

BC/5821
IB/80243

1:38p

T/UNICAMP

Si38_s

SELEÇÃO DE *Aspergillus niger*
PARA PRODUÇÃO DE ÁCIDOS

Fls. N.º 38
Proc. N.º 386/45
Rub. Sadabo

de { I. a XII
1 a 91

JOSÉ CARLOS DA SILVA

Orientador: JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do grau de Mestre
em Biologia.

CAMPINAS
Estado de São Paulo - Brasil
1977

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

Classif.	T
Autor	Si 381
V.	Ex.
Tombo BC/	5821
IB/593	

IB/80243
BC/5821

Aos meus pais,

José e Celeste,

dedico.

A Maria José,

ofereço.

Ao Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

Ao exemplo de professor, pesquisador e
pessoa humana, minha
sincera homenagem

A G R A D E C I M E N T O S

Apresentamos nossos sinceros agradecimentos :

- Ao Professor Dr. João Lúcio de Azevedo, pela orientação e constante estímulo na realização deste trabalho.
- Ao Professor Dr. Ivanhoê Rodrigues Baracho, pelas sugestões e críticas apresentadas na análise estatística e no decorrer do trabalho.
- Ao Professor Aquiles Eugênio Piedrabuena, pela ajuda na análise estatística.
- Ao Professor Renato Bonatelli Junior, pelas sugestões apresentadas.
- A Maria José Lima da Silva, pelo estímulo, confiança e paciência.
- Aos Colegas de Graduação e Pós-Graduação, pela convivência científica e humana.
- Ao Departamento de Genética e Evolução da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu chefe professor Dr. William José da Silva.
- Ao Professor Dr. Walter August Hadler, pelas facilidades concedidas como diretor do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

- Ao Departamento de Biologia da Universidade Federal da Paraíba pelas facilidades concedidas.
- Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro que possibilitou a execução deste trabalho.
- Ao Centro de Energia Nuclear Aplicada à Agricultura (CENA), Piracicaba-SP, pelo uso da fonte de irradiação gama (Bomba de Cobalto 60).
- A Usina Amália, Santa Rosa do Viterbo - SP, na pessoa do Dr. E. Duprat, pelo fornecimento da linhagem do fungo empregado no trabalho.

E finalmente a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização do presente trabalho.

I N D I C E

	Página
1 - INTRODUÇÃO	1
2 - REVISÃO DE LITERATURA	4
2.1 - Aspectos biológicos do <i>Aspergillus niger</i>	4
2.2 - Importância industrial do <i>Aspergillus niger</i>	7
2.3 - Importância da Genética de Microrganismos no melhoramento	8
2.4 - Melhoramento Genético em <i>Aspergillus niger</i>	12
2.5 - Instabilidade da linhagem como fator na queda de produção de ácido cítrico ...	17
3 - MATERIAL E MÉTODOS	19
3.1 - Linhagem utilizada	19
3.2 - Meios de Cultura e soluções usadas	19
3.2.1 - Meio mínimo	19
3.2.2 - Meio completo	20
3.2.3 - Meio de Foster líquido	20
3.2.4 - Meio de Foster sólido	21
3.2.5 - Meio de fermentação	21
3.2.6 - Solução salina	21
3.2.7 - Solução de tween	22
3.2.8 - Solução de vitaminas	22
3.2.9 - Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras	23
3.2.10 - Solução de verde de bromocresol	23
3.3 - Esterilização e temperatura usadas ...	24
3.4 - Irradiação	24
3.5 - Curva de sobrevivência	25

3.6 - Técnica seletiva para verificação de produção de ácidos	25
3.7 - Teste de fermentação	27
3.8 - Teste de estabilidade	29
4 - RESULTADOS	31
4.1 - Curva de sobrevivência	31
4.2 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia	34
4.3 - Efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido	35
4.4 - Distribuição do Índice Ácido das populações pertencentes às linhagens irradiadas e não irradiada	39
4.5 - Teste de fermentação	39
4.6 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais	46
4.7 - Teste de estabilidade	46
5 - DISCUSSÃO	49
5.1 - Dose de irradiação gama	49
5.2 - Correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia	51
5.3 - Efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido	52
5.4 - Distribuição de frequência e valores de Índice Ácido das populações pertencentes às linhagens irradiadas e não irradiada; progresso na seleção do Índice Ácido ...	56
5.5 - Fermentação	60
5.6 - Estabilidade	62
6 - RESUMO E CONCLUSÕES	64

VII.

7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS	68
8 - BIBLIOGRAFIA CITADA	71
9 - APENDICE	80

LISTA DE TABELAS

	Página
TABELA 1 - Porcentagem de sobrevivência de <i>Aspergillus niger</i> linhagem 10V10 após tratamentos com raios gama	32
TABELA 2 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia para as populações irradiadas e não irradiada.	34
TABELA 3 - Análise de Variância dos dados apresentados para efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido	37
TABELA 4 - Comparação do Índice Ácido entre linhagens irradiadas e não irradiada	38
TABELA 5 - Análise de Variância dos dados apresentados para estabilidade das linhagens irradiadas	47
TABELA 6 - Comparação da estabilidade para linhagem irradiada pela primeira vez (80 Kr), segunda vez (M14 2i e M47 2i) e terceira vez (M47 3i 22) com raios gama na dose 80 Kr	48
TABELA 7 - Médias do Índice Ácido das populações irradiadas e não irradiada e o ganho na seleção	58

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 - Índice $\bar{A}$ cido, obtido nela relação, diâmetro do halo ácido/diâmetro da colônia	28
FIGURA 2 - Curva de sobrevivência do <i>Aspergillus niger</i> linhagem 10V10, sob a ação de radiação gama	33
FIGURA 3 - Retas de regressão para Índice $\bar{A}$ cido e diâmetro da colônia para as populações irradiadas e não irradiada	36
FIGURA 4 - Distribuição dos valores de Índice $\bar{A}$ cido com suas respectivas frequências para <i>Aspergillus niger</i> linhagem 10V10, não irradiada (0 Kr)	40
FIGURA 5 - Distribuição dos valores de Índice $\bar{A}$ cido com suas respectivas frequências para <i>Aspergillus niger</i> linhagem irradiada pela primeira vez com raios gama (80 Kr)	41
FIGURA 6 - Distribuição dos valores de Índice $\bar{A}$ cido com suas respectivas frequências para <i>Aspergillus niger</i> linhagem N142i, irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr)	42

- FIGURA 7 - Distribuição dos valores de Índice Áci
do com suas respectivas frequências pa
ra *Aspergillus niger* linhagem N47 2i,
irradiada pela segunda vez com raios ga
ma (80 Kr) 43
- FIGURA 8 - Distribuição dos valores de Índice Áci
do com suas respectivas frequências pa
ra *Aspergillus niger* linhagem N47 3i
22 irradiada pela terceira vez com raj
os gama (80 Kr) 44
- FIGURA 9 - Distribuição dos valores de Índice Áci
do para as linhagens irradiadas e não
irradiada, com suas respectivas fre-
quências 45
- FIGURA 10 - Reta de regressão (valor calculado) e
valor observado para a média de Índice
Ácido e ciclos de seleção 59

LISTA DE TABELAS DO APÊNDICE

Página

Tabelas

A-1	Valores de Índice Ácido para <i>Aspergillus niger</i> linhagem 10V10 não irradiada (0 Kr)	81
A-2	Valores de Índice Ácido para linhagem <u>ir</u> radiada pela primeira vez com raios gama (80 Kr)	82
A-3	Valores de Índice Ácido para linhagem N14 2i irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr)	84
A-4	Valores de Índice Ácido para linhagem N47 2i, irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr)	85
A-5	Valores de Índice Ácido para linhagem N47 3i 22 irradiada pela terceira vez com <u>rai</u> os gama (80 Kr)	86
A-6	Valores de Índice Ácido das linhagens 0Kr (controle), 80 Kr (1. ^a irradiação), N14 2i e N47 2i (2. ^a irradiação) e N47 3i 22 (3. ^a irradiação).....	87
A-7	Produção de ácidos totais em cultura de superfície para isolados provenientes de linhagens irradiadas derivadas de <i>Aspergillus niger</i> linhagem 10V10	89
A-8	- Teste de estabilidade para linhagens <u>irra</u> diadas pela primeira, segunda e terceira vez com raios gama na dose 80 Kr	90

XII.

A-9 - Valores de Tabela A-8 transformados em

$\sqrt{x + (0,5)}$

91

1 - INTRODUÇÃO

A Genética de Microrganismos se expandiu somente após 1941, quando BEADLE e TATUM introduziram o fungo *Neurospora crassa* em estudos genéticos. No entanto, apesar de relativamente recente, ela ofereceu contribuições para a resolução de inúmeros problemas básicos da Genética, além de produzir um grande impacto na Genética como um todo.

Com os conhecimentos básicos da Genética de Microrganismos (explicação da variabilidade microbiana em termos mutacionais, revelação de processos sexuais em bactérias e também de processos parassexuais), houve uma transferência de metodologia e conteúdo para áreas aplicadas. Tal contribuição para a área aplicada é ainda relativamente pequena se considerarmos a importância dos microrganismos em processos industriais e outros ramos aplicados (obtenção de aminoácidos, proteínas, enzimas, ácidos orgânicos, vitaminas, antibióticos, fixação de nitrogênio, controle biológico, controle de poluição, etc).

PONTECORVO (1976) relata que o avanço nas aplicações da Genética e melhoramento de microrganismos industriais, são incipientes quando comparados com o avanço da Genética fun

damental de Microrganismos, havendo uma separação entre conhecimentos e aplicações práticas, devido em parte a fragmentação de esforço e predominância de químicos nas indústrias microbiológicas.

Dentre os fungos de valor industrial, destaca-se o *Aspergillus niger*, no qual não se conhece fase sexual e por isso é incluído no grupo de fungos imperfeitos ou deuteromicetos. O *Aspergillus niger* é um fungo filamentoso, possuindo micélio constituído de hifas septadas bem desenvolvidas; forma esporos assexuais, chamados de conídios em estruturas especiais denominadas de conidióforos.

O *Aspergillus niger* é empregado na produção industrial de vários ácidos orgânicos, principalmente ácido cítrico e glucônico, seus dois principais metabólitos (LOCKWOOD, 1975). Tais produções são funções do meio de cultura e da linhagem utilizada na obtenção do produto desejado.

Em vista do exposto, procurou-se estudar uma linhagem de *A. niger* de origem industrial, empregada na produção de ácido cítrico, com os seguintes objetivos: utilizar radiação gama na seleção de *A. niger* para produção de ácidos, através do método de Foster (FOSTER e DAVIS, 1949); ensaio de produção de ácidos em meio líquido para confirmar se o método seleciona os melhores produtores com o mesmo grau de for

mação de ácidos em placas de ágar contendo meio de Foster sólido; verificar o efeito da irradiação gama na instabilidade da linhagem utilizada, visto que uma das maiores dificuldades encontradas em trabalhos relativos a produção, está asociada com produções inconsistentes.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 - Aspectos biológicos do *Aspergillus niger*

O *A. niger* é considerado como um dos mais comuns de todos os fungos saprófitas; tem ampla distribuição mundial e ocorre numa grande variedade de substratos orgânicos. Devido as características de pigmentação das cabeças conidiais (normalmente escuras), membros do grupo são comumente referidos como *Aspergillus niger*, embora a identificação específica torna-se bastante difícil, devido a abundância dos membros deste grupo. Uma revisão detalhada contendo as características deste fungo tais como : tipo de hifa e de conidióforo, tamanho dos conídios, crescimento da colônia, e temperatura adequada são encontradas em RAPER e FENNEL (1985).

Um dos aspectos bastante discutidos em *A. niger* é o número de núcleos nos conídios. DANGEARD (1907), analisou várias espécies de *Aspergillus*: *A. fumigatus*, *A. nidulans*, *A. ochraceus*, *A. niger*, *A. flavus* e *Eurotium* (*Aspergillus*) *herbariorum* e verificou que exceto a última, todos são uninucleados.

WHELDEN (1940), analisou *A. niger* Van Thiegen e confirmou serem os conídios uninucleados.

YUILL (1950), estudou várias espécies de *Aspergillus*, incluindo mutantes e variedades e assegurou que linhagens de *A. niger* (mutantes ou não) possuem apenas um núcleo.

CHANG e col. (1974), estudaram a proporção de núcleos em linhagens haplóides e diplóides de *A. niger* Van Tieghen e encontraram 3 linhagens haplóides com 60, 63 e 65% de conídios binucleados e 2 linhagens diplóides com 87 e 92% de conídios binucleados.

BARACHO e col. (1975), estudaram 33 linhagens do grupo niger e encontraram uma grande variação na proporção de conídios binucleados e uninucleados.

Uma característica importante neste grupo de *Aspergillus niger* é a não ocorrência do ciclo sexual (por isso denominados de fungos imperfeitos) e assim a análise genética torna-se bastante difícil. Entretanto, procurando a solução de tal problema, PONTECORVO e col. (1953a), aplicaram com sucesso em *Aspergillus niger* a técnica de ROPER (1952) para a produção em fungos filamentosos, de linhagens com núcleos diplóides heterozigotos. Desde então, através de recombinação genética sem necessidade de um processo sexual (fenômeno denominado de ciclo parassexual), novas perspectivas para investigações genéticas nesse fungo foram abertas.

LHOAS (1961, 1967 e 1968), baseado nestes trabalhos anteriores, procura fazer análises genéticas de *A. niger*, tentando estabelecer grupos de ligações e construir mapas cromossômicos, através de segregação mitótica e recombinação e os resultados obtidos foram os seguintes :

- a) - Trinta e um marcadores não alélicos foram assinalados para os seis grupos de ligação (contendo 11, 9, 6, 3, 1 e 1 marcadores respectivamente), pela análise de segregantes mitóticos haplóides a partir de diplóides sintetizados.
- b) - A maioria dos segregantes haplóides foram obtidos em meio suplementado com um análogo de aminoácido, a p-fluorofenilalanina (pFA) cuja ação foi interpretada como indução na perda de cromossomos.
- c) - As taxas de permuta mitótica e haploidização foram muito maiores do que as encontradas em espécies com ciclo sexual como o *A. nidulans*.

Todos os trabalhos sobre genética de *A. niger* foram feitos com linhagens isoladas por YUILL (1951), que afirmou (1950) serem uninucleados todos os conídios de *A. niger*.

2.2 - Importância industrial do *Aspergillus niger*

A conversão micológica de carboidratos em ácidos orgânicos industriais tem sido investigada em vários laboratórios durante os últimos setenta anos. Os processos mais estudados são aqueles para produção de ácido cítrico, fumárico, glucônico, itacônico, kójico, láctico e oxálico.

A produção comercial destes ácidos orgânicos por fungos miceliais, na maioria dos casos, limita-se aos membros do gênero *Aspergillus* (LOCKWOOD, 1975).

A presente revisão está voltada mais para a produção de ácido cítrico, importante produto metabólico produzido comercialmente por fermentação com fungos específicos, principalmente linhagens de *Aspergillus niger*.

O desenvolvimento dos processos de fermentação para produção de ácido cítrico pode ser dividido em três fases históricas. A primeira fase foi iniciada por WEHMER (1893) que utilizou várias espécies de *Penicillium* (embora considerasse estes fungos como membros do gênero *Citromyces*), para a produção de ácido cítrico a partir de carboidratos e sais inorgânicos no meio. A segunda fase, a fermentação de superfície usando *A. niger*, foi feita por CURRIE (1917). A terceira fase, a fermentação submersa, iniciou-se com PERQUIM (1938).

Diferentes processos industriais tem sido usados para produção de ácido cítrico, entretanto, eles são mantidos em segredo e assim poucos detalhes tem sido publicados. As revisões de JOHNSON (1954) e LOCKWOOD (1975), citam os principais processos industriais mais empregados comercialmente na produção de ácido cítrico.

Vários fatores que interferem na produção de ácido cítrico, como: composição do meio de cultura e ação destes componente sobre a produção, temperatura da fermentação, pH do meio, abastecimento de oxigênio e outros estão bem detalhados nas revisões de FOSTER (1949), JOHNSON (1954) e PERLMAN e SIH (1960).

O mecanismo bioquímico na formação de ácido cítrico, foi recentemente revisado por SMITH e col. (1974). Entretanto, apesar de várias teorias propostas para explicar a formação desse ácido a partir de compostos de carbono, nenhuma delas explicou satisfatoriamente todas as observações conhecidas.

2.3 - Importância da Genética de Microrganismos no melhoramento.

A aplicação da Genética em melhoramento tem sido utilizada em plantas e animais superiores. Por outro lado, a Genética de Microrganismos embora de recente implanta-

ção tem fornecido em comparação com a de plantas e animais superiores menores impactos aplicados não obstante o fato de que a Genética de bactérias e fungos (mesmo os assexuais) pode propiciar resultados mais rápidos do que se consegue em organismos superiores.

