

FATORES QUE ATUAM NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

CONSUELO MARGARIDA RUBIO DE BIAGI

Orientador: Prof. Dr. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

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

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Junho - 1982

A

meus pais, *Francisco e Nair*

meu marido, *Eduardo Henrique*

meus filhos, *Camila Melissa e Eduardo Francisco*

D E D I C O

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a todos que direta ou indiretamente tornaram possível a realização deste trabalho e em especial:

- Dr. *João Lúcio de Azevedo*.
- Dr. *Flávio César Almeida Tavares*.
- Dr. *Ernesto Paterniani*.
- Colegas do Curso de Pós-Graduação.
- Funcionários do Setor de Genética de Microrganismos - Departamento de Genética/ESALQ-USP.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
RESUMO.	x
SUMMARY	xii
1. INTRODUÇÃO.	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	3
3. MATERIAL E MÉTODOS.	17
3.1. Amostras bacterianas	17
3.2. Meios de cultura e soluções.	20
3.2.1. Caldo Nutriente (NL).	20
3.2.2. Nutriente Ágar (NA)	20
3.2.3. Nutriente Ágar Semi-sólido.	20
3.2.4. Meio D ₃ (para isolamento de <i>Erwinia</i>).	20
3.2.5. Meio D ₄ (para isolamento de <i>Pseudomonas</i>).	21
3.2.6. Meio D ₅ (para isolamento de <i>Xanthomonas</i>).	21
3.2.7. Meio 523 - Sólido (para bactérias fitopatogênicas)	22
3.2.8. Meio 523 - Semi-sólido.	22
3.2.9. Meio 523 - Líquido.	22
3.2.10. Meio TY Ágar (TYA).	23
3.2.11. Meio TYA - Semi-sólido.	23
3.2.12. Meio TY - Líquido	23
3.2.13. Meio de LIGNIÈRES (para estocagem das bactérias).	23
3.2.14. Solução salina 0,85%.	24
3.3. Drogas.	24
3.4. Preparo das drogas.	24
3.5. Esterilização e temperatura de incubação	25
3.6. Isolamento das bactérias fitopatogênicas	26

	<u>Página</u>
3.7. Identificação das bactérias.	26
3.8. Determinação dos níveis de resistência	26
3.9. Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultura.	27
3.10. Produção de bacteriocinas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ágar	28
3.11. Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio.	29
3.12. Produção de bacteriocinas com diferentes tempos de incubação.	29
3.13. Liberação de bacteriocinas em meio de cultura líquido. .	30
3.14. Indução de bacteriocinas com luz ultravioleta curta (UVC).	31
3.14.1. Indução em meio líquido	31
3.14.2. Indução em meio sólido	32
3.15. Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas . .	33
3.16. Ensaio da atividade fágica.	34
3.16.1. A partir de meio sólido	34
3.16.2. A partir de cultura líquida	34
3.17. Eliminação do caráter bacteriocinogênico.	35
3.17.1. Através do brometo de etídio.	35
3.17.2. Através da temperatura elevada.	35
3.18. Tratamento com 8-metoxipsoraleina (8-MOP) e luz ultravioleta longa (360 nm).	36

	<u>Página</u>
3.18.1. Tratamento em meio líquido.	36
3.18.2. Tratamento em meio sólido	37
4. RESULTADOS.	38
4.1. Níveis de resistência.	38
4.2. Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultura.	54
4.3. Produção de bacteriocinas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ágar	57
4.4. Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio.	57
4.5. Produção de bacteriocinas com diferentes tempos de incubação.	68
4.6. Liberação de bacteriocina em meio de cultura líquido	69
4.7. Indução de bacteriocinas com luz ultravioleta curta (UVC).	70
4.8. Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas.	72
4.9. Ensaio da atividade fágica	72
4.10. Eliminação do caráter bacteriocinogênico	73
4.11. Tratamento com 8-metoxipsoraleina e luz ultravioleta longa (8 MOP-UVL).	74
5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES.	77
6. BIBLIOGRAFIA.	99

LISTA DE TABELAS

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
1 - Procedência das amostras bacterianas	18
2 - Preparo das soluções de drogas.	25
3 - Níveis de resistência de 81 amostras de bactérias fitopatogênicas frente a 12 drogas antimicrobianas.	39
4 - Modelos de resistência das amostras frente aos agentes antimicrobianos.	53
5 - Número e porcentagem de amostras bacteriocinogênicas em diferentes meios de cultura, nos 81 isolados	54
6 - Número de linhagens sensíveis a bacteriocina de cada amostra bacteriocinogênica crescida em diferentes meios (523, TYA e NA).	55
7 - Produção e sensibilidade a bacteriocinas em 81 amostras cultivadas em meio 523.	58
8 - Medidas do halo de inibição do crescimento e do diâmetro da colônia bacteriocinogênica (em mm) crescida em meio 523.	59
9 - Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio 523 e placas contendo meio 523 com diferentes concentrações de ágar (média de 50 repetições).	68

<u>Tabela</u>	<u>Página</u>
10 - Medidas do halo de inibição e diâmetro da colônia bacteriocinogênica (média de 100 repetições) após diferentes tempos de incubação.	69
11 - Produção de bacteriocinas após tratamento com luz ultravioleta curta em meio líquido. (Média de 50 repetições).	71
12 - Produção de bacteriocinas após tratamento com luz ultravioleta curta em meio sólido. (Média de 50 repetições; inativação após 2 ou 24 horas).	71
13 - Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas	72
14 - Porcentagem de eliminação do fator <i>Bac</i> através do tratamento com brometo de etídio.	74
15 - Produção de bacteriocinas após tratamento com 8 MOP-UVL em meio líquido. (Média de 50 repetições).	75
16 - Produção de bacteriocinas após tratamento com 8 MOP-UVL em meio sólido. (Média de 50 repetições).	76

LISTA DE FIGURAS

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
1 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente ao Ácido Nalidixico.	41
2 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Ampicilina.	42
3 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente ao Bicloreto de Mercúrio.	43
4 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Cefalotina.	44
5 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente ao Cloranfenicol.	45
6 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Eritromicina.	46
7 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Hetacilina.	47

<u>Figura</u>	<u>Página</u>
8 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Penicilina.	48
9 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Canamicina.	49
10 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Estreptomicina.	50
11 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Gentamicina.	51
12 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Tetraciclina.	52

FATORES QUE ATUAM NA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS
DE BACTÉRIAS FITOPATOGÊNICAS

Consuelo Margarida Rubio de Biagi

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Orientador -

RESUMO.

O presente trabalho foi conduzido com a finalidade de se analisar em bactérias fitopatogênicas dos gêneros *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* as condições ideais para a produção de bacteriocinas e perda dessa capacidade, além da determinação dos níveis naturais de resistência a drogas.

Detectou-se produção de bacteriocinas em 70,96%, 82,75% e 55,00% dos isolados de *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*, respectivamente. As condições que influenciaram na produção de bacteriocinas foram em primeiro lugar a composição do meio de cultura, seguindo-se a viscosidade do meio, o tempo de incubação da amostra produtora e a concentração de ágar no meio da cultura. Tratamento com luz ultravioleta (253 nm) levou com apenas uma exceção ao aumento na produção de bacteriocinas. Tratamento com brometo de etídio levou à perda da capacidade de produção de bacteriocinas; por outro lado, temperatura elevada foi incapaz de eliminar essa capacidade. Tratamento com 8-metoxipsoraleina e luz ultravioleta (360 nm) acarre-

tou a diminuição do halo de inibição produzido pelas bacteriocinas em amostras sensíveis. Não se detectou relação entre capacidade bacteriocinogênica, resistência a drogas, planta hospedeira e local de origem dos isolados.

FACTORS ACTING ON BACTERIOCIN PRODUCTION
BY PHYTOPATHOGENIC BACTERIA

Consuelo Margarida Rubio de Biagi

Prof. Dr. João Lúcio de Azevedo

- Adviser -

SUMMARY

The present research has been carried out to analyse phytopathogenic bacteria of genus *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas* under optimum conditions for bacteriocins production. It was the aim also to evaluate the loss of bacteriocin production and the determination of drug resistance natural level.

Bacteriocin were produced by 70.96% of *Erwinia*, 82.75% of *Pseudomonas* and 55,00% of *Xanthomonas* isolates. It has been shown that the medium composition was relevant for bacteriocins production, followed by medium viscosity, sample incubation time and the amount of agar added to the medium. Ultraviolet light (253 nm) treatment have increased bacteriocin production except for a single sample. Ethidium bromide treatment caused loss of bacteriocin production and high

temperature was not able to eliminate this capacity. 8-methoxypsoralen plus ultraviolet light (360 nm) treatment have decreased inhibition zone in test with sensitive bacteria. It was not possible to detect a relation among the bacteriocin production, drug resistance, host plant and isolate origin.

1. INTRODUÇÃO

Bacteriocinas são substâncias produzidas por muitas espécies bacterianas. Essas bacteriocinas atuam sobre linhagens relacionadas ou mesmo, em alguns casos de espécies e gêneros diferentes. As bacteriocinas embora apresentando certas semelhanças com os bacteriófagos são distinguíveis destes, pois não se autoduplicam no organismo hospedeiro.

Os determinantes genéticos para produção de bacteriocinas, localizam-se em elementos extra cromossômicos denominados plasmídios bacteriocinogênicos ou simplesmente Bac. Tais fatores são passíveis de transferência para outras células através de conjugação, transformação ou transdução e são eliminados por tratamentos com agentes curagênicos.

Produção de bacteriocina por bactérias fitopatogênicas tem sido pouco estudada; por esse motivo, o objetivo de nosso trabalho foi justamente em primeiro lugar, verificar a produção de tais substâncias por espécies de *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* patogênicas à plantas.

A partir de isolados produtores objetivou-se estudar: 1) as melhores condições para a produção de bacteriocinas tais como o meio de cultura ideal, tempo de incubação, viscosidade do meio e indução por luz ultravioleta, (253 nm); 2) eliminação do plasmídeo *Bac* com o agente de cura brometo de etídio ou por tratamento com 8-metoxipsoraleína e luz ultravioleta longa (360 nm); 3) determinação do nível de resistência natural de bactérias fitopatogênicas frente a drogas antimicrobianas e relacionamento da produção de bacteriocinas com essa resistência e com as plantas hospedeiras e seu local de origem.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O estudo das bacteriocinas iniciou-se em 1925 quando GRATIA, analisando linhagens de *Escherichia coli* observou que a linhagem *E. coli* V produzia uma substância que inibia o crescimento de *E. coli* ϕ . FREDERICQ em 1946, realizou observações semelhantes em outras linhagens de *E. coli* e, essa substância inibitória foi chamada colicina (GRATIA e FREDERICQ, 1946). O mesmo fenômeno foi observado em outros gêneros e espécies bacterianas como *Shigella* (FREDERICQ, 1948a; FASTER, 1949), *E. freundii* (FREDERICQ, 1947), *Salmonella* (FREDERICQ, 1952a) e *Micrococcus* (HEALEY e DOERY, 1951; LOEB *et alii*, 1950). Diante de tal fato, JACOB *et alii* (1953a) propuseram o termo geral de bacteriocina e, de acordo com o gênero ou a espécie produtora as bacteriocinas receberam denominações específicas como por exemplo colicina (*E. coli*), piocina (*Pseudomonas pyocyanea*), megacina (*Bacillus megaterium*), estafilococcina (*Staphylococcus aureus*) e agrocina (*Agrobacterium radiobacter*). Atualmente, devido talvez ao alto grau de especificidade, a nomenclatura das bacteriocinas baseia-se na espécie do organismo hospedeiro (BRADLEY, 1967) e é codificada segundo FRE-

DERICQ (1948b) onde, o tipo de bacteriocina produzida é precedido pela designação da linhagem. Dessa forma, colicina CA 23-D significa colicina tipo D produzida por *E. coli* CA 23.

A definição original de bacteriocina dada por JACOB *et alii* (1953a) como "*proteínas do tipo colicina caracterizada por biossíntese letal, atividade intraespecífica e adsorção a receptores específicos*" foi sendo ampliada com o passar dos tempos uma vez que novos dados permitiram um melhor conhecimento de tais substâncias com relação principalmente à composição química, características físicas, estruturais, genéticas e imunológicas, especificidade e sensibilidade.

Atualmente não se tem uma definição precisa para bacteriocinas e TAGG *et alii* (1976) afirmaram que seria ilusório tentar-se elaborar uma definição devido à grande diversidade dessas substâncias.

Com relação à composição química, as bacteriocinas apresentam-se variáveis, podendo constituírem-se de proteínas, carboidratos, lipídios ou nucleotídeos e, tal variabilidade é observada até mesmo dentro da mesma espécie, uma vez que, a mesma bactéria pode produzir diferentes bacteriocinas. Dentre as bacteriocinas constituídas quimicamente de proteínas encontram-se a butiricina (ADAMS, 1959; CLARKE *et alii*, 1975), cloacina (DE GRAAF *et alii*, 1968; 1970), colicina D (TIMINIS, 1972), colicina E₁ (SCHWARTZ e HELINSKI, 1968; 1971), colicina E₂ (MAEDA e NOMURA, 1966; HERSCHMAN e HELINSKI, 1967), colicina E₃ (MAEDA e NOMURA, 1966; HERSCHMAN e HELINSKI, 1967), colicina I (KONISKY e RICHARD, 1970), coli-

cina K (AMANO *et alii*, 1958; GOEBEL e BARRY, 1958; HINSDILL e GOEBEL, 1964; 1966), colicina ML (JACOB *et alii*, 1952), colicina V (DEPOUX e CHABBERT, 1953), enterococcina (BROCK *et alii*, 1963), estafilococcina (BARROW, 1963; HSU e WISEMAN, 1967), fluocina (HAMON, 1956), megacina A (HOLLAND, 1961; MARJAI e IVÁNOVICS, 1962; HOLLAND e ROBERTS, 1964), megacina C (HOLLAND, 1961), micrococcina (HEATLEY e DOREY, 1951), miracina (JESAITIS, 1970; GOEBEL, 1973), perfringocina (ADAMS, 1959), piocina (JACOB, 1954; HAMON, 1956; HOMMA e SUZUKI, 1964; HOMMA *et alii*, 1968; KLEINSCHMIDT, 1968), salmonellicina (HAMON, 1955) e bacteriocinas de espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas*, *Corinebacterium* e *Agrobacterium* (OKABE e GOTO, 1963). Dentre as constituídas por lipocarboidrato-proteína salientam-se a colicina A (BARRY *et alii*, 1963; 1965), colicina E₂ (REEVES, 1963), colicina K (GOEBEL *et alii*, 1955; LATARJET e FREDERICQ, 1955; GOEBEL, 1962), colicina SG (NUSKE *et alii*, 1957), colicina V (HUTTON e GOEBEL, 1961; 1962), estafilococcina (GAGLIANO e HINSDILL, 1970), estreptocina (SCHLEGEL e SLADE, 1972), lactocina (UPRETI e HINSDILL, 1973, 1975), morganocina (SMIT *et alii*, 1968), perfringocina (TUBYLEWICZ, 1968) e piocina (HOMMA *et alii*, 1958; 1963; HOMMA e SUZUKI, 1964; 1966). Exemplo de bacteriocina constituída de nucleotídeo de adenina é o da agrocina 84 (ROBERTS *et alii*, 1977).

As bacteriocinas constituídas de lipopolissacarídeo-proteína geralmente encontram-se associadas ao antígeno somático O e, análises posteriores efetuadas com algumas dessas bacteriocinas levou os autores a separarem como protêica a sua parte funcionalmente ativa. Desta forma, talvez, outras bacteriocinas posteriormente, sejam também englobadas apenas nas bacteriocinas protêicas. Cerecina (GÁAL e IVÁNOVICS, 1972) e

megacina A (OZAKI *et alii*, 1966) apresentam atividade enzimática semelhante à fosfolipase A.

Estudos realizados ao nível de microscopia eletrônica demonstraram que muitas bacteriocinas apresentam-se semelhantes a bacteriófagos defectivos completos ou incompletos. Tal fato foi observado com boticina (INOUE e IIDA, 1968; LAU *et alii*, 1974), cloacina (BRADLEY, 1967), colicina 15 (ENDO *et alii*, 1965; FRAMPTON e BRINKLEY, 1965; MENNIGMANN, 1965; SANDOVAL *et alii*, 1965), colicina H (BRADLEY e DEWAR, 1966; BRADLEY, 1967), estreptocina (BRADLEY, 1967), fluocina (BRADLEY, 1967), monocina (BRADLEY e DEWAR, 1966; HAMON e PÉRON, 1966; BRADLEY, 1967), piocina (KAGEYAMA e EGAMI, 1962; KAGEYAMA, 1964; ISHII *et alii*, 1965; HIGERD *et alii*, 1967; HOMMA e SHIONOYA, 1967; HOMMA *et alii*, 1967; ONISHI, 1969; TAKEYA *et alii*, 1969), subtilicina (IONESCO *et alii*, 1964; SEAMAN *et alii*, 1964; BRADLEY, 1965; STICKLER *et alii*, 1965; OKAMOTO *et alii*, 1968), vibriocina (JAYAWARDENE e FARKAS - HIMSLEY, 1968) e bacteriocina de *Rhizobium lupini* (VIDAVER *et alii*, 1972).

Devido a diversidade das bacteriocinas, BRADLEY (1967) as dividiu em dois grupos. No primeiro grupo colocou as bacteriocinas de baixo peso molecular e no segundo grupo englobou as de alto peso molecular e de morfologia semelhante a bacteriófagos.

Apesar dessas semelhanças morfológicas observadas em microscópio eletrônico e outras como estabilidade, especificidade, etc, bacteriocinas e bacteriófagos são entidades distintas uma vez que os fagos possuem determinantes genéticos para sua auto-replicação em organismos sus-

ceptíveis, lisam a célula hospedeira e são transmitidos em série, o que, não ocorre com as bacteriocinas (revisões de FREDERICQ, 1957; BRADLEY, 1967; NOMURA, 1967; KAYSER, 1969; REEVES, 1972; HARDY, 1975; TAGG *et alii*, 1976).

