicol, tetraciclina, eritromicina, posteriormente completado o volume com água destilada esterilizada. Todas as soluções padrões foram preparadas numa concentração de 10.000 mcg/ml, posteriormente diluída em água destilada esterilizada até a concentração adequada para se obter as concentrações finais de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 mcg da droga por mililitro de meio de cultura.

Os níveis de resistência foram determinados pelo método das diluições em placas, onde o meio de cultura (NA) é mantido à 45°C em banho maria, já separados em tubos com 20 ml cada um, posteriormente é misturado o antibiótico, sendo então preparadas várias placas de Petri contendo meio de cultura e antibiótico nas concentrações citadas acima. Obtem-se então uma série de diluições da droga em meio sólido. (FAVA NETO, 1975).

A amostra de *A. brasiliense* a ser usada, foi inoculada em NL e colocada para incubar à 30°C, 48 horas antes do preparo das placas com os antibióticos. Com alça de níquel-cromo as bactérias foram inoculadas do NL para as placas com antibiótico, por estria.

Como controle da viabilidade da amostra foram usadas placas contendo o meio de cultura, sem antibiótico.

Após incubação por 48-72 horas à 30°C os resultados foram anotados.

Os níveis de resistência dos mesmos antibióticos foram também medidos em meio líquido (NL), para as mesmas concentrações dos antibióticos.

Após incubação por 48-72 horas à 30°C os resultados foram observados por turvação do meio de cultura, resultado de crescimento.

Foi considerado como nível de resistência a concentração da droga imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento da amostra.

#### 4.2.5. Obtenção e isolamento de mutantes resistentes às drogas

##### 4.2.5.1. Isolamento de mutantes resistentes à penicilina, cloranfenicol e tetraciclina

A técnica usada foi da placa gradiente de *BRYSON e SZYBALSKI (1952)*. Dez ml. de meio de cultura sem antibióticos foi vertido na placa com uma inclinação de 6mm. De-

pois do meio de cultura estar solidificado mais 10 ml de meio, agora com antibiótico na concentração desejada, foi vertido na placa sem inclinação.

Solidificado o meio de cultura, as placas foram entreabertas, em ambiente asséptico, para eliminação do excesso de umidade da superfície.

Para penicilina foram feitas duas transferências para gradientes crescentes: um gradiente de 0 a 500 mcg/ml e outro de 0 à 1000 mcg/ml.

Para cloranfenicol foram feitas quatro transferências para gradientes crescentes: um gradiente de 0 à 5 mcg/ml outro de 0 à 10 mcg/ml, outro de 0 à 20 mcg/ml e último de 0 à 40 mcg/ml.

Para tetraciclina foram feitas quatro passagens para gradientes crescentes: um de 0 à 1 mcg/ml, outro de 0 à 2 mcg/ml outro de 0 à 4 mcg/ml e o quarto de 0 à 8mcg/ml.

Para procederem-se as transferências foi retirada a colônia crescida, isolada, mais próxima da maior concentração do antibiótico, que foi então inoculada em NL. Após incubação à 30°C por 48 horas alíquotas foram semeadas em placa com gradiente maior e assim sucessivamente até a placa gradiente mais alta.

As colônias que apareceram no último gradiente, foram passadas em NL incubadas a 30°C por 48 horas e depois ensaiadas em placas com concentrações crescentes até a maior concentração usada em placa gradiente. Nestas placas se meou-se de um lado a bactéria original e do outro o mutante resistente.

Observou-se o crescimento.

#### 4.2.5.2. Isolamento de mutantes resistentes a estreptomicina.

Quarenta ml de uma cultura da amostra incubada por 72 horas a 30°C, foi centrifugada a 6000 rpm por 15 minutos e ressuspensa em 4,4 ml do salina.

Um ml dessa suspensão foi diluída  $10^8$  vezes e das três últimas diluições foram semeadas 0,1 ml, com alças de Drigalsky em placas com NA sem antibiótico. Após incubação foi escolhida a placa mais apropriada para o cálculo do título da ressuspensão.

Para a estreptomicina foram feitas 19 placas com 20 ml de NA mais estreptomicina numa concentração final de 500 mcg/ml.

Em cada placa foi semeado 0,2 ml de ressuspensão e espalhadas com alça de Drigalski.



Todas as placas foram incubadas à 30°C por 48 horas, posteriormente as colônias foram contadas tanto das placas usadas para título, como das placas usadas para obtenção de mutantes.

O número de colônias desenvolvidas nas placas acrescida de antibiótico corresponde ao número de bactérias mutantes.

Posteriormente essas colônias resistentes foram inoculadas em NL e incubadas à 30°C por 48 horas.

Uma placa com NA mais estreptomicina(500mcg/ml) foi preparada para o ensaio da resistência. Inoculou-se, por estria, de um lado a bactéria original, do outro a mutante. Incubou-se por 48 horas à 30°C e observou-se o crescimento.

#### 4.2.6. Comparação do crescimento da linhagem original com as linhagens mutantes resistentes.

Foram feitas culturas em NL da linhagem original e das quatro linhagens mutantes resistentes obtidas: clo-ranfenicol, penicilina, tetraciclina e estreptomicina, que foram incubadas à 30°C por 72 horas.

Após esse tempo as culturas foram diluídas em salina, até obter-se  $10^3$  células. Da última diluição transferiu-se 1 ml para 10 ml de meio líquido (NL). Desses tubos de

NL foram imediatamente semeados 0,1 ml em placas de Petri com NA, correspondentes ao tempo zero ( $t_0$ ) de incubação.

Esses mesmos tubos foram colocados para incubar à 30°C. Após 8 horas ( $t_8$ ) retirou-se 1 ml das amostras, diluiu-se  $10^{-5}$  vezes e das três últimas diluições, foram semeadas 0,1 ml em placas com NA. Após 13 horas ( $t_{13}$ ) retirou-se novamente 1 ml e diluiu-se  $10^{-6}$  vezes, semeando 0,1 ml das três últimas diluições em placas com NA.

Para tetraciclina foram semeadas as diluições  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$  e  $10^{-3}$  tanto após 8 horas como após 13 horas.