A Genética de Microrganismos utilizada no melhoramento de organismos produtores de substâncias de valor industrial, quase que inteiramente restringe-se a produção de antibióticos e, em menor escala, de ácidos orgânicos. Talvez uma das dificuldades desse estudo seja o fato de que a produção dessas substâncias sejam controladas por caracteres quantitativos, sendo assim sua manifestação fenotípica altamente sujeita às condições ambientais e portanto de estudo mais complexo do que caracteres qualitativos. Outro fator é a pressão das indústrias que visam interesses próprios de produção, utilizando então métodos empíricos. No entanto, resultados mais concretos da aplicação da Genética de Microrganismos no campo de produtos industriais poderiam ser obtidos pelo desenvolvimento paralelo da Genética de Microrganismos e fermentação industrial.

Os pontos decisivos na síntese de um grande número de substâncias comerciais produzidas por microrganismos foram primeiramente, aumentar a produtividade nas linhagens usadas e em segundo (no caso de produtos bacterianos) indu-

zir experimentalmente mudanças na sequência metabólica de produtos biossintéticos microbianos para obtenção de substâncias desejáveis.

Vários métodos genéticos são usados para aumentar a produtividade. A indução de mutações foi um dos primeiros a ser utilizados e o mais empregado em programas de melhoramento.

Essa técnica de induzir mutações e em seguida proceder-se a seleção dos mutantes mais apropriados foi utilizada com grande sucesso para produção de antibióticos, particularmente penicilina. Assim, MCCANN e CALAM (1972), citam que o mutante selecionado de *Penicillium chrysogenum* linhagem Wiscosin Q 176 aumentou sua atividade na produção de penicilina de 250 unidades/ml em 1945, para $10-13 \times 10^3$ unidades/ml em ótimas condições. A atividade de produção de outros antibióticos também tem sido aumentada em diversos outros microrganismos.

Tal procedimento de indução de mutações e posterior seleção, tornou-se crítico durante os últimos anos em programas de melhoramento, uma vez que o progresso obtido não tem sido tão marcante quando comparado com o processo obtido nos primeiros estágios do melhoramento.

Outra técnica menos utilizada, sendo ainda poucas as informações obtidas a respeito é a de recombinação e seleção. A descoberta de uma forma de recombinação genética na ausência de ciclo sexual permitiu exploração através de técnicas genéticas em espécies chaves na indústria de antibióticos, como o fungo assexual *Penicillium chrysogenum* (PONTECORVO e SERMONTI, 1953 e 1954).

A utilização da técnica de recombinação apesar de ainda ter sido pouco utilizada com finalidades práticas até o momento, tem fornecido resultados promissores em um certo número de microrganismos industriais principalmente *Penicillium*, *Aspergillus* e *Streptomyces* e deveria ser melhor explorada nestes e em outros organismos utilizados na indústria.

Outros métodos de melhoramento poderiam ser utilizados, incluindo-se por exemplo fagos, os quais possuem habilidade para transferir vários elementos genéticos de uma célula para outra. BANKS e col. (1970), isolaram vírus com RNA de cadeia dupla em *P. chrysogenum*, *A. niger* e *A. foetidus*; ainda LHOAS (1972), trabalhando com partículas virais com RNA de cadeia dupla isoladas de *A. niger* infectou células de *Saccharomyces cerevisiae*. Desse modo, os vírus poderiam contribuir pelo processo de recombinação, na construção de linhagens melhoradas de fungos industriais.

Uma idéia de conjunto a respeito de melhoramento feito em microrganismos e perspectivas para futuros trabalhos pode ser obtida pelas revisões de SERMONTI (1969); CALAM (1972); BALL (1973); ELANDER e col. (1973).

2.4. - Melhoramento Genético em *Aspergillus niger*

O aumento na produção de ácido cítrico através do melhoramento genético da linhagem utilizada e principal - mente das condições ambientais de fermentação, tem sido objeto de estudo de vários investigadores.

Os trabalhos referentes às condições ambientais, estão fora do escopo desta revisão e ênfase maior será dada ao melhoramento genético do fungo *A. niger*, embora ainda não sejam numerosos os trabalhos que referem-se a tal estudo.

A idéia de tratar microrganismos com vários mutagênicos e ensaiar entre os sobreviventes aqueles que aumentavam sua capacidade de produção de ácido cítrico foi adotada por KRESLING e STERN (1935), os quais verificaram pela primeira vez, que mutantes de *A. niger* obtidos por tratamentos com luz ultra violeta produziram consideravelmente mais ácido cítrico que a linhagem parental.

DEMEREK (1945), trabalhando com *Penicillium notatum*, isolou um mutante X-1612 que aumentou a produção de penicilina e somente após esta observação é que houve incremento no processo de induzir mutações e selecionar linhagens para produção de vários produtos metabólicos.

GERHARDT e col. (1946), utilizaram o mesmo processo de seleção e dentre vinte isolados monospóricos de *A. niger* produtores de ácido cítrico, nenhum deles apresentou aumento de produção.

DILLER e col. (1946) isolaram um mutante de *A. niger* após tratamento com raios X e compararam com a linhagem selvagem no que se refere a produção de ácido cítrico, quantidade de açúcar utilizado e peso do micélio resultante; o mutante mostrou-se mais eficiente na produção de ácido cítrico, embora crescesse mais lentamente e produzisse menor quantidade de micélio.

GARDNER e col. (1956), estudaram a atividade fermentativa dos mutantes de *A. niger* induzidos por irradiação com raios X e ultra violeta e verificaram que os mutantes selecionados pela Técnica de Cultura de Papel (JAMES e col., 1956), produziram mais ácido cítrico do que a linhagem parental em todas as condições de fermentação. Também verificaram correlação entre mutantes melhores produtores de ácido

cítrico e o lento desenvolvimento da colônia (colônias "dwarf").

MILLIS e *col.* (1963), estudaram 40.000 colônias sobreviventes da irradiação com luz ultra violeta e obtiveram alguns mutantes que produziam cerca de quatro vezes mais ácido cítrico que a linhagem parental.

ILCZUK (1968), estudou 161 mutantes morfológicos quanto a coloração dos conídios obtidos a partir de 24 linhagens de *A. niger* submetidos a ação de luz ultra violeta e nenhuma correlação foi encontrada entre a cor dos conídios e a habilidade para produção de ácido cítrico.

DAS e NANDI (1969), através do uso de radiação gama e luz ultra violeta, conseguiram um mutante de *A. niger* (linhagem CGU 163) que mostrava ser 4,3 vezes superior na produção de ácido cítrico que a linhagem parental.

MUSÍLKOVÁ e FENCL (1970), isolaram mutantes auxotróficos de *Aspergillus niger* após tratamento com Etilmetano sulfonato e mostraram que a maioria dos mutantes isolados apresentava baixa produção de ácidos orgânicos.

DAS (1972), fez uma revisão da maioria dos trabalhos referentes a processos utilizados na seleção de linhagens produtoras de ácido cítrico e sugere tratamentos combinados de mutagênicos tanto físicos como químicos.

HANNAN (1972), isolou vários mutantes morfológicos de *A. niger*, induzidos com raios gama em diferentes doses (20, 40, 60 e 80 kr) e ensaiou suas habilidades para produção de ácidos, particularmente ácido cítrico. Nenhuma das linhagens "aconidial" ou "colorido" mostraram apreciáveis aumentos na produção de ácido comparados com a linhagem parental. O mutante "dwarf" mostrou um notável aumento na produção total de ácidos, ao redor de duas vezes mais na produção de ácido cítrico. Análise feita para um certo número de mutantes "dwarf" mostrou que esta característica morfológica não estava ligada a propriedade de alta produção de ácido cítrico.

BANIK (1974), utilizou tratamentos combinados de etilenoimina e luz ultra violeta para obtenção de mutantes de *A. niger* (linhagem AB) e encontrou um mutante que apresentava aumento na produção de ácido cítrico em relação a linhagem parental.

Além de indução de mutação, alguns trabalhos, embora em pequeno número, foram feitos na seleção de linhagens, através de heterocariose, poliploidização e recombinação somática.

YUILL (1951), fez várias fermentações com linhagens misturadas e não relacionadas de *A. niger* e observou que

quando duas linhagens alto produtoras de ácido cítrico foram colocadas juntos, a produção de ácido era menor do que cada uma separadamente; duas linhagens com baixa produção de ácido deram produção maior do que cada uma separada e quando duas linhagens, uma com alta produção de ácido e outra com baixa eram misturadas, a produção de ácido era intermediária entre as duas linhagens separadas. Resultados semelhantes foram obtidos por CIEGLER e RAPER (1957), que sintetizaram 19 heterocários entre diferentes mutantes para coloração de *A. niger* e ensaiaram suas habilidades para produção de ácido cítrico.

CHANG e TERRY (1973), estudaram a produção de ácido cítrico por heterocários e diplóides entre componentes auxotróficos (altos e baixos produtores) de *A. niger* e explicaram o aumento na produção de ácido cítrico, quando os componentes haplóides eram baixos produtores, como resultado de complementação intergênica e que o grau de ploidia não interferia na produção de ácido cítrico, uma vez que os diplóides entre altos produtores deram produção inferior aos respectivos componentes separados.

TAVARES e AZEVEDO (1974), utilizaram radiação gama para obtenção de alguns mutantes em linhagens industriais de *A. niger*; cruzamentos dialélicos foram efetuados e os melhores produtores foram ensaiados na indústria, havendo correlação com os dados obtidos em laboratório.

2.5 - Instabilidade da linhagem como fator na queda de produção de ácido cítrico.

Um dos maiores problemas genéticos com relação a fermentação por fungos, refere-se a estabilidade da linhagem utilizada e a manutenção de suas propriedades fermentativas.

A estabilidade da linhagem não é determinada somente pelo seu genótipo, mas também pelas condições ambientais como demonstrado por WILLS (1968).

A conservação da linhagem para que suas características próprias sejam mantidas é sugerida através de vários processos em diferentes microrganismos; tais métodos podem ser encontrados nas revisões de PERLMAN e SIH (1960) e JOHNSTON (1975).

A observação da existência de instabilidade em *A. niger* foi verificada por YUILL (1953) e trabalhos com instabilidade específicas a *A. niger* são escassos ou pelo menos desconhecem-se resultados publicados.

O estudo de instabilidade em fungos com ciclo parassexual, foi revisado por BALL e AZEVEDO (1976) e estes autores relatam que linhagens de importância industrial podem ser estabilizadas por mudanças genéticas ou por controle

das condições ambientais e que a instabilidade genética constitui-se em importante problema para a indústria de fermentação não somente como fator indesejável na queda de produção, mas também um meio útil de melhorar a produção.

3 - MATERIAL E MÉTODOS

3.1 - Linhagem utilizada

O fungo utilizado no presente trabalho foi o *A. niger*, linhagem 10V10, de origem industrial, gentilmente cedido pelo Dr. E. DUPRAT, Usina Amália, Santa Rosa do Viterbo, SP. Esta linhagem é usada na produção industrial de ácido cítrico pelo processo de cultura de superfície, sendo a sacarose, utilizada como substrato.

3.2 - Meios de cultura e soluções usadas

3.2.1 - Meio mínimo (PONTECORVO e col. 1953b)

NaNO_3	6,0 gramas
KH_2PO_4	1,5 gramas
KCl	0,5 gramas
$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$	0,5 gramas
FeSO_4	traços
ZnSO_4	traços
Glicose	10,0 gramas
Ágar (oxoid-nº 3)	15,0 gramas
Água destilada	1 litro
pH ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1N.	

3.2.2 - Meio completo (PONTECORVO e col. 1953b)

Acrescenta-se ao meio mínimo :

Peptona (oxoid)	2,0 gramas
Extrato de levedura	0,5 gramas
Caseína hidrolisada (oxoid)	1,5 gramas
Hidrolisado de <u>ácido nucleí</u> co de leveduras	2,5 ml
Solução de vitaminas	1,0 ml
pH ajustado para 6,5 com NaOH 4% ou HCl 1 N.	

3.2.3 - Meio de Foster líquido (FOSTER e DAVIS, 1949)

Glicose	5,0 gramas
Peptona	1,0 grama
KH_2PO_4	1,0 grama
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5 gramas
Água destilada	1 litro
Ajustar pH para 5,0 com NaOH 4% ou HCl 1 N.	

3.2.4 - Meio de Foster sólido (FOSTER e DAVIS, 1949)

Acrescenta-se ao meio líquido :

Ágar (oxoid-nº 3) 2,0 gramas

Solução de verde de bromo
cresol 67,0 ml

Ajustar pH para 5,0 com NaOH 4% ou HCl 1 N.

3.2.5 - Meio de fermentação (DOELGER e PPESCOTT, 1934)

Sacarose 140,0 gramas

NH_4NO_3 2,23 gramas

K_2HPO_4 1,0 grama

$\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ 0,23 gramas

Água destilada 1 litro

Ajustar pH para 2,0 com HCl 1 N.

3.2.6 - Solução salina

Uma solução de cloreto de sódio 0,85% foi obtida, dissolvendo-se o sal em água destilada, autoclavando-se em seguida. A solução salina foi distribuída em quantidades iguais de 9 ml por frasco.

3.2.7 - Solução de tween

Adicionou-se 0,1 ml de tween 80 em 99,9 ml de água destilada, autoclavando-se em seguida. A solução de tween foi distribuída em quantidades iguais de 2,5 ml por frasco.

3.2.8 - Solução de vitaminas

Ácido nicotínico	10,0 mg
Ácido <u>p</u> -aminobenzoico	10,0 mg
Aneurina	10,0 mg
Biotina	0,2 mg
Piridoxina	50,0 mg
Riboflavina	100,0 mg
Água destilada	100,0 ml

A solução foi esterilizada em banho-maria por 15 minutos e conservada em frasco escuro no refrigerador.

3.2.9 - Hidrolisado de ácido nucleico de leveduras

Ácido nucleico de leveduras 2 g em 15 ml de solução normal
de ácido clorídrico.

Ácido nucleico de leveduras 2 g em 15 ml de solução normal
de hidróxido de sódio.

As duas soluções foram aquecidas a 100°C por 20 minutos. Em seguida elas foram misturadas, e o pH foi ajustado a 6,0, filtrando-se a seguir. O volume foi completado a 40,0 ml e a preparação foi conservada em refrigerador sob clorofórmio.

3.2.10 - Solução de verde de bromocresol

Dissolveu-se 1 g de verde de bromocresol em 14,3 ml de NaOH 0,1 N. Após completamente dissolvido, a solução foi diluída em 250 ml de água destilada e conservada em frasco escuro.

3.3 - Esterilização e temperatura usadas

Os meios de cultura foram autoclavados a 120°C a pressão de 1 atmosfera, durante 15 minutos, exceção feita ao meio de fermentação, que foi autoclavado a 110°C a pressão de 1/2 atmosfera durante 30 minutos.

A temperatura de incubação em todos os experimentos foi de 28°C .

3.4 - Irradiação

Por meio de um fio de platina, o fungo foi inoculado em uma série de tubos de meio completo em ágar inclinado e incubado a 28°C por 4 dias.

Os tubos em seguida, foram submetidos à radiação gama emitida por uma fonte de cobalto 60 no Centro de Energia Nuclear Aplicada a Agricultura (CENA), Piracicaba, SP.

O tempo de irradiação foi o mesmo para todos os tubos, variando somente a distância, a qual corresponde a várias doses : 20 - 40 - 60 - 80 - 100 - 120 - 140 Kr. Um tubo não irradiado (0 Kr) foi usado como controle.

Para conservação das linhagens, os tubos foram estocados em refrigerador.

3.5 - Curva de sobrevivência

Com a finalidade de determinar qual dose de raios gama era conveniente para produzir 1 a 5% de sobreviventes, foi feita a curva de sobrevivência da linhagem referida.

Conídios provenientes de cada tubo irradiado com as várias doses de raios gama usadas e também obtidos do tubo não irradiado (controle), foram colocados separadamente em solução de tween, agitados e seu número foi estimado, através da contagem em hematímetro no microscópio. A seguir, diluições apropriadas em solução salina foram realizadas e alíquotas de 0,1 ml de cada amostra, foi espalhada em placas de meio completo. Após 3 dias de incubação a 28°C, as placas foram observadas, e a porcentagem dos sobreviventes foi calculada comparando-se com o número de colônias provenientes da amostra não irradiada.

3.6 - Técnica seletiva para verificação de produção de ácidos

O objetivo desta técnica foi selecionar diferentes colônias provenientes da cultura irradiada com raios gama (80 Kr) com relação ao caráter produção de ácidos. Este

teste seletivo foi proposto por FOSTER e DAVIS (1949) e baseia-se na mudança de cor do verde de bromocresol pela variação do pH entre 5,4 e 3,8. A formação de acidez orgânica no meio inicialmente ajustado a pH 5,0, causa pronunciada mudança da cor verde azulado para amarelo. Nestes testes utilizaram-se placas de Petri esterilizadas de 9,2 cm de diâmetro na base, com um papel de filtro colocado sob a tampa para absorver o excesso de umidade. Foram usados 10 ml de meio de FOSTER sólido por placa.