O mecanismo de ação das bacteriocinas, segundo HOLLAND e HOLLAND (1970), ocorre em dois estágios. No primeiro passo forma-se o complexo I que envolve a interação física da bacteriocina com o receptor específico da célula susceptível, e, nessa forma a bacteriocina não causa mudanças bioquímicas detectáveis. O segundo estágio, o qual é dependente de muitos fatores, resulta na expressão dos efeitos bioquímicos na superfície da célula e a nível intracelular. PLATE e LURIA (1972) sugerem mecanismo semelhante.

A interação física decorrente da presença de receptores na célula sensível foi primeiramente observado por MAEDA e NOMURA (1966) e a localização de tais receptores pode ocorrer na parede celular (WELTZIEN e JESAITIS, 1971; SABET e SCHNAITMAN, 1971, 1973; BRAUN e WOLFF, 1973; DI MASI *et alii*, 1973), na membrana citoplasmática (SMARDA e TAUBENECK, 1968; BHATTACHARYYA *et alii*, 1970; ELLISON e KAUTTER, 1970; SABET e SCHNAITMAN, 1971; SMARDA e LANEK, 1971; JETTEN e VOGELS, 1972b; 1973a; TAKAGAKI *et alii*, 1973) ou em regiões onde a membrana citoplasmática está em íntimo contato com a parede celular (SABET e SCHNAITMAN, 1973).

A composição química dos receptores pode ser protéica (BRAUN e WOLFF, 1973; SABET e SCHNAITMAN, 1973; BRAUN *et alii*, 1974) ou lipopolissacarídica (GUTERMAN e LURIA, 1969; CHANG e HAGER, 1970). TAGG

et alii, (1976) sugerem que devido à diversidade de composição e estrutura das moléculas de bacteriocinas, parece plausível que receptores de diferentes bacteriocinas sejam de composição diferente e se localizem em locais diferentes.

Com relação à especificidade de adsorção, ANASTESIO *et alii* (1971) e DAJANI e WANNAMAKER (1973) observaram adsorção altamente específica para boticina e estafilocina respectivamente, enquanto, GAGLIANO e HINS DILL (1970), JETTEN e VOGELS (1972a) e UPRETI e HINS DILL (1973;1975) não obtiveram o mesmo resultado para estafilocina e lactocina.

Uma vez a bacteriocina adsorvida ao receptor (complexo I), inicia-se o desenvolvimento do segundo estágio que é bastante influenciado pela temperatura, íons, energia e meio de cultura (HOLLAND,1977). NOMURA (1963; 1964), LURIA (1964) e MAEDA e NOMURA (1966) sugerem que a bacteriocina permanece adsorvida ao sítio receptor e a partir daí, envia um estímulo através de um sistema de transmissão, possivelmente localizado na membrana citoplasmática, o qual atinge o alvo bioquímico. Esse mecanismo envolve portanto uma ação indireta da bacteriocina e diversas etapas entre adsorção e a ação final no alvo. Para explicar esse mecanismo, os autores propõem que os alvos possuem conexões físicas com a membrana citoplasmática ou, são partes integrantes da mesma.

CHANGEUX e THIERY (1967) sugerem que após a adsorção, as moléculas de bacteriocinas induzem mudanças conformacionais nas unidades protoméricas que se propagam sequencialmente através da membrana celular. Essa hipótese foi confirmada por CRAMER *et alii* (1973) e JETTEN e VOGELS

(1973b), utilizando fluoresceína, porém, foi colocada em dúvida por SMAR-DA (1975).

O método de penetração das moléculas de bacteriocinas ainda não está elucidado, porém, alguns autores sugerem diferentes mecanismos. Para HOLLAND (1977) a entrada pode ser efetuada através de canais superficiais do tipo descrito por BAYER (1968) ou por degradação localizada da membrana através da atividade de fosfolipase de algumas bacteriocinas. Para CAPALDI e GREEN (1972), a penetração das moléculas ocorre através do deslocamento lateral de regiões ricas em polipeptídeos que existem intercaladas com a matriz fosfolipídica da membrana celular. Tal deslocamento levaria à formação de um canal relativamente hidrofílico por onde passaria a molécula de bacteriocina.

Após a penetração ou translocação de toda ou de uma parte da molécula de bacteriocina, ocorre a formação do complexo II que culmina com a interação da bacteriocina e seu alvo, alterando-o e acarretando a morte celular.

As bacteriocinas atuam atingindo diferentes alvos, ou seja, inibindo a síntese de DNA, RNA e proteínas: colicina A (NAGEL DE ZWAIG, 1969), colicina B (ARIMA *et alii*, 1968), colicina E₁ (JACOB *et alii*, 1952), colicina I (LEVISOHN *et alii*, 1968), colicina K (NOMURA e NAKAMURA, 1962; NOMURA, 1963; FIELDS e LURIA, 1969), enterococcina (KRAMER e BRANDIS, 1975), estafilococcina (DAJANI *et alii*, 1970b; JETTEN e VOGELS, 1972b; HALLE e HINS DILL, 1975), estreptococcina (TAGG *et alii*, 1973; SCHLEGEL e SLADE, 1974) e piocina (JACOB, 1954); inibindo o meta-

bolismo do DNA: colicina E₂ (NOMURA, 1963; 1964; REYNOLDS e REEVES, 1963; 1969; NOMURA e MAEDA, 1965; HOLLAND e HOLLAND, 1970), megacina C (HOLLAND, 1963; 1965) e pesticina (ELGAT e BEN-GURION, 1969); inibindo a síntese protéica: colicina E₃ (NOMURA, 1963; 1964) e lactocina (UPRETI e HINS DILL, 1975); afetando a membrana citoplasmática: butiricina (CLARKE e MORRIS, 1976), enterococcina (DAVIE e BROCK, 1966a) e megacina A (IVÁNOVICS *et alii*, 1958; HOLLAND, 1961; 1962) ou afetando a parede celular: perfringocina (MAHONY *et alii*, 1971).

A ação mortal da maioria das bacteriocinas como um processo de um único toque ("*single-hit*") foi primeiramente demonstrado em *E. coli* ML por JACOB *et alii* (1952) e confirmado "a posteriori" por NOMURA (1963), KAGEYAMA (1964), NOMURA e MAEDA (1965) e REEVES (1965). Hipótese inversa sugerindo que a morte celular ocorre através de múltiplos toques foi enfatizada por FREDERICQ (1952b) e FREDERICQ e DELCOUR (1953).

Uma unidade letal (quantidade de moléculas necessárias para matar uma célula sensível) pode corresponder a apenas uma molécula de bacteriocina como observado com colicina (JACOB *et alii*, 1952; REEVES, 1965; 1972; CRAMER e PHILLIPS, 1970; PLATE e LURIA, 1972), estafilococcina (JETTEN e VOGELS, 1974), estreptococcina (SCHLEGEL e SLADE, 1973), megacina (HOLLAND, 1961; 1965) e piocina (JACOB, 1954) ou, a muitas moléculas como detectado com cloacina (DE GRAAF *et alii*, 1969), colicina (MAEDA e NOMURA, 1966) e piocina (KAGEYAMA, 1964; KAZIRO e TANAKA, 1965).

Com o intuito de conciliar a morte da célula sensível pela ação de um só toque com muitas moléculas de bacteriocinas (cloacinas),

DE GRAAF *et alii* (1969) sugerem que cada molécula adsorvida tenha igual, porém baixa probabilidade de matar a célula, ou que, alguns receptores não possuem capacidade de iniciar o evento letal, ou ainda que, algumas preparações incluem proporções de moléculas inativas.

A bactéria bacteriocinogênica sobrevive à bacteriocina homóloga devido à presença de uma imunidade específica. Essa imunidade é diferente de resistência uma vez que a bacteriocina adsorve aos receptores da célula imune (MAEDA e NOMURA, 1966; LEVISOHN *et alii*, 1968; KONISKY e COWELL, 1972). De acordo com KAYSER (1969), a bactéria produtora de bacteriocina possui um gene capaz de codificar a síntese de uma substância que inativa o estímulo produzido pela bacteriocina e NOMURA (1963) sugere que uma "substância imune" interfere no mecanismo de transmissão.

OCHI *et alii* (1971) observaram que imunidade à megacina A-216 ocorre devido à presença de um inibidor protéico que atua por diminuição da taxa de "turnover" da enzima fosfolipase. Imunidade à hemólise na foi atribuída ao ácido teicóico (DAVIE e BROCK, 1966b). Na bactéria colicinogênica E₃ - W3110 extraiu-se uma proteína que bloqueia a ação da bacteriocina "in vitro" (JAKES *et alii*, 1974; SIDIKARO e NOMURA, 1974; BOWMAN *et alii* (1971). Para TAGG *et alii* (1976) a imunidade decorre da formação de um complexo entre a bacteriocina e sua proteína de imunidade específica.

A primeira análise da base genética da bacteriocinogenici

dade foi realizada por FREDERICQ e BETZ - BAREAU (1953a,b,c) os quais sugeriram que os genes responsáveis pela produção de colicina E₁ localizam-se em um elemento extracromossômico. Os trabalhos de ALFOLDI *et alii* (1958) e JACOB e WOLMAN (1958) colocando o fator Col E₁ como epissomo não foi confirmado por CLOWES (1963) o qual sugere que fator E₁ e outros fatores colicinogênicos são melhor definidos como plasmídio do que epissomo até que seja demonstrada uma associação mais direta desses elementos com o cromonema bacteriano. REEVES (1965) também sugere que se coloque o fator Bac como plasmídio uma vez que não há evidências de integração ao cromonema bacteriano.

Muitas análises foram realizadas e a maioria dos resultados indicaram tratar-se de um plasmídio porém, KAGEYAMA (1970a,b) sugere que o determinante genético da aeruginocina tipo R de *P. aeruginosa* PAO localiza-se no cromonema bacteriano e CHENGAPPA e CARTER (1977) postulam que o elemento genético responsável pela produção de bacteriocina em *Pasteurella multocida* pode estar localizado no próprio cromonema.

O plasmídio bacteriocinogênico é constituído por DNA (SILVER e OZEKI, 1962; OZEKI, 1965) e análises ao microscópio eletrônico e em gradiente de densidade revelam constituir-se de DNA bicatenário e circular (ROTH e HELINSKI, 1967; BAZARAL e HELINSKI, 1968a,b; HELINSKI e CLEWELL, 1971).

Com relação ao peso molecular, HARDY (1975) dividiu os plasmídios bacteriocinogênicos em dois grupos. O primeiro, compreende plasmídeos pequenos ($10^5 - 10^6$ daltons) e o segundo grupo inclui plasmídios maiores ($10^7 - 10^8$ daltons). Muitas características genéticas e fi-

siológicos estão intimamente relacionadas com essa divisão, ou seja, apenas os plasmídios maiores são auto-transferíveis por conjugação e existem em poucas cópias por célula enquanto os menores necessitam ser mediados por outros plasmídios na conjugação.

OZEKI *et alii* (1962), SMITH *et alii* (1963) e STOCKER *et alii* (1963) estudando a capacidade de transferência do fator *Col* através de conjugação, também observaram que existem dois tipos de plasmídios o primeiro compreendendo os plasmídios infecciosos (*Col* V, B e I) e o segundo tipo não infecciosos (*Col* E₁, E₂ e K), porém podendo ser transferidos quando em conjunto com um plasmídio mobilizador.

A produção de bacteriocina pode ser profundamente afetada pelas condições de culturas como temperatura (LACHOWICZ, 1965; FOULDS e SHEMIN, 1969; VIDAVER *et alii*, 1972; TAGG *et alii*, 1975; 1976; ECHANDI, 1976; GROSS e VIDAVER, 1978; 1979), pH (GOEBEL *et alii*, 1955; TAGG *et alii*, 1973), viscosidade do meio (MATSUSHITA *et alii*, 1960; HOLLAND e ROBERTS, 1964; LACHOWICZ, 1965; JONES e EDWARDS, 1966; ATKINSON, 1967; GAGLIANO e HINSDILL, 1970; TRUST, 1970; BOTTONE *et alii*, 1971; JETTEN *et alii*, 1972; VIDAVER *et alii*, 1972; GROSS e VIDAVER, 1978), composição do meio (JACOB *et alii*, 1952; HAMON, 1955; ALFOLDI, 1958; MATSUSHITA *et alii*, 1960; BRUBAKER e SURGALLA, 1961; HERTMAN e BEN-GURION, 1958; BEPPU e ARIMA, 1967; ROGERS, 1972; 1973; HALE e HINSDILL, 1973; CLARKE *et alii*, 1975; SCHWINGHAMER, 1975; GROSS e VIDAVER, 1978; 1979; HIRSCH, 1979), aeração (GAÁL e IVÁNOVICS, 1972; JETTEN *et alii*, 1972) e fase do ciclo de crescimento (ANACKER e ORDAL, 1959; DAJANI e WANNAMAKER, 1969; SCHLEGEL e SLADE,

1973; CLARKE *et alii*, 1975).

A liberação de bacteriocina por linhagens bacteriocinogênicas pode ser aumentada com a utilização de agentes de indução. Através de irradiação com luz ultravioleta observou-se maior produção de aeruginocina (HAMON *et alii*, 1961), carotovoricina (HAMON e PERON, 1961b), cloacina (HAMON e PERON, 1963b), clostocina (HONGO *et alii*, 1968), colicina (JACOB *et alii*, 1952; FREDERICQ, 1957; 1963; SANDOVAL *et alii*, 1965; MEYER *et alii*, 1976), fluocina (HAMON *et alii*, 1961), marcescina (HAMON e PERON, 1961a), megacina (IVÁNOVICS e ALFOLDI, 1957; IVÁNOVICS e NAGY, 1958; HOLLAND e ROBERTS, 1964; OZAKI *et alii*, 1966), monocina (HAMON e PERON, 1962, 1963a) pesticina (BEN-GURION e HERTMAN, 1958; HERTMAN e BEN-GURION, 1958; BRUBAKER e SURGALLA, 1961), piocina (JACOB, 1954; HAMON, 1956; HAMON *et alii*, 1961) e bacteriocinas de *C. michiganense* (ECHANDI, 1976), de *Pseudomonas* fitopatogênicas (VIDAVER *et alii*, 1972; CUPPELS *et alii*, 1978) e de *Rhizobium* (LOTZ e MAYER, 1972). Utilizando-se mitomicina C obteve-se maior liberação de clostocina (HONGO *et alii*, 1968), colicina (JACOB *et alii*, 1952; 1953b; HELINSKI e HERSCHMAN, 1967; MAC PHEE, 1970), megacina (OZEKI *et alii*, 1966) e bacteriocina de *C. michiganense* (ECHANGI, 1976). Outras substâncias também induzem a liberação de bacteriocinas como azaserina (MEYER *et alii*, 1976), cloranfenicol (BEN-GURION, 1970; KENNEDY, 1971), cloreto de cálcio (BRUBAKER e SURGALLA, 1961; CHANGAPPA e CARTER, 1977) e peróxido de hidrogênio (LWOFF *et alii*, 1952; JACOB *et alii*, 1953b; BRADLEY, 1967). SENIOR (1968) obteve indução por choques de temperatura.

O plasmídeo bacteriocinogênico geralmente é estável porém, ocasionalmente pode ser perdido espontaneamente. Através da utilização de agentes de "cura" pode-se acelerar sua eliminação.

Na definição original de bacteriocinas, JACOB *et alii*, (1953a) postularam sua ação como intraespecífica, porém, hoje tem-se inúmeras informações de atividade bacteriocinogênica entre espécies e gêneros diferentes. Nas revisões de REEVES (1965; 1972) e de TAGG *et alii* (1976) observa-se que esse amplo espectro de atividades abrange até mesmo espécies pertencentes a diferentes famílias.

Tipagem de bactérias tem sido efetuada com base na capacidade de produção e sensibilidade a bacteriocinas em *Chondrococcus* (ANAKER e ORDAL, 1959), *Clostridium* (MAHONY, 1974), *Corinebacterium* fitopatogênica (ECHANDI, 1976; GROSS e VIDAVER, 1979), *Pseudomonas* fitopatogênicas (VIDAVER *et alii*, 1972), *Salmonella* (FREDERICQ e LEVINE, 1947), *Serratia* (KUWABARA *et alii*, 1977), *Shigella* (FREDERICQ e LEVINE, 1947; ABBOT e SHANNON, 1958), *Staphylococcus* (IVANOV, 1970) e *Streptococcus* (TZANNETIS *et alii*, 1970; KECESSY e PIGUET, 1971; SHARMA *et alii*, 1976; SADATSUNE *et alii*, 1978).

O papel das bacteriocinas na regulação de populações dinâmicas em vários ecossistemas tem sido observado e, uma possível base para essa hipótese é que as bacteriocinas devem preencher alguma função vi-

tal uma vez que possuem distribuição universal e sobreviveram às pressões evolutivas (TAGG *et alii*, 1976). REEVES (1965; 1972) sugeriu que os receptores possivelmente possuam uma função alternativa, ou seja, constituem um sistema de reconhecimento relacionado ao potencial de fertilidade de cruzada de diferentes linhagens.

Evidências que as bacteriocinas possuem algum papel em interações microbianas na natureza foram apresentadas por SHERWOOD *et alii* (1949), HALBERT e SWICK (1950), HALBERT *et alii* (1954; 1957), BRAUDE e SIEMIENSKI (1965) e GUZE *et alii* (1969) através de prevenção de infecções experimentais em animais utilizando bactérias bacteriocinogênicas ativas contra as bactérias patogênicas. HALBERT (1948a,b), FREDERICQ e BETZ-BAREAU (1948), FREDERICQ *et alii* (1949), FREDERICQ (1950) observaram que a frequência de bactérias produtoras de colicinas ativas contra *Shigella* e *Salmonella* é maior em indivíduos doentes do que em sãos sugerindo portanto algum papel regulador das bacteriocinas.

Com relação ao controle de doenças em plantas causadas por bactérias fitopatogênicas alguns trabalhos também foram efetuados por KERR (1972), NEW e KERR (1972), HTAY e KERR (1974), KERR e HTAY (1974) e MOORE (1979) através da utilização de *A. radiobacter* não patogênica.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Amostras bacterianas

Foram utilizadas 81 amostras de bactérias fitopatogênicas, sendo que 61 foram isoladas e classificadas até gêneros a partir de hortaliças infectadas e 20 foram cedidas por outras instituições. Tais amostras acham-se discriminadas na Tabela 1.

Tabela 1 - Procedência das amostras bacterianas.

Amos- tras	T a x o n o m i a	P r o c e d ê n c i a
1	<i>E. carotovora</i>	KIMATI (ESALQ - Piracicaba)
2	<i>E. carotovora</i>	SCROTH (Univ. California - U.S.A.)
3	<i>Erwinia sp</i>	MALOZZI (Inst. Biológico - São Paulo)
4	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
5	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
6	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
7	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
8	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
9	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
10	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
11	<i>Erwinia sp</i>	Campinas
12	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
13	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
14	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
15	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
16	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
17	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
18	<i>Erwinia sp</i>	Leme
19	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
20	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
21	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
22	<i>Erwinia sp</i>	Rio Claro
23	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
24	<i>Erwinia sp</i>	Campinas
25	<i>Erwinia sp</i>	São Carlos
26	<i>Erwinia sp</i>	São Carlos
27	<i>Erwinia sp</i>	São Carlos
28	<i>Erwinia sp</i>	Capão Bonito
29	<i>Erwinia sp</i>	Piracicaba
30	<i>Erwinia sp</i>	São Paulo
31	<i>Erwinia sp</i>	Capão Bonito
32	<i>P. cichorii</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)
33	<i>P. dinitrificans</i>	I.Z. (ESALQ - Piracicaba)
34	<i>P. garceae</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)
35	<i>P. solanacearum</i>	MALOZZI (Inst. Biológico - São Paulo)
36	<i>P. solanacearum</i>	I.Z. (ESALQ - Piracicaba)
37	<i>P. solanacearum</i>	I.Z. (ESALQ - Piracicaba)
38	<i>P. solanacearum</i>	AKIBA (U.F.R. - Rio de Janeiro)
39	<i>P. synxantha</i>	I.Z. (ESALQ - Piracicaba)
40	<i>P. syringae</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)
41	<i>Pseudomonas sp</i>	Piracicaba

- Continua -

Tabela 1 - Continuação.

Amos- tras	T a x o n o m í a	P r o c e d ê n c i a
42	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
43	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
44	<i>Pseudomonas sp</i>	Piracicaba
45	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
46	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
47	<i>Pseudomonas sp</i>	Campinas
48	<i>Pseudomonas sp</i>	Campinas
49	<i>Pseudomonas sp</i>	Campinas
50	<i>Pseudomonas sp</i>	Piracicaba
51	<i>Pseudomonas sp</i>	Leme
52	<i>Pseudomonas sp</i>	Leme
53	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
54	<i>Pseudomonas sp</i>	Rio Claro
55	<i>Pseudomonas sp</i>	São Carlos
56	<i>Pseudomonas sp</i>	Capão Bonito
57	<i>Pseudomonas sp</i>	Capão Bonito
58	<i>Pseudomonas sp</i>	Rio Claro
59	<i>Pseudomonas sp</i>	São Paulo
60	<i>Pseudomonas sp</i>	Capão Bonito
61	<i>X. campestris</i>	LOURES (U. F. - Viçosa)
62	<i>X. campestris</i>	MALOZZI (Inst. Biológico - São Paulo)
63	<i>X. manihotis</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)
64	<i>X. manihotis</i>	MALOZZI (Inst. Biológico - São Paulo)
65	<i>X. passiflorae</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)
66	<i>X. vesicatoria</i>	AKIBA (U.F.R. - Rio de Janeiro)
67	<i>X. vesicatoria</i>	AKIBA (U.F.R. - Rio de Janeiro)
68	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
69	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
70	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
71	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
72	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
73	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
74	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
75	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
76	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
77	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
78	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
79	<i>Xanthomonas sp</i>	Rio Claro
80	<i>Xanthomonas sp</i>	Piracicaba
81	<i>A. tumefasciens</i>	LOURES (U.F. - Viçosa)

3.2. Meios de cultura e soluções

3.2.1. Caldo Nutriente (NL)

Nutrient broth (Difco)	8,0 g
Água destilada esterilizada.	1000 ml

3.2.2. Nutriente Ágar (NA)

Caldo nutriente adicionado de 15,0 g de ágar por litro de meio.

3.2.3. Nutriente ágar semi-sólido

Caldo nutriente adicionado de 7,5 g de ágar por litro de meio.

3.2.4. Meio D₃ (para isolamento de *Erwinia*)

Preparado de acordo com KADO e HESKETT (1970).

Sacarose	10,0 g
Arabinose.	10,0 g
Caseína ácida hidrolisada.	5,0 g
LiCl.	7,0 g
NaCl	5,0 g
Glicina.	3,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O.	0,3 g

Na ₂ HPO ₄	0,1 g
Dodecil sulfato de sódio.	0,05 g
Azul de bromotimol.	0,06 g
Fucsina ácida.	0,1 g
Ágar.	15,0 g
Água destilada esterilizada	1000 ml
pH 6,9 - 7,1	

3.2.5. Meio D₄ (para isolamento de *Pseudomonas*)

Preparado de acordo com KADO e HESKETT (1970)

Sacarose	10,0 g
Glicerol	10,0 ml
Caseína hidrolisada	1,0 g
NH ₄ Cl.	5,0 g
Na ₂ HPO ₄	2,3 g
Dodecil sulfato de sódio.	0,6 g
Ágar.	15,0 g
Água destilada esterilizada	1000 ml
pH 6,8	

3.2.6. Meio D₅ (para isolamento de *Xanthomonas*)

Preparado de acordo com KADO e HESKETT (1970)

Celobiose	10,0 g
K ₂ HPO ₄ (anidro)	3,0 g
NaH ₂ PO ₄	1,0 g
NH ₄ Cl	1,0 g

MgSO ₄ .7H ₂ O	0,3 g
Ágar.	15,0 g
Água destilada esterilizada	1000 ml

3.2.7. Meio 523 - Líquido (para bactérias fitopatogênicas)

Preparado de acordo com KADO e HESKETT (1970)

Sacarose.	10,0 g
Caseína ácida hidrolisada	8,0 g
Extrato de levedura	4,0 g
K ₂ HPO ₄ (anidro)	2,0 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,3 g
Água destilada esterilizada	1000 ml

pH 7,0 - 7,2

3.2.8. Meio 523 - Semi-Sólido

Igual ao meio 523 (item 3.2.7.) com adição de apenas 7,5 g de ágar.

3.2.9. Meio 523 - Sólido

Meio 523 (item 3.2.7.) com a adição de 15,0 g de ágar.

3.2.10. Meio TY agar (TYA)

Preparado de acordo com STANGHELLINI *et alii* (1977)

Bacto triptona.	10,0	g
Extrato de levedura	5,0	g
NaCl.	5,0	g
Ágar.	15,0	g
Água destilada esterilizada	1000	ml

3.2.11. Meio TYA - Semi-sólido

Semelhante ao meio TYA (item 3.2.10.), porém com adição de apenas 7,5 g de ágar.

3.2.12. Meio TY - Líquido

Igual ao meio TYA (item 3.2.10.), porém sem adição de ágar.

3.2.13. Meio de gelatina* (para estocagem das bactérias)

Nutriente broth	8,0	g
Gelatina.	5,0	g
Ágar	5,0	g
Água destilada esterilizada.	1000	ml

pH 7,4

3.2.14. Solução salina 0,85%

NaCl.	8,5 g
Água destilada esterilizada	1000 ml

3.3. Drogas

- Ácido nalidíxico (Nx) - Winthrop Products Inc.
- Ampicilina (Ap) - Laborterápica Bristol S.A.
- Bicloreto de mercúrio ($HgCl_2$) - E. Merck.
- Brometo de etídio (BE) - Sigma Chemical Co.
- Cefalotina sódica (Ce) - Eli Lilly do Brasil Ltda.
- Cloranfenicol (Cm) - Parke Davis Ltda.
- Eritromicina (Em) - Eli Lilly do Brasil Ltda.
- Hetacilina potássica (He) - Laborterápica Bristol S.A.
- 8-Metoxipsoraleina (8-MOP) - Sigma Chemical Co.
- Penicilina G. Potássica (Pn) - Fontoura - Wyeth Ind. Farmac. S.A.
- Sulfato de canamicina (Km) - Laborterápica Bristol S.A.
- Sulfato de estreptomicina (Sm) - Foutoura - Wyeth Ind. Farmac. S.A.
- Sulfato de gentamicina (Ge) - Ind. Quim. e Farmac. Schering S.A.
- Tetraciclina (Tc) - Pfizer Química Ltda.

3.4. Preparo das drogas

A Tabela 2 apresenta os solventes utilizados no preparo das drogas.

Tabela 2 - Preparo das soluções de drogas.

D r o g a s	S o l v e n t e s
Ácido nalidíxico	NaOH 0,1 N
Ampicilina	Água destilada esterilizada
Bicloreto de mercúrio	Água destilada esterilizada
Brometo de etídeo	Água destilada esterilizada
Cefalotina sódica	Água destilada esterilizada
Cloranfenicol	1/10 Metanol e 9/10 água dest. esterilizada
Eritromicina	1/10 Metanol e 9/10 água dest. esterilizada
Hetacilina	Água destilada esterilizada
8-Metoxípsoraleína	1/10 Acetona e 9/10 água dest. esterilizada
Penicilina G potássica	Água destilada esterilizada
Sulfato de canamicina	Água destilada esterilizada
Sulfato de estreptomicina	Água destilada esterilizada
Sulfato de gentamicina	Água destilada esterilizada
Tetraciclina	1/10 Metanol e 9/10 água dest. esterilizada

3.5. Esterilização e temperatura de incubação

Os meios de cultura foram esterilizados em autoclave por 15 minutos a 1 atmosfera de pressão e a 120°C.

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

3.6. Isolamento das bactérias fitopatogênicas

As amostras bacterianas foram coletadas a partir de hortaliças infectadas. Após desinfecção dos vegetais com álcool, a região lesada foi retirada com auxílio de espátula e pinça esterilizadas e colocada em tubo de ensaio contendo solução salina esterilizada. A seguir, agitou-se vigorosamente e a solução foi semeada em estrias em placas contendo meios específicos para isolamento de *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. As placas foram incubadas por 24 - 48 h e "à posteriori" as amostras bacterianas foram estocadas em tubos contendo meio de gelatina.

3.7. Identificação das bactérias

As provas bioquímicas para identificação das bactérias foram realizadas de acordo com LOURES e GUIMARÃES (1974) e ROMEIRO (1976) e a classificação baseou-se nas normas de BREED *et alii* (1957).

3.8. Determinação dos níveis de resistência

Os níveis de resistência foram determinados pela técnica de diluição em placas (TRABULSI e ZULIANI, 1969). As placas e as soluções de antibióticos foram preparadas no dia do uso.

Em tubos de ensaio contendo 20 ml de NA a 45°C, colocou-se

quantidades adequadas da solução de antibiótico a fim de obter-se a concentração final de 1, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg da droga por ml de meio de cultura. Os tubos foram agitados vigorosamente para homogeneizar a mistura e seu conteúdo vertido em placas de Petri. Após solidificação, as placas foram mantidas entreabertas em ambiente asséptico por aproximadamente 2 horas para eliminação da umidade superficial.

As amostras bacterianas a serem ensaiadas foram inoculadas em NL, incubadas por 24 horas e, após diluições apropriadas foram inoculadas com auxílio do replicador multialça de 17 unidades descrito por AZEVEDO *et alii* (1980) nas placas contendo antibiótico. A viabilidade das amostras foi observada inoculando-as em NA isento da droga. Após 24 horas de incubação observou-se o crescimento e considerou-se como nível de resistência a concentração da droga imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento da amostra bacteriana.

3.9. Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultura

Com a finalidade de se conhecer o meio de cultura ideal para produção de bacteriocinas, observou-se o comportamento das 81 linhagens em três diferentes meios: NA, 523 e TYA. A técnica utilizada foi de COSTA (1973).

As amostras crescidas por 24 horas em meio 523 líquido foram replicadas para placas de Petri contendo NA, TYA ou meio 523 sólido

através do multi-replicador que permite análise simultânea de 17 diferentes linhagens. Após 24 horas de incubação as placas foram invertidas e colocou-se 0,5 ml de clorofórmio na tampa. Decorridos 15 minutos as placas foram entreabertas em ambiente asséptico por 30 minutos para eliminação do clorofórmio residual.

Sobre as placas adicionou-se 5 ml de meio 523 semi-sólido a 45°C previamente inoculado com 0,1 ml da cultura a ser ensaiada de modo a obter-se uma delgada película sobre as colônias mortas pelo clorofórmio. Incubou-se por 24 horas e observou-se a presença ou ausência de halo de inibição ao redor das colônias inativadas. As linhagens que apresentaram halo foram observadas com relação ao tipo e tamanho da colônia e do halo de inibição. O diâmetro da linhagem produtora foi medido de uma extremidade à outra da colônia e o halo foi medido do bordo da colônia à extremidade externa do halo de inibição.

As amostras bacterianas foram todas analisadas quanto à capacidade de produção e quanto à sensibilidade às bacteriocinas nos 3 meios de cultivo. Efetuou-se também uma análise com as bactérias testadoras crescidas em NL e TY líquido e também NA e TY semi-sólido.

3.10. Produção de bacteriocinas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ágar

Utilizou-se o meio de cultura 523 contendo 1,0 e 1,5% de ágar.

Linhagens bacteriocinogênicas crescidas por 24 horas em meio 523 líquido foram inoculadas com auxílio de alça de platina calibrada, em placas contendo meio 523 com diferentes concentrações de ágar e incubadas por 24 horas. Após esse tempo adicionou-se 0,5 ml de clorofórmio na tampa das placas por 15 minutos para matar as bactérias produtoras. A seguir entreabriu-se as placas em ambiente asséptico por 30 minutos para evaporação do clorofórmio residual.

Sobre as placas adicionou-se 5 ml de meio 523 semi-sólido previamente inoculado com a linhagem indicadora e incubou-se por 24 horas. Posteriormente observou-se o tamanho e tipo do halo de inibição do crescimento.

3.11. Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio

Foram utilizadas placas de 10 cm de diâmetro contendo 10 ml e 20 ml de meio 523 sólido.

A técnica para detecção do tipo e tamanho do halo de inibição foi a mesma descrita no item 3.10.

3.12. Produção de bacteriocinas com diferentes tempos de incubação

Linhagens produtoras de bacteriocinas foram inoculadas em

meio 523 líquido e incubadas por 24 horas. "A posteriori" as culturas foram convenientemente diluídas (para obter-se em média, 10 colônias por placa) e semeadas em placas contendo meio 523 sólido. As placas foram separadas em três grupos sendo o primeiro conjunto incubado por 24 horas, o segundo por 48 horas e o terceiro por 72 horas.

Decorrido o tempo de incubação, as colônias foram mortas pela adição de 0,5 ml de clorofórmio na tampa da placa por 15 minutos. A seguir, entreabriu-se as placas por 30 minutos para evaporação do clorofórmio residual.

Sobre as colônias, adicionou-se 5 ml de meio 523 semi-sólido previamente inoculado com 0,1 ml da linhagem indicadora.

Após 24 horas de incubação observou-se o tamanho do halo de inibição de crescimento. Anotou-se também, o diâmetro das colônias.

As placas onde o halo de inibição apresentou-se opaco, isto é, não totalmente transparente, foram reincubadas por mais 24 horas.

3.13. Liberação de bacteriocina em meio de cultura líquido

A análise da liberação de bacteriocina em meio de cultura líquido foi efetuada com amostras crescidas por 24 e 48 horas com e sem aeração. O meio de cultura utilizado foi o 523.

Aos tubos de ensaio contendo as linhagens bacteriocinogêni-

cas crescidas, adicionou-se 1% de clorofórmio, centrifugou-se e filtrou-se o sobrenadante em filtro Millipore (GSWPO 2500) para eliminação de eventuais células bacterianas.

Em placas contendo meio 523 previamente semeado com a linhagem indicadora, colocou-se 0,05 ml do filtrado em concentrações não diluídas até a diluição 10^{-5} . A linhagem testadora foi semeada de dois modos: no 1º caso semeou-se 0,1 ml sobre o meio de cultura e espalhou-se com a alça de Drigalski; no 2º caso adicionou-se 0,1 ml em meio semi-sólido a 45°C e depositou-se na placa sobre o meio de cultivo.

As placas foram incubadas por 24 horas e a seguir observou-se a formação ou não de halos de inibição do crescimento da amostra sensível no local onde adicionou-se a gota do filtrado.

Paralelamente foram efetuados experimentos sem a adição de clorofórmio e sem a filtração.

3.14. Indução de bacteriocinas com luz ultravioleta curta (UVC)

3.14.1. Indução em líquido

Linhagem produtora de bacteriocina foi inoculada em meio 523 líquido, incubada por 24 horas e centrifugada. O sedimento foi ressuspenso em solução salina e irradiado com luz ultravioleta (comprimento de onda de 253 nm) por 10, 20 e 30 segundos a 7,0 cm da fonte. Para ir

radiação utilizou-se lâmpada Mineralight UV Lamp, modelo UVSL 25 e placas com 5,0 cm de diâmetro.

Após o tratamento, com auxílio de alça de platina calibrada (diâmetro de 5,0 mm), fez-se 4 inoculações em placas contendo meio 523 e incubou-se por 24 horas. A seguir submeteu-se as placas aos vapores de clorofórmio por 15 minutos e, após esse tempo as placas foram entreabertas por 30 minutos em ambiente asséptico para eliminação do clorofórmio residual.

Sobre as placas adicionou-se 5 ml de meio 523 semi-sólido a 45°C previamente inoculado com 0,1 ml da linhagem testadora, incubou-se por 24 horas e mediu-se o tamanho do halo de inibição.

Efetuuou-se paralelamente um controle sem irradiação.