Todas as placas ( $t_0$ ,  $t_8$  e  $t_{13}$ ) foram incubadas à 30°C por 48 horas. Após esse tempo procedeu-se a contagem das colônias.

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Determinação do meio de cultura

De acordo com o ítem 4.2.2. a bactéria em estudo foi ensaiada em alguns meios de cultura para observar-se o crescimento.

A temperatura de incubação foi de 30°C.

Tabela 1. Crescimento do *Azospirillum brasilense* em diferentes meios de cultura.

Tempo de incubação em horas	Meios									
	NA	NL	BHIsól	BHiliq	MMsol	MMliq	MMsol	MMliq	MMliq	MMliq
24	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
48	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+

+ Crescimento

- ausência de crescimento

NA Nutriente ágar. MM Meio mínimo. NL Nutriente líquido.

MMm Meio mínimo citrato. BHI Caldo infusão cérebro e coração.

A Tabela 1. mostra que em meio líquido, por inspeção visual, o crescimento pareceu ser mais demorado do que em meio sólido.

Observou-se que em meio mínimo, tanto na forma sólida como líquida, não houve crescimento; no entanto, crescimento ocorreu em meio mínimo modificado (MMm).

## 5.2. Curva de crescimento

De acordo com o item 4.2.3. foi feita a curva de crescimento do *Azospirillum brasilense*, pelo método de contagem de colônia em placa, a partir da qual foi calculado o título.

A temperatura de incubação foi 30°C.

Tabela 2. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em diversos tempos.

Horas	Diluição (a)	Número médio de bactérias por placa (b)	Título	Redução a uma Bactéria
0	s/d	40,0	$4,0 \times 10^2$	1,00
1	s/d	58,0	$5,8 \times 10^2$	1,45
2	s/d	92,5	$9,2 \times 10^2$	2,30
4	$10^{-1}$	46,0	$4,6 \times 10^3$	$1,15 \times 10^1$
6	$10^{-2}$	28,5	$2,8 \times 10^4$	$7,10 \times 10^1$
12	$10^{-4}$	12,5	$1,2 \times 10^6$	$3,10 \times 10^3$
18	$10^{-6}$	14,0	$1,4 \times 10^8$	$3,50 \times 10^5$
20	$10^{-6}$	64,0	$6,0 \times 10^8$	$1,50 \times 10^6$

(a) Foram semeados 0,1 ml

(b) Média de três placas

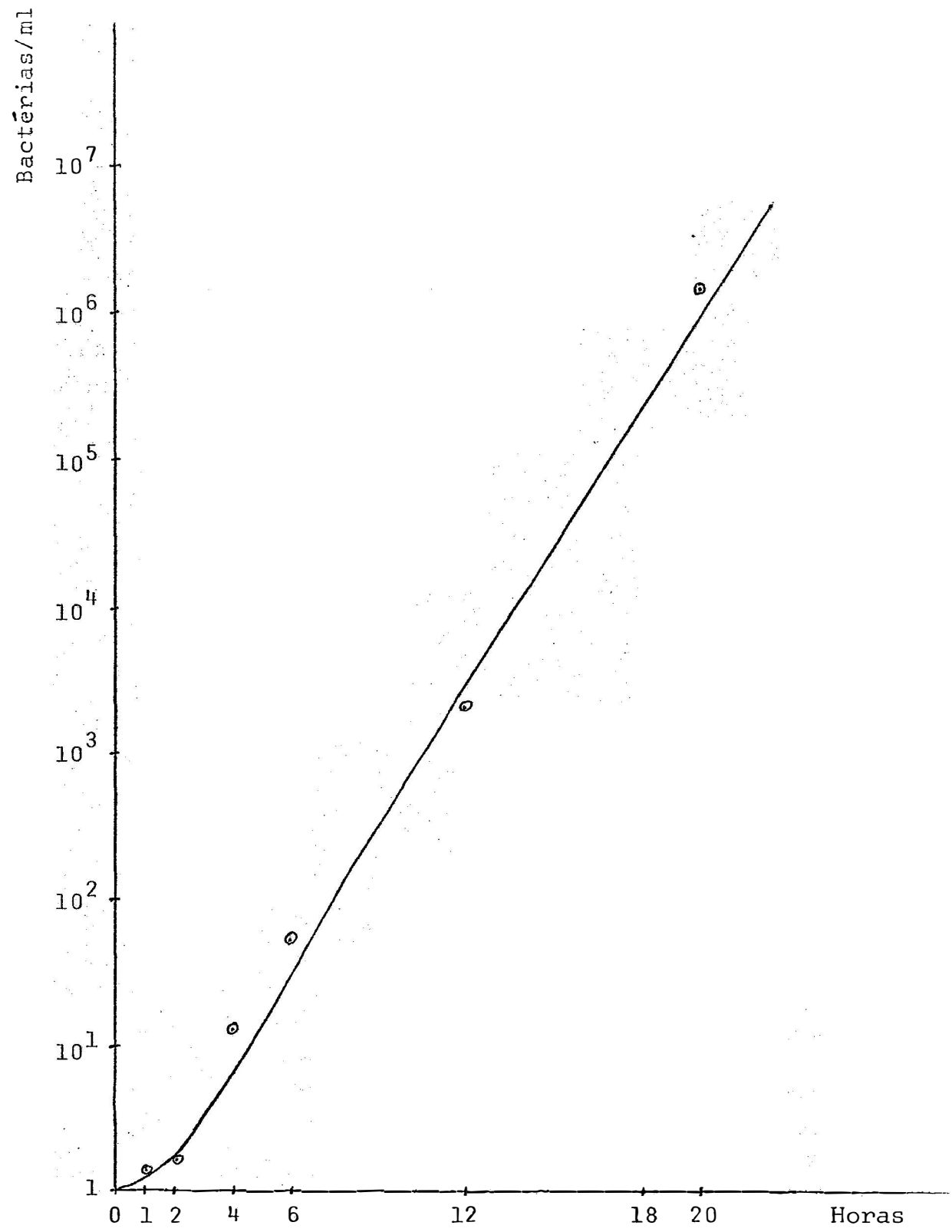


Gráfico 1. Curva de crescimento do *Azospirillum brasilense*.

A Tabela 2 e o Gráfico 1 correspondem aos dados da curva de crescimento.

A linhagem estudada mostrou uma lag fase de aproximadamente duas horas; vindo após a fase logarítmica. O tempo de geração foi calculada pela fórmula  $N_f = N_i \times 2^n$  (LARPENT e LARPENT-GOURGAUD, 1975), utilizando-se 2 pontos da fase logarítmica de crescimento. (6 horas e 12 horas) onde  $N_f$  é o nº de bactérias no tempo 12 horas,  $N_i$  o número de bactérias no tempo 6 horas e  $n$  é o número de gerações no intervalo de tempo correspondente (6 horas).

O tempo de geração encontrado foi aproximadamente de 66 minutos.

### 5.3. Níveis de Resistência

De acordo com o item 4.2.4. foram determinados os níveis de resistência do *Azospirillum brasilense* a várias drogas, pelo método das diluições em placas.

A temperatura de incubação foi 30°C.

Os resultados obtidos podem ser encontrados na Tabela 3.



Tabela 3. Crescimento do *Azospirillum brasilense* em diferentes concentrações das drogas, em meio sólido (NA).

Concentração (mcg/ml)	Drogas									
	Tc	Pc	Cm	Sm	Em	Nx	Hg	Km	He	Gm
0,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,0	-	+	-	+	+	(-)	-	+	+	+
10,0	-	+	-	+	+	(-)	-	-	+	(+)
20,0	-	+	-	+	+	(-)	-	-	+	(+)
50,0	-	+	-	(+)	+	-	-	-	+	(+)
100,0	-	+	-	(+)	+	-	-	-	+	-
200,0	-	+	-	-	(+)	-	-	-	+	-
500,0	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-
1000,0	-	-	-	-	(+)	-	-	-	-	-

+ Crescimento

- ausência de crescimento

(+) Colônias de menor tamanho

(-) Forma colônias na região da estria por onde se iniciou a inoculação.

Para tetraciclina, foram usadas concentrações menores que 1 mcg/ml, porque essa concentração já é suficiente para inibir o crescimento do *A. brasilense*. Os resultados estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Crescimento do *A. brasilense* em concentrações menores que 1,0 mcg/ml de tetraciclina.

Concentração mcg/ml	Tc
0,0	+
0,1	+
0,2	+
0,4	+
0,5	+
0,6	+
0,8	-

A concentração das diferentes drogas, imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento da amostra foi para tetraciclina - 0,6 mcg/ml, penicilina - 200 mcg/ml, cloranfenicol - 2 mcg/ml, estreptomicina - 20 mcg/ml, eritromicina - 100 mcg/ml, ácido nalidixico - 2 mcg/ml, bicloreto de mercúrio - 2 mcg/ml, canamicina - 5 mcg/ml, hetaciclina - 200 mcg/ml e gentamicina - 5 mcg/ml.

Com 50 e 100 mcg/ml de estreptomina, 200 a 1000 mcg/ml de eritromicina e 10 a 50 mcg/ml de gentamicina, ocorre crescimento, sã que as colônias formadas são de menor tamanho, aparecendo em toda a extensão do inóculo por estria.

Com 5 a 20 mcg/ml de ácido nalidíxico há crescimento somente no princípio da estria, ou seja, por onde se iniciou a inoculação da bactéria aparecendo colônias grandes e isoladas.

Nas tabelas 5 e 6 estão apresentados os dados referentes ao crescimento da bactéria em diferentes concentrações das drogas ensaiadas em meio líquido (NL).

Tabela 5. Crescimento do *A. brasilense* em diferentes concentrações das drogas, em meio líquido (NL).

Concentrações (mcg/ml)	Drogas									
	Tc	Pc	Cm	Sm	Em	Nx	Hg	Km	Hc	Gm
0,0	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
1,0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2,0	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
5,0	-	+	-	+	+	-	-	(+)	+	+
10,0	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+
20,0	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
50,0	-	+	-	+	+	-	-	-	+	-
100,0	-	+	-	-	(+)	-	-	-	+	-
200,0	-	(+)	-	-	-	-	-	-	+	-
500,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
1.000,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ Turvação

- ausência de turvação

(+) pouca turvação

Tabela 6. Crescimento do *A. brasilense* em concentrações menores que 1,0 mcg/ml de tetraciclina.

Concentração mcg/ml	Tc
0,0	+
0,1	+
0,2	+
0,4	+
0,5	+
0,6	+
0,8	-

Para tetraciclina, cloranfenicol, ácido nalidíxico, bicloreto de mercúrio, hetacilina e gentamicina os níveis de resistência observados por inspeção visual, através da turvação, foram iguais aos níveis de resistência medido em meio sólido.

No entanto, para penicilina em meio líquido, foi 100 mcg/ml, estreptomicina - 50 mcg/ml, eritromicina - 50 mcg/ml e canamicina - 2 mcg/ml.

Observou-se também que com 200 mcg/ml de penicilina, 100 mcg/ml de eritromicina e 5 mcg/ml de canamicina ocorreu pouca turvação, indicando menor crescimento.

#### 5.4. Isolamento de mutantes resistentes

##### 5.4.1. Isolamento de mutantes resistentes à penicilina, cloranfenicol e tetraciclina.

As placas usadas para teste dos mutantes resistentes obtidos nas placas gradiente foram de: 500 e 1000 mcg/ml na penicilina; 5 a 40 mcg/ml para cloranfenicol, onde foram feitos 6 gradientes e 1 a 8 mcg/ml de tetraciclina, passando-se por 5 gradientes.

Os resultados de obtenção de linhagens resistentes estão na Tabela 7.

Tabela 7. Mutantes resistentes obtidos em placa gradiente.

Concentração mcg/ml	Pc		Cm		Tc	
	mutante	original	mutante	original	mutante	original
0	+	+	+	+	+	+
1	+	+	+	+	+	-
2	+	+	+	+	+	-
5	+	+	+	-	-	-
10	+	+	+	-	-	-
20	+	+	+	-	-	-
25	+	+	+	-	-	-
30	+	+	+	-	-	-
35	+	+	+	-	-	-
40	+	+	+	-	-	-
50	+	+	+	-	-	-
100	+	+	+	-	-	-
200	+	+	+	-	-	-
500	+	-	-	-	-	-
1000	+	-	-	-	-	-

+ crescimento

- ausência de crescimento

Pela Tabela 7 observamos que foram selecionadas linhagem resistente à 1000 mcg/ml de penicilina, outra resistente à 200 mcg/ml de cloranfenicol e outra resistente à 2 mcg/ml de tetraciclina.

Fica salientado que para penicilina a linhagem encontrada pode ser resistente a concentrações mais altas desse antibiótico, concentrações que não foram testadas.

#### 5.4.2. Isolamento e frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.

A Tabela 8 apresenta os resultados da frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.



Tabela 8. Frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.

número médio de colônias/placa (0,1 ml/placa)	Diluição	número inicial de bactérias/ml	número total de colônias $Sm^r$ obtidas (0,2 ml/placa, 19 placas)	número de bactérias mutante em $10^6$ células
336	$10^{-6}$	$3,36 \times 10^9$	5082	2,5

$Sm^r$  - estreptomicina resistente

Nas placas com estreptomomicina foram inoculadas 0,2 ml por placa, de tal modo que no total (19 placas) foram inoculados 3,8 ml, e portanto, cerca de aproximadamente  $1,3 \times 10^{10}$  bactérias. Nessas placas com 500 mcg/ml de estreptomomicina foram contadas 5082 colônias resistentes. Portanto, a frequência de mutantes resistentes à estreptomomicina foi de um mutante em  $2,5 \times 10^6$  bactérias. A linhagem resistente e a linhagem original foram ensaiadas com 500 mcg/ml de estreptomomicina.

Os resultados estão na Tabela 9.

Tabela 9. Crescimento das linhagens original e resistentes na presença de estreptomomicina.

Concentração mcg/ml	Crescimento	
	original	resistente
0	+	+
500	-	+

+ crescimento

- ausência de crescimento

Na placa teste (com 500 mcg/ml) a linhagem original não cresceu e a linhagem mutante cresceu.

Nesse teste não foram usadas concentrações

maiores que 500 mcg/ml, podendo essa linhagem ser resistente a concentrações mais altas de estreptomicina.

#### 5.4.3. Comparação do crescimento da linhagem original com as linhagens mutantes resistentes.

Foram comparados, segundo item 4.2.6., os crecimentos da linhagem original com as linhagens mutantes, para determinar se as mutações para resistência a drogas influenciaram ou não no tempo de geração do *A. brasiliense*.

Tabela 10. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em três tempos diferentes.

Horas	Linhagem	Diluição <sup>(a)</sup>	Número médio de bactérias por placa <sup>(b)</sup>	Título (bact./ml)
0	original	S/D	600,0	$6,00 \times 10^3$
	Sm <sup>r</sup>	S/D	470,0	$4,70 \times 10^3$
	Tc <sup>r</sup>	S/D	63,0	$6,30 \times 10^2$
	Pc <sup>r</sup>	S/D	527,0	$5,27 \times 10^3$
	Cm <sup>r</sup>	S/D	295,0	$2,95 \times 10^3$
8	original	$10^{-3}$	427,0	$4,27 \times 10^6$
	Sm <sup>r</sup>	$10^{-5}$	3,5	$3,50 \times 10^6$
	Tc <sup>r</sup>	$10^{-1}$	135,0	$1,35 \times 10^4$
	Pc <sup>r</sup>	$10^{-3}$	36,0	$3,60 \times 10^5$
	Cm <sup>r</sup>	$10^{-3}$	256,0	$2,56 \times 10^6$
13	original	$10^{-5}$	95,5	$9,55 \times 10^7$
	Sm <sup>r</sup>	$10^{-5}$	65,0	$6,50 \times 10^7$
	Tc <sup>r</sup>	$10^{-2}$	129,0	$1,29 \times 10^5$
	Pc <sup>r</sup>	$10^{-4}$	51,0	$5,10 \times 10^6$
	Cm <sup>r</sup>	$10^{-5}$	67,0	$6,70 \times 10^7$

(a) Foram semeados 0,1 ml

Tc<sup>r</sup> - tetraciclina resistente

(b) média de três placas

Pc<sup>r</sup> - penicilina resistente

Sm<sup>r</sup> - estreptomicina resistente

Cm<sup>r</sup> - cloranfenicol resistente

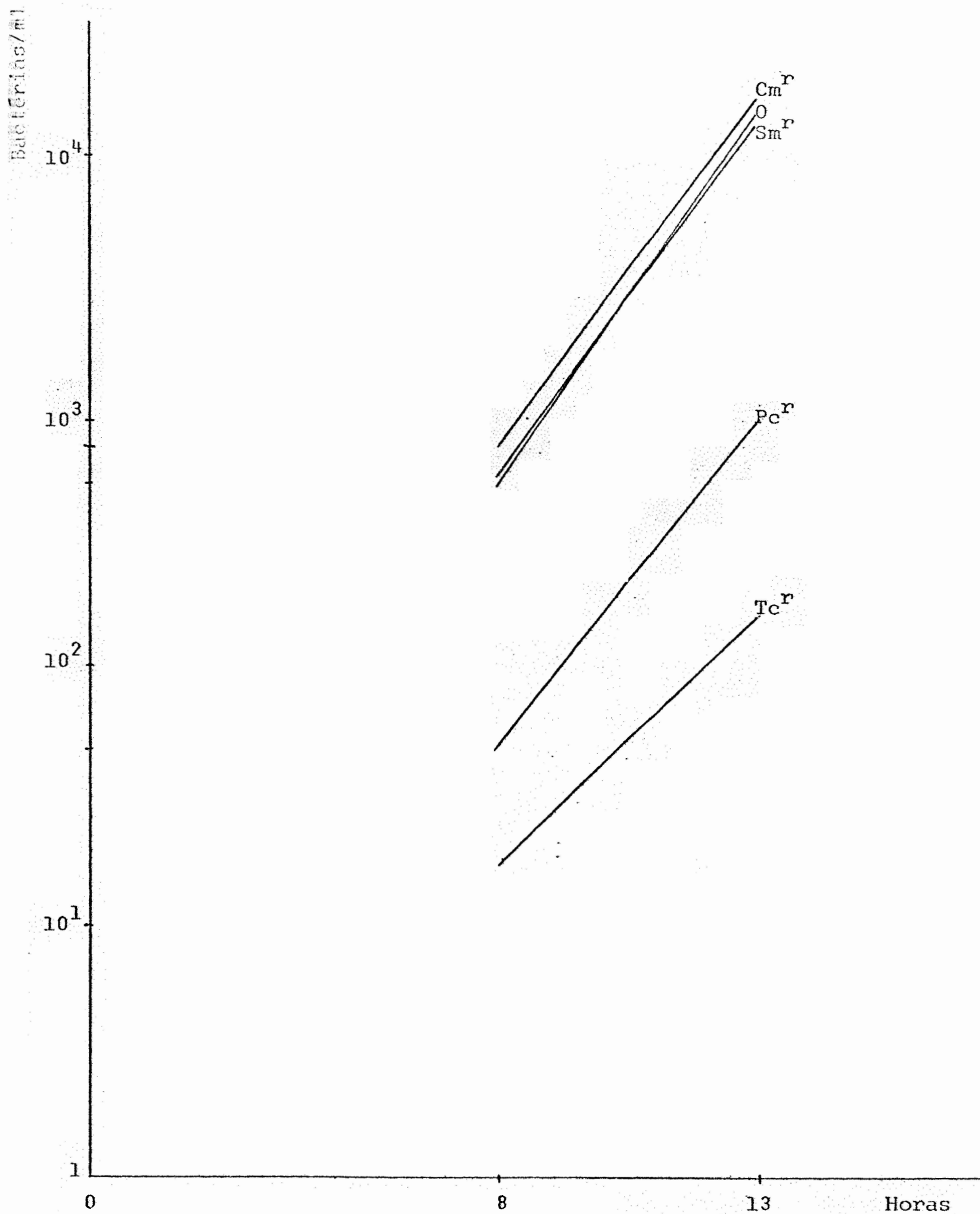


Gráfico 2. Número médio de bactérias viáveis, por ml de meio de cultura, em função de dois tempos ( $t_8$  e  $t_{13}$ ), para as linhagens original e mutantes resistentes à estreptomicina ( $Sm^R$ ), penicilina ( $Pc^R$ ), tetraciclina ( $Tc^R$ ) e clovanfenicol ( $Cm^R$ ).

A Tabela 10 mostra o número de bactérias por ml de meio de cultura, no tempo de zero, oito e treze horas.

Com o número de bactérias após oito e treze horas foi calculado o tempo de geração para a linhagem original e as linhagens mutantes resistentes.

O cálculo do tempo de geração foi feita pela fórmula  $N_f = N_i \times 2^n$  (LARPENT e LARPENT - GOURGAUD, 1975), a mesma usada no item 5.2.

Os tempos de geração encontrados estão na Tabela 11.

Tabela 11. Tempos de geração, da linhagem original e das linhagens mutantes resistentes a antibióticos em *A. brasilense*.

Linhagens	Tempo de Geração (minutos)
original	66
Sm <sup>r</sup>	71
Tc <sup>r</sup>	90
Pc <sup>r</sup>	78
Cm <sup>r</sup>	64

Sm<sup>r</sup> estreptomicina resistente      Pc<sup>r</sup> Penicilina resistente

Tc<sup>r</sup> tetraciclina resistente      Cm<sup>r</sup> cloranfenicol resistente

Foi determinada a meia vida relativa (M<sub>Vr</sub>) das linhagens mutantes resistentes em relação à linhagem original, pelo método proposto por *BERGAMIN FILHO e col. (1975)*, usando-se os tempos oito e treze (Tabela 10, Gráfico 2).

Os resultados obtidos estão na Tabela 12.

Tabela 12. M<sub>Vr</sub> das linhagens mutantes resistentes.

Linhagens	M <sub>Vr</sub> (horas)
Sm <sup>r</sup>	34,65
Tc <sup>r</sup>	0,81
Pc <sup>r</sup>	1,24
Cm <sup>r</sup>	(-) <sub>8,66</sub>

Sm<sup>r</sup> estreptomicina resistente      Pc<sup>r</sup> Penicilina resistente

Tc<sup>r</sup> tetraciclina resistente      Cm<sup>r</sup> cloranfenicol resistente

(-) indica que esse tempo é o tempo necessário para a linhagem mutante dobrar em relação à linhagem original.

## 6. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

### 6.1. Meios de cultura e curva de crescimento

Pela Tabela 1 verificamos que o *Azospirillum brasilense* cresce bem em todos os meios de cultura ensaiados com exceção do meio mínimo.

Comparando-se a composição do meio mínimo e do meio mínimo modificado observa-se que o meio mínimo modificado não contém glicose e a fonte de carbono é o citrato de sódio, que é usado pela *A. brasilense* possibilitando o seu crescimento.

Nos três meios líquidos onde cresceu o *A. brasilense* (NL, BHI liq. e MMm liq.), observamos que o crescimento foi aparentemente mais demorado, não havendo crescimento visível por turvação após 24 horas de incubação.

O crescimento do *A. brasilense* em meio mínimo



possibilita um estudo dessa bactéria sob o ponto de vista genético; para que se tenham definidos os tipos de recombinação nessa bactéria há necessidade de se construírem linhagens com marcadores genéticos apropriados. Marcas para auxotrofia são extremamente úteis e assim, com um meio mínimo apropriado como o MMm elas poderão ser obtidas e então utilizadas, como já vem sendo tentado em outros laboratórios (LEMOS, M.V., *com. pessoal*).

A curva de crescimento do *A. brasilense* obtida em meio completo revelou um tempo de geração de aproximadamente 66 minutos (Tabela 2 e Gráfico 1).

Esse tempo é bem maior que o encontrado em outras bactérias como a *Escherichia coli*, largamente usada em estudos genéticos. Embora esse tempo de crescimento retarde um pouco a obtenção de resultados com o *A. brasilense* quando usada para experimentos em genética, não constitui fator limitante para seu estudo se ela for empregada para aspectos aplicados visando o seu melhoramento genético.

## 6.2. Níveis de resistência e isolamento de mutantes resistentes

Os níveis de resistência em meio sólido e meio líquido (Tabelas 3, 4, 5 e 6) de *A. brasilense* revelam que ela é naturalmente resistente à penicilina (200 mcg/ml), eri-

tromicina e hetacilina (200 mcg/ml), o que era de se esperar, pois se trata de bactéria Gram negativa. Por outro lado ela é bastante sensível a antibióticos como a tetraciclina, cloranfenicol e canamicina.

Verifica-se que em meio líquido para algumas drogas os níveis de resistência foram menores quando comparados com os níveis de resistência das mesmas drogas em meio sólido.

Posteriormente foram isolados mutantes resistentes obtidos espontaneamente através da técnica seletiva em placas contendo antibióticos em uma determinada concentração (para os antibióticos com modelo de resistência monogênica) e placas gradientes (para os antibióticos com modelo de resistência poligênica).

Os mutantes resistentes foram obtidos em múltiplos passos para a penicilina, cloranfenicol e tetraciclina, em um único passo para a estreptomina.

Os mutantes para penicilina são cinco vezes mais resistentes que a linhagem original, os mutantes para cloranfenicol são cem vezes mais resistentes que a linhagem original, os mutantes para tetraciclina cerca de três vezes mais resistentes e os mutantes para estreptomina vinte e cinco vezes mais resistentes que a linhagem original.

As drogas que apresentam modelos de resistência do tipo múltiplos passos, adquirem pequeno aumento na resistência em cada passo, (CARLBERG, 1976), sendo que os nossos mutantes resistentes a penicilina e tetraciclina demonstram isso. No entanto o mutante resistente a cloranfenicol encontrado, aumentou muito e rapidamente e a sua resistência, não afetando praticamente o tempo de geração com relação à linhagem original, isso favorece a hipótese de que a mutação tenha ocorrido em alguma estrutura extracromossômica. Aliás, LEMOS, M.V. (com. pessoal) já faz referência à existência de um possível plasmídeo nessa mesma linhagem bacteriana.

Pelos mutantes resistentes à estreptomicina obtidos, pode-se calcular a frequência com que esses mutantes aparecem. O valor obtido de  $2,5 \times 10^6$  está próximo do que se espera para uma frequência de mutação (cerca de 1 mutante em  $10^6$  células) mas está bem acima dos valores encontrados para a frequência de mutantes resistentes à estreptomicina em outras bactérias. BRAUN (1957) descreve como  $1 \times 10^{10}$  a frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.

### 6.3. Comparação do crescimento da linhagem original com as linhagens mutantes resistentes

Na Tabela 11 encontram-se os tempos de geração da linhagem original e das linhagens mutantes.

Verificou-se que o tempo de geração das linhagens resistentes à estreptomicina, tetraciclina e penicilina parece ter aumentado, o que indica que a taxa de crescimento diminuiu. Já para o mutante resistente ao cloranfenicol o tempo de geração permaneceu praticamente o mesmo daquele da linhagem original.

Segundo *BERGAMIN FILHO e col. (1975)* quando a mutação para resistência a uma determinada droga diminui a taxa de crescimento do organismo mutado significa que a droga em questão é forte, isto é, quando a seleção estabilizadora age sobre o mutante resistente, na ausência da droga.

Segundo os mesmos autores citados acima quando a taxa de crescimento não é alterada a droga é neutra.

Explicam ainda que quando a taxa de crescimento diminui a droga é fraca. Isto ocorre porque o gene que foi mutado para resistência, possivelmente, antes controlasse uma função importante no metabolismo do microrganismo e com a mutação perde essa função. No entanto se esse gene mutado controlasse anteriormente uma função não tão vital à célula a mutação não alteraria sua taxa de crescimento.

Segundo esses mesmos autores ainda, a maioria das drogas fortes são as que apresentam modelos de resistência do tipo múltiplos passos, isto porque a linhagem mutante

perde muitos genes para tornar-se resistente e a maioria das drogas neutras e fracas seriam as que seguem modelo de resistência de um só passo. Penicilina e tetraciclina comportaram-se como drogas fortes. No entanto os nossos dados mostram que o mutante estreptomicina resistente encontrado diminuiu sua taxa de crescimento, indicando ser a estreptomicina uma droga forte, apesar de que resistência à estreptomicina segue o modelo de um único passo.

Segundo *BERGAMIN FILHO e col. (1975)* meia vida relativa (M<sub>Vr</sub>) é o tempo necessário para a população de uma dada linhagem de um microrganismo cair até a metade ou dobrar em relação a uma outra linhagem considerada.

Os dados de M<sub>Vr</sub> estão na Tabela 12. Para as linhagens resistentes à estreptomicina, tetraciclina e penicilina a meia vida relativa é o tempo necessário para essas linhagens cair a metade em relação à linhagem original, já para o mutante resistente ao cloranfenicol, a M<sub>Vr</sub> é o tempo necessário para essa linhagem dobrar em relação à linhagem original. Portanto o cloranfenicol em relação a nossa linhagem é uma droga fraca pois a taxa de crescimento do mutante resistente aumentou.

*BERGAMIN FILHO (1973)* trabalhando com *Corynebacterium michiganense* e *ALVES (1975)* trabalhando com *Rhizobium japonicum* CB - 1809, demonstraram ser a estreptomi-

cina uma droga forte para essas duas bactérias, como encontrado para a nossa linhagem de *Azospirillum brasilense* resistente à estreptomicina.

Esses dados obtidos em nosso trabalho são subsídios de importância para posteriores estudos genéticos.

O tempo de geração do *Azospirillum brasilense*, de 66 minutos, que não chega a ser um fator limitante para seu estudo, a existência de um meio mínimo modificado (MMm) onde ele cresce e a obtenção de linhagens resistentes à drogas, abrem novos campos para o estudo de mutantes auxotróficos, produção de marcos genéticos e posterior melhoramento de espécie para uso prático.

## 7. SUMMARY

The object of this work was a study of the growth of *Azospirillum brasilense*: a nitrogen fixing bacteria and to determine the levels of resistance of this bacteria to ten drugs. Some of these drugs were used to obtain resistant mutant strains. The generation time of the original strain was compared with that of the resistant mutants.

It was found that it is better to use sodium citrate as the source of carbon in the minimal medium.

The levels of resistance were determined by the method of plate dilution. The resistant mutant strains were obtained by the use of plate selection and gradient plate.

The original strain appears to have natural resistance to penicillin, erythromycin and hetacillin.

The generation time of the original strain was 66 minutes; for the mutant strains it was: streptomycin, 71 minutes; tetracycline, 90 minutes and penicillin, 78 minutes. Significantly the generation time of the mutant strain to chloramphenicol was only 64 minutes, less than the generation time of the original strain.

The frequency of mutation to streptomycin was 2,5 mutants/ $10^6$  cells.

With the data of the generation times of the original and mutant strains and the observed relative half-lives (M<sub>Vr</sub>), we concluded that streptomycin, penicillin and tetracycline act as strong drugs and chloramphenicol as a weak drug for *Azospirillum brasilense*.



## 8. BIBLIOGRAFIA CITADA

ABRANTES, G.T.V., J.M. DAY., V.C. CRUZ. e J. DÖBEREINER. 1976a. Fatores limitantes da fixação de nitrogênio em campo de *Digitaria decumbens* cv *transvala*. Anais do XV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Campinas, São Paulo. p. 171-176.

ABRANTES, G.T.V., J.M. DAY e J. DÖBEREINER. 1976b. Métodos para o estudo da atividade da nitrogenase em raízes gramíneas colhidas no campo. Anais do XV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Campinas, São Paulo. p. 137-142.

ALBRECHT, S.L., Y. OKON e R.H. BURRIS. 1977. Effects of light and temperature on the association between *Zea mays* and *Spirillum lipoferum*. Plant Physiology. 60: 528-531.

ALVES, M.F. 1975. Mutantes de *Rhizobium japonicum* (Kirchner) Buchanan, resistentes à estreptomicina e sua infecciosidade. Dissertação para grau de mestre, ESALQ, Piracicaba,

São Paulo.

AZEVEDO, J.L. 1977. Tópicos de Genética Microbiana e Molecular. II Genética de procariontes. ESALQ/USP, Piracicaba. 203 p.

AZEVEDO, J.L. 1979. Genética de bactérias fixadoras de nitrogênio. Atas do II Congresso Latinoamericano de Botânica. Brasília, DF: (no prelo).

AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA.(org.) 1973. Exercícios práticos de genética. Companhia Editora Nacional - USP. São Paulo. 22 p.

BARBER, L.E., J.D. TJEPKEMA, S.A. RUSSEL e H.J. EVANS. 1976. Acetyline reduction (nitrogen fixation) associated with corn inoculated with *Spirillum*. Applied and Environmental Microbiology. 32 (2): 108-113.

BEIJERINCK, M.W. 1925. Apud: KRIEG, N.R. e J.J. TARRAND. 1977. Taxonomy of the root-associated nitrogen - fixing bacterium. Simpósio Internacional sobre Limitações Potenciais da Fixação Biológica de Nitrogênio nos Trópicos. Brasília - D.F. Brasil.

BERGAMIN FILHO, A. 1973. O conceito de força de drogas ilustrado com resistência de *Corynebacterium michiganense* (Smith) Jensen à antibióticos. Dissertação para grau de

mestre. ESALQ, Piracicaba, São Paulo.

BERGAMIN FILHO, A., H. KIMATI e J.L. AZEVEDO. 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*. 1: 31-42.

BRAUN, W. 1957. *Bacterial Genetics*. W.B. Saunder. Philadelphia p. 81-87.

BRYSON, V. e W. SZYBALSKI. 1952. Microbial selection. *Science*. 116: 45-51.

BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, (Ed.), 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8<sup>a</sup> ed. Williams e Wilkins Company, Baltimore. p. 196-207.

CANNON, F.C., C.K. KENNEDY, J.R. POSTGATE e R.A. DIXON. 1976. Construction of an F - prime factor carrying the *Klebsiella pneumoniae nif* genes: a genetic tool for analysis of the nif system. In: NEWTON, W.W. e C.J. NYMAN, Ed. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press. 2: 320-326.

CANNON, F.C. e J.R. POSTGATE. 1976. Expression of *Klebsiella* nitrogen fixation genes (*nif*) in *Azotobacter*. *Nature*. 260: 271-272.

CARLBERG, D.M. 1976. *Essentials of bacterial and viral genetics*. C.C. Thomas. Pub. Springfield. Illinois.

- CAVALLI-SFORZA, L.L. e J. LEDERBERG. 1956. Isolation of pre-adaptative mutants in bacteria by sib-selection. *Genetics*. 41: 367-381.
- CHILD, J.J. e G.W. KURZ. 1978. Inducing effect of plant cells on nitrogenase activity by *Spirillum* and *Rhizobium* in vitro. *Canadian Journal of Microbiology*. 24: 143-148.
- DEMEREK, M. 1948. Origin of bacterial resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*. 56: 63-74.
- DIXON, R.A. e J.R. POSTGATE. 1971. Transfer of nitrogen fixation genes by conjugation in *Klebsiella pneumoniae*. *Nature (Lond.)* 234: 47-48.
- "  
DÖBEREINER, J. e J.M. DAY. 1976. Associative symbioses in tropical grasses: characterization of microorganisms and dinitrogen fixing sites. In: NEWTON, W.W. e C.J. NYMAN, Ed. *Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation*. Washington State University Press. 2: 518-538.
- "  
DÖBEREINER, J., I.E. MARRIEL e M. NERY. 1976. Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinck. *Canadian Journal of Microbiology*. 22: 1464-1473.
- FAVA NETO, C. 1975. In: LACAZ, C.S. (org.) *Antibióticos*. 3a. Ed. São Paulo. Editora Edgar Blücher Ltda. e Editora USP.

509 pp.

- HARDY, R.W.F. e M.D. HAVELKA. 1975. Nitrogen fixation research: a key to world food? *Science* 188: 633-643.
- KENNEDY, C. 1977. Linkage map of the nitrogen fixation (*nif*) genes in *Klebsiella pneumoniae*. *Molecular General Genetics*. 157: 199-204.
- KNOWLES, R. 1976. Factors affecting dinitrogen fixation by bacteria in natural and agricultural systems. In: NEWTON, W.E. e C.J. NYMAN, Ed. Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen Fixation. Washington State University Press. 2: 239-555.
- KRIEG, N.R. e J.J. TARRAND. 1977. Taxonomy of the root-associated nitrogen-fixing bacterium. Simpósio Internacional sobre Limitações e Potenciais da Fixação Biológica de Nitrogênio nos Trópicos. Brasília - DF.
- LARPENT, J.P. e M. LARPENT-GOURGAND. 1975. *Microbiologia Prática*. Editora Edgard Blücher Ltda. e Editora USP. 162 pp.
- LEDERBERG, J. e E.M. LEDERBERG. 1952. Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. *Journal of Bacteriology*. 63: 399-406.
- LINDSTROM, E.S., J.W. NEWTON e P.W. WILSON. 1952. The relationship between photosynthesis and nitrogen fixation.

Proceedings of the National Academy of Science-USA. 38:  
392-396.

LURIA, S.E. e M. DELBRUCK. 1943. Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance. *Genetics*. 28(6): 491-511.

NAYAK, D.N. e V. RAJARAMAMOHAN RAO. 1977. Nitrogen fixation by *Spirillum* sp from rice roots. *Archives of Microbiology*. 115: 359-360.

NEVES, M.C.P., M. NERY e J.M. DAY. 1976. Efeito da temperatura na fixação do nitrogênio de estirpes de *Spirillum* sp isoladas de *Digitaria* sp e milho. In: Anais XV Congresso Brasileiro de Ciência do Solo. Campinas. p. 143-149.

NEWCOMBE, H.B. 1949. Origin of bacterial variants. *Nature* (Lond.) 164: 150-151.

NEYRA, C.A., J. DOBEREINER, R. LALANDE e R. KNOWLES. 1977. Denitrification by  $N_2$  - fixing *Spirillum lipoferum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 23: 300-305.

NEYRA, C.A. e P. VAN BERKUM. 1977. Nitrate reduction and nitrogenase activity in *Spirillum lipoferum*. *Canadian Journal of Microbiology*. 23: 306-310.

OKON, Y., S.L. ALBRECHT e R.H. BURRIS. 1976. Factors affecting growth and nitrogen fixation of *Spirillum lipoferum*.

Journal of Bacteriology 127(3): 1248-1254.

OKON, Y., S.L. ALBRECHT e R.H. BURRIS. 1977a. Methods for growing *Spirillum lipoferum* and for counting it in pure culture and in association with plants. Applied and Environmental Microbiology. 33(1): 85-88.

OKON, Y., J.P. HOUCHINS, S.L. ALBRECHT e R.H. BURRIS. 1977b. Growth of *Spirillum lipoferum* at constant partial pressures of oxygen, and the properties of its nitrogenase in cell-free extracts. Journal of general Microbiology. 98: 87-93.

O'TOOLE, P. e R. KNOWLES. 1973. Efficiency of acetylene reduction ( $N_2$  fixation) in soil: effect of type and concentration of available carbohydrate. Soil Biological and Biochemistry. 5: 789-797.

PATRIQUIN, D.G. e J. DÖBEREINER. 1978. Light microscopy observations of tetrazolium - reducing bacteria in the endorhizosphere of maize and other grasses in Brazil. Canadian Journal of Microbiology. 24: 734-742.

PEÑA, J.J. e J. DÖBEREINER. 1974. Efecto del nitrato y amonio en la actividad de la nitrogenasa de bacterias tropicales fijadoras de nitrógeno atmosférico. Revista Latinoamericana de Microbiología 16(1): 33-44.

POSTGATE, J.R. 1974. New advances and future potential in

biological nitrogen fixation. Journal applied Bacteriology  
37: 185-202.

SHANMUGAM, K.T., S.L. STREICHER, C. MORANDI, F. AUSUBEL, R.B.  
GOLDBERG e R.C. VALENTINE. 1976. Model for genetic  
regulation of dinitrogen fixation (nif) in  
*Klebsiella pneumoniae*. In: NEWTON, W.E. e C.J. NYMAN, Ed.  
Proceedings of the 1st International Symposium on Nitrogen  
Fixation. Washington State University Press. 2: 313-319.

SHANMUGAM, K.T. e R.C. VALENTINE. 1975. Molecular biology of  
nitrogen fixation. Science. 187: 919-924.

SMITH, R.L., J.H. BOUTON, S.C. SCHANK, K.H. QUESENBERRY, M.E.  
TYLER, J.R. MILAM, M.H. GASKINS e R.C. LITTELL. 1976.  
Nitrogen fixation in grasses inoculated with  
*Spirillum lipoferum*. Science. 193: 1003-1005.

STREICHER, S.L., E. GURNEY e R.C. VALENTINE. 1971. Transduction  
of the nitrogen fixation genes in *Klebsiella pneumoniae*.  
Proceedings of the National Academy of Science USA. 68(6):  
1174-1177.

VON BÜLOW, F.W. e J. DÖBEREINER, 1975. Potential for nitrogen  
fixation in maize genotypes in Brazil. Proceedings of the  
National Academy of Science. USA. 72(6): 2389-2393.

WILSON, P.W. e R.H. BURRIS. 1947. The mechanism of biological



nitrogen fixation. *Bacteriological Reviews*. 11: 41-73.

ZUMFT, W.G. e L.E. MORTENSON. 1975. The nitrogen fixing complex of bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*. 416: 1-52.