Para obtenção de colônias isoladas da linhagem irradiada com raios gama (80 Kr) e para o controle (0 Kr), os confídios foram transferidos para uma solução de tween, por meio de um fio de platina. Por agitação, as cadeias de confídios foram desagregadas. Diluições apropriadas foram feitas, pipetando-se 1 ml da suspensão em 9 ml de solução salina. Alíquotas de 0,1 ml da suspensão de confídios foi semeada em placas de meio completo, utilizando-se em seguida, espalhador de vidro esterilizado em álcool e flambado. As placas foram incubadas a 28°C por 3 dias. Cada colônia isolada e ao acaso, foi inoculada por picada, no centro da placa com meio de Foster sólido e incubadas a 28°C. A estimativa de produção de ácidos das diferentes colônias foi determinada no 3º e 4º dias de incubação, dividindo o diâmetro do halo

produzido pelo diâmetro da colônia (Figura 1) e o resultado assim obtido foi chamado de Índice Ácido. Aproximadamente 5% das colônias provenientes da linhagem irradiada que apresentavam altos valores de Índice Ácido em relação a linhagem não irradiada eram selecionadas e submetidas a nova irradiação com raios gama e novamente empregou-se a técnica seletiva para essas linhagens. Da mesma maneira, uma terceira seleção foi feita para a linhagem irradiada pela segunda vez.

Algumas colônias que mostraram valores altos de Índice Ácido, foram transferidos para placas de ágar contendo o meio completo e purificadas, para posteriores testes de fermentação.

3.7 - Teste de fermentação

O objetivo deste teste foi verificar se algumas linhagens com altos valores de Índice Ácido apresentavam relação com a produção total de ácidos. Para analisar os resultados, foram empregados dois meios diferentes para a fermentação. Os meios utilizados foram meio de Foster líquido e meio de fermentação, sendo que o último é bastante semelhante ao utilizado na indústria para obtenção de ácido cítrico. Foram colocados 25 ml, de cada meio em frascos de

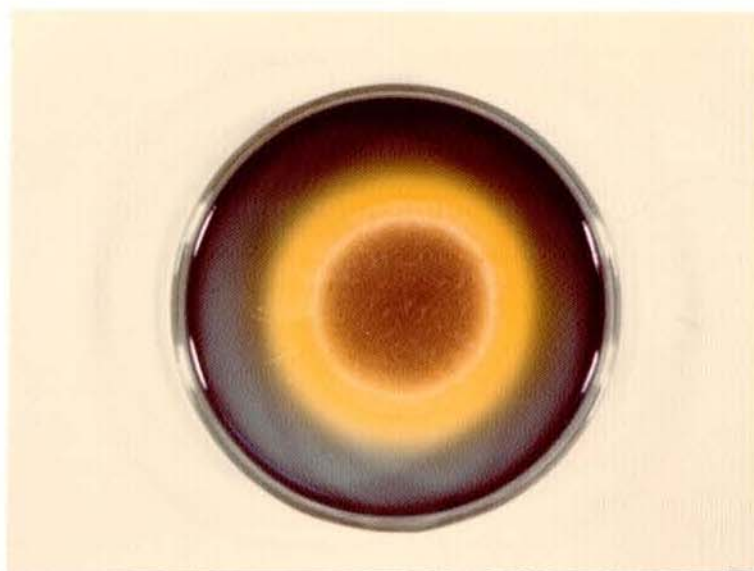


FIGURA 1 - Índice Ácido, obtido pela relação: diâmetro do halo ácido/diâmetro da colônia.

Erlenmeyer de 250 ml, que foram esterilizados. A seguir, eles foram inoculados com uma suspensão de esporos de cerca de 10^5 conídios/ml, e incubados a 28°C , por um período de 5 - 9 dias. Após esse período de tempo, o peso do micélio seco e a acidez total eram determinados.

A determinação do peso do micélio seco, consistia em filtrar o conteúdo do frasco em fermentação, separando o micélio que era colocado em placa de Petri previamente pesada e aquecido a 70°C em estufa, durante 10 horas; a seguir o micélio mais a placa eram pesados e por diferença, o peso do micélio seco era obtido. A acidez total foi obtida por titulação de 10 ml do meio filtrado com alíquotas de NaOH 0,1 N, usando fenolftaleína (1%) como indicador.

3.8 - Teste de estabilidade

A finalidade deste teste foi a de verificar se as colônias irradiadas sofreram efeitos sobre a estabilidade. A linhagem 10V10 de *A. niger*, usada na produção de ácido cítrico, apresenta queda na produção, devido a sua instabilidade. Para verificar o efeito da irradiação na instabilidade, grupos de 10 colônias isoladas irradiadas, foram inoculadas uma a uma por picada no centro de uma placa de Petri com meio mínimo e incubadas a 28°C por 10 dias. Ao final des

te período, verificou-se o aparecimento ou não de setores em cada colônia.

4 - RESULTADOS

4.1 - Curva de sobrevivência

Os dados referentes à sobrevivência de *Aspergillus niger* linhagem 10V10, submetida à ação de várias doses de radiação gama estão expressos na Tabela 1 e Figura 2.

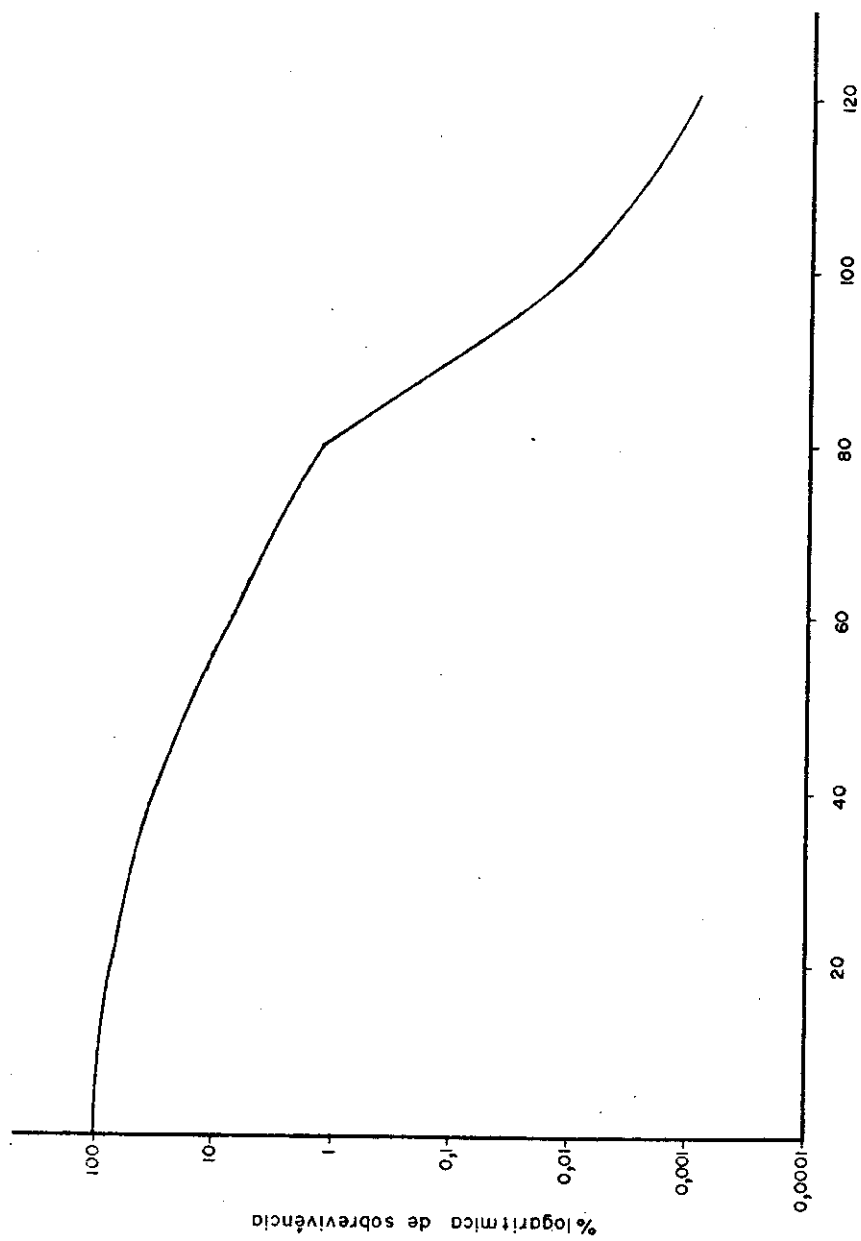
A dose de raios gama que forneceu 1,61% de sobreviventes, foi escolhida para os trabalhos posteriores.

Com os dados da Tabela 1, construiu-se uma curva de sobrevivência a qual está representada graficamente na Figura 2.

TABELA 1 - Porcentagem de sobrevivência de *A. niger*
linhagem 10V10 após tratamentos com raios
gama~

Dose (Kr)	Número de co nídios semea dos	Número de co nídios germi nados	Porcentagem de sobrevi- vência	% de sobre* vivência corrigida
0	330	204	61,81	100,00
20	660	268	40,60	65,68
40	825	170	20,60	33,33
60	616	33	5,35	8,60
80	5.500	55	1,00	1,61
100	7.260	5	0,06	0,01
120	124.300	13	0,01	0,001
140	1.560.000	0	0,00	0,00

(*) O controle foi considerado como 100% e toda porcentagem de sobreviventes irradiados foi tomada em relação a 100% do controle.



Dose de irradiação com raios gama em Kr.

FIGURA 2 - Curva de sobrevivência do *Aspergillus niger* -
linhagem 10V10, sob ação de radiação gama.

4.2 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia

Foram calculados os coeficientes de correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia (Tabelas A.1, A.2, A.3, A.4 e A.5 do Apêndice) e os resultados estão na Tabela 2.

TABELA 2 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e o diâmetro da colônia para as populações irradiadas e não irradiada

Tratamento de Linhagem *	Coeficiente de correlação (r)
Linhagem não irradiada (controle)	r = - 0,48182 **
Linhagem irradiada pela 1ª vez com raios gama (80 Kr)	r = - 0,88345 **
Linhagem N14 2i irradiada pela 2ª vez com raios gama (80 Kr)	r = - 0,87767 **
Linhagem N47 2i irradiada pela 2ª vez com raios gama (80 Kr)	r = - 0,87025 **
Linhagem N47 3i 22 irradiada pela 3ª vez com raios gama (80 Kr)	r = - 0,90390 **

(*) Linhagens N14 2i e N47 2i, referem-se aos dois isolados irradiados pela segunda vez com raios gama, na dose 80 Kr, seleccionados entre a população da linhagem irradiada pela primeira vez com raios gama (80 Kr) que apresentaram altos valores de Índice Ácido. A Linhagem N47 3i 22, refere-se ao isolado irradiado pela terceira vez com raios gama, na dose 80 Kr, seleccionado entre a população da linhagem N47 2i. Tais designações aparecem em várias Tabelas, incluindo as do Apêndice.

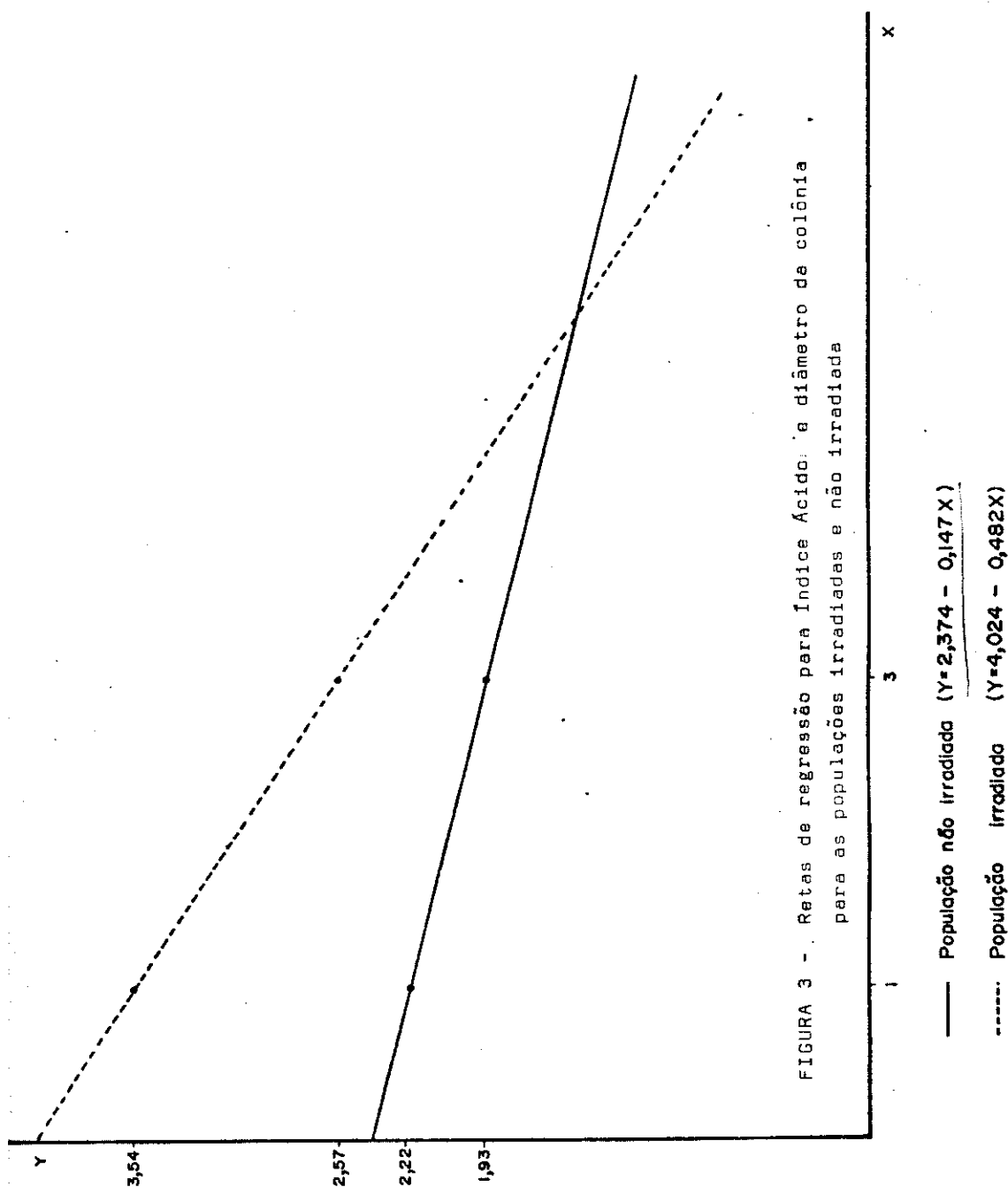
Pela observação da Tabela 2 verifica-se que to dos valores de r foram significativos ao nível de 1% de probabilidade, indicando que existe correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia.

Para uma comparação dos cinco coeficientes de correlação obtidos, aplicou-se o teste B (PIEDRABUENA e BARACHO, 1976), através do qual pode-se verificar que os coeficientes das linhagens irradiadas se comportam como se pertencessem a uma mesma população, mas diferentes da população da linhagem não irradiada.

Com esses resultados, calculou-se um coeficiente de correlação conjunto para as quatro populações irradiadas ($r = - 0,933$) e determinou-se a reta de regressão para as populações irradiadas e não irradiada (Figura 3).

4.3 - Efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido

Com o objetivo de saber se a radiação gama apresentava efeito sobre o Índice Ácido, foi feita a análise de variância, conforme PIMENTEL GOMES (1966), comparando os Índice Ácido das populações não irradiada e irradiadas, cujos valores acham-se expressos no Apêndice (Tabela A-6).



Os resultados da análise de variância, feita nos moldes de experimentos completamente casualizados, encontram-se na Tabela 3.

TABELA 3 - Análise de Variância dos dados apresentados para efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido.

Causa da Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	4	83,35	20,83	253,80**
Resíduo	295	24,24	0,08	
Total	299	107,59		

(**) Indica significância ao nível de 1% de probabilidade. Coeficiente de Variação = 12,51%.

Pela observação da Tabela 3, nota-se que houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade devido às diferenças no Índice Ácido das Linhagens irradiadas e não irradiada.

O estudo comparativo das médias do Índice Ácido, de cada linhagem, foi feito através do teste de Tukey, cujos resultados encontram-se na Tabela 4.

A linhagem (80 Kr) tem número diferente de repetições (n=100) em relação a outras linhagens (n=50) e assim, a d.m.s. pelo teste de Tukey, ao nível de 1%, quando se com-

para esta linhagem com outras foi de 0,154 e a d.m.s. para linhagens com mesmo número de repetições foi de 0,188, ao nível de 1% de probabilidade.

TABELA 4 - Comparação do Índice Ácido entre linhagens irradiadas e não irradiada.

Linhagens	Média do Índice Ácido (1)	
Não irradiada (controle)	1,70	a
Irradiada pela 1. ^a vez (80 Kr)	1,77	a
N14 21	2,62	b
N47 21	2,71	b
N47 31 22	3,00	c

(1) Valores seguidos da mesma letra não são diferentes entre si ao nível de 1% de probabilidade.

A linhagem N47 31 22 situou-se em primeiro lugar, sendo portanto estatisticamente diferente de todas as outras linhagens. Em seguida vieram as linhagens N4721 e N14 21 que estatisticamente são diferentes das linhagens não irradiada e irradiada pela primeira vez (80 Kr), mas não são diferentes entre si. O último lugar ficou para as linhagens não irradiada e irradiada pela primeira vez, que estatística^umente não são diferentes entre si.

Resumindo, a linhagem N47 3i 22, apresentou a maior média de Índice Ácido, em seguida vieram as linhagens N47 2i e N14 2i, que apresentaram médias intermediárias de Índice Ácido e depois a linhagem irradiada pela primeira vez (80 Kr) e a linhagem não irradiada (controle), com suas respectivas médias de Índice Ácido em ordem decrescente.

4.4 - Distribuição do Índice Ácido das populações pertencentes às linhagens irradiadas e não irradiada

Com os dados da Tabela A-6 (Apêndice), foram construídos gráficos (Figuras 4, 5, 6, 7, 8 e 9), que apresentam os Índice Ácido das populações pertencentes às linhagens irradiadas e não irradiada com suas respectivas frequências.

4.5 - Teste de fermentação

De acordo com a técnica descrita em 3,7, algumas colônias das linhagens irradiadas que apresentaram altos valores de Índice Ácido e uma colônia da linhagem não irradiada (0 Kr) foram ensaiadas em laboratório em suas habilidades para fermentação em cultura de superfície em dois meios de cultura diferentes.

Os resultados encontram-se na Tabela A-7 (Apêndice), onde estão expressos para cada isolado, a titulação de ácidos totais, peso do micélio seco, Índice Ácido e o tempo mais hábil de fermentação durante o período de 5-9 dias.

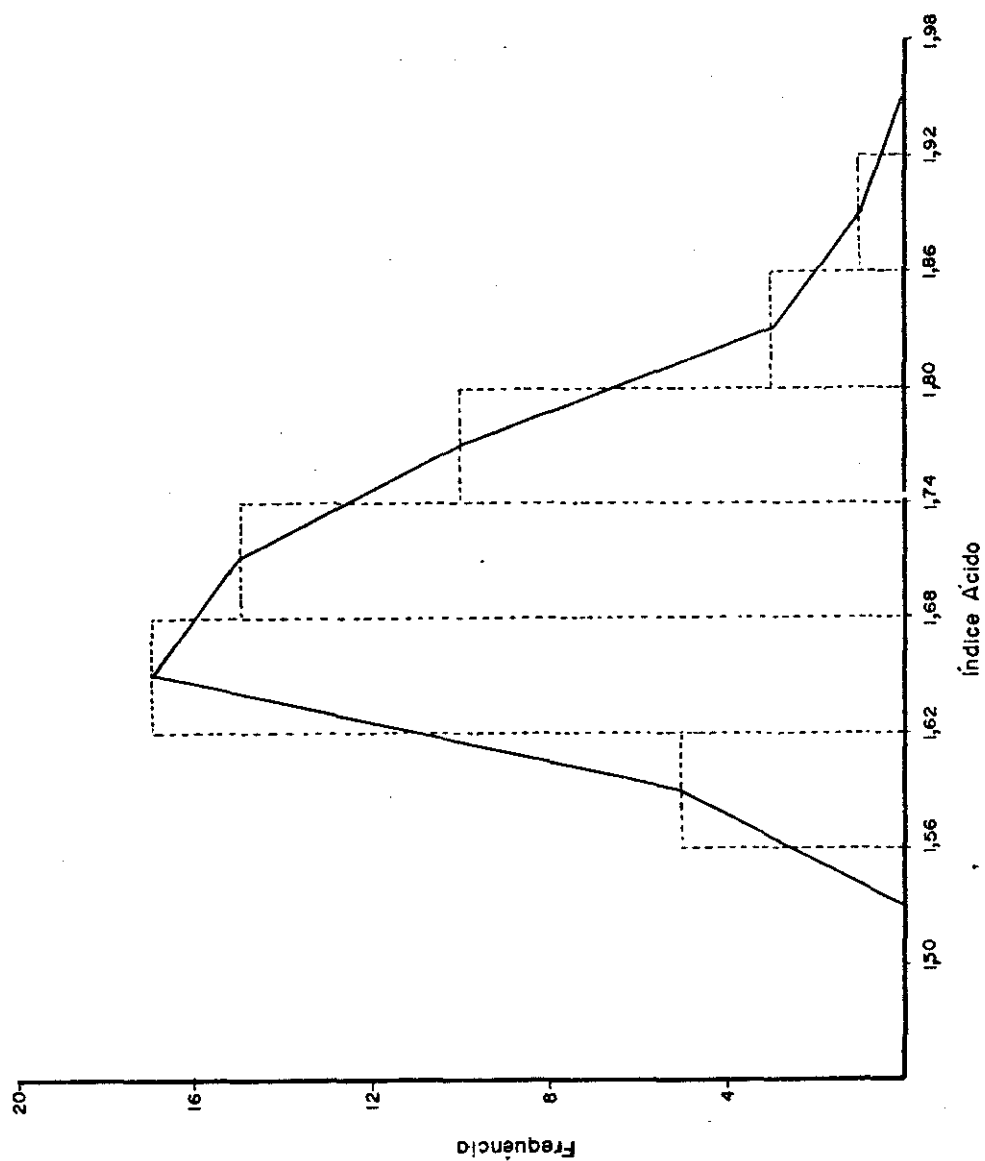


FIGURA 4 - Distribuição dos valores de Índice Ácido com suas respectivas frequências para *Aspergillus niger* - linhagem 10V10, não irradiada (0 Kr).

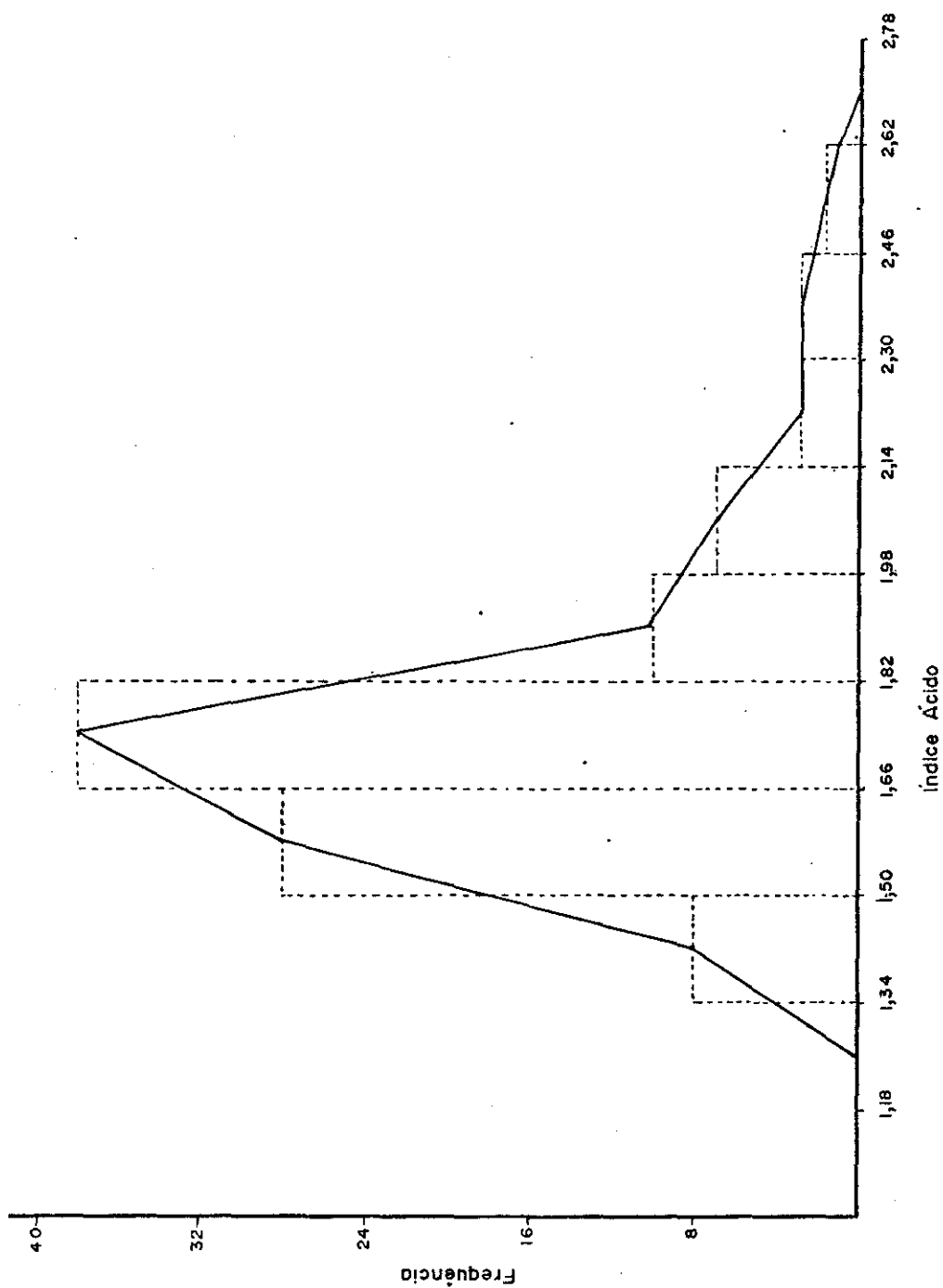


FIGURA 5 - Distribuição dos valores de Índice Ácido com suas respectivas frequências para *Aspergillus niger*, linhagem irradiada pela primeira vez com raios gama (80 Kr).

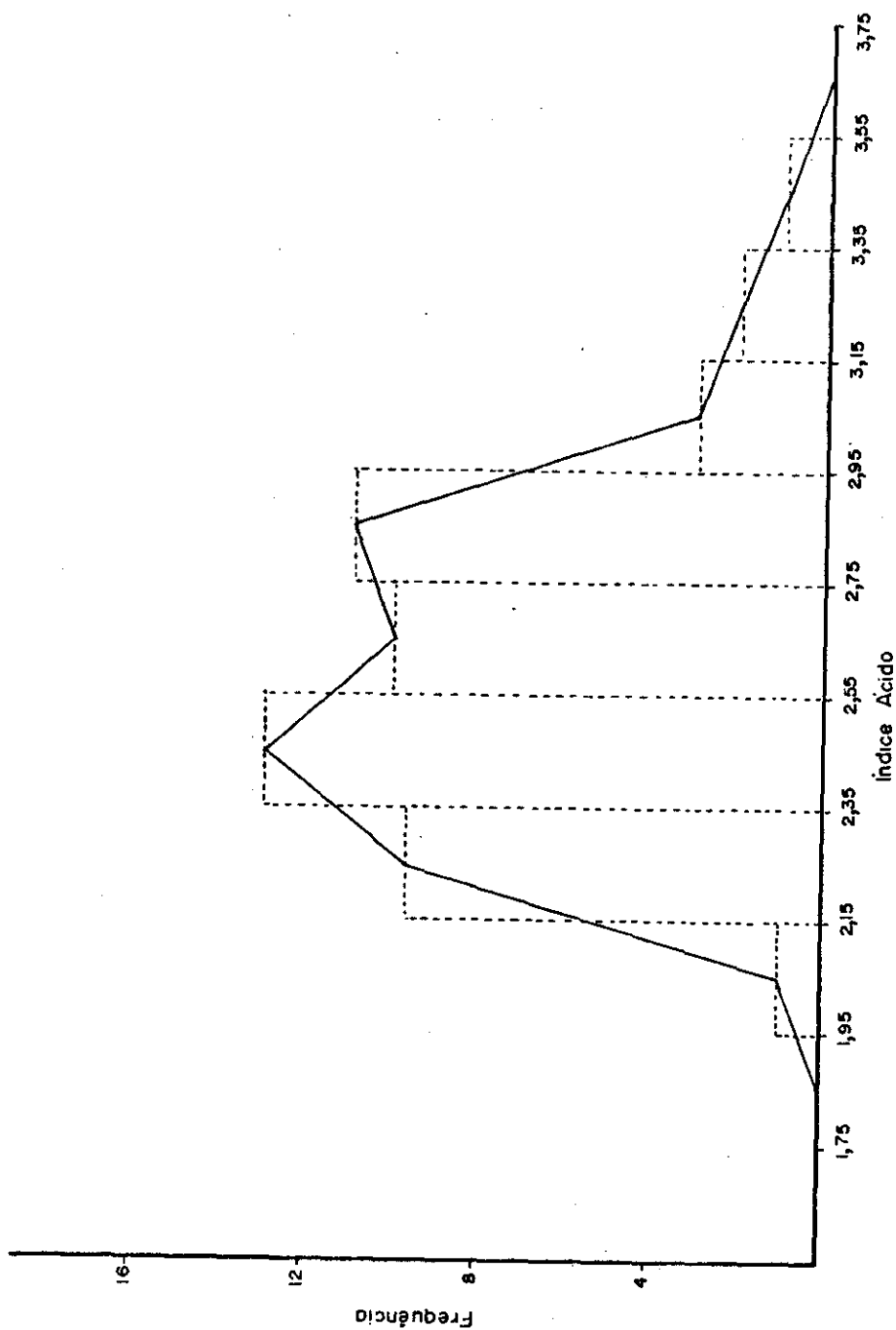


FIGURA 6 - Distribuição dos valores de Índice Ácido com suas respectivas frequências para *Aspergillus niger* - linhagem N14 21, irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr).

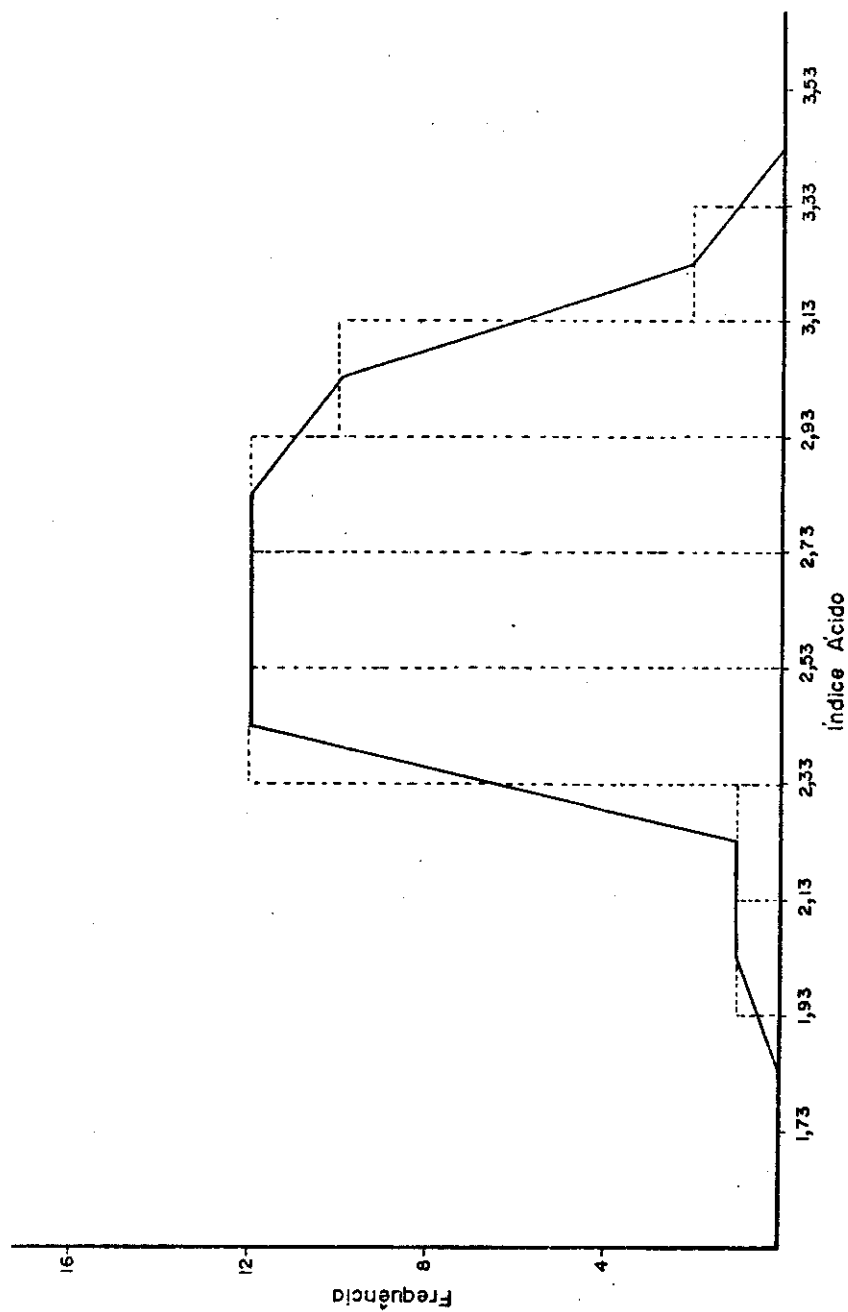


FIGURA 7 - Distribuição dos valores de Índice Ácido com suas respectivas frequências para *Aspergillus niger* - Linhagem N47 2i, irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr).

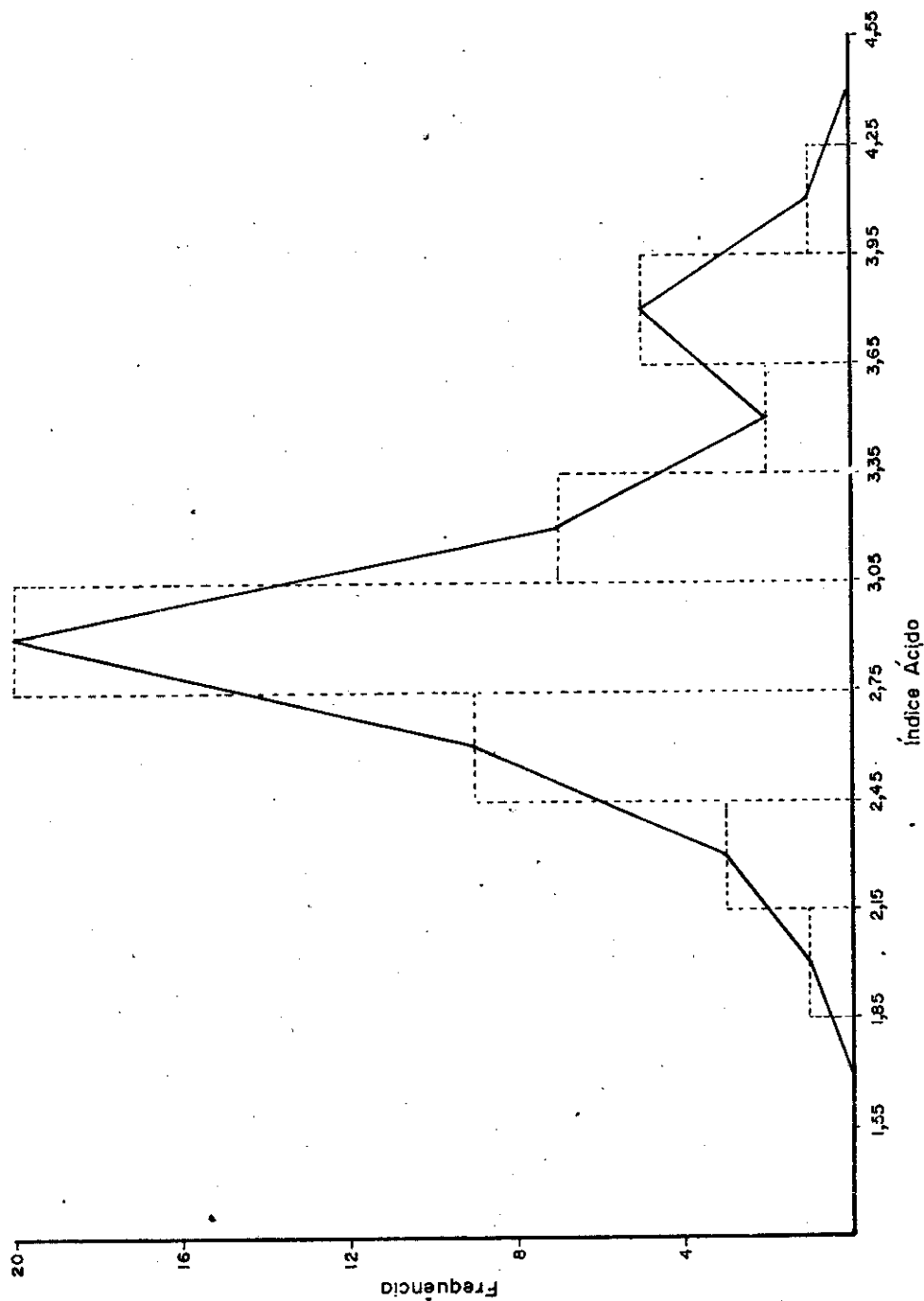


FIGURA 8 - Distribuição dos valores de Índice Ácido com suas respectivas frequências para *Aspergillus niger* - linhagem N47 31 22, ir radiada pela terceira vez com raios gama (80 Kr).

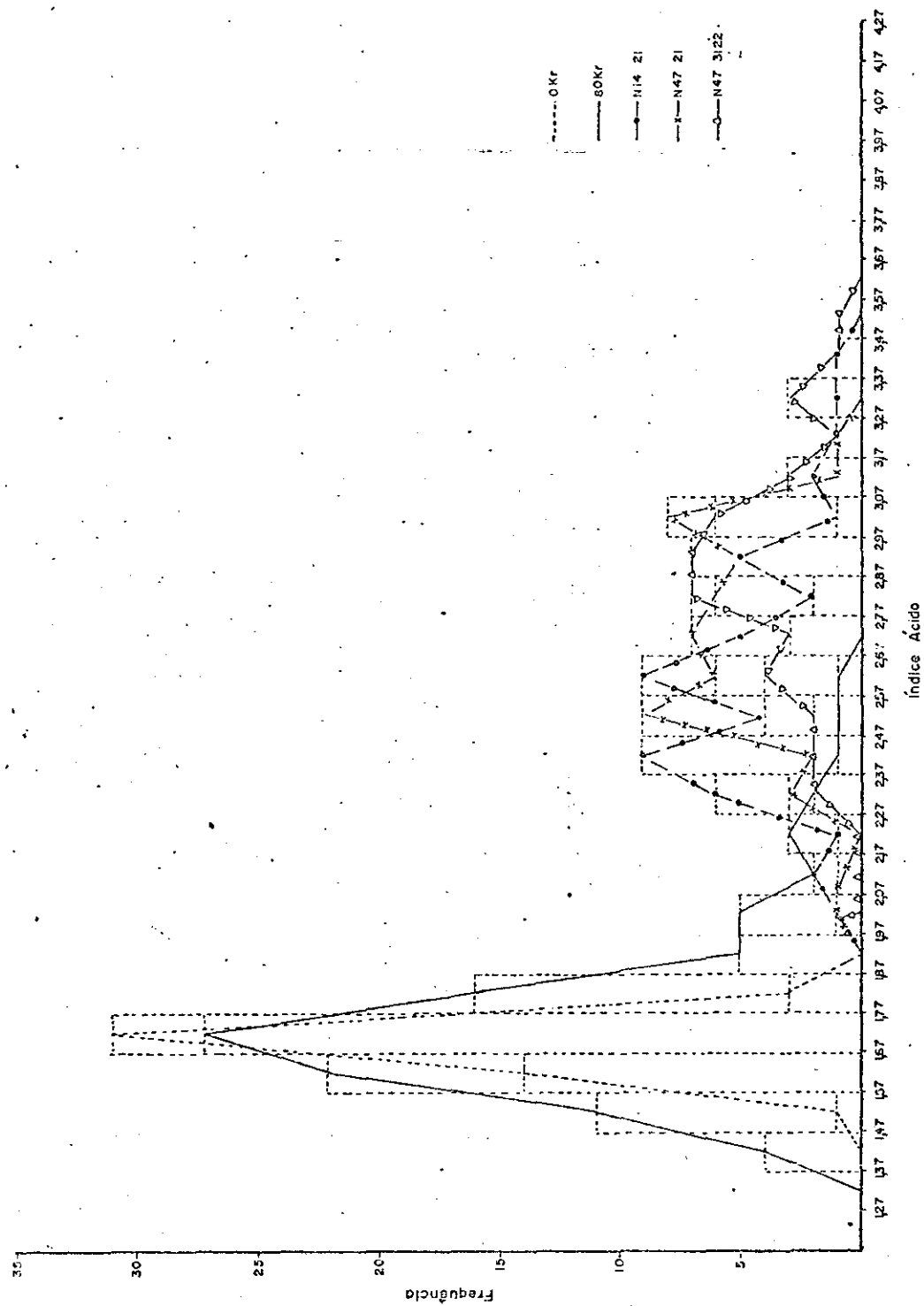


FIGURA 9 - Distribuição dos valores de Índice Ácido para as linhagens irradiadas e não irradiada, com suas respectivas frequências.

4.6 - Coeficientes de correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais.

Foram calculados os coeficientes de correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais nos dois meios de culturas diferentes, Tabela A-7 (Apêndice) e os valores de r obtidos foram de : $r = - 0,0439$ no meio de fermentação e $r = 0,1335$ no meio de Foster líquido.

Ambos valores de r foram não significativos, indicando que não houve correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais.

4.7 - Teste de estabilidade

Foi feita uma comparação de estabilidade, de acordo com a técnica descrita em 3.8, para linhagens irradiadas pela primeira, segunda e terceira vez com raios gama, na dose 80 Kr.

Os resultados obtidos encontram-se na Tabela A-8 (Apêndice). Os valores da Tabela referida, não tem uma distribuição normal, razão pela qual foi utilizada para cada valor a transformação do tipo $\sqrt{X + (0,5)}$, para que os valores fossem distribuídos de acordo com a distribuição de Poisson. Os valores transformados encontra-se na Tabela A - 9 (Apêndice).

Foi feito um esquema de análise de variância, nos moldes de experimentos completamente casualizados, cujos resultados encontram-se na Tabela 5.

TABELA 5 - Análise de Variância dos dados apresentados para estabilidade das linhagens irradiadas.

Causa de Variação	G.L.	S.Q.	Q.M.	F
Tratamento	3	2,7199	0,9066	17.91**
Resíduo	19	0,9632	0,0506	
Total	22	3,6831		

(**) Indica significância ao nível de 1% de probabilidade. Coeficiente de Variação = 8,07%.

Pelos dados apresentados na Tabela 5, verifica-se que houve um efeito significativo ao nível de 1% de probabilidade, devido à diferença de estabilidade das linhagens.

O estudo comparativo das médias de colônias com setores, foi feito pelo teste de Tukey, cujos resultados encontram-se na Tabela 6.

A d.m.s., pelo teste de Tukey, ao nível de 1% de probabilidade foi de 0,4570 para números diferentes de repetições e de 0,5075 para o mesmo número de repetições.

As linhagens N14 2i, N47 3i 22 e N47 2i não são diferentes entre si estatisticamente e estão em ordem decrescente para a média de colônias com setores.

A linhagem irradiada pela primeira vez com raios gama na dose 80 Kr, é estatisticamente diferente de todas as outras linhagens, ao nível de 1% de probabilidade, apresentando a menor média de colônias com setores e sendo portanto a mais estável.

TABELA 6 - Comparação da estabilidade para linhagens irradiadas pela primeira vez (80 Kr), segunda vez (N14 2i e N47 2i) e terceira vez (N47 3i 22) com raios gama na dose 80 Kr.

Tratamentos	Média de colônias com setores ⁽¹⁾	
Linhagem N14 2i	3,1454	a
Linhagem N47 3i 22	3,0471	a
Linhagem N47 2i	2,9052	a
Linhagem 80 Kr	2,3301	b

(1) Valores seguidos da mesma letra não são diferentes entre si ao nível de 1% de probabilidade.

5 - DISCUSSÃO

Para maior facilidade de apresentação, a discussão será dividida em sub-ítem, de acordo com a sequência dos resultados (Capítulo 4).

5.1 - Dose de irradiação gama

A radiação gama vem sendo largamente usada para produção de mutações em microrganismos, uma vez que é de fácil utilização desde que se tenha uma fonte disponível.

Opiniões diversas existem a respeito do grau de mortalidade para se obter maior número de mutantes ou de sobreviventes potenciais em programas de melhoramento. BURNETT (1975), se refere a uma sobrevivência de 5-1% como a mais indicada para obtenção de mutantes; STAUFER (1961) e SPRAGUE (1967), sugerem taxa de sobrevivência de 25-30% para melhor obtenção de mutantes para fim industrial; outros trabalhos sobre linhagens industriais indicam mortalidade ao nível de

90-99%. Entretanto pouco se conhece a respeito da eficácia de diferentes mutagênicos e doses adequadas para indução de mutações e seleção, tornando esta metodologia ainda bastante empírica (ALIKHANIAN, (1973).

Os resultados da Tabela 1 demonstraram que com a dose 80 Kr de radiação gama, já obteve-se sobrevivência de 1,61%, taxa considerada boa para os propósitos desejados de seleção.

Pela curva de sobrevivência da Figura 2, pode - se observar a existência de pelo menos duas inclinações que corresponderia à presença em alguns conídios de dois núcleos, levando-se em conta que a irradiação estaria atingindo mais de um alvo por conídio e para a inviabilidade haveria necessidade de um evento duplo, desde que a mortalidade pela radiação gama pode ser explicada pela "teoria do alvo" (LEA, 1956). Tal fato concorda com as observações de BARACHO (comunicação pessoal), BONATELLI JUNIOR e AZEVEDO (1974a) em *Aspergillus niger* e MESSIAS e col. (1974) em *Aspergillus flavus*.

5.2 - Correlação entre Índice Ácido e diâmetro da colônia

Pelos resultados obtidos com valores de r (Tabela 2), verificou-se que houve significância estatística ao nível de 1% de probabilidade, indicando correlação negativa entre Índice Ácido e diâmetro da colônia. Tal observação poderia indicar a correlação de um caráter morfológico, no caso o lento desenvolvimento da colônia, com a maior produção de ácidos, hipótese defendida por GARDNER e cols. (1956), a respeito de ácido cítrico. Entretanto, HANNAN (1972), analisou um certo número de linhagens "dwarf" de *Aspergillus niger*, mostrando que tal caráter morfológico não estava sempre ligado com a propriedade de alta produção. Outros autores em diversos microrganismos industriais também procuraram estabelecer correlação entre certos caracteres morfológicos e produção; no entanto, pelos resultados obtidos não se encontrou ainda qualquer característica morfológica que pudesse ser associada ao caráter produção.

Do estudo comparativo dos valores de r (Teste B, cujos valores não foram incluídos nos resultados), pode-se verificar que a população não irradiada é diferente das populações irradiadas, sendo que entre as últimas não se observaram diferenças estatísticas significativas, mostrando com isso que a irradiação gama deve ter provocado efeito(s) sobre as populações irradiadas.

5.3 - Efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido

Pelos resultados da análise de variância para verificar o efeito do tratamento com radiação gama sobre o Índice Ácido (Tabela 3), observou-se que o valor de F é significativo ao nível de 1% de probabilidade, indicando diferença no Índice Ácido das linhagens irradiadas e não irradiada.

A explicação do efeito da radiação gama sobre as populações irradiadas poderia ser devido a :

a) - Efeito fisiológico da irradiação

A radiação gama provocaria certos efeitos fisiológicos nas linhagens, que poderiam ser manifestadas por exemplo no lento crescimento da colônia e conseqüentemente, a relação: diâmetro do halo ácido/diâmetro da colônia, ficaria alterada, aumentando assim o valor do Índice Ácido. A hipótese acima pode ser refutada, uma vez que tal efeito fisiológico seria apenas temporário e o fungo teria condições de corrigir tal anormalidade, retornando às suas atividades normais de crescimento e foi demonstrado que mesmo após sub-culturas, o valor de Índice Ácido continuou o mesmo.

b) - Mutações

Conhecendo a atividade mutagênica da radiação gama, mutações poderiam ter ocorrido, afetando o Índice Ácido das populações irradiadas. Entretanto, o número de mutações seria pequeno e não atingiria grande número de indivíduos, como observado nos Índice Ácido das colônias analisadas e assim, mutação por si só, embora pudesse explicar casos isolados, não justificaria o aumento do Índice Ácido na maioria dos indivíduos das populações irradiadas.

c) - Conídios heterocarióticos

O *Aspergillus niger*, embora considerado por vários autores como possuindo conídios uninucleados (DANGEARD, 1907; WHELDON, 1940; YUILL, 1950), foi analisado por outros, os quais encontraram uma variação no número de núcleos conidiais, sendo a maioria binucleados (CHANG e col., 1974; BONATELLI JUNIOR e AZEVEDO, 1974b ; BARACHO e col., 1975).

Na explicação da hipótese sugerida, pode-se admitir que alguns conídios binucleados teriam dois núcleos diferentes, um seria normal e outro carregaria uma mutação recessiva letal, sendo que os dois em conjunto acarretam um vigor de híbrido. DODGE (1942), denominou vigor heterocariótico à associação de núcleos diferentes num citoplasma comum, que po

deria resultar expressão mais vigorosa de qualquer caráter; PRASAD (1970), discutiu em *Aspergillus niger*, conídios heterocarióticos que apresentavam maior tamanho do que os conídios homocarióticos; BARACHO e col. (1970), explicaram em *Aspergillus nidulans*, o aumento do tamanho do cleistotécio em linhagens heterocarióticas, devido a heterose ou vigor de híbrido. Desse modo, para explicar a produção de ácidos aumentada, admitimos serem os conídios heterocarióticos os responsáveis; outros conídios com dois núcleos normais teriam produção inferior e aqueles com dois núcleos que carregassem mutações recessivas letais, pereceriam. Com a irradiação gamma, os conídios uninucleados seriam mais facilmente eliminados do que os conídios binucleados, aumentando a porcentagem dos últimos. Tal explicação hipotética, baseia-se em algumas observações :

- 1 - Pela taxa de sobrevivência (Tabela 1) de 61,81% da linhagem não irradiada (controle) cujos conídios admitimos ter núcleos: um normal ou um normal e um letal ou dois normais; os outros 38,19% deveriam conter conídios com um ou dois núcleos letais. Assim, poderíamos também explicar a baixa taxa de sobrevivência natural da linhagem utilizada.
- 2 - Dentre os isolados que apresentavam altos valores de Índice Ácido, selecionados para segunda e terceira

ra irradiação, alguns baixavam ou permaneciam iguais nos valores de Índice Ácido em relação à média de Índice Ácido da população irradiada. Isso talvez seja devido a presença de um ou dois núcleos normais (principalmente os últimos), na maioria dos conídios.

- 3 - Número baixo de sobrevivência das linhagens irradiadas pela segunda e terceira vez (dados não publicados), levando-se em consideração vários fatores que deveriam ter ocorrido como a eliminação de conídios uninucleados, conídios com dois núcleos letais, acumulação de mutações em alguns conídios, etc.

Alguns estudos poderiam ser feitos para elucidar ou refutar tal hipótese sugerida, como: micromanipulação de conídios e germinação para observação da letalidade de alguns; sobrevivência esperada de 100% para conídios que tivessem baixa produção de ácidos, uma vez que teriam um ou dois núcleos normais; número de núcleos conidiais das populações irradiadas.

Pode-se comparar pelo teste de Tukey (Tabela 4), as médias de Índice Ácido das linhagens irradiadas e não irradiada (controle). Pelos resultados, pode-se verificar que houve uma ordem crescente na média de Índice Ácido, da linhagem.

gem não irradiada para a que sofreu irradiação pela terceira vez, mostrando que o Índice Ácido aumentou seu valor à medida que nova irradiação era aplicada. Houve aumento na média de Índice Ácido das linhagens não irradiada e irradiada pela primeira vez, embora não fosse suficientemente grande para acusar significância estatística; os demais valores foram significativos estatisticamente ao nível de 1% de probabilidade.

5.4 - Distribuição da frequência e valores de Índice Ácido das populações pertencentes às linhagens irradiadas e não irradiada; progresso na seleção do Índice Ácido.

Pelos resultados dos gráficos (Figuras 4, 5, 6, 7, 8, e 9) referentes aos valores de Índice Ácido das populações irradiadas e não irradiada, verifica-se que a população da linhagem que sofreu irradiação pela primeira vez apresentou maior variabilidade que a população da linhagem controle, tal variabilidade é acentuada na segunda e terceira irradiação gama, principalmente nesta última.

A figura 4, mostra que a população não irradiada (controle) já apresenta variabilidade; seleção natural poderia ser feita escolhendo isolados com maiores valores de Índice Ácido, mas provavelmente a nova população ou na próxima

ma seleção, a variabilidade diminuiria e assim o emprego de mutagênicos faz-se necessário para restaurar a variabilidade perdida; fato semelhante foi observado por MAGNI (1956), na produção de vitamina B₁₂ por *Bacillus megatherium*.

Desde que o caráter produção seja poligênico (BURNETT, 1975), a radiação gama embora sem produzir um número excessivo de mutações, provavelmente após repetidas irradiações deve ter afetado algum(s) gene(s) diferente(s) de outros, obtendo-se assim variantes com relação aos valores de Índice Ácido.

Pode-se também verificar pelos gráficos que os valores de Índice Ácido das populações irradiadas foram aumentados em relação à linhagem não irradiada, mostrando progresso na seleção, que pode ser calculado através da diferença das médias do Índice Ácido, de acordo com a Tabela 7.

Isto permite concluir, que o ganho maior na seleção foi no terceiro ciclo de irradiação, mostrando que com aplicação de radiação gama e seleção de isolados com maiores valores de Índice Ácido é possível, através do meio de Foster sólido. Tal resultado poder-se-ia obter se selecionasse para colônias pequenas, uma vez que houve correlação negativa entre diâmetro da colônia e Índice Ácido, como mostrado no item 5.2 da discussão.

TABELA 7 - Médias do Índice Ácido das populações irradiadas e não irradiada e o ganho na seleção.

Linhagens	Média do Índice Ácido da população	Ganho na seleção
0 Kr (controle)	$X_0 = 1,70$	$X_0 - X_1 = 0,77$
80 Kr (1. ^a irradiação)	$X_1 = 1,77$	$X_0 - X_2 = 0,96$
N47 21		$X_0 - X_3 = 1,30$
e (2. ^a irradiação)	$X_2 = 2,66$	
N14 21		$X_1 - X_2 = 0,89$
N47 31 22 (3. ^a irradiação)	$X_3 = 3,00$	$X_2 - X_3 = 0,34$

Desde que foi realizado três ciclos de seleção e temos para cada população uma média de Índice Ácido, correlação foi feita e mostrou-se significativa ao nível de 5% de probabilidade ($r = 0,954465$), indicando que em cada ciclo de seleção, há progresso no caráter Índice Ácido, como representado na Figura 10. No entanto, deve-se ressaltar que um contínuo aumento no Índice Ácido por seleção, resultaria na estabilização da variabilidade, mesmo se estimulada por tratamentos mutagênicos. Observação semelhante foi constatada na produção de Estreptomicina por *Streptomyces* (ALIKHANIAN, 1962) e provavelmente deve ser regra geral para qualquer característica estudada.

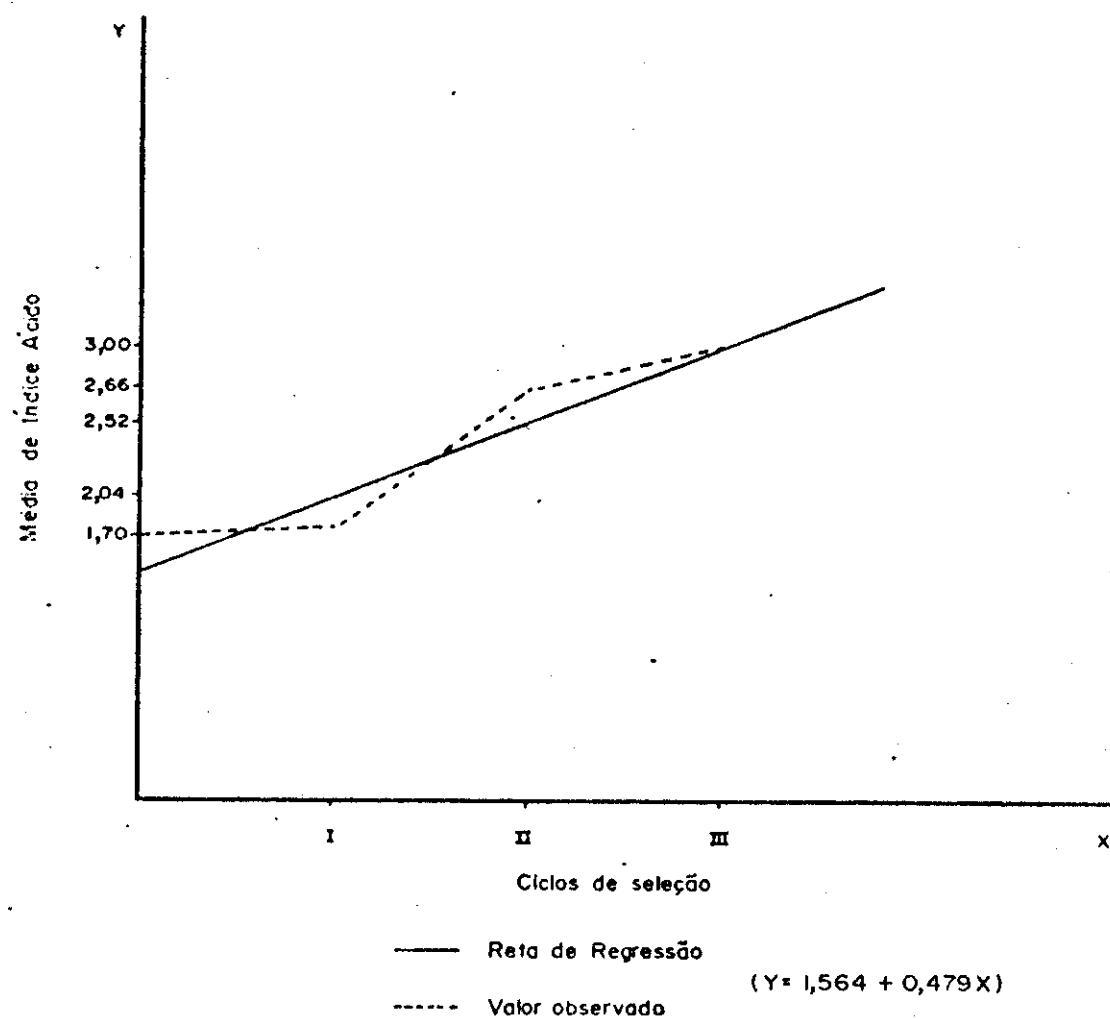


FIGURA 10 - Reta de regressão (valor calculado) e valor observado para a média de Índice Ácido e ciclos de seleção.

5.5 - Fermentação

A Tabela A-7 (Apêndice) mostra os resultados de fermentação de alguns isolados de linhagens irradiadas derivadas de *A. niger* - linhagem 10V10.

A estimativa do crescimento do fungo em meio líquido, foi feita através do peso do micélio seco e pelos resultados obtidos (Tabela A-7 do Apêndice), verifica-se que a maioria dos isolados tem peso do micélio seco inferior ao do controle e isto era esperado, confrontando com os resultados de desenvolvimento lento da maioria das colônias das populações irradiadas; tal crescimento explicaria parcialmente a baixa produção de ácidos totais, embora o valor de Índice Ácido fosse elevado. Entretanto, alguns isolados com altos valores de Índice Ácido apresentam também altos valores de ácidos totais e esses isolados poderiam ser ensaiados na indústria produtora de ácido cítrico para verificar se haveria correlação com os dados obtidos no laboratório, o que valorizaria este trabalho, com uma contribuição aplicada.

Uma sugestão para indústria no sentido de corrigio o lento crescimento, seria o de aumentar o número de conídios no meio para fermentação ou que esta seja prolongada, para que o crescimento seja compensado e aumente a produção de ácido.

Pela análise dos coeficientes de correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais (item 4.6 dos resultados), pode-se verificar pelos valores de r obtidos, que não houve correlação entre Índice Ácido e produção de ácidos totais em nenhum dos dois meios de culturas empregados. Esses resultados são contrastantes com os de GARDNER e col. (1956), os quais encontraram correlação entre a relação: diâmetro do halo ácido/diâmetro da colônia, com produção de ácido cítrico e inclusive discriminaram um valor que, acima dele havia correlação positiva.

Visto pelos resultados, não ser o Índice Ácido, um método para selecionar os melhores produtores de ácidos, ele poderia ser bastante útil na triagem inicial de organismos produtores ou não de ácidos, de acordo com FOSTER e DAVIS (1949).

Futuros estudos poderiam ser explorados no sentido de selecionar os melhores produtores de ácidos, através do tamanho da colônia e estabelecer por ensaios de fermentação, uma faixa de tamanho das colônias, que produzisse maior quantidade de ácidos ou então procurar uma amplitude de Índice Ácido, que correspondesse a maior produção.

5.6 - Estabilidade

O fenômeno da instabilidade genética é amplamente conhecido em vários organismos, entre eles o milho, a *Drosophila*, o fumo, as bactérias e os fungos.

As causas de instabilidade em microrganismos foram revisadas por MENEZES (1974) e basicamente os principais fatores incluem: mutação gênica, adição de material genético extra, herança citoplasmática, segregação, permuta mitótica ou haploidização, aneuploidia, translocação cromossômica, deleção e duplicação em tandem, inversão pericêntrica, transição de bases e genes mutadores.

Pelos resultados obtidos na análise de variância (Tabela 5) para verificar se houve efeito da radiação gama sobre a estabilidade das linhagens irradiadas, observou-se diferença estatística significativa ao nível de 1% de probabilidade. O teste de Tukey (Tabela 6) complementou tal estudo, indicando o grau de estabilidade. Os resultados mostraram que a linhagem irradiada pela primeira vez, apresentou-se mais estável do que as que sofreram irradiação pela segunda e terceira vez com raios gama.

A maior instabilidade das linhagens irradiadas pela segunda e terceira vez, pode ser explicada pelo provável aumento no número de aberrações cromossômicas provocadas

pela radiação gama, o que causaria o aparecimento de setores no crescimento da colônia, embora estudo da causa da instabilidade não tivesse sido investigado.

A instabilidade apresentada pelo *A. niger*, apesar de pouco estudada, é discutida por alguns autores; BONATELLI JUNIOR e AZEVEDO (1974b), atribuíram a instabilidade à condição heterocariótica dos conídios; NGA e col.(1975) analisaram algumas linhagens isoladas do solo e justificaram a instabilidade pelo fato dos conídios possuírem núcleos diplóides heterozigotos.

No entanto, apesar deste fatos e outras teorias, permanece obscuro a causa fundamental da instabilidade em *Aspergillus niger* e a solução do problema muito contribuiria para a estabilização de microrganismos de valor industrial.

6 - RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se estudar através do método de Foster, a seleção de *Aspergillus niger*, para produção de ácidos, utilizando radiação gama. Também foi estudada a produção de ácidos em meio líquido para confirmação do método de Foster na seleção de melhores produtores. Por fim, procurou-se conhecer possível efeito da radiação gama sobre a instabilidade da linhagem utilizada. Para isso, foi empregada uma linhagem industrial, usada na produção de ácido cítrico. Foram feitos três ciclos de seleção, sendo que cada população foi analisada quantitativamente quanto ao caráter produção de ácidos, através do fator Índice Ácido.

Dos experimentos realizados, os seguintes resultados e conclusões foram obtidos :

- a) - Com uma dose de radiação gama de 80 Kr obteve-se 1,61% de sobreviventes. A curva de sobrevivência indicou a existência de conídios binucleados e co

nídios não irradiados apresentaram porcentagem de sobrevivência inferior a 100%. Por esses resultados foi possível concluir-se que a dose acima citada se presta bem a indução de mutações em *A. niger* e que a baixa sobrevivência dos conídios pode ser atribuída a existência de mutação letal em um dos núcleos conidiais.

- b) - Foi encontrada uma correlação negativa entre o Índice Ácido e o diâmetro das colônias em todas as populações irradiadas, o que permitiu concluir que a seleção para produção de ácidos através de altos Índices Ácidos pode-se selecionar também colônias de crescimento menor.
- c) - Houve uma diferença estatisticamente significativa entre colônias produzidas a partir de conídios irradiados quando comparados com colônias vindas de conídios não irradiados com relação ao Índice Ácido. A média obtida para o Índice Ácido aumentou após cada irradiação sendo que o maior valor foi obtido após a terceira irradiação. Os resultados permitiram concluir que a radiação gama, como esperado provocou efeitos provavelmente genéticos na linhagem empregada. A população irradiada mostrou maior variabilidade do que a população não irradiada.

da com relação ao Índice Ácido, mostrando que irradiação é um efetivo processo de aumento de variabilidade, indispensável para posterior seleção. Conclui-se também através do progresso obtido pela seleção de isolados mais produtivos com relação ao Índice Ácido, que o método de seleção empregado foi eficiente. Finalmente, o aumento geral no valor de Índice Ácido após irradiação foi atribuído à existência de conídios heterocarióticos contendo um núcleo normal e outro contendo um recessivo letal.

- d) - Não houve correlação entre os valores de Índice Ácido em meio de Foster e os resultados obtidos em meio líquido de fermentação. Esses resultados permitem concluir que seleção para Índice Ácido em meio de Foster não é condição *Sine qua non* para que a linhagem tenha alta produtividade em condições industriais.
- e) - Ensaio de estabilidade das linhagens irradiadas através do número de setores, revelou que a linhagem que sofreu a primeira irradiação mostrou-se mais estável do que as com segunda e terceira irradiação. Concluiu-se portanto que a obtenção de linhagens estáveis e portanto de interesse industrial poderá ser facilmente conseguida com doses menores

de radiação, do que com múltiplas irradiações ou mesmo altas doses de irradiação, embora a explicação do fenômeno ainda permaneça obscura.

7 - SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present work was carried out aiming the study, by Foster method, of the *Aspergillus niger* selection in relation of the acid production using gamma rays as mutagenic agent. It was studied also the acid production in liquid medium in an attempt to confirm the Foster method for selection of the best producers. Finally it was studied the effects of gamma rays on the instability of the strain used.

One industrial strain of *A. niger*, normally utilized for citric acid production was used. Three selection cycles were carried out, each population being quantitatively analysed for the character acid production through the unitage acid factor. From the experimental data the following results and conclusions could be drawn :

- a - With a doses of 80 kr of gamma irradiation, it was obtained 1.61% survival. The survival curve indicated the presence of binucleated conidia ; non irradiated conidia did present a percentage of survival lower

than 100%. From the results it was possible to conclude that the used doses in appropriated to induction of mutations in *A. niger* and that the low survival of the conidia could be due to the existence of a lethal mutation in one of the conidial nuclei.

- b - It was found a negative correlation between unitage acid and diameter of the colonies in all irradiated populations; this, permitted the conclusion that selection for acids production through elevated unitage acid could also select colonies with low growth.
- c - There was statistical significant difference between colonies produced from irradiated conidia when compared to colonies from non-irradiated conidia in relation to the unitage acid. The obtained mean for the unitage acid increased after each irradiation, the highest value being obtained after each irradiation. These results permitted the conclusion that gamma rays, as expected, produced probably genetic effects in the used strains. The irradiated population has shown greater variability when compared to the non-irradiated population regarding the character unitage acid; this shows that irradiation is an effective process to increase variability, indispensable to further selection. It can also be concluded

through the obtained progress by selection of the most productive isolates in relation to the unitage acid character, that the selection method employed was efficient. Finally, the general increased in the unitage acid value after irradiation was attributed as being due to the presence of heterokaryotic conidia consisting of a normal nucleus and another one bearing a recessive lethal.

- d - There was no correlation between the value of unitage acid in Foster's medium and the results obtained in fermentation liquid medium. Such results permitted the conclusion that selection for unitage acid in Foster's medium is not a "sine qua non" condition to the high productivity of the strain in industrial conditions.
- e - Stability tests for the strains irradiated through the sector number, has shown that greater stability was achieved after the first irradiation. It can then be concluded that the obtention of stable strains, of industrial value, can easily be obtained with low doses of irradiation than with multiple irradiation or even higher doses, although the explanation for these facts remains obscure.

8 - BIBLIOGRAFIA CITADA

- ALIKHANIAN, S.I., 1962. Induced mutagenesis in the selection of microorganisms. Advances in Applied Microbiology. 4 : 1-9.
- ALIKHANIAN, S. I., 1973. Principal results and unsolved problems in microbial selection. In : VANĚK, Z., Z. HOŠŤÁLEK e J. CUDLÍN Eds. Genetics of Industrial microorganisms. Actinomycetes and Fungi. Prague and Elsevier, Academia, p. 9-18.
- BALL, C., 1973. Improvement of Penicillin productivity in *Penicillium chrysogenum* by recombination. In: VANĚK, Z., Z. HOŠŤÁLEK e J. CUDLÍN, Eds. Genetics of Industrial Microorganisms-Actinomycetes and Fungi. Prague and Elsevier, Academia, p. 227-237.
- BALL, C. e J. L. AZEVEDO, 1976. Genetic instability in parasexual fungi. In: MACDONALD, K. D., Ed. Proceedings of Second International Symposium in Genetics of industrial Microorganisms. New York, Academic Press, p. 243-251.
- BANIK, A. K., 1974. Fermentative production of citric acid by *Aspergillus niger*: strain selection an optimum cultural conditions for improved citric acid production. Journal of Food Science and Technology, Indian. 12 : 111-114.

- BANKS, G.T., K.W. BUCK, E.B. CHAIN, J.E. DARBYSHIRE, F. HEMMELWEILT, G. RATTI, T.J. SHARPE e D.N. PLANTEROSÉ, 1970. Antiviral activity of double stranded RNA from a virus isolated from *Aspergillus foetidus*. Nature. 227 : 505-507.
- BARACHO, I. R., 1976. Comunicação pessoal.
- BARACHO, I. R., W.R. COELHO e M. KIMURA, 1975. Variação no número de núcleos em conídios de *Aspergilli* do grupo *niger*. Ciência e Cultura. 27 : 227.
- BARACHO, I. R., R. VENCOVSKY e J. L. AZEVEDO, 1970. Correlation between size and hybrid or selfed state of the cleistothecia in *Aspergillus nidulans*. Transactions British Mycological Society. 54 : 109-116.
- BEADLE, G. W. e E. L. TATUM, 1941. Genetic control of biochemical reaction in *Neurospora*. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 27 : 499-506.
- BONATELLI JUNIOR, R. e J. L. AZEVEDO, 1974a. Efeitos de mutagênicos e inibidores em *Aspergillus niger*. Relatório Científico, Instituto e Dpto. de Genética, ESALQ/USP, 42-46.
- BONATELLI JUNIOR, R. e J. L. AZEVEDO, 1974b. Instabilidade em *Aspergillus niger*. Relatório Científico, Instituto e Dpto. de Genética, ESALQ/USP, 47-48.
- BURNETT, J. H., 1975. *Mycogenetics*. London and New York, John Wiley & Sons, 375 pp.

- CALAM, G. T., 1972. Genetics and development of industrial strains. Process Biochemistry. 7 : 29-31.
- CHANG, L. T. e C. A. TERRY, 1973. Intergenic complementation of glucoamylase and citric acid production in two species of *Aspergillus*. Applied Microbiology. 25 : 890-895.
- CHANG, L. T., C. A. TERRY e R. W. TUVESON, 1974. The influence of heterokaryotic conidia on the selective recovery of somatic diploids in *Aspergillus niger*. Mycologia. 66 : 67-75.
- CIEGLER, A. e K. B. RAPER, 1957. Application of heterokaryons of *Aspergillus* to commercial - type fermentations. Applied Microbiology. 5 : 106-110.
- CURRIE, J. N., 1917. The citric acid fermentation of *Aspergillus niger*. Journal of Biological Chemistry. 31 : 15-37.
- DANGEARD, P. A., 1907. Recherches sur le développement du périthèce chez les ascomycètes. Botaniste. 10 : 1-385.
- Apud: YUILL, E., 1950. The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. Transactions of the British Mycological Society. 33 : 324-331.
- DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - A Review. Current Science. 41 : 593-596.
- DAS, A. e P. NANDI, 1969. A new strain of *Aspergillus niger* producing citric acid. Experientia. 25 : 1211.
- DEMEREK, M., 1945. Carnegie Institution Washington Yearbook, 44 : 117. Apud: DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - A Review. Current Science. 41 : 593-596.

- DILLER, V. M., A. A. TYTELL e H. KERSTEN, 1946. Mutation of *Aspergillus niger* Van Tieghen by means of soft-X-rays. Journal of Bacteriology. 51 : 404.
- DODGE, B. O., 1942. Heterokaryotic vigor in *Neurospora*. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 69 : 7-11.
- DOELGER, W. P. e S. C. PRESCOTT, 1934. Citric acid fermentation. Industrial Engineering Chemistry. 26 : 1142-1149.
- ELANDER, R. P., M. A. ESPENSHADE, S. G. PATHAK e C. H. PAN, 1973. The use of parasexual genetics in a industrial - strain improvement program with *Penicillium chrysogenum*. In : VANĚK, Z., Z. HOŠTÁLEK e J. CUDLÍN, Eds. Genetics of Industrial Microorganisms - Actinomycetes and Fungi. Prague and Elsevier, Academia, p. 239-254.
- FOSTER, J. W., 1949. Chemical Activities of Fungi. New York, Academic Press, 378 pp.
- FOSTER, J. W. e H. DAVIS, 1949. Detection and occurrence of acid-producing fungi. Bulletin of the Torrey Botanical Club. 76 : 174-176.
- GARDNER, J. F., L. V. JAMES e S. D. RUBBO, 1956. Production of citric acid by mutants of *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology. 14 : 228-237.
- GERHARDT, P., W. W. DORREL e I. L. BALDWIN, 1946. Citric acid fermentation of beet molasses. Journal of Bacteriology. 52 : 555-564.
- HANNAN, M. A., 1972. Variants of *Aspergillus niger* induced by gamma rays. Indian Journal of Experimental Biology. 10 : 379-381.

- ILCZUK, Z., 1968. Genetic of citric acid producing strains of *Aspergillus niger*. Citric acid synthesis by morphological mutants induced with UV. Acta Microbiologica Polonica. 17 : 331-336.
- JAMES, L. V., S. D. RUBBO & J. F. GARDNER, 1956. Isolation of high acid yielding mutants of *Aspergillus niger* by a paper culture selection technique. Journal of General Microbiology. 14 : 223-227.
- JOHNSON, M. J., 1954. The citric acid fermentation. In : UNDERKOFER, L. A. & R. J. HICKEY, Eds. Industrial Fermentations, vol I. New York, Academic Press, p. 420-445.
- JOHNSTON, J. R., 1975. Strain improvement and strain stability in filamentous fungi, In : SMITH, J. E. & D. R. BERRY, Eds. The Filamentous Fungi - Industrial Mycology, vol. 1. London, Edward Arnold, Publ., John Wiley & Sons, Ltd., p. 59-78,
- KRESLING, E. K. & E. A. STERN, 1935. Proceedings Institute Sciences Research of Food Industrial 3 : 5. Apud : DAS, A., 1972. Strain selection in citric acid fermentation - A Review. Current Science. 41 : 593-596.
- LEA, D. E., 1956. Actions of radiation on living cells. Cambridge Univ. Press, 416 pp.
- LHOAS, P., 1961. Mitotic haploidization by treatment of *Aspergillus niger* diploids with para-fluoro-phenylalanine. Nature. 190 : 744.
- LHOAS, P., 1967. Genetic analysis by means of the cycle paraxual in *Aspergillus niger*. Genetical Research. 10 : 45-61.

- LHOAS, P., 1968. Growth rate and haploidization of *Aspergillus niger* on medium containing p-fluorophenylalanine. Genetical Research. 12 : 305-315.
- LHOAS, P., 1972. Mating pairs of *Saccharomyces cerevisiae* infected with double stranded RNA viruses from *Aspergillus niger*. Nature New Biology. 236: 86-87.
- LOCKWOOD, L. B., 1975. Organic acid production. In : SMITH, J. E. e D. R. BERRY, Eds. The Filamentous Fungi - Industrial Mycology, vol. 1. London, Edward Arnold, Publ. , John Wiley & Sons, Ltd., p. 140-157.
- MAGNI, G. E., 1956. Selezione e mutazione nel miglioramento di un carattere fermentativo in *B. megatherium*. Atti XI Congresso Nazionale del Microbiology. (Palermo). Apud : SERMONTI, G., 1969. Genetics of producing Microorganisms. London and New York, John Wiley & Sons, Ltd., p. 110-141.
- MCCANN, E. P. e C. T. CALAM, 1972. The metabolism of *Penicillium chrysogenum* and the production of penicillin using a high yielding strain at different temperatures. Journal of Applied Chemistry and Biotechnology. 22 : 1201-1208.
- MENEZES, E. M., 1974. Análise genética de variantes deteriorados e suas reversões em *Aspergillus nidulans* (Eidam) Winter. Piracicaba, ESALQ/USP, 114 p. (Tese de Mestrado).
- MESSIAS, E. L., J. P. BARROS e J. L. AZEVEDO, 1974. Número de núcleos em conídios de *Aspergillus flavus*, LINK. Relatório Científico, Instituto e Depto. de Genética, ESALQ/USP, 95-99.

- MILLIS, N. F., B. H. TRUMPY e B. M. PALMER, 1963. The effect of lipides on citric acid production by and *Aspergillus niger* mutant. Journal of General Microbiology. 30 : 365-379.
- MUSÍLKOVÁ, M. e Z. FENCL, 1970. Isolation of auxotrophic mutants of *Aspergillus niger* by Ethylmethane Sulphonate treatment. Folia Microbiolōgica. 15 : 34-39.
- NGA, B. H., S. P. TEO e G. LIM, 1975. The occurrence in nature of a diploid strain of *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology. 88 : 364-366.
- PERLMAN, D. e J. C. SIH, 1960. Fungal synthesis of citric, fumaric and itaconic acids. Progress Industrial Microbiology. 2 : 168-194.
- PERQUIN, L. H. D., 1938. Beydrage tot de Kennis der oxidativen dissimilatie van Tieghehen. Dissertation, Technische Hogeschool, Delft, W. D. Meijniera. Apud : SHU, P. e M. J. JOHNSON, 1948. Citric acid production by submerged fermentation with *Aspergillus niger*. Industrial and Engineering Chemistry. 40 : 1202-1205.
- PIEDRABUENA, A. E. e I. R. BARACHO, 1976. Teste de significância entre coeficientes de correlação. Ciência e Cultura. 28 : 191-192.
- PIMENTEL GOMES, F., 1966. Curso de Estatística Experimental, 3ª edição. Piracicaba, ESALQ/USP, Livraria Nobel S.A., p. 61.
- PONTECORVO, G., 1976. Presidential address. In : MACDONALD, K. D., Ed. Proceedings of the second International Symposium in Genetics of Industrial Microorganisms. New York, Academic Press, p. 1-4.

- PONTECORVO, G., J. A. ROPER e D. FORBES, 1953a. Genetic recombination without sexual reproduction in *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology. 8 : 198-210.
- PONTECORVO, G., J. A. ROPER, L. M. HEMMONS, K. D. MACDONALD e A. W. J. BUFTON, 1953b. The Genetics of *Aspergillus nidulans*. Advances in Genetics. 5 : 141-238.
- PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1953. Recombination without sexual reproduction in *Penicillium chrysogenum*. Nature. 172 : 126-135.
- PONTECORVO, G. e G. SERMONTI, 1954. Parasexual recombination in *Penicillium chrysogenum*. Journal of General Microbiology. 11 : 94-104.
- PRASAD, I., 1970. Genetic analysis of the coloured mutants of *Aspergillus niger*. Genetica. 41 : 388-398.
- RAPER, K. B. e D. I. FENNEL, 1965. The Genus Aspergillus. Baltimore, the Williams and Wilkins Co., p. 293-344.
- ROPER, J. A., 1952. Production of heterozygotes diploids in filamentous fungi. Experientia. 8 : 14-15.
- SERMONTI, G., 1969. Genetics of Antibiotic-producing Microorganisms. London and New York, John Wiley & Sons, Ltd., p. 110-316.
- SMITH, J. E., A. NOWAKOWSKA-WASZCZUK e J. G. ANDERSON, 1974. Organic acid production by mycelial fungi. In: SPENCER, B., Ed. Industrial Aspects of Biochemistry, vol. 1. Amsterdam : Elsevier, p. 297-317.
- SPRAGUE, G. F. 1967. Plant breeding. Annual Reviews of Genetics. 1 : 269.

- STAUFER, J. F., 1961. Sci. Repts. Inst. Sup. Sanita, 1 : 441-446. Apud: BURNETT, J. H., 1975. Mycogenetics. London and New York, John Wiley & Sons, p. 235-258.
- TAVARES, F. C. A. e J. L. AZEVEDO, 1974. Genetical improvement of *Aspergillus niger* for citric acid production. Second International Symposium in Genetics of Industrial Microorganisms. 2 : 86 (abstract).
- WEHMER, C., 1893. Preparation d'acide citrique de synthèse, par la fermentation du glucose. Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. 117 : 332-33. Apud: RAPER, K. B. e D. I. FENNEL, 1965. The Genus Aspergillus. Baltimore, The Williams and Wilkins Co., p. 293-344.
- WHELDEN, R. M., 1940. "Mutations" in *Aspergillus niger* bombarded by low voltage cathode rays. Mycologia. 32 : 630-643.
- WILLS, C., 1968. Yeast partial dominance: affect of environment and background genotype. Science. 160 : 549-550.
- YUILL, E., 1950, The numbers of nuclei in conidia of *Aspergilli*. Transactions of the British Mycological Society. 33 : 324-331.
- YUILL, J. L., 1951. Fermentation with mixed strains of *Aspergillus niger*. Biochemical Journal. 49 : XIX (communication).
- YUILL, J. L., 1953. Culture study of an unstable strains of *Aspergillus niger*. Journal of General Microbiology. 9 : V (communication).

A P Ê N D I C E

TABELA A-1 - Valores de Índice Ácido para A. niger Linhagem 10V10 não irradiada (0 Kr)

Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido *	Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido *
1	4,3	4,4	7,5	8,0	1,74	1,81	26
2	4,5	4,2	7,5	7,4	1,66	1,76	27
3	4,7	4,7	7,6	7,8	1,61	1,65	28
4	4,5	4,8	7,8	8,0	1,71	1,66	29
5	4,5	4,5	7,5	7,5	1,66	1,66	30
6	4,4	4,5	7,8	7,8	1,77	1,71	31
7	4,5	4,8	7,7	7,8	1,71	1,62	32
8	4,5	4,6	7,7	7,7	1,71	1,67	33
9	4,8	4,6	7,8	8,0	1,62	1,73	34
10	4,0	4,2	8,0	7,8	2,00	1,85	35
11	4,3	4,4	7,7	7,7	1,79	1,75	36
12	4,8	4,4	8,0	7,5	1,67	1,70	37
13	4,4	4,7	7,8	8,0	1,77	1,70	38
14	4,5	4,5	7,8	7,8	1,71	1,71	39
15	4,6	4,5	8,0	7,8	1,70	1,71	40
16	4,4	4,5	7,7	7,9	1,75	1,73	41
17	4,4	4,4	7,4	7,4	1,68	1,68	42
18	4,5	4,8	7,7	8,0	1,71	1,67	43
19	4,5	4,5	8,0	7,9	1,77	1,73	44
20	4,6	4,5	7,7	7,8	1,67	1,71	45
21	4,3	4,5	7,3	7,6	1,69	1,68	46
22	4,4	4,3	7,8	7,5	1,77	1,74	47
23	4,5	4,5	7,5	7,5	1,66	1,66	48
24	4,6	4,5	7,5	7,3	1,63	1,62	49
25	4,4	4,5	8,0	7,9	1,81	1,73	50

81.

* As leituras do Índice Ácido no 3º ou 4º dia de incubação, não são diferentes estatisticamente e optou-se pelo 4º dia de incubação para a leitura do Índice Ácido para todas as linhagens.

Cada colônia tem duas repetições.
Linhas.**

TAPELA A-2 - Valores de Índice Ácido para linhagem irradiada pela primeira vez com raios gama (80 Kr).

Colônias *	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido	Colônias *	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido						
1	5,2	5,0	8,4	8,4	1,61	1,68	N9	4,2	4,4	7,8	8,0	1,84	1,81
2	3,5	3,7	8,1	8,3	1,31	2,24	N10	4,8	5,0	8,7	9,0	1,81	1,80
3	3,5	3,3	7,7	7,4	2,20	2,24	N11	3,8	3,8	7,8	7,6	2,05	2,00
4	4,8	4,8	8,4	8,4	1,75	1,75	N12	5,0	5,5	8,2	8,1	1,64	1,47
5	5,0	4,7	8,6	8,4	1,72	1,78	N13	5,1	4,8	8,8	8,6	1,72	1,79
6	4,2	3,7	7,7	6,6	1,83	1,78	N14	3,2	3,3	7,8	8,0	2,43	1,42
7	4,8	5,0	8,3	8,3	1,73	1,66	N15	4,8	4,8	8,8	8,6	1,83	1,79
8	4,5	5,0	7,5	7,5	1,66	1,50	N16	5,1	5,5	8,8	8,8	1,72	1,60
9	4,8	5,0	7,5	7,5	1,56	1,50	N17	3,2	3,2	7,5	7,5	2,34	2,34
10	5,2	5,3	7,5	7,5	1,44	1,41	N18	3,8	3,8	8,0	8,0	2,10	2,10
11	4,6	5,0	7,2	7,5	1,56	1,50	N19	5,5	5,1	9,0	8,8	1,63	1,72
12	3,8	3,8	7,8	8,0	2,05	2,10	N20	5,4	5,5	8,8	9,0	1,62	1,63
13	5,2	5,0	8,0	8,0	1,34	1,60	N21	4,6	4,6	8,3	8,1	1,80	1,76
14	2,9	3,0	7,3	7,5	2,51	2,50	N22	3,5	3,4	8,0	8,2	2,28	2,41
15	4,1	4,3	8,0	8,2	1,95	1,90	N23	5,4	5,4	8,8	8,8	1,62	1,60
16	5,5	5,1	8,3	7,9	1,50	1,55	N24	5,2	5,1	9,0	9,0	1,73	1,76
17	5,4	5,0	8,0	7,9	1,48	1,58	N25	3,9	3,9	8,0	8,0	2,05	2,05
N1	5,1	5,2	8,9	9,0	1,94	1,73	N26	5,5	5,3	9,2	9,0	1,67	1,69
N2	4,8	4,9	7,4	8,7	1,75	1,77	N27	5,8	5,5	8,7	8,2	1,50	1,48
N3	4,6	4,2	7,7	8,1	1,67	1,92	N28	5,3	5,2	9,0	9,0	1,69	1,73
N4	4,5	4,7	8,2	7,8	1,82	1,65	N29	5,1	5,2	8,8	9,0	1,72	1,73
N5	5,3	4,5	8,0	8,2	1,50	1,82	N30	5,4	5,1	9,2	9,0	1,70	1,76
N6	5,2	4,2	9,0	8,7	1,75	2,07	N31	4,5	4,7	8,6	8,8	1,91	1,87
N7	4,8	5,0	7,8	8,5	1,62	1,70	N32	5,6	5,7	8,2	8,7	1,46	1,52
N8	5,0	5,5	8,7	8,5	1,74	1,54	N33	5,9	5,9	8,9	8,9	1,50	1,50

TAPELA A-2 - Continuação

Colônias *	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido	Colônias *	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido
N34	4,8	4,7	1,81	N59	4,2	4,2	1,95
N35	4,0	4,0	2,07	N60	4,6	4,6	1,76
N36	5,1	5,5	1,80	N61	4,1	4,2	1,75
N37	4,8	5,3	1,70	N62	5,0	4,6	1,68
N38	4,5	5,8	1,66	N63	4,5	4,7	1,75
N39	4,2	4,4	1,71	N64	4,5	4,3	1,73
N40	4,5	5,3	1,66	N65	4,6	4,5	1,78
N41	4,4	5,6	1,77	N66	4,7	4,7	1,76
N42	4,9	5,3	1,75	N67	4,8	5,4	1,66
N43	5,4	5,6	1,75	N68	4,8	4,5	1,66
N44	4,6	5,2	1,69	N69	5,6	5,7	1,46
N45	4,7	5,1	1,63	N70	3,9	3,9	2,02
N46	4,5	4,4	1,62	N71	2,3	2,4	2,17
N47	2,8	2,2	2,32	N72	4,7	4,9	1,70
N48	4,5	4,2	1,62	N73	4,3	4,5	1,66
N49	4,7	5,3	1,70	N74	4,2	4,4	1,73
N50	4,0	4,4	1,85	N75	4,5	4,5	1,75
N51	4,4	5,0	1,77	N76	3,6	3,2	2,00
N52	4,4	4,5	1,70	N77	4,0	4,3	1,85
N53	4,6	4,5	1,76	N78	5,3	4,7	1,50
N54	5,8	5,6	1,46	N79	5,5	5,3	1,54
N55	3,9	4,5	1,94	N80	4,4	4,4	1,86
N56	4,5	4,7	1,66	N81	4,2	4,5	1,85
N57	4,0	3,8	1,95	N82	4,9	4,6	1,63
N58	4,2	4,4	1,92	N83	4,5	4,5	1,73

* Cada colônia tem duas repetições.

TABELA A-3 - Valores de Índice Ácido para linhagem N14 2i irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr).

Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido	Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido
N14 2i	1	2,8	7,5	26	3,5	7,2	2,05
	2	2,8	7,5	27	3,5	7,6	2,17
	3	2,7	7,1	28	2,7	7,5	2,77
	4	2,5	7,2	29	2,8	7,0	2,50
	5	2,7	7,5	30	2,2	6,4	2,90
	6	3,0	7,5	31	3,1	7,4	2,38
	7	3,0	7,9	32	3,2	7,4	2,31
	8	2,9	7,5	33	3,0	7,2	2,40
	9	2,2	7,0	34	2,7	6,1	2,25
	10	3,1	7,3	35	2,8	6,8	2,42
	11	3,0	7,8	36	2,9	7,1	2,44
	12	2,6	7,2	37	3,0	7,0	2,33
	13	2,6	7,6	38	2,7	6,5	2,40
	14	2,1	7,0	39	2,7	6,5	2,40
	15	2,9	7,0	40	3,0	6,5	2,16
	16	2,5	7,5	41	2,6	7,5	2,88
	17	2,6	7,1	42	2,5	6,5	2,60
	18	2,2	6,8	43	2,7	7,5	2,77
	19	2,4	7,4	44	2,8	6,9	2,46
	20	2,1	7,2	45	2,8	6,8	2,42
	21	2,6	7,3	46	2,9	6,8	2,34
	22	2,7	7,0	47	2,7	7,1	2,62
	23	2,9	7,4	48	2,6	7,5	2,88
	24	2,9	7,2	49	3,2	7,5	2,34
	25	3,1	7,1	50	2,6	7,3	2,80

TABELA A-4 - Valores de Índice Ácido para linhagem N47 2i irradiada pela segunda vez com raios gama (80 Kr).

Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido	Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido
N47 2i							
1	2,5	7,9	3,18	N47 2i	3,0	7,5	2,50
2	3,0	7,5	2,50	27	3,0	7,7	2,58
3	3,2	6,5	2,03	28	2,5	7,5	3,00
4	2,7	7,3	2,70	29	2,8	7,8	2,70
5	2,4	7,0	7,91	30	2,8	7,5	2,67
6	2,8	7,3	2,60	31	3,2	7,5	2,34
7	3,4	7,4	2,17	32	2,3	6,0	2,60
8	2,8	7,5	2,67	33	2,3	7,0	3,04
9	2,5	7,5	3,00	34	2,3	7,0	3,04
10	2,4	7,2	3,00	35	2,7	7,5	2,77
11	3,5	6,2	2,34	36	2,6	7,5	2,88
12	2,8	7,5	2,67	37	2,6	7,0	2,69
13	3,0	7,7	2,56	38	2,5	7,2	2,88
14	2,6	7,3	2,84	39	2,8	7,7	2,75
15	3,2	7,5	2,34	40	2,7	7,5	2,77
16	2,9	7,0	2,41	41	2,7	7,6	2,81
17	2,4	7,2	3,00	42	2,3	7,0	3,04
18	3,0	7,5	2,50	43	2,6	7,3	2,80
19	3,3	6,2	2,48	44	2,5	6,5	2,60
20	3,2	7,0	2,50	45	2,8	7,0	2,50
21	3,0	7,5	2,50	46	2,5	6,8	2,72
22	2,0	6,5	3,25	47	2,5	6,8	2,72
23	2,4	7,2	3,00	48	2,2	6,5	2,95
24	3,1	7,5	2,41	49	2,4	6,8	2,83
25	2,6	7,7	2,96	50	2,5	7,0	2,80

TABELA A-5 - Valores de Índice Ácido para linhagem N47 3i 22 irradiada pela terceira vez com raios gama (80 Kr).

Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido	Colônias	Diâmetro da colônia (cm)	Diâmetro do halo ácido (cm)	Índice Ácido
N47 3i 22				N47 3i 22			
1	2,9	6,7	2,31	26	2,3	7,3	3,17
2	2,3	6,7	2,91	27	2,3	7,5	3,26
3	2,3	5,3	2,29	28	1,8	7,2	4,00
4	2,3	6,9	3,00	29	2,7	8,0	2,96
5	2,2	5,9	2,68	30	1,8	7,1	3,94
6	2,4	7,3	3,04	31	2,5	8,2	3,28
7	2,4	6,8	2,83	32	2,7	8,7	2,48
8	2,2	6,2	2,81	33	2,4	8,8	2,83
9	2,3	7,0	3,04	34	2,4	7,2	3,00
10	1,9	5,5	2,89	35	2,8	7,8	2,78
11	3,0	7,3	2,83	36	2,9	7,5	2,58
12	2,7	7,0	2,59	37	2,4	8,0	3,33
13	2,9	7,3	2,51	38	2,8	7,7	2,75
14	3,2	6,4	2,00	39	3,0	8,4	2,80
15	2,8	7,8	2,78	40	2,2	7,8	3,54
16	2,5	7,2	2,88	41	2,7	8,1	3,00
17	2,7	7,5	2,77	42	1,7	7,2	4,23
18	2,7	7,7	2,85	43	2,3	7,2	3,13
19	2,5	7,3	2,92	44	3,0	8,0	2,68
20	3,2	7,9	2,46	48	2,2	7,5	3,40
21	2,5	7,5	3,00	46	2,7	7,9	2,92
22	2,3	7,1	3,08	47	2,3	7,7	3,34
23	1,9	7,1	3,73	48	2,0	7,5	3,75
24	2,7	7,9	2,92	49	2,0	7,5	3,75
25	1,7	6,7	3,94	50	3,1	7,5	2,41

TABELA A-6 - Valores de Índice Ácido das Linhagens 0 Kr* (controle), 80 Kr* (1ª irradiação), N14 2i e N47 2i (2ª irradiação) e N47 3i 22 (3ª irradiação).

Tratamentos	Valores de Índice Ácido								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Linhagem C Kr (Não irradiada) Controle	1,77	1,71	1,63	1,68	1,66	1,74	1,66	1,69	1,67
	1,70	1,84	1,68	1,69	1,75	1,69	1,68	1,75	1,66
	1,68	1,63	1,73	1,70	1,65	1,66	1,70	1,68	1,76
	1,67	1,76	1,76	1,80	1,72	1,84	1,68	1,56	
Linhagem 80 Kr (1ª irradiação)	1,64	2,27	2,22	1,75	1,75	1,80	1,69	1,58	1,53
	1,92	1,52	1,53	1,86	1,76	1,79	1,73	1,66	1,91
	1,55	1,75	2,42	1,81	1,66	2,34	2,10	1,67	1,62
	1,68	1,49	1,71	1,72	1,73	1,89	1,49	1,50	1,83
	1,64	1,66	1,64	1,59	1,63	1,64	1,66	2,59	1,64
	1,44	1,86	1,65	1,96	1,86	1,93	1,77	1,80	1,73
	1,71	1,47	2,20	2,21	1,70	1,84	1,71	1,74	2,07
	1,64	1,73							
Linhagem N14 2i (2ª irradiação)	2,67	2,67	2,62	2,88	2,77	2,50	2,83	2,58	3,18
	2,41	3,00	2,73	3,09	3,08	3,42	2,00	2,59	2,55
	2,50	2,90	2,38	2,31	2,40	2,25	2,42	2,44	2,33
	2,47	2,46	2,42	2,34	2,62	2,88	2,34	2,80	
Linhagem N47 2i (2ª irradiação)	3,16	2,50	2,03	2,70	2,91	2,60	2,17	2,67	3,00
	2,50	2,48	2,50	2,50	3,25	3,00	2,41	2,96	2,50
	2,77	2,88	2,69	2,88	2,75	2,77	2,81	3,04	2,80
Linhagem N47 3i 22 (3ª irradiação)	2,31	2,91	2,29	3,00	2,68	3,04	2,83	2,81	3,04
	2,85	2,92	2,46	3,00	3,08	3,73	2,92	3,94	3,17
	2,78	2,58	3,33	2,75	2,80	3,54	3,00	4,23	3,14

TABELA A-6 - Continuação

Tratamentos	Valores de Índice Ácido							
	1	2	3	4	5	6	7	8
Linhagem 0 Kr (Não irradiada) Controle	1,92	1,77	1,68	1,73	1,71			
	1,62	1,77	1,72	1,69	1,65			
	1,62	1,59	1,61	1,85	1,76			
Linhagem 80 Kr (1ª irradiação)	1,42	1,53	2,07	1,47	2,50			
	1,66	1,64	1,82	1,80	2,02			
	1,78	2,34	1,61	1,74	2,05			
	2,09	1,73	1,65	1,50	1,70			
	1,61	1,74	1,72	1,73	1,76			
	1,72	1,73	1,80	1,76	1,52			
Linhagem N14 2i (2ª irradiação)	1,82	1,60	1,55	1,86	1,82			
	2,35	2,60	2,76	2,92	3,33			
	2,48	2,29	2,05	2,17	2,77			
	2,40	2,40	2,16	2,88	2,60			
Linhagem N47 2i (2ª irradiação)	3,00	2,34	2,67	2,56	2,84	2,34	2,41	3,00
	2,56	3,00	2,78	2,67	2,34	2,60	3,04	3,04
	2,60	2,50	2,72	2,72	2,95	2,83	2,80	
Linhagem N47 3i 22 (3ª irradiação)	2,89	2,63	2,59	2,51	2,00	2,78	2,88	2,77
	3,26	4,00	2,96	3,94	3,28	2,48	2,83	3,00
	2,66	3,40	2,92	3,34	3,75	3,75	2,41	

(*) Valores de Índice Ácido é resultado da média de duas repetições, enquanto que nas outras linhagens é resultado de uma repetição visto que não houve diferença estatística entre duas repetições.

TAFELA A-7 - Produção de ácidos totais em cultura de superfície para isolados provenientes de linhagens irradiadas derivadas de *Aspergillus niger* - Linhagem 10V10.

Isolados	Índice Ácido*	Meios de culturas**	Dias de fermentação	Peso do micélio seco (g)	Titulação de ácidos totais com NaOH 0,1 N (ml)	***
10V10 (controle)	1,70	F	9	0,60	74,3	
14	2,50	F.D	7	0,50	54,0	
		F	8	0,30	36,7	
		F.D	8	0,35	53,2	
N14	2,42	F	8	0,39	71,4	
		F.D	8	0,37	52,0	
N14 21 13	2,92	F	9	0,80	152,4	
		F.D	7	0,38	62,5	
N14 21 29	2,50	F	9	0,20	17,7	
		F.D	7	0,54	55,2	
N14 21 35	2,42	F	7	0,82	100,0	
		F.D	7	0,42	27,2	
N14 21 11	2,34	F	8	0,70	108,6	
		F.D	7	0,25	46,2	
N47 31 22.6	3,04	F	9	0,15	32,0	
		F.D	9	0,38	46,9	
N47 31 22.27	3,26	F	9	0,30	54,0	
		F.D	9	0,36	52,2	
N47 31 22.47	3,34	F	9	0,25	22,0	
		F.D	9	0,33	42,0	
N47 31 22.49	3,75	F	9	0,42	102,0	
		F.D	7	0,38	57,5	

(*) Índice Ácido é o valor obtido pela relação: Diâmetro do halo ácido/diâmetro da colônia.

(**) Meios de cultura: F = Meio de fermentação;

F.D = Meio de Foster líquido.

(***) Os dados representam a média de dois frascos de repetição.

TABELA A-8 - Teste de Estabilidade para linhagens irradiadas pela primeira, segunda e terceira vez com raios gama na dose 80 Kr.

Linhagem irradiada pela primeira vez com dose 80 Kr					
Linhagem N14 21, irradiada pela segunda vez com raios gama na dose 80 Kr					
Linhagem N47 21, irradiada segunda vez com raios gama na dose 80 Kr					
Linhagem N47 31 22, irradiada pela terceira vez com raios gama na dose 80 Kr					
Número de colônias - análise - das	Número de colônias com seto-res	Número de colônias - análise - das	Número de colônias com seto-res	Número de colônias - análise - das	Número de colônias com seto-res
10	4	10	10	10	9
10	6	10	9	10	8
10	3	10	9	10	8
10	5	10	9	10	9
10	6	10	9	10	8
10	4	10	10	10	10
10	5				
10	7				

TABELA A-9 - Valores da Tabela A-8 transformados em $\sqrt{x + (0,5)}$

Tratamentos	Número transformado de colônias com setores									
Linhagem 80 Kr	2,1213	2,5495	1,8700	2,3452	2,5495	2,1213	2,3452	2,7386		
Linhagem N14 2i	3,2403	3,0822	3,0822	3,0822	3,2403					
Linhagem N47 2i	2,9154	2,5495	3,0822	2,7386	3,2403					
Linhagem N47 3i 22	3,0822	2,9154	3,0822	2,9154	3,2403					