3.14.2. Indução em meio sólido

Em placas contendo meio 523 sólido fez-se 4 inoculações da bactéria produtora com auxílio de alça de platina calibrada (5 mm de diâmetro) e incubou-se por 24 horas. Decorrido esse tempo as placas foram submetidas à irradiação com luz ultravioleta (253 nm) por 10, 20 e 30 segundos a 7,0 cm da fonte (Mineralight UV Lamp, modelo UVSL 25).

Após a irradiação as placas foram divididas em três lotes. O primeiro lote foi imediatamente submetido aos vapores de clorofórmio

por 15 minutos para matar a linhagem produtora, o segundo grupo permaneceu por 2 horas em ambiente escuro e foi depois tratado com clorofórmio e, o terceiro lote permaneceu 24 h no escuro antes de ser submetido ao clorofórmio.

Entreabriu-se cada placa por 30 minutos, adicionou-se 5 ml de meio 523 semi-sólido inoculado com a linhagem testadora e incubou-se por 24 horas. Posteriormente efetuou-se a medida do halo de inibição do crescimento.

Efetuuou-se paralelamente um controle sem irradiação.

3.15. Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas

Linhagens produtoras de bacteriocina foram inoculadas em meio 523 líquido e incubadas por 24 horas. Após diluições convenientes as culturas foram semeadas em meio 523 sólido e incubadas por 24 horas. Decorrido esse tempo colocou-se 0,5 ml de clorofórmio na tampa das placas e, após 15 minutos entreabriu-se as placas em ambiente asséptico por 30 minutos.

Sobre as placas adicionou-se a linhagem indicadora inoculada em meio 523 semi-sólido e incubou-se por 24 horas.

Anotou-se o número total de colônias por placa e o número de colônias que produziram halo de inibição do crescimento.

3.16. Ensaio da atividade fágica

3.16.1. A partir de meio sólido

Com auxílio do fio de platina, retirou-se blocos de meio de cultura da região do halo de inibição, colocou-se em tubos contendo meio 523 líquido e incubou-se por 18 - 24 horas.

A partir dos tubos que não apresentaram crescimento bacteriano, retirou-se 0,05 ml e adicionou-se sobre placas com meio 523 semeado com a linhagem indicadora. Incubou-se por 24 horas e anotou-se a presença ou não de lacunas de inibição.

3.16.2. A partir de cultura líquida

Bactérias produtoras de bacteriocinas crescidas por 24 horas em meio 523 líquido foram centrifugadas e o sobrenadante submetido à filtração em filtro Millipore (GSWPO 2500) e diluído até 10^{-5} .

Sobre placas contendo meio 523 sólido semeado com a amostra indicadora colocou-se 0,05 ml do filtrado nas diferentes diluições. Incubou-se por 24 horas e observou-se a ocorrência ou não de halos de inibição.

Efetou-se um controle, semeando-se o filtrado em placas com meio 523 para certificação da ausência de células bacterianas.

3.17. Eliminação do caráter bacteriocinogênico

3.17.1. Através do brometo de etídio

Em tubos contendo meio 523 líquido acrescido de brometo de etídio (100 e 500 $\mu\text{g/ml}$) colocou-se 0,1 ml da bactéria portadora do fator bacteriocinogênico crescida em meio 523 líquido por 24 horas. Efetuou-se também um tubo controle, sem o agente de "cura" para estimar-se a porcentagem de sobrevivência. Incubou-se por 24 horas e após diluições convenientes, semeou-se em placas contendo meio 523. Após 24 horas de incubação, adicionou-se 0,5 ml de clorofórmio por 15 minutos e a seguir entreabriu-se as placas por 30 minutos para eliminação do clorofórmio residual.

Sobre as placas adicionou-se 0,1 ml de meio 523 semi-sólido acrescido de 0,1 ml da bactéria indicadora e incubou-se por 24 horas.

Efetuuou-se a leitura dos resultados anotando o número de colônias Bac^+ e Bac^- e o número de colônias provenientes do tubo controle.

3.17.2. Através da temperatura elevada

Em tubos contendo meio 523 líquido inoculou-se a linhagem bacteriocinogênica e incubou-se por 24 horas a 28°C e 45°C. Após diluições convenientes semeou-se em placas com meio 523 e incubou-se por 24 ho

ras. Inativou-se a bactéria com clorofórmio por 15 minutos, entreabriu-se a placa por 30 minutos e adicionou-se sobre a placa, 5 ml de meio 523 semi-sólido acrescido da linhagem indicadora. Após 24 horas de incubação anotou-se o número de colônias Bac^+ e Bac^- e o número de colônias provenientes do tubo controle.

3.18. Tratamento com 8-metoxipsoraleina (8-MOP) e luz ultravioleta longa (360 nm)

3.18.1. Tratamento em meio líquido

Linhagem bacteriocinogênica foi inoculada em meio 523 líquido, incubada por 24 horas e a seguir centrifugada. O sedimento foi ressuspenso em solução salina e dividido em quatro alíquotas. Uma delas foi utilizada para controle, a segunda, submetida à irradiação com luz ultravioleta longa (UVL) por 30, 60, 90 e 120 segundos e, as duas restantes adicionou-se 8-MOP (25 $\mu\text{g/ml}$) e incubou-se por 30 minutos no escuro a 28°C. Decorrido esse tempo retirou-se metade dessa solução (sem irradiação) e o restante foi submetido a irradiação com UVL por 30, 60, 90 e 120 segundos.

Em placas contendo meio 523 inoculou-se amostras dos diversos tratamentos e incubou-se por 24 horas. A inoculação foi realizada com auxílio de alça de platina calibrada ($\phi = 5 \text{ mm}$). Posteriormente adicionou-se 0,5 ml de clorofórmio e após 15 minutos, entreabriu-se as placas

em ambiente asséptico por 30 minutos para eliminação do clorofórmio residual. Adicionou-se sobre as placas, 5 ml de meio 523 semi-sólido a 45°C previamente inoculado com a bactéria indicadora, incubou-se por 24 horas e anotou-se o tamanho do halo de inibição.

A fonte utilizada foi Mineralight UV Lamp, modelo UVSL25 regulada para emitir luz de 360 nm de comprimento de onda. A distância das placas à fonte foi de 1,0 cm. O diâmetro da placa utilizada na irradiação foi de 5,0 cm.

3.18.2. Tratamento em meio sólido

Em placas contendo meio 523 e placas com meio 523 acrescido de 8-MOP (25 µg/ml), fez-se 4 inóculos da linhagem bacteriocinogênica com auxílio de alça de platina calibrada ($\phi = 5$ mm) e incubou-se por 24 horas. Metade das placas foram utilizadas para controle sem irradiação e as restantes foram submetidas à irradiação com luz UVL (360 nm) por 30, 60, 90 e 120 segundos. Utilizou-se a lâmpada Mineralight UV Lamp, modelo UVSL25, colocada a 1,0 cm das placas.

As placas irradiadas e não irradiadas permaneceram no escuro por 24 horas. A seguir adicionou-se 0,5 ml de clorofórmio por 15 minutos. Após evaporação por 30 minutos adicionou-se sobre as placas, 5 ml de meio 523 previamente inoculado com 0,1 ml da linhagem indicadora. Incubou-se por 24 horas e efetuou-se a medida do halo de inibição.

4. RESULTADOS

4.1. Níveis de resistência

A Tabela 3 apresenta os níveis de resistência e as figuras 1 a 12 a frequência para cada nível de resistência das 81 amostras frente a 12 agentes antimicrobianos. Na Tabela 4 encontram-se os modelos de resistência das amostras em função das Figuras 1 a 12.

Tabela 3 - Níveis de resistência de 81 amostras de bactérias fitopatogênicas frente a 12 drogas antimicrobianas.

Amostras	D r o g a s (µg/ml)*											
	Nx	Ap	Hg	Ce	Cm	Em	He	Pn	Km	Sm	Ge	Tc
<i>Erwinia</i>												
1	10	20	1	1000	5	20	100	1000	1	<1	<1	2
2	1	2	2	<1	5	20	<1	2	1	<1	<1	2
3	2	10	2	2	10	500	10	1	2	5	2	2
4	2	100	<1	5	5	1000	50	100	<1	<1	<1	5
5	20	1000	1	1000	50	1000	1000	1000	100	200	100	20
6	2	2	<1	20	2	50	2	20	<1	<1	<1	1
7	5	20	<1	50	5	10	5	50	<1	<1	<1	5
8	5	20	<1	1000	20	1000	5	1000	<1	<1	<1	5
9	5	20	1	1000	100	1000	20	1000	1	<1	<1	100
10	2	20	1	50	5	10	100	100	<1	<1	<1	5
11	5	20	1	20	5	20	20	50	<1	<1	<1	5
12	5	10	1	1000	100	1000	20	1000	<1	<1	<1	200
13	2	50	<1	100	10	1000	20	1000	<1	<1	<1	2
14	5	100	1	10	10	1000	50	100	<1	<1	<1	2
15	5	20	1	1000	100	1000	20	1000	1	<1	<1	200
16	5	100	<1	10	5	20	20	100	<1	<1	<1	2
17	5	20	<1	200	5	500	10	1000	<1	<1	<1	2
18	5	100	<1	10	5	1000	50	100	2	<1	<1	2
19	2	50	<1	2	5	1000	50	50	<1	<1	<1	1
20	10	100	<1	200	10	100	10	1000	<1	<1	<1	2
21	10	100	<1	1000	100	1000	100	1000	<1	<1	<1	200
22	2	20	2	1000	10	1000	20	1000	<1	<1	<1	2
23	2	20	10	1000	20	1000	10	100	2	<1	1	10
24	10	1000	2	1000	500	1000	1000	1000	1	1000	2	5
25	2	50	2	1000	10	1000	100	500	<1	<1	<1	5
26	2	<1	2	<1	2	1000	<1	<1	<1	1	<1	1
27	2	100	20	1000	100	1000	100	1000	1	1	<1	5
28	1	2	2	50	2	1000	2	20	<1	20	<1	1
29	2	5	2	50	10	1000	10	200	1	1	1	5
30	5	100	20	2	20	1000	50	100	1	1	<1	5
31	10	100	20	1000	10	1000	100	1000	<1	5	<1	1
<i>Pseudomonas</i>												
32	2	100	2	1000	5	1000	100	1000	1	1	<1	10
33	20	1000	1	1000	50	1000	<1	1000	100	10	20	20
34	5	2	<1	1000	20	20	10	20	<1	<1	<1	1
35	2	1	<1	10	20	2	2	2	<1	1	2	1
36	200	2	1	10	200	20	5	50	5	50	5	2
37	200	10	1	10	200	20	5	100	2	50	5	2
38	2	2	<1	20	20	2	1	5	<1	2	2	<1
39	5	1000	20	1000	200	1000	1000	1000	100	20	10	10
40	5	10	1	1000	100	20	20	50	<1	1	<1	1
41	2	200	2	2	5	100	100	100	<1	<1	<1	1
42	5	20	1	1000	5	1000	100	1000	<1	2	<1	2
43	5	100	1	20	5	1000	100	100	5	<1	<1	2
44	20	100	<1	1000	1000	1000	200	100	<1	2	5	10
45	5	50	1	1000	100	1000	100	1000	2	<1	<1	1000
46	2	50	1	5	2	1000	100	100	<1	<1	<1	2
47	5	100	1	10	5	1000	100	100	<1	<1	<1	5
48	5	50	1	5	10	1000	20	50	<1	2	<1	2
49	5	100	1	1000	20	1000	50	1000	<1	<1	<1	10
50	20	20	<1	1000	100	1000	100	100	<1	2	2	2
51	5	20	<1	5	10	1000	20	50	<1	<1	<1	2
52	5	100	<1	50	5	1000	2	100	<1	<1	<1	2
53	5	50	<1	1000	100	1000	100	1000	<1	<1	<1	200
54	2	2	2	5	2	1000	20	50	2	1	1	2
55	2	100	2	100	2	1000	50	50	<1	<1	<1	2
56	2	50	5	1000	50	1000	200	200	<1	2	1	10
57	<1	50	10	20	2	1000	100	200	<1	1	<1	2
58	50	500	2	1000	500	1000	150	1000	1	5	1	200
59	2	200	10	1000	20	1000	1000	1000	1	1	<1	500
60	2	100	2	2	2	100	100	200	<1	50	<1	<1

- Continua -

Tabela 3 - Continuação.

Amostras	D r o g a s (µg/ml)*											
	Nx	Ap	Hg	Ce	Cm	Em	He	Pn	Km	Sm	Ge	Tc
<i>Xanthomonas</i>												
61	10	200	<1	50	10	2	<1	200	<1	1	2	<1
62	10	200	<1	100	10	2	2	200	<1	2	<1	<1
63	5	2	1	20	1	2	1	1	<1	1	<1	<1
64	5	5	<1	20	2	10	1	5	<1	2	<1	<1
65	20	5	<1	100	2	10	2	100	<1	<1	<1	<1
66	20	1000	1	200	2	20	<1	200	<1	<1	<1	2
67	10	5	<1	50	2	10	5	2	<1	<1	<1	1
68	10	2	<1	10	20	2	5	10	<1	<1	<1	1
69	2	2	<1	2	5	10	2	10	<1	<1	<1	1
70	5	2	<1	2	5	20	2	10	<1	<1	<1	1
71	5	2	<1	2	2	20	2	10	<1	<1	<1	1
72	20	5	<1	20	5	2	10	10	<1	<1	<1	1
73	5	2	<1	20	20	2	2	5	<1	<1	<1	1
74	2	10	<1	10	5	50	10	50	<1	<1	<1	1
75	2	5	1	10	5	5	10	20	<1	<1	<1	1
76	2	2	<1	10	2	100	1	10	<1	<1	<1	1
77	5	10	1	200	10	1000	10	1000	<1	<1	<1	2
78	5	2	1	2	5	10	2	10	<1	<1	<1	1
79	2	20	2	1000	10	1000	20	200	<1	1	<1	5
80	5	10	<1	2	10	1000	10	50	<1	<1	<1	1
<i>Agrobacterium</i>												
81	500	20	1	200	20	100	10	500	5	20	5	1

* Nx = Ácido Nalidíxico

Ap = Ampicilina

Hg = Bicloreto de Mercúrio

Ce = Cefalotina

Cm = Cloranfenicol

Em = Eritromicina

He = Hetacilina

Pn = Penicilina

Km = Canamicina

Sm = Estreptomicina

Ge = Gentamicina

Tc = Tetraciclina

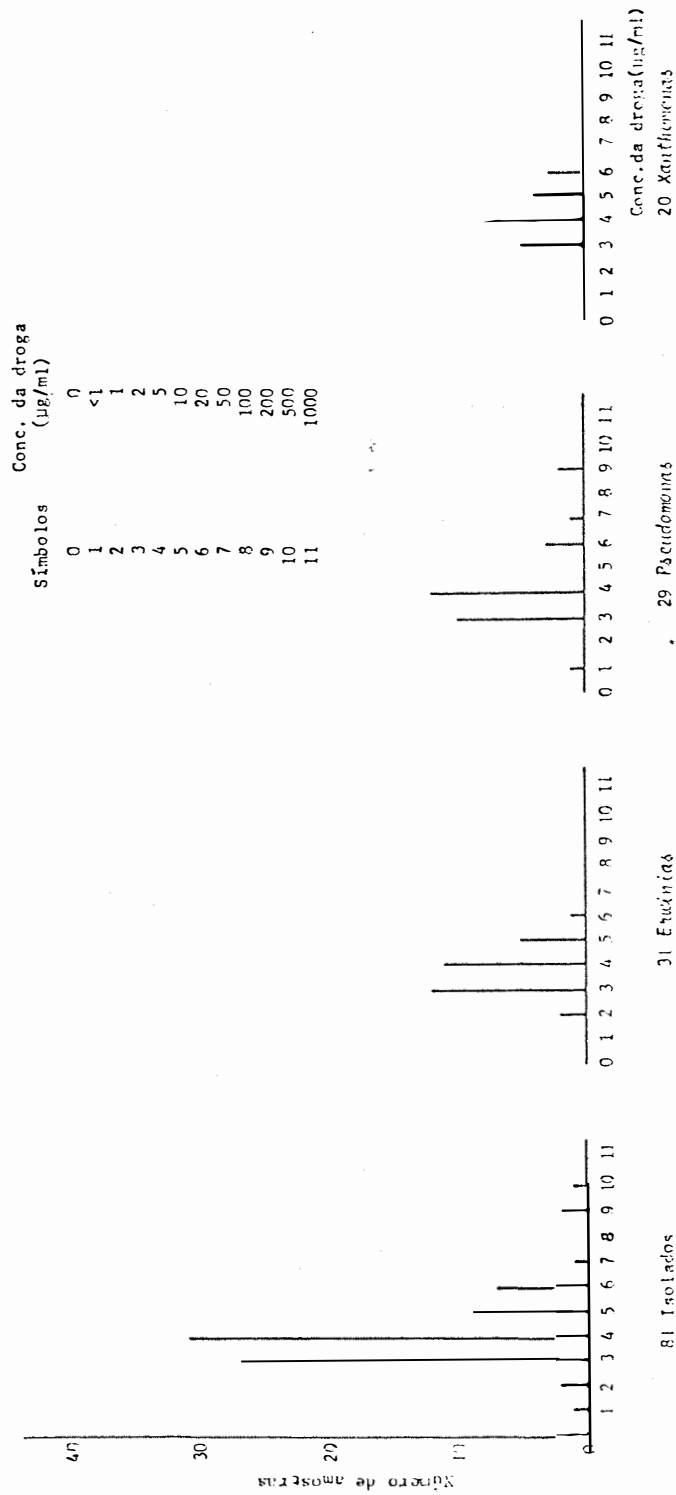


Figura 1 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (pômeros) frente ao Ácido Na-lidíxico.

Símbolos	Conc. da droga (µg/ml)
0	0
1	<1
2	1
3	2
4	5
5	10
6	20
7	50
8	100
9	200
10	500
11	1000

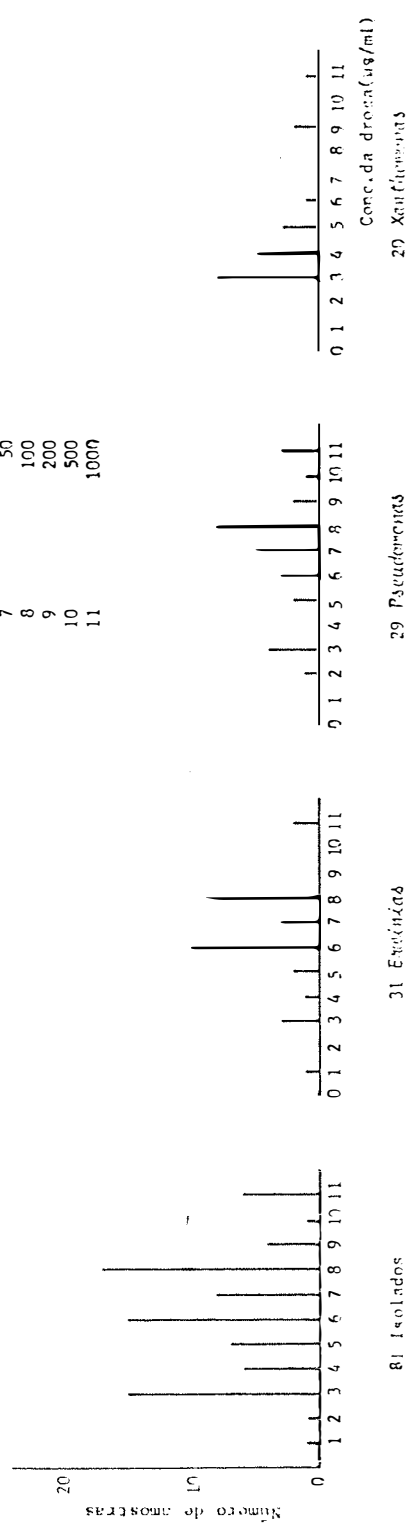


Figura 2 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Ampicilina.

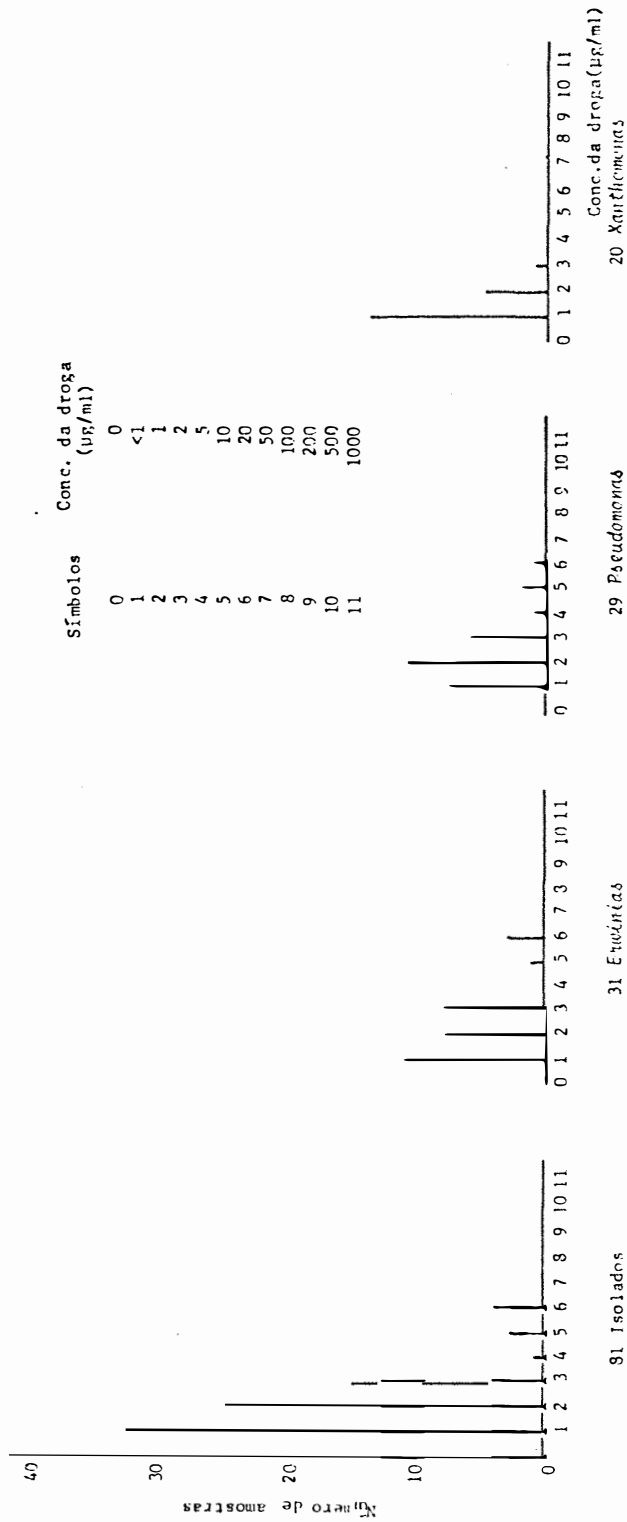


Figura 3 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente ao Bicolreto de Mercúrio.

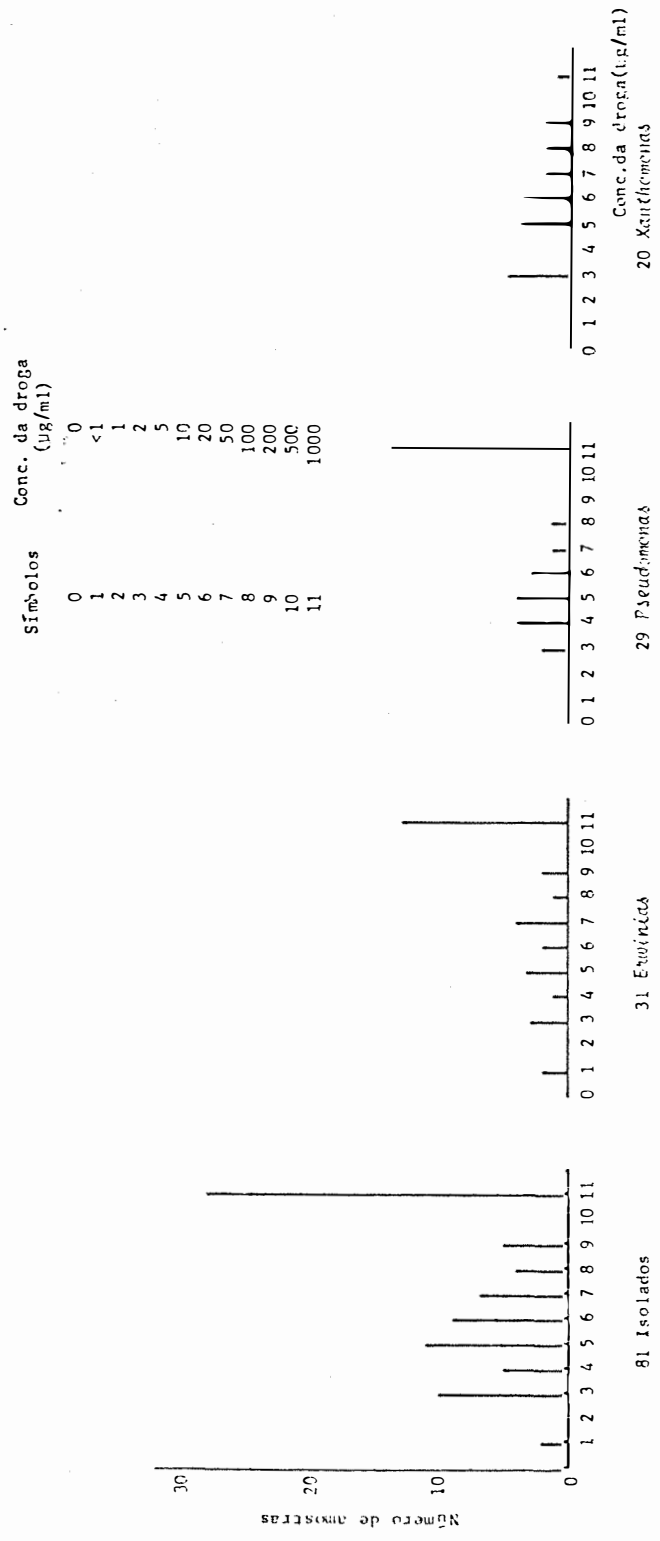


Figura 4 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Cefalotina.

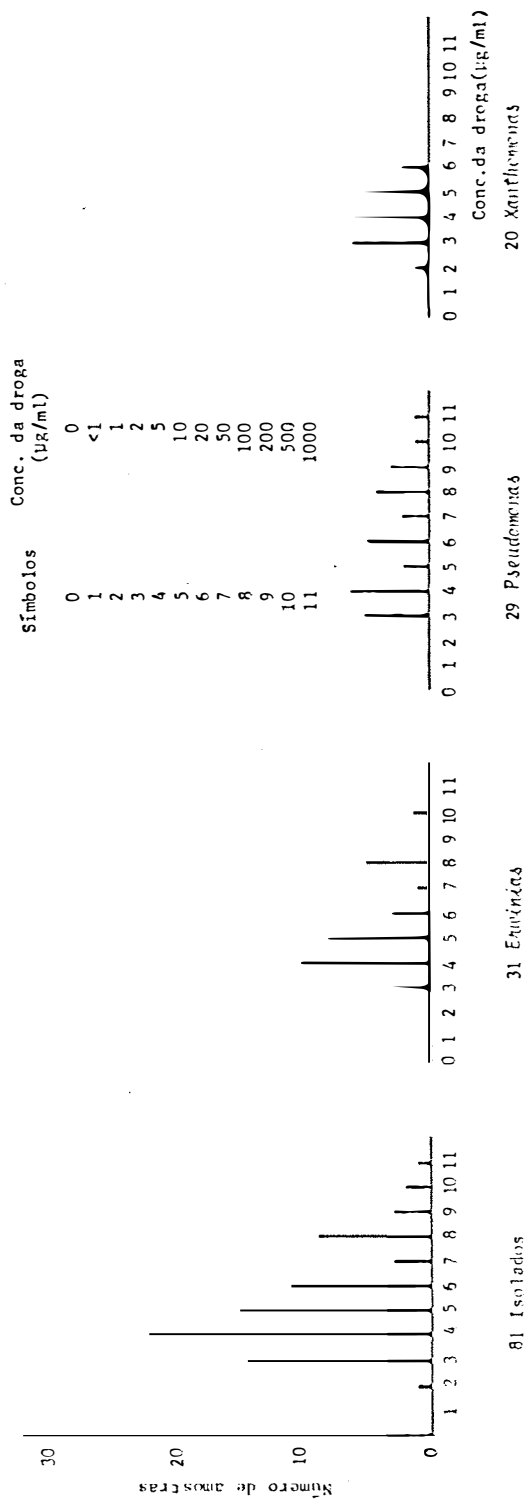


Figura 5 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente ao Cloranfenicol.

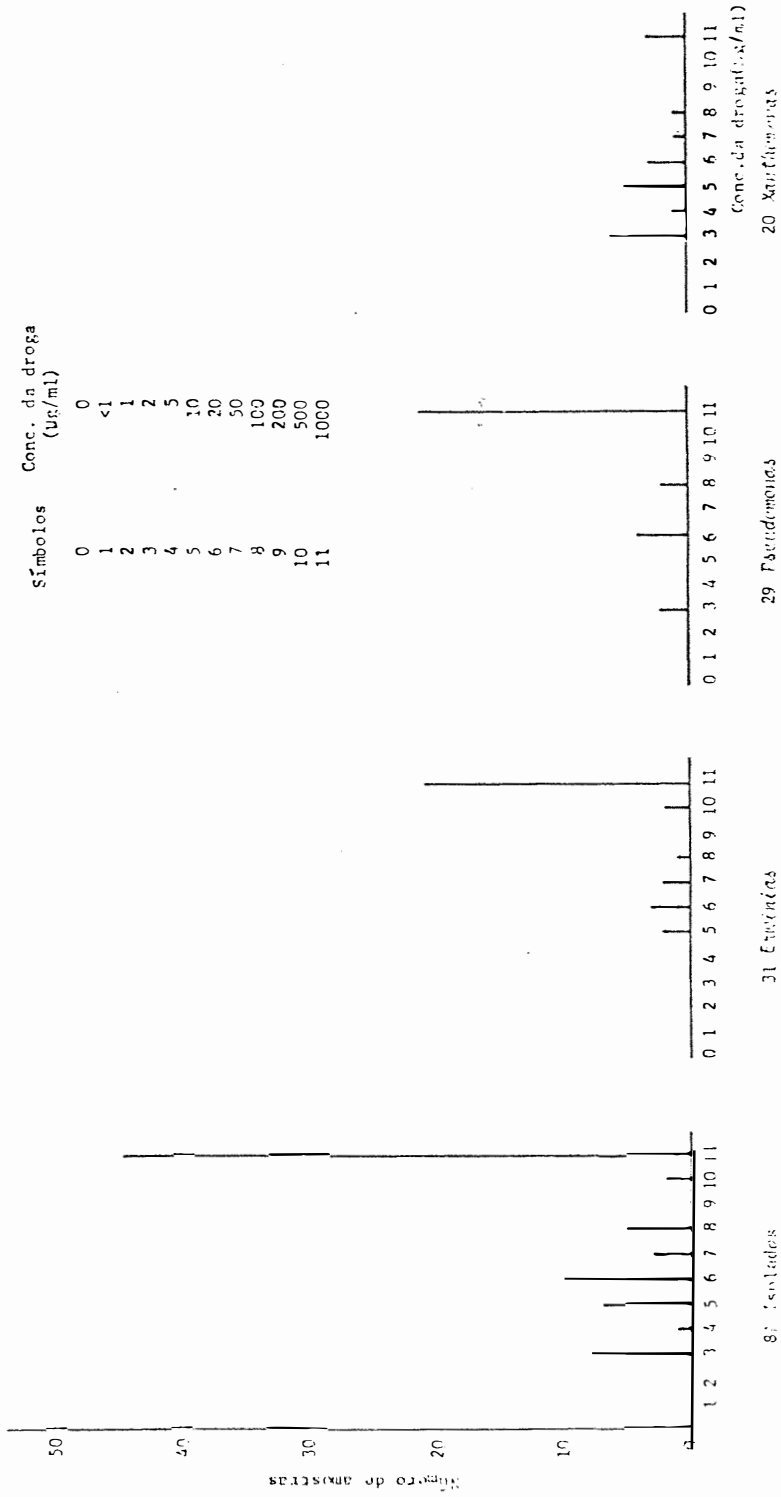


Figura 6 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Eritromicina.

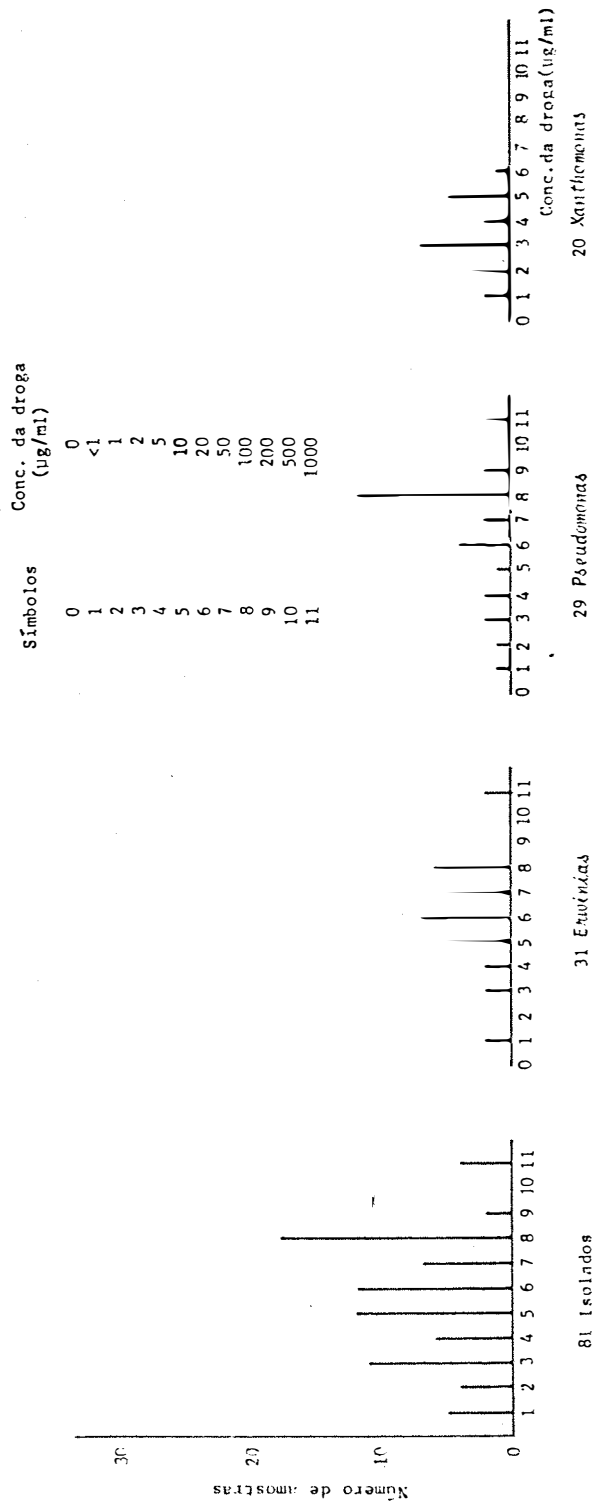


Figura 7 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a tetraciclina.

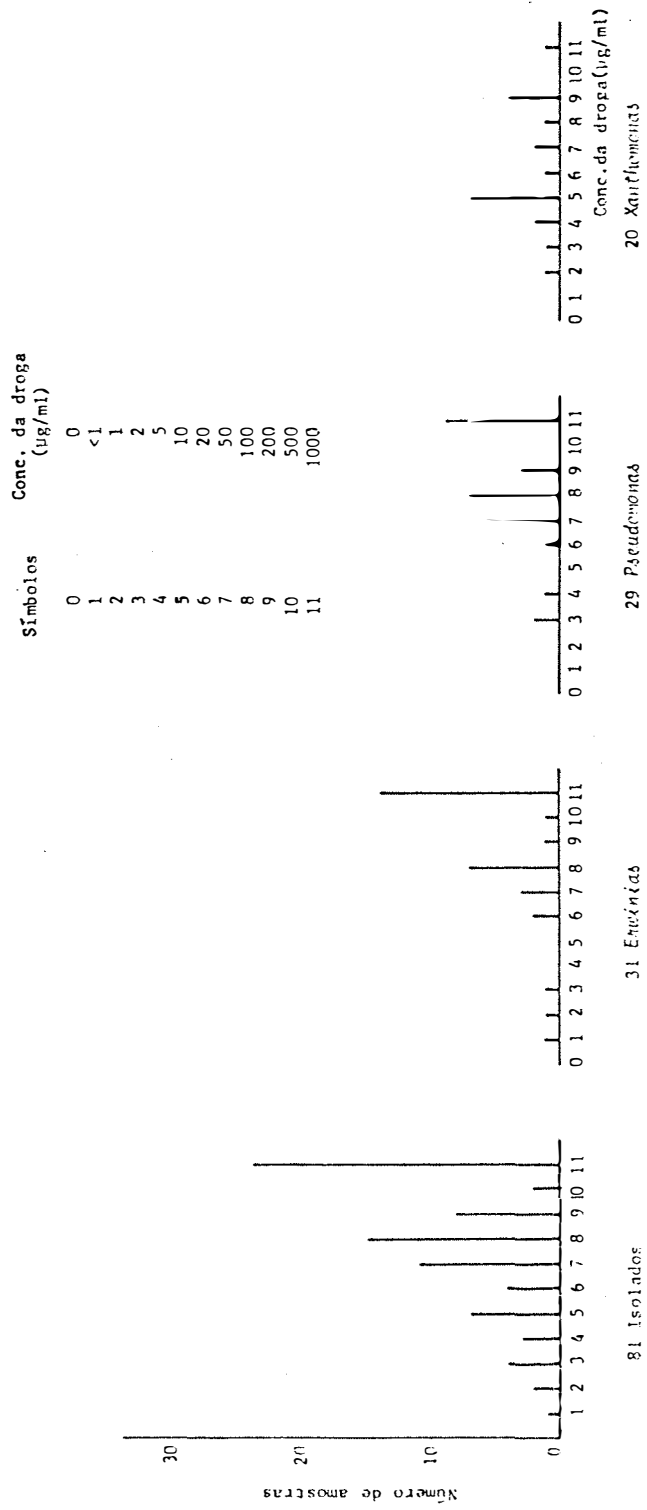


Figura 8 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Penicilina.

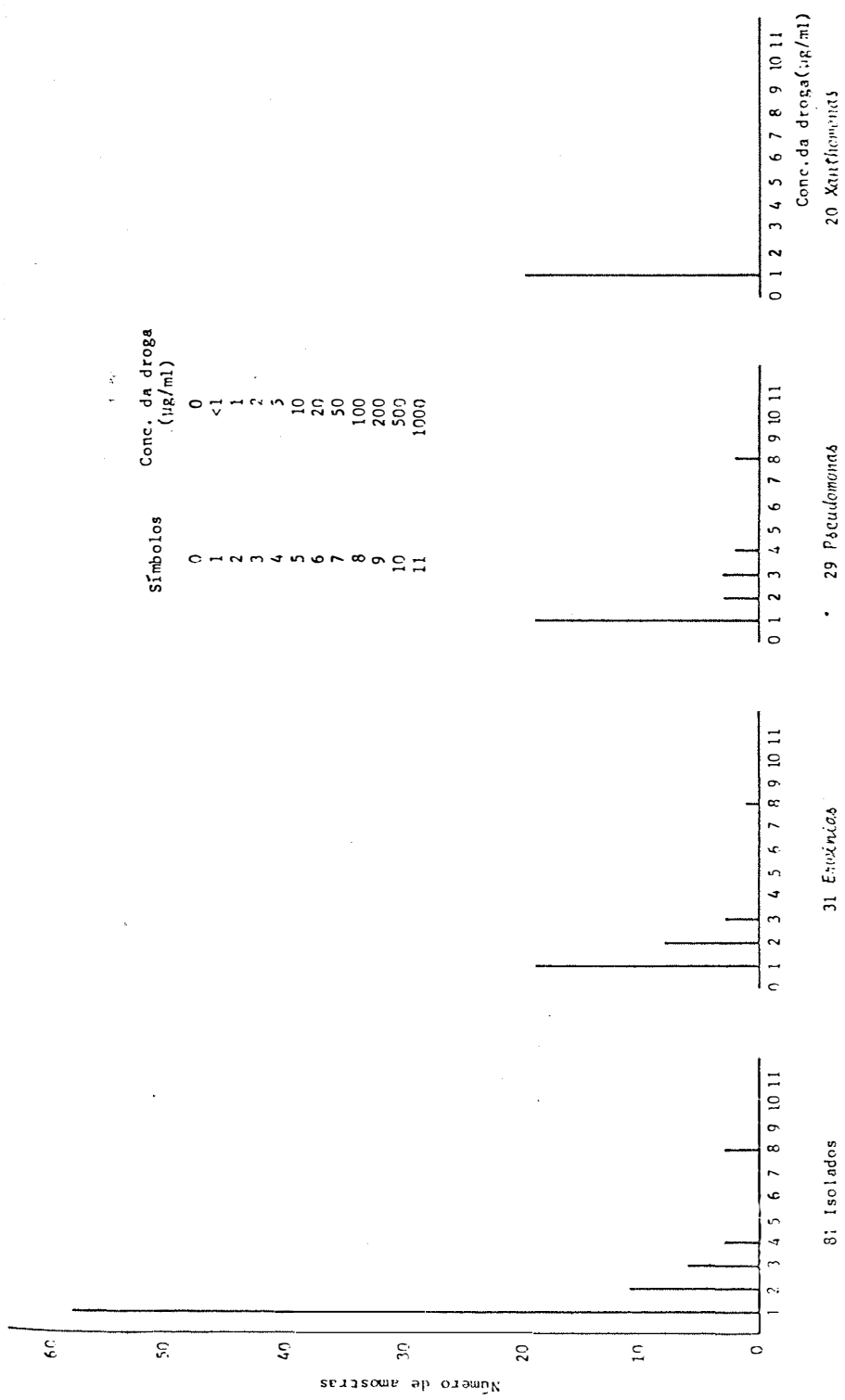


Figura 9 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Canamicina.

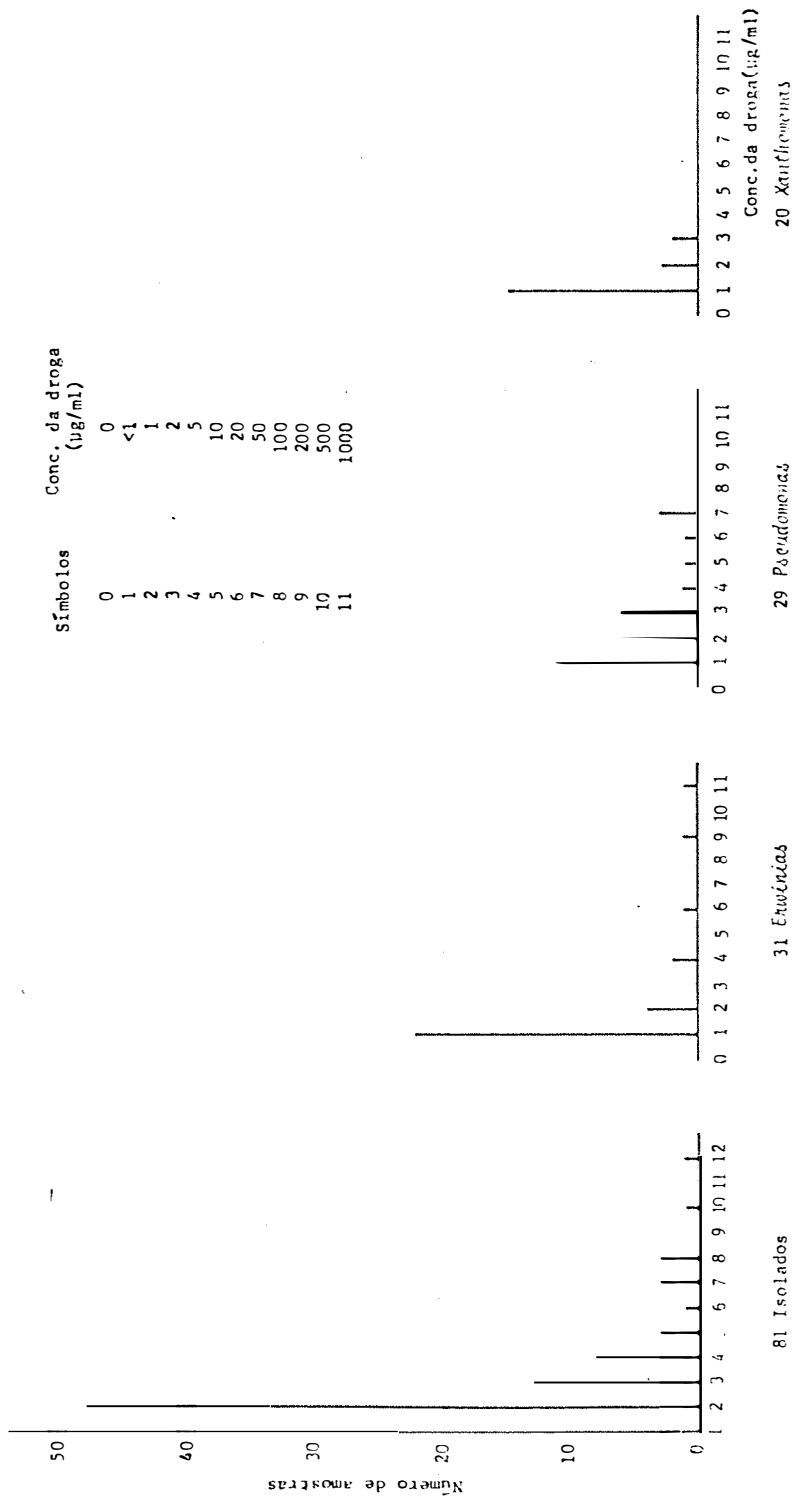


Figura 10 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Estreptomicina.

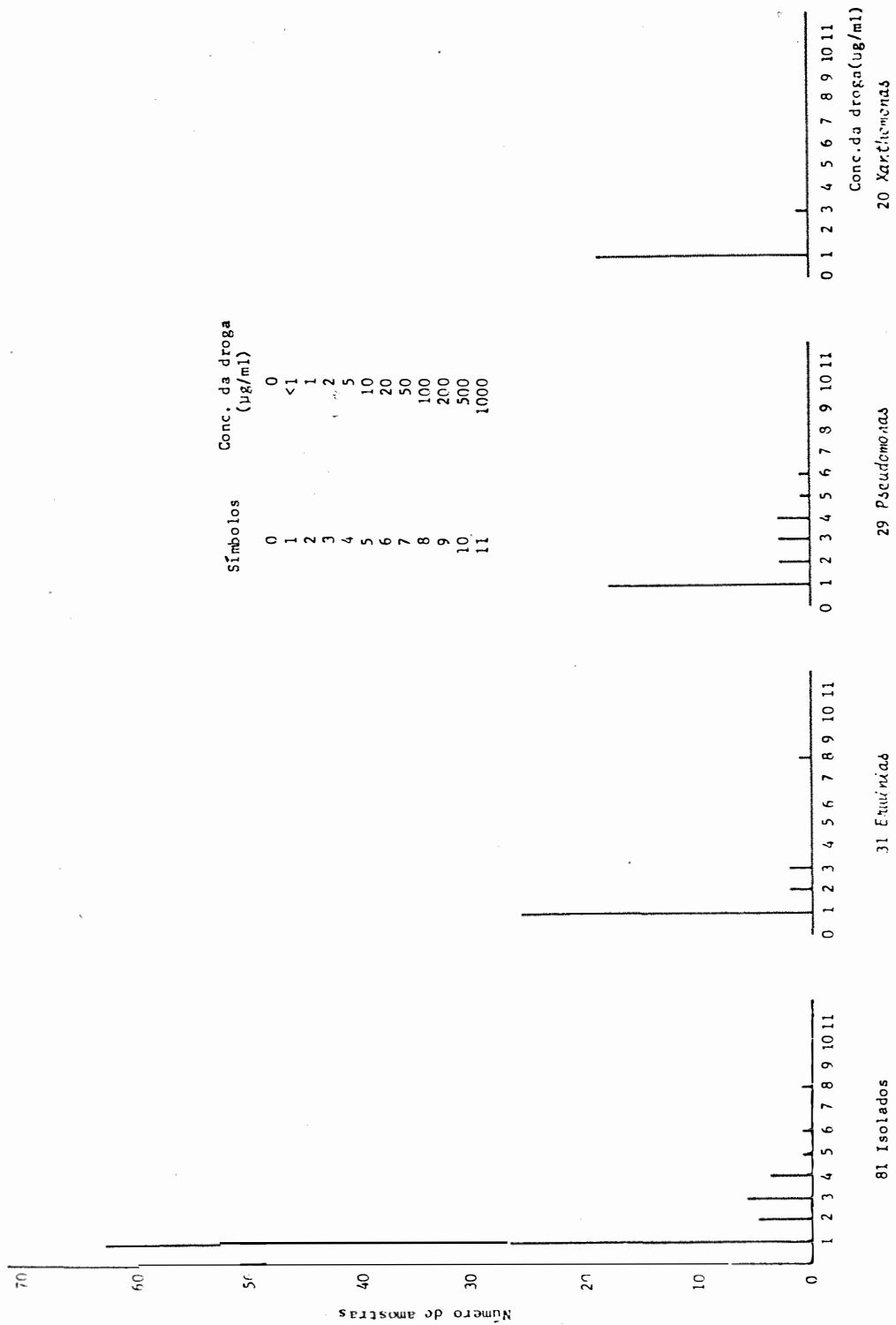


Figura 11 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Gentamicina.

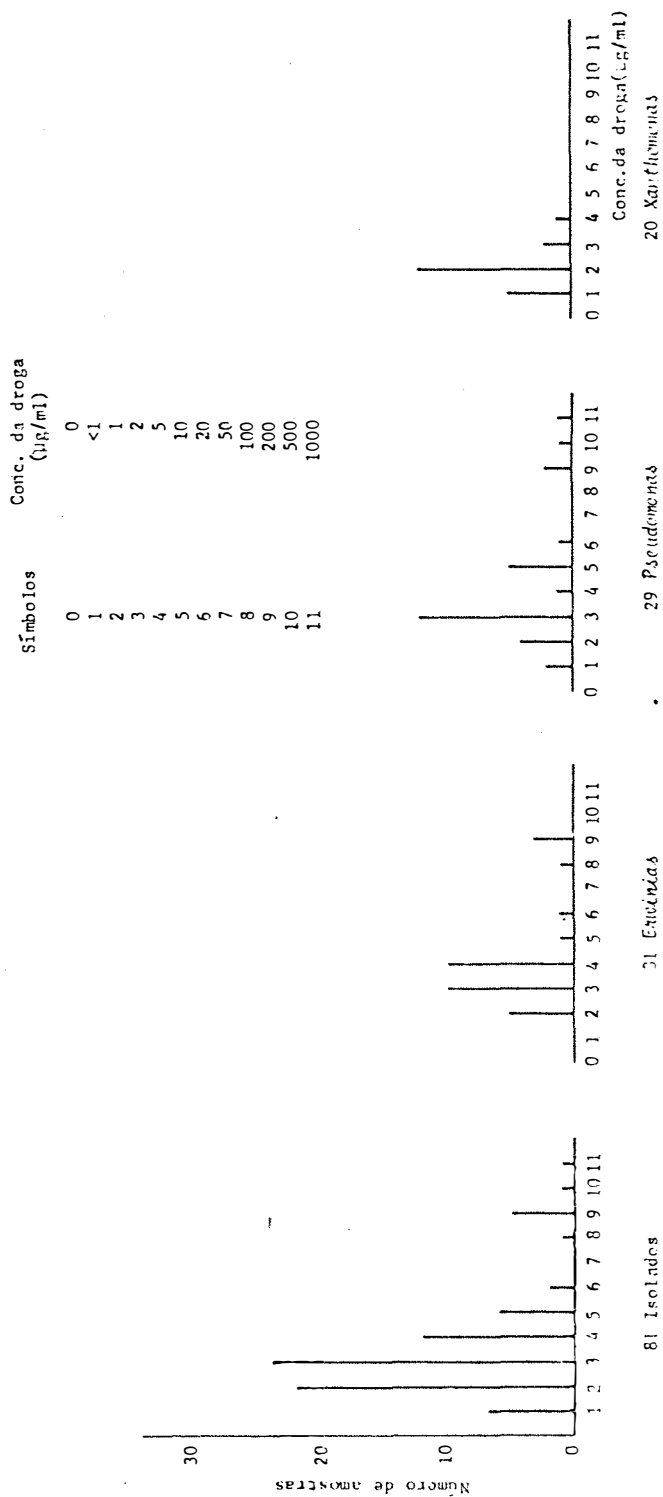


Figura 12 - Representação gráfica dos níveis de resistência dos 81 isolados em conjunto e separadamente (gêneros) frente a Tetraciclina.

Tabela 4 - Modelos de resistência das amostras frente aos agentes antimicrobianos.

Amostras	Modelos de resistência	Modelos encontrados	Número de amostras
<i>Erwinia</i>			
5	Km Sm Ge	Hg	3
9	Cm Tc	Sm	1
12	Cm Tc	Hg Cm	1
15	Cm Tc	Cm Sm	1
21	Cm Tc	Cm Tc	4
23	Hg	Km Sm Ge	1
24	Cm Sm		
27	Hg Cm		
28	Sm		
30	Hg		
31	Hg		
<i>Pseudomonas</i>			
33	Nx Km	Hg	1
36	Nx Cm Sm	Cm	1
37	Nx Cm Sm	Sm	1
39	Hg Cm Km Sm	Nx Cm	2
40	Cm	Nx Km	1
44	Nx Cm	Hg Tc	1
45	Cm Tc	Cm Tc	1
50	Nx Cm	Nx Cm Sm	2
53	Cm Km Tc	Nx Cm Tc	1
57	Hg	Cm Km Tc	1
58	Nx Cm Tc	Hg Cm Km Sm	1
59	Hg Tc		
60	Sm		

4.2. Produção de bacteriocinas em diferentes meios de cultura

Objetivando-se conhecer o meio de cultura ideal para a produção de bacteriocinas ensaiaram-se as 81 linhagens nos meios NA, TYA e 523. As linhagens foram todas analisadas quanto à capacidade de produção e quanto a sensibilidade às bacteriocinas.

O meio de cultura 523 mostrou-se mais favorável para análise da bacteriocinogenicidade do que TYA e NA. Nesse meio detectou-se maior número de linhagens bacteriocinogênicas e o espectro de ação de cada linhagem foi maior, isto é, as linhagens produziram bacteriocinas contra maior número de indicadoras quando comparadas com os outros dois meios.

A Tabela 5 apresenta o número e porcentagem de bactérias produtoras de bacteriocinas em NA, TYA e 523 e a Tabela 6 mostra o número de linhagens sensíveis para cada produtora cultivada nos três diferentes meios de cultura.

Tabela 5 - Número e porcentagem de amostras bacteriocinogênicas em diferentes meios de cultura, nos 81 isolados.

Meios de cultivo	Nº de amostras produtoras	% de amostras produtoras
523	57	70,37
TYA	18	22,22
NA	15	18,51

Tabela 6 - Número de linhagens sensíveis a bacteriocina de cada amostra bacteriocinogênica crescida em diferentes meios (523, TYA e NA).

Número da amostra produtora	Nº de amostras sensíveis		
	523	TYA	NA
<i>Erwinia</i>			
1	25	0	0
3	27	0	0
4	4	0	0
5	3	0	0
7	3	0	0
8	11	0	0
9	10	0	0
10	23	0	0
11	23	0	0
12	9	0	0
13	19	0	0
14	11	0	0
16	29	0	0
17	8	2	2
18	10	0	0
20	10	1	0
21	16	2	2
22	19	1	2
23	22	0	0
24	9	0	0
30	15	0	0
31	9	0	0
<i>Pseudomonas</i>			
32	4	1	0
33	47	14	1
35	6	2	0
38	7	0	0

- Continua -

Tabela 6 - Continuação.

Número da amostra produtora	Nº de amostras sensíveis		
	523	TYA	NA
39	32	14	0
40	2	0	0
41	4	0	1
42	11	0	2
43	36	0	3
44	54	14	25
45	29	5	8
46	28	2	0
47	38	0	0
48	44	0	0
49	37	0	4
50	40	12	0
51	14	0	0
52	5	0	0
53	19	2	5
54	44	2	0
55	9	0	0
56	10	0	0
58	29	10	0
59	9	0	0
<i>Xanthomonas</i>			
64	11	0	0
65	19	0	0
70	9	1	3
71	16	0	0
72	5	0	0
73	5	0	2
74	8	0	0
75	12	1	2
77	8	0	0
79	11	0	0
80	5	4	2

O crescimento das linhagens testadoras em NL, TY ou meio 523 líquido e semi-sólido não mostrou diferença significativa com relação à sensibilidade, ou seja, a bactéria apresentou-se sensível ou resistente indiferentemente se cultivada em NL, TY ou meio 523.

Uma vez definido como ideal o meio de cultura 523, foram definidas também as linhagens produtoras e sensíveis à bacteriocinas (Tabela 7). A Tabela 8 apresenta o diâmetro da colônia e o tamanho do halo de inibição do crescimento em cada caso.

4.3. Produção de bacteriocinas em meio de cultura contendo diferentes concentrações de ágar

A Tabela 9 apresenta o tamanho do halo de inibição das linhagens bacteriocinogênicas 11, 30, 49, 58 e 65 semeadas em meio 523 contendo 1,0 e 1,5% de ágar.

4.4. Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio

Em placas contendo 10 e 20 ml de meio 523 ensaiou-se a produção de bacteriocinas pelas amostras 11, 30, 49, 58 e 65 (Tabela 9).

Tabela 7 - Produção e acessibilidade a bacteriocinas em BL amostras cultivadas em meio 327.

Amostra nº	L i n h a s																																								Indicador																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																																													
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40		41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140	141	142	143	144	145	146	147	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	192	193	194	195	196	197	198	199	200	201	202	203	204	205	206	207	208	209	210	211	212	213	214	215	216	217	218	219	220	221	222	223	224	225	226	227	228	229	230	231	232	233	234	235	236	237	238	239	240	241	242	243	244	245	246	247	248	249	250	251	252	253	254	255	256	257	258	259	260	261	262	263	264	265	266	267	268	269	270	271	272	273	274	275	276	277	278	279	280	281	282	283	284	285	286	287	288	289	290	291	292	293	294	295	296	297	298	299	300	301	302	303	304	305	306	307	308	309	310	311	312	313	314	315	316	317	318	319	320	321	322	323	324	325	326	327	328	329	330	331	332	333	334	335	336	337	338	339	340	341	342	343	344	345	346	347	348	349	350	351	352	353	354	355	356	357	358	359	360	361	362	363	364	365	366	367	368	369	370	371	372	373	374	375	376	377	378	379	380	381	382	383	384	385	386	387	388	389	390	391	392	393	394	395	396	397	398	399	400	401	402	403	404	405	406	407	408	409	410	411	412	413	414	415	416	417	418	419	420	421	422	423	424	425	426	427	428	429	430	431	432	433	434	435	436	437	438	439	440	441	442	443	444	445	446	447	448	449	450	451	452	453	454	455	456	457	458	459	460	461	462	463	464	465	466	467	468	469	470	471	472	473	474	475	476	477	478	479	480	481	482	483	484	485	486	487	488	489	490	491	492	493	494	495	496	497	498	499	500	501	502	503	504	505	506	507	508	509	510	511	512	513	514	515	516	517	518	519	520	521	522	523	524	525	526	527	528	529	530	531	532	533	534	535	536	537	538	539	540	541	542	543	544	545	546	547	548	549	550	551	552	553	554	555	556	557	558	559	560	561	562	563	564	565	566	567	568	569	570	571	572	573	574	575	576	577	578	579	580	581	582	583	584	585	586	587	588	589	590	591	592	593	594	595	596	597	598	599	600	601	602	603	604	605	606	607	608	609	610	611	612	613	614	615	616	617	618	619	620	621	622	623	624	625	626	627	628	629	630	631	632	633	634	635	636	637	638	639	640	641	642	643	644	645	646	647	648	649	650	651	652	653	654	655	656	657	658	659	660	661	662	663	664	665	666	667	668	669	670	671	672	673	674	675	676	677	678	679	680	681	682	683	684	685	686	687	688	689	690	691	692	693	694	695	696	697	698	699	700	701	702	703	704	705	706	707	708	709	710	711	712	713	714	715	716	717	718	719	720	721	722	723	724	725	726	727	728	729	730	731	732	733	734	735	736	737	738	739	740	741	742	743	744	745	746	747	748	749	750	751	752	753	754	755	756	757	758	759	760	761	762	763	764	765	766	767	768	769	770	771	772	773	774	775	776	777	778	779	780	781	782	783	784	785	786	787	788	789	790	791	792	793	794	795	796	797	798	799	800	801	802	803	804	805	806	807	808	809	810	811	812	813	814	815	816	817	818	819	820	821	822	823	824	825	826	827	828	829	830	831	832	833	834	835	836	837	838	839	840	841	842	843	844	845	846	847	848	849	850	851	852	853	854	855	856	857	858	859	860	861	862	863	864	865	866	867	868	869	870	871	872	873	874	875	876	877	878	879	880	881	882	883	884	885	886	887	888	889	890	891	892	893	894	895	896	897	898	899	900	901	902	903	904	905	906	907	908	909	910	911	912	913	914	915	916	917	918	919	920	921	922	923	924	925	926	927	928	929	930	931	932	933	934	935	936	937	938	939	940	941	942	943	944	945	946	947	948	949	950	951	952	953	954	955	956	957	958	959	960	961	962	963	964	965	966	967	968	969	970	971	972	973	974	975	976	977	978	979	980	981	982	983	984	985	986	987	988	989	990	991	992	993	994	995	996	997	998	999	1000	1001	1002	1003	1004	1005	1006	1007	1008	1009	1010	1011	1012	1013	1014	1015	1016	1017	1018	1019	1020	1021	1022	1023	1024	1025	1026	1027	1028	1029	1030	1031	1032	1033	1034	1035	1036	1037	1038	1039	1040	1041	1042	1043	1044	1045	1046	1047	1048	1049	1050	1051	1052	1053	1054	1055	1056	1057	1058	1059	1060	1061	1062	1063	1064	1065	1066	1067	1068	1069	1070	1071	1072	1073	1074	1075	1076	1077	1078	1079	1080	1081	1082	1083	1084	1085	1086	1087	1088	1089	1090	1091	1092	1093	1094	1095	1096	1097	1098	1099	1100	1101	1102	1103	1104	1105	1106	1107	1108	1109	1110	1111	1112	1113	1114	1115	1116	1117	1118	1119	1120	1121	1122	1123	1124	1125	1126	1127	1128	1129	1130	1131	1132	1133	1134	1135	1136	1137	1138	1139	1140	1141	1142	1143	1144	1145	1146	1147	1148	1149	1150	1151	1152	1153	1154	1155	1156	1157	1158	1159	1160	1161	1162	1163	1164	1165	1166	1167	1168	1169	1170	1171	1172	1173	1174	1175	1176	1177	1178	1179	1180	1181	1182	1183	1184	1185	1186	1187	1188	1189	1190	1191	1192	1193	1194	1195	1196	1197	1198	1199	1200	1201	1202	1203	1204	1205	1206	1207	1208	1209	1210	1211	1212	1213	1214	1215	1216	1217	1218	1219	1220	1221	1222	1223	1224	1225	1226	1227	1228	1229	1230	1231	1232	1233	1234	1235	1236	1237	1238	1239	1240	1241	1242	1243	1244	1245	1246	1247	1248	1249	1250	1251	1252	1253	1254	1255	1256	1257	1258	1259	1260	1261	1262	1263	1264	1265	1266	1267	1268	1269	1270	1271	1272	1273	1274	1275	1276	1277	1278	1279	1280	1281	1282	1283	1284	1285	1286	1287	1288	1289	1290	1291	1292	1293	1294	1295	1296	1297	1298	1299	1300	1301	1302	1303	1304	1305	1306	1307	1308	1309	1310	1311	1312	1313	1314	1315	1316	1317	1318	1319	1320	1321	1322	1323	1324	1325	1326	1327	1328	1329	1330	1331	1332	1333	1334	1335	1336	1337	1338	1339	1340	1341	1342	1343	1344	1345	1346	1347	1348	1349	1350	1351	1352	1353	1354	1355	1356	1357	1358	1359	1360	1361	1362	1363	1364	1365	1366	1367	1368	1369	1370	1371	1372	1373	1374	1375	1376	1377	1378	1379	1380	1381	1382	1383	1384	1385	1386	1387	1388	1389	1390	1391	1392	1393	1394	1395	1396	1397	1398	1399	1400	1401	1402	1403	1404	1405	1406	1407	1408	1409	1410	1411	1412	1413	1414	1415	1416	1417	1418	1419	1420	1421	1422	1423	1424	1425	1426	1427	1428	1429	1430	1431	1432	1433	1434	1435	1436	1437	1438	1439	1440	1441	1442	1443	1444	1445	1446	1447	1448	1449	1450	1451	1452	1453	1454	1455	1456	1457	1458	1459	1460	1461	1462	1463	1464	1465	1466	1467	1468	1469	1470	1471	1472	1473	1474	1475	1476	1477

Tabela 8 - Medidas do halo de inibição do crescimento e do diâmetro da colônia bacteriocinogênica (em mm) crescida em meio 523.

Prod. Par.	Indicadoras																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
1				3,0			2,0	5,0	8,0		3,0	6,0									5,0*					2,0	3,0	3,0*			
C				6,0			6,0	5,0	5,0		6,0	7,0									4,0					6,0	5,0	7,0			
3				4,0*							1,0										1,0					2,0*	1,0	4,0*	6,0	1,0	1,0
5				6,0							4,0										5,0					5,0	4,0	5,0	4,0	5,0	
8																															
9				2,0							1,0																				
C				5,0							4,0																				
10																															
11				2,0																											
C				6,0																											
13																															
C																															
14																															
16				4,0																											
C				9,0																											
17																															
C																															
18																															
C																															
20																															
21				4,0																											
C				7,0																											
22				5,0*																											
C				5,0																											
23																															
C																															
24																															
H																															
C																															
30																															
C																															

Prod. = Produtoras; Par. = Parâmetros;
 a/H = halo de inibição do crescimento.
 C = diâmetro da colônia bacteriocinogênica.
 *halo de inibição opaco (turvo).

- Continua -

Tabela B - Continuação.

Prod. Par.	Indicadores																														
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
1	H																														
C																															
3		2,0	1,0			2,0	1,0																								
4		6,0	4,0			6,0	4,0																								
5																															
7																															
8																															
9																															
10																															
11																															
12																															
13																															
14																															
16																															
17																															
18																															
20																															
21																															
22																															
23																															
24																															
30																															
31																															

Tabela 8 - Continuação.

Prod. Par.	Indicadoras																					
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	
1	H																					
	C																					
3																						
4																						
5																						
7																						
8																						
9																						
10																						
11																						
12																						
13																						
14																						
16																						
17																						
18																						
20																						
21																						
22																						
23																						
24																						
30																						
31																						

Tabela 8 - Continuação.

Prod. Par.	Indicadoras																																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31					
32																									1,0 10,0											
33	4,0 9,0			9,0*		5,0 6,0	4,0 6,0	5,0 6,0	5,0* 6,0	1,0 10,0	5,0 6,0	1,0 5,0	3,0*	6,0	3,0*	3,0 6,0	3,0 6,0	8,0 7,0	3,0 6,0	4,0 6,0	4,0 6,0	4,0*	5,0 6,0	5,0 6,0	8,0 7,0	6,0 5,0	1,0 2,0	6,0 7,0	3,0*	7,0	3,0*	4,0 10,0				
38																									2,0* 5,0	2,0 7,0	5,0 5,0	5,0 5,0	2,0* 2,0*	2,0* 5,0	2,0* 6,0	2,0*				
39	5,0 6,0	5,0	8,0		8,0	6,0	6,0*		4,0 8,0	9,0 7,0	6,0										2,0*	5,0														
41										1,0 8,0	5,0																									
42																																				
43																																				
44	5,0* 5,0	2,0 5,0	5,0	4,0	7,0		2,0	5,0	4,0	1,0 5,0	5,0 7,0	4,0	3,0	5,0	4,0	7,0	3,0	6,0	2,0	8,0	9,0	4,0	7,0	5,0	8,0	5,0	9,0	6,0	4,0	6,0	6,0*	2,0	6,0			
45																																				
46																																				
47																																				
48	1,0 8,0	1,0 6,0	3,0 6,0	1,0 6,0	2,0 5,0	1,0 6,0	2,0 5,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0	1,0 6,0			
49	1,0 8,0	1,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0	2,0 6,0			
50																																				
51																																				
53	5,0 7,0																																			
54	4,0 7,0	2,0 7,0	3,0 7,0	5,0 7,0	3,0 7,0	7,0 7,0	7,0 7,0	7,0 7,0	7,0 7,0	2,0 7,0	3,0 9,0	1,0 9,0																								
55																																				
56	5,0* 7,0																																			
58	7,0* 10,0																																			
59																																				

- Continua -

Tabela 8 - Continuação.

		Índice de Dorcas																																
Prod. Par.		32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60				
32	H																																	
	C																																	
33					3,0		8,0					6,0	8,0																					
					7,0		5,0					5,0	6,0																					
35																																		
					3,0		5,0*																											
					6,0		6,0																											
38																																		
39					6,0	3,0	5,0	3,0	6,0	7,0	2,0																							
					7,0	9,0	5,0	9,0	9,0	5,0	5,0																							
40																																		
41																																		
42																																		
43																																		
44																																		
45																																		
46																																		
47																																		
48																																		
49																																		
50																																		
51																																		
52																																		
53																																		
54																																		
55																																		
58																																		
59																																		

- Continua -

Tabella B - Continuação.

Prod. Par.	Indicadores																						
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81		
32																		1,0	6,0		4,0*	5,0	
33	5,0	6,0	2,0	5,0		6,0			10,0	6,0	3,0	3,0		7,0	2,0	2,0	5,0	5,0	8,0	5,0	1,0	7,0	
35	7,0	6,0	7,0	10,0		6,0			6,0	7,0	6,0	7,0		8,0	8,0	9,0	5,0	5,0	5,0	5,0	7,0	7,0	
38	7,0					2,0										8,0						2,0	6,0
39	9,0					5,0				2,0				3,0*	7,0*	1,0*				6,0*			
41	6,0					4,0				5,0			2,0	6,0	7,0	7,0				7,0			
42							1,0				2,0*		1,0										
43							10,0				7,0		1,0										
44											2,0*		1,0										
45											7,0		3,0										
46											10,0		2,0										
47													7,0										
48													2,0										
49													7,0										
50													3,0										
51													6,0										
52													10,0										
53													3,0										
54													6,0										
55													2,0										
56													7,0										
58													3,0										
59													10,0										
													4,0*										
													5,0										

- Continua -

Tabela 8 - Continuação.

Prod. Par.	Indicadoras																														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
64	H									1,0									2,0		3,0		1,0*		2,0*		1,0*		2,0*		1,0*
	C									6,0									6,0		5,0		5,0		6,0		5,0		5,0		5,0
65				3,0*												1,0	1,0	1,0*					2,0*		4,0		1,0		1,0		1,0
				5,0												5,0	3,0	4,0					5,0		6,0		5,0		5,0		5,0
70								3,0*			3,0*				3,0*						3,0										
								6,0			4,0				7,0						5,0										
71		3,0	5,0			3,0														3,0*											
		9,0	6,0			8,0														6,0											
72		3,0				4,0																									
		9,0				6,0																									
73		6,0																													
		8,0																													
74						4,0																									
						5,0																									
75																															
77																															
79																															
80																															

- Continua -

Tabela 8 - Continuação.

Prod. Par.	Indicadoras																														
	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60		
64															2,0					1,0*				2,0*							
															5,0					6,0				5,0							
65															3,0	1,0	1,0	1,0	2,0		1,0*		1,0*		2,0	1,0*					
															6,0	6,0	5,0	6,0	4,0		4,0		4,0		6,0	5,0					
70													4,0																		
												4,0																			
71			4,0				7,0	1,0																							
			6,0				7,0	9,0																							
72										2,0																					
										7,0																					
73																				1,0											
																				8,0											
74											1,0			3,0									3,0*								
											7,0			5,0									5,0								
75											1,0			4,0	1,0								4,0*								
											5,0			5,0	6,0								6,0								
77											1,0			3,0																	
											7,0			5,0																	
79											2,0	2,0		2,0		2,0	2,0	1,0													
											6,0	6,0		5,0		4,0	5,0	4,0													
80																															

- Continua -

Tabela B - Continuação.

Prod. Par.	Indicadores																					
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80	81	
64																	3,0 6,0					
65																	6,0 6,0	3,0 6,0	1,0 5,0			
70									3,0 5,0		4,0 6,0	2,0 8,0		4,0 5,0								
71			4,0 10,0	5,0 9,0	4,0* 6,0			6,0* 7,0	3,0* 7,0			1,0 6,0						6,0 6,0				
72																5,0* 7,0		5,0 7,0				
73																	1,0 8,0					
75						6,0* 7,0																3,0 6,0
77									2,0* 7,0				6,0 5,0									

Tabela 9 - Produção de bacteriocinas em placas contendo diferentes quantidades de meio 523 e placas contendo meio 523 com diferentes concentrações de ágar (média de 50 repetições).

A m o s t r a s	Halo de inibição (em mm)			
	Concentração de ágar		Quantidade de meio	
	1,0%	1,5%	10 ml	20 ml
11	1,0*	2,0	1,8	1,9
30	0,9	1,7	1,7	1,6
49	0,8	1,5	1,4	1,6
58	0,7	1,3	1,4	1,1
65	1,4	2,2	2,0	1,7

*O diâmetro da colônia foi de 10,0 mm.

4.5. Produção de bacteriocinas com diferentes tempos de incubação

A Tabela 10 mostra as medidas do diâmetro da colônia e tamanho do halo de inibição após incubação das linhagens bacteriocinogênicas 11, 30, 49, 58 e 65 por 24, 48 e 72 horas em meio 523.

As linhagens que apresentaram halo turvo, foram reincubadas por mais 24 horas. Após esse período de tempo, continuaram a apresentar halo turvo.

Tabela 10 - Medidas do halo de inibição e diâmetro da colônia bacteriocinogênica (média de 100 repetições) após diferentes tempos de incubação.

Linhagens	Parâmetros*	Medidas (mm/tempo (h))		
		24	48	72
11	H	1,0	2,3	3,2
	C	4,6	7,0	7,5
30	H	1,0	2,4	5,0
	C	3,9	6,7	8,5
49	H	2,0	5,0	6,4
	C	4,3	6,1	8,2
58	H	1,2	1,8	2,6
	C	5,0	8,8	9,7
65	H	0,8	1,5	2,0
	C	3,7	4,2	6,3

*H : Halo de inibição do crescimento.

C : Diâmetro da colônia bacteriocinogênica.

4.6. Liberação de bacteriocina em meio de cultura líquido

A liberação de bacteriocinas em meio de cultura líquido foi ensaiada com as amostras bacteriocinogênicas 4, 11, 30, 44, 47, 48, 54, 58, 65 e 74. Como testadoras foram utilizadas amostras que se mostraram sensíveis às bacteriocinas produzidas por essas linhagens em meio de cultura sólido.

Obteve-se produção e liberação de bacteriocinas em meio

líquido apenas com a amostra 58. As lacunas formadas no local onde depositou-se o sobrenadante contendo bacteriocina apresentaram-se mais evidentes na técnica onde a bactéria sensível foi espalhada sobre o meio de cultura do que quando colocou-se a indicadora no meio semi-sólido.

O título obtido foi baixíssimo uma vez que apenas houve atividade até diluição 10^{-1} .

A produção não foi afetada pela presença de clorofórmio tendo em vista que os resultados permaneceram inalterados.

Sobrenadante contendo bacteriocina manteve sua atividade após a filtração. Crescimento da linhagem produtora nº 58 por 24 ou 48 horas em meio 523 líquido como também a aeração, não levaram ao aumento na liberação das moléculas.

4.7. Indução de bacteriocinas com luz ultravioleta curta (UVC)

As Tabelas 11 e 12 apresentam os valores dos halos de inibição do crescimento das linhagens 30, 49 e 58 submetidas ao tratamento com luz ultravioleta em meio líquido e sólido respectivamente.

A linhagem não bacteriocinogênica 76 submetida a esse tratamento não apresentou formação de halo de inibição do crescimento.

Morte das células produtoras logo após a exposição à luz ultravioleta não ocasiona indução, ou seja não há aumento no halo de inibição.

Tabela 11 - Produção de bacteriocinas após tratamento com luz ultravioleta curta em meio líquido. (Média de 50 repetições).

Tempo de irradiação (seg.)	Tamanho do halo de inibição (mm)		
	Linhagens*		
	30	49	58
0	0,7	2,0	0,6
10	0,6	2,7	1,5
20	0,2	3,0	1,0
30	0,4	3,2	1,6

*O diâmetro das colônias foi de 10,0 mm.

Tabela 12 - Produção de bacteriocinas após tratamento com luz ultravioleta curta em meio sólido. (Média de 50 repetições; inativação após 2 ou 24 horas).

Tempo de irradiação (seg.)	Tamanho do halo de inibição (mm)					
	Linhagens*					
	30		49		58	
	2 h	24 h	2 h	24 h	2 h	24 h
0	1,6	3,0	1,2	2,2	1,0	1,6
10	1,6	2,7	1,3	2,5	1,1	1,9
20	0,7	1,5	1,3	2,5	1,4	2,7
30	1,1	2,3	1,4	2,9	1,5	3,2

*O diâmetro das colônias foi de 10,0 mm.

4.8. Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas

A porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas em uma determinada cultura foi analisada com as linhagens 11, 30, 49, 58 e 65 em meio 523.

A Tabela 13 apresenta o número de colônias analisadas e a porcentagem de produtoras (Bac^+).

Tabela 13 - Porcentagem de colônias produtoras de bacteriocinas.

Linhagens	Número de colônias analisadas	Porcentagem de colônias produtoras
11	328	100,0
30	297	100,0
49	313	100,0
58	302	100,0
65	289	100,0

4.9. Ensaio da atividade fágica

Efetuuou-se este ensaio com o intuito de observar, se os halos de inibição eram devidos à presença de moléculas de bacteriocinas ou de partículas fágicas.

As linhagens utilizadas na técnica de produção em meio sólido foram 11, 30, 49, 58 e 65 e na técnica de liberação em líquido, apenas a linhagem 58 uma vez que não se obteve produção de bacteriocina em meio líquido com as demais linhagens.

Bacteriocinas provenientes do meio sólido não mostraram atividade quando colocadas em contato com linhagens sensíveis. As bacteriocinas liberadas em meio líquido formaram lacunas de inibição até diluição 10^{-1} , enquanto que em soluções mais diluídas não ocorreu a inibição de crescimento típica de partículas fágicas.

4.10. Eliminação do caráter bacteriocinogênico

A possibilidade de se eliminar o caráter *Bac* foi examinada através do tratamento de linhagens bacteriocinogênicas (11, 30, 49, 58) com brometo de etídio e temperatura elevada. Obteve-se resultado positivo através do tratamento com B.E. (Tabela 14) porém tratamento com temperatura elevada não ocasionou eliminação do fator bacteriocinogênico em 504 colônias analisadas.

Tabela 14 - Percentagem de eliminação do fator *Bac* através do tratamento com brometo de etídio.

Amostras	Brometo de etídio ($\mu\text{g/ml}$)	Número de colônias analisadas	Porcentagem de eliminação
11	0	416	0,00
	100	439	12,85
	500	397	37,86
30	0	435	0,00
	100	451	0,03
	500	448	1,12
49	0	394	0,00
	100	378	0,94
	500	402	4,34
58	0	457	0,00
	100	466	2,13
	500	415	43,73

4.11. Tratamento com 8-metoxipsoraleina e luz ultravioleta longa (8 MOP-UVL)

As Tabelas 15 e 16 apresentam o tamanho do halo de inibição produzidos pelas linhagens após tratamento com 8 MOP-UVL em meio líquido e sólido respectivamente.

Tabela 15 - Produção de bacteriocinas após tratamento com 8 MOP-UVL em meio líquido (média de 50 repetições).

Tratamentos (segundos)	Tamanho do halo de inibição (mm)		
	Linhagens*		
	30	49	58
Controle	1,4	1,6	1,5
8 MOP	1,2	1,5	1,3
UVL 30	1,0	1,1	1,2
UVL 60	0,6	1,4	0,7
UVL 90	1,0	1,1	1,1
UVL 120	0,5	1,3	1,1
8 MOP-UVL 30	1,2	1,5	0,5
8 MOP-UVL 60	0,5	1,2	0,4
8 MOP-UVL 90	1,0	0,9	0,6
8 MOP-UVL 120	0,5	1,0	0,9

*Diâmetro da colônia foi 10,0 mm.

Tabela 16 - Produção de bacteriocinas após tratamento com 8 MOP-UVL em meio sólido. (Média de 50 repetições).

Tratamentos (segundos)	Tamanho do halo de inibição (mm)		
	Linhagens*		
	30	49	58
Controle	1,8	1,6	1,5
8 MOP	1,7	1,4	1,2
UVL 30	1,7	1,1	1,3
UVL 60	1,0	0,9	1,0
UVL 90	1,0	1,0	1,0
UVL 120	1,0	1,1	1,2
8 MOP-UVL 30	0,5	1,5	0,7
8 MOP-UVL 60	0,5	1,3	1,0
8 MOP-UVL 90	0,3	0,9	0,2
8 MOP-UVL 120	1,0	1,4	0,9

*Diâmetro da colônia foi de 10,0 mm.

5. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Através da representação gráfica do nível de resistência (Figuras 1 - 12), pode-se observar que a distribuição das amostras foi bastante variável atingindo níveis em baixas, médias ou altas concentrações de acordo com a droga utilizada.

A análise dos gráficos levando-se em consideração as 81 amostras como um todo, revelaram que as mesmas apresentaram-se em sua maioria sensíveis ao efeito inibitório do ácido nalidíxico, bicloreto de mercúrio, canamicina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina (Figuras 1, 3, 9, 10, 11 e 12), se considerarmos como sensibilidade as doses de zero a 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da droga. Os níveis de resistência das 81 amostras frente à ampicilina, cloranfenicol e hetacilina (Figuras 2, 5 e 7) foram esparsos, ou seja, houve amostras enquadradas em quase todas as concentrações da droga, encontrando-se maior proporção nas doses medianas ou menores. Não se observou separação nítida entre sensíveis e resistentes. Finalmente, com relação à cefalotina, eritromicina e penicilina (Figuras

4, 6 e 8) também observou-se distribuição esparsa nas concentrações baixas e médias da droga e acúmulo de amostras (28, 45 e 24 respectivamente no nível de 1000 $\mu\text{g/ml}$ do agente antimicrobiano. Essa comparação entretanto só é válida para casos onde para todos os gêneros estudados os sistemas de resistência sejam semelhantes. Devido a isso, muito mais importante é a comparação dentro dos gêneros.

Analisando-se os níveis de resistência das amostras agrupadas dentro de seus respectivos gêneros observa-se que para algumas drogas a distribuição é unimodal, para outras, bimodal e, finalmente para outras não houve possibilidade de nítida separação. Separação pouco nítida, aliás como esperado, ocorreu para a ampicilina, cefalotina, eritromicina, hetacilina e penicilina que são antibióticos tipicamente usados para bactérias Gram positivas. Como todas as bactérias fitopatogênicas aqui utilizadas são Gram negativas, era de se esperar a alta resistência encontrada. Assim, esses agentes antimicrobianos não foram levados em consideração na elaboração dos modelos de resistência. (Tabela 4).

Com relação ao gênero *Erwinia* nota-se que as 31 amostras foram sensíveis ao ácido nalidíxico (Figura 1) distribuindo-se entre zero e 20 $\mu\text{g/ml}$ da droga, sugerindo uma curva do tipo unimodal. Frente ao cloranfenicol (Figura 5) as amostras apresentaram variação sendo porém a maioria sensíveis ou com resistência intermediária. Se considerarmos como sensibilidade o crescimento das amostras entre zero e 20 $\mu\text{g/ml}$ da droga teremos uma curva tipo bimodal. Finalmente para o bicloreto de mercúrio, canamicina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina (Figura

ras 3, 9, 10, 11 e 12) os isolados mostraram a presença de curva do tipo bimodal, com amostras sensíveis e resistentes, sendo porém a maioria encaixada na região de zero a 5 $\mu\text{g/ml}$ das drogas. Tal distribuição sugere grande sensibilidade das amostras a esses agentes antimicrobianos.

Os isolados do gênero *Pseudomonas* apresentaram-se em sua maioria sensíveis ao ácido nalidíxico, canamicina, estreptomicina e tetraciclina (Figuras 1, 9, 10 e 12) uma vez que cresceram apenas na faixa de zero a 50 $\mu\text{g/ml}$ das drogas. Ocorreram entretanto isolados resistentes a esses antimicrobianos sugerindo bimodalidade das curvas. Com relação ao cloranfenicol (Figura 5) as amostras em sua maioria localizaram-se nas concentrações intermediária dessa droga, ficando difícil uma distinção entre sensíveis e resistentes. Finalmente, para o bicloreto de mercúrio e a gentamicina (Figuras 3 e 11), ao que parece só ocorreram linhagens sensíveis.

Relativo à *Xanthomonas* observou-se que os 20 isolados apresentaram-se sensíveis ao ácido nalidíxico, bicloreto de mercúrio, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina, gentamicina e tetraciclina (Figuras 1, 3, 5, 9, 10, 11 e 12), uma vez que seu crescimento ocorreu apenas na faixa de zero a 20 $\mu\text{g/ml}$ das drogas. O máximo de sensibilidade ocorreu frente ao Hg, Sm, Ge e Km onde o crescimento de 14, 15, 19 e 20 amostras respectivamente ocorreu em dose menor que 1,0 $\mu\text{g/ml}$ desses agentes antimicrobianos.

Com base nos resultados obtidos poderíamos sugerir que as drogas efetivas contra *Xanthomonas* seriam o Hg, Km, Sm, Ge e Tc; contra *Pseudomonas* a Km e para o gênero *Erwinia* a Km e Ge. Deve-se salientar po-

rêm, que no caso dos gêneros *Pseudomonas* e *Erwinia* houve o crescimento de uma ou duas amostras na concentração de 100 µg/ml o que exigiria doses mais elevadas no combate a essas amostras fitopatogênicas.

Dados sobre ensaio de resistência ou sensibilidade a drogas em bactérias fitopatogênicas realizado no presente trabalho e por outros autores nos permitem levantar hipóteses sobre o desenvolvimento de resistência ou a manutenção da sensibilidade com o decorrer dos anos. Com relação ao Hg, Cm, Km, Sm e Tc parece ter havido uma estabilidade uma vez que ARK (1947), ARK e STANLEY (1956), THIRUMALACHAR (1956), ECHEGARAY (1958), POPOV (1958), QUADLING (1960), AZEVEDO (1961), KLISIEWICZ e POUND (1961), SHAFFER (1962), DEKKER (1963), DESAL *et alii* (1967), LEMOS (1969), NAMASIVA e HEDGES (1971), IIDA (1975), SAKURAI *et alii* (1976), MISATO *et alii* (1977), SANTOS (1979) e BECKER (1980) também observaram sensibilidade dos isolados a essas drogas. Para Penicilina porém, há discrepância entre os dados uma vez que, BROWN e BOYLE (1946) e GILLIVER (1946) detectaram sensibilidade nas amostras enquanto que THIRUMALACHAR *et alii* (1956), AZEVEDO (1961), SANTOS (1979) e no presente trabalho detectou-se resistência na maioria das amostras. Tais resultados sugerem que, com o passar do tempo a aquisição da resistência à Pn está se processando.

Numa tentativa de associar-se resistência ou sensibilidade à bacteriocinas analisou-se cada amostra em particular, porém, nenhuma correlação positiva foi encontrada. Tais observações apenas mostraram que as classes de maior frequência foram as sensíveis à drogas e resistentes a duas drogas simultaneamente tanto em linhagens Bac^+ como Bac^- .

Relação entre planta de origem e local de coleta com resistência a drogas foi nulo, ou seja, ocorreram resistências altas e baixas independentes da planta hospedeira ou cidade onde os vegetais foram coletados indicando talvez uma certa uniformidade nos moldes de controle de bactérias fitopatogênicas.

A composição do meio de cultura afetou sensivelmente a produção e/ou liberação das moléculas de bacteriocinas, uma vez que obtivemos 70,37%, 22,22% e 18,51% de linhagens produtoras nos meios 523, TYA e NA respectivamente (Tabela 5). O espectro de ação também foi bastante variado nos diferentes meios (Tabela 6). Na maioria dos casos apenas as boas produtoras produziram bacteriocinas também em TYA e NA. GROSS e VIDAVER (1978) observaram resultados semelhantes com *R. japonicum*.

Analisando-se a composição dos 3 meios de cultura utilizados, observamos que o meio 523 é mais complexo, isto é, mais rico em nutrientes que os meios TYA e NA e, nessa complexidade talvez existam substâncias estimulatórias da produção de bacteriocinas.

Comparativamente a outros trabalhos poderíamos sugerir que a caseína ácida (complexo de aminoácidos), presente no meio 523 seria a substância responsável por esse estímulo de produção uma vez que resultados semelhantes foram obtidos com colicinas (HAMON, 1955), pesