

Estudos sôbre a possível ação mutagênica de
antibióticos em bactérias¹

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO²

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

1 — Trabalho patrocinado pela Fundação de Amparo á Pesquisa do Estado de São Paulo, recebido para publicação em 30-8-1965;
2 — Cadeira de Citologia e Genética da E. S. A. Luiz de Queiroz.

RESUMO

Foram estudados 4 antibióticos (penicilina, estreptomina, cloranfenicol e aureomicina) com relação a indução de mutações em uma linguagem de *S. typhimurium* deficiente para triptofano e uma linhagem de *X. campestris* deficiente para o mesmo amino-ácido. Não foi verificada atividade mutagênica em nenhum dos antibióticos, em relação aos dois fatores estudados.

1. INTRODUÇÃO

Mutação reversa em *Escherichia coli* e *Salmonella typhimurium* tem sido amplamente discutida por DEMEREC e seus colaboradores. Assim, estudos com *Escherichia coli* (DEMEREC, 1953, 1954; HEMMERLY e DEMEREC, 1955; GLOVER, 1956) mostraram que os gens reagem diferentemente ao tratamento com um mesmo agente mutagênico e, também que, um mesmo gen é afetado diferentemente pelo tratamento com diversos mutagênicos. DEMEREC, BERTANI e FLINT (1951) ensaiaram uma série de substâncias químicas demonstrando sua atividade mutagênica contra bactérias. Muitos outros mutagênicos químicos tem sido usados para induzir mutações em microrganismos.

No presente trabalho, ensiamos quatro antibióticos (penicilina, estreptomina, aureomicina e cloranfenicol) para verificação de uma possível atividade mutagênica dessas drogas em duas bactérias: *Salmonella typhimurium* e *Xanthomonas campestris*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

Foram usadas as linhagens try-D 4 de *Salmonella typhimurium* fornecida pelo Dr. Elias Balbinder do Departamento de Genética da Carnegie Institution of Washington e, a linhagem try-2 de *Xanthomonas campestris* obtida por nós após tratamento com cloreto de manganês (0,04%). Ambas linhagens não conseguem sintetizar triptofano sendo auxotróficas portanto.

O meio sólido completo utilizado foi o nutriente ágar (Difco). O meio líquido completo foi o líquido nutriente (Difco). O meio mínimo usado para *S. typhimurium* foi o meio A sintético descrito por GLOVER (1956) enriquecido com 0,01% de meio completo. O meio mínimo usado para

X. campestris foi o descrito por STARR (1946), também enriquecido com 0,01% de meio completo. O enriquecimento do meio foi efetuado a fim de possibilitar que as bactérias apresentassem um certo número de divisões no meio mínimo evidenciando o aparecimento de tôdas as mutações que porventura fossem induzidas (DEMEREC, 1946).

Os antibióticos utilizados foram Penicilina G — Potássica da Fontoura Whyet do Brasil S.A., Cloromicetina de Park Davies S.A., Cloridrato de clortetraciclina da Cyanamid Química do Brasil Divisão Lederle e Sulfato de Dihidro estreptomycinina da Merck Sharp Dohme S.A. As soluções de antibióticos foram preparados momentos antes de serem utilizadas, por dissolução de quantidades apropriadas dos mesmos em água destilada esterilizada.

Cultura de 24 horas de *S. typhimurium* try-D 4 a 37°C desenvolvida em líquido nutriente foi centrifugada (6.000 rpm durante 15 minutos), o sedimento ressuspenso em solução salina 0,15M, recentrifugado (6.000 rpm por 15 minutos) e as células novamente foram ressuspenso em solução salina. O mesmo método foi utilizado para cultura de 72 horas de *X. campestris* try-2 desenvolvida em líquido nutriente e incubada a 28°C.

Quantidades iguais de células lavadas de *S. typhimurium* foram colocadas em tubos contendo solução salina (controle), solução salina + 100 mcg/ml de penicilina, salina + 100 mcg/ml de estreptomycinina, salina + 100 mcg/ml de aureomicina e salina + 100 mcg/ml de cloranfenicol. O mesmo foi feito com as células lavadas de *X. campestris* variando-se apenas a concentração de aureomicina que para essa última bactéria foi de 10 mcg/ml. Os tubos foram incubados durante 1 hora a 37°C no caso da *S. typhimurium* e por 1 hora a 28°C no caso da *X. campestris*. Após esse período de tempo, o material de cada tubo era semeado (0,1 ml por placa) em diluições apropriadas, em placas de petri contendo meio completo sólido e as placas incubadas. O material dos tubos foi semeado também em placas contendo meio mínimo suplementado com 0,01% de meio completo. Aproximadamente o mesmo número de bactérias foi semeado nas placas contendo meio mínimo. Dessa forma, o número final de bactérias nessas placas foi aproximadamente o mesmo (DEMEREC e CAHN, 1953).

As placas com meio completo foram incubadas durante 2 dias a 37°C no caso da *S. typhimurium* e durante 4 dias a

28°C no caso da *X. campestris*. Após tais períodos de tempo foram efetuadas as contagens de colônias podendo assim ser estabelecido o número de bactérias no controle e tratamento, tirando-se dessa forma a porcentagem de sobreviventes.

As placas com meio mínimo foram incubadas durante 6 dias a 37°C no caso da *S. typhimurium* e durante 10 dias a 28°C para *X. campestris* após o que efetuaram-se as contagens de colônias possibilitando assim a verificação do número de reversões ocorridas.

Foram feitas 3 repetições para cada bactéria e para cada tratamento.

3. RESULTADOS

Os dados referentes às porcentagens de sobrevivência, número de bactérias semeadas nas placas controle e tratamento bem como o número de reversões encontradas, encontram-se nos Quadros 1 (*S. typhimurium*) e 2 (*X. campestris*).

4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela observação dos Quadros 1 e 2 verificamos que nenhum dos antibióticos ensaiados comportou-se como agente mutagênico pelo menos para as duas bactérias ensaiadas, para os dois gens testados e nas concentrações usadas. O número de mutantes obtidos nas placas controle e tratamentos foi praticamente o mesmo. HARTMAN (1956) verificou que o modelo de indução de mutabilidade em *S. typhimurium* varia com o gen; cada gen reage diferentemente em relação a determinados mutagênicos. Certos gens apresentam estabilidade mutagênica não sendo aumentada a frequência de mutações após o tratamento com determinados mutagênicos.

JARAI (1962) verificou ação mutagênica da estreptomina em *Streptomyces* como também YOKOTA KEN (1955) verificou essa ação em *Micrococcus*. HERCIK e JANOVSKA (1961) verificaram aumento no número de mutações para pigmentação da colônia em *Serratia marcescens* com aplicação de cloranfenicol. Os referidos autores sugerem a possibilidade de fatores citoplasmáticos estarem envolvidos. BROWNING e ALTENBURG (1963) verificaram possivelmente, uma pequena atividade mutagênica do cloranfenicol em *Drosophila melanogaster*. No nosso caso, a atividade mutagênica não foi verificada.

QUADRO 1

Número de reversões observadas na linhagem try-D 4 de *S. typhimurium* após tratamento com antibióticos. Comparação com o número de reversões encontradas no controle. (Resultados de 3 repetições).

Antibiótico	% Sobrevivência	TRATAMENTO			CONTRÔLE		
		Bac. sementeas	Mutantes	Bac. sementeas	Bac. sementeas	Mutantes	
Penicilina (100 mcg/ml)	47,1	4,80 x 10 ⁵	159	3,40 x 10 ⁵	282		
	21,8	1,37 x 10 ⁷	822	1,27 x 10 ⁷	945		
	13,1	6,80 x 10 ⁶	389	1,05 x 10 ⁷	541		
Estreptomina (100 mcg/ml)	12,7	4,30 x 10 ⁵	283	3,40 x 10 ⁵	282		
	19,7	2,50 x 10 ⁷	592	1,27 x 10 ⁷	945		
	19,1	2,00 x 10 ⁷	312	1,05 x 10 ⁷	541		
Cloranfenicol (100 mcg/ml)	7,4	2,50 x 10 ⁵	420	3,40 x 10 ⁵	282		
	15,3	1,94 x 10 ⁷	644	1,27 x 10 ⁷	945		
	18,6	1,95 x 10 ⁷	233	1,05 x 10 ⁷	541		
Aureomicina (100 mcg/ml)	16,2	5,50 x 10 ⁵	102	3,40 x 10 ⁵	282		
	10,6	1,34 x 10 ⁷	720	1,25 x 10 ⁷	945		
	8,8	9,25 x 10 ⁶	474	1,05 x 10 ⁷	541		

QUADRO II

Número de reversões observadas na linhagem try-2 de *Xantromonas campestris* após tratamento com antibióticos. Comparação com o número de reversões encontradas no controle. (Resultados de 3 repetições).

Antibiótico	% Sobrevivência	TRATAMENTO		CONTROLE	
		Bac. sementeas	Mutantes	Bac. sementeas	Mutantes
Penicilina (100 mcg/ml)	100,0	1,50 x 10 ⁵	67	1,05 x 10 ⁵	95
	100,0	1,85 x 10 ⁶	169	1,23 x 10 ⁶	137
	61,2	1,56 x 10 ⁶	64	2,55 x 10 ⁶	125
Estreptomomicina (100 mcg/ml)	21,9	2,20 x 10 ⁵	73	1,05 x 10 ⁵	95
	12,4	1,53 x 10 ⁶	101	1,23 x 10 ⁶	137
	6,8	1,73 x 10 ⁶	138	2,55 x 10 ⁶	125
Cloranfenicol (100 mcg/ml)	100,0	4,95 x 10 ⁵	85	1,05 x 10 ⁵	95
	83,7	1,03 x 10 ⁶	161	1,23 x 10 ⁶	137
	87,5	2,23 x 10 ⁶	55	2,55 x 10 ⁶	125
Aureomicina (10 mcg/ml)	32,1	3,37 x 10 ⁵	125	1,05 x 10 ⁵	95
	11,2	1,48 x 10 ⁶	110	1,23 x 10 ⁶	137
	46,6	1,19 x 10 ⁶	84	2,55 x 10 ⁶	125

5. SUMMARY

Four antibiotics have been tested (penicillin, streptomycin, chloranphenicol and aureomycin), with relation to induction of mutations in a strain of S. typhimurium triptophanelles and in a strain of X. campestris also deficient for tryptophan. No mutagenic action was detected in any case analysed.

- BROWNING, L. S. and F. ALTENBURG — 1963 — Failure to detect an anti-mutagenic effect of Chloranphenicol in ultra-violet-treated polar cap cells (Early germ track) of *Drosophila*. *Genetics* 48 (4): 525-528.
- DEMEREK, M. — 1946 — Induced mutations and possible mechanism of the transmission of heredity in *Escherichia coli*. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.* 32: 36-46.
- DEMEREK, M., G. BERTANI and J. FLINT — 1951 — A survey for chemicals for mutagenic action on *E. coli*. *Am. Nat.* 85: 119-136.
- DEMEREK, M. — 1953 — Reaction of genes of *Escherichia coli* to certain mutagens. *Symp. Soc. Exp. Biol.* 7: 43-54.
- DEMEREK, M. and E. CAHN — 1953 — Studies of mutability in nutritionally deficient strains of *E. coli*. *J. Bact.* 65 (1): 27-36.
- DEMEREK, M. — 1954 — Genetic action of mutagens. *Caryologia*. Vol. suppl. 201-217.
- GLOVER, S. W. — 1956 — A comparative study of induced reversions in *E. coli*. *Carn. Inst. Wash. Publ.* 612 — Genetic Studies with bacteria, 121-136.
- HARTMAN, Z. — 1956 — Induced mutability in *Salmonella typhimurium* — *Carn. Inst. Wash. Publ.* 613 — Genetic Studies with bacteria, 107-120.
- HEMMERLY, S. and M. DEMEREK — 1955 — Tests of chemicals for mutagenicity. *Cancer Res. Suppl.* 3: 69-75.
- HERCIK, F. and E. JANOVSKA — — 1961 — The effect of chloranphenicol on the formation of mutations by *Serratia marcescens*. *Folia Biologica* 7: 66-67.
- JARAI, — 1962 — Action of mutagenic agents on auxotrophic strains of *Streptomyces*. *Acta Microbiol. Acad. Sci. Hungaricae* 9 (3): 273-284.
- STARR, M. P. — 1946 — The nutrition of phytopathogenic bacteria genus *Xanthomonas*. *J. Bact.* 51: 131-146.
- YOKOTA, K. — 1955 — The mechanism of drug resistance of bacterium — II — The mutagenic effect of *Streptomycin*. *J. Jap. Bac.* 10 (4): 317-319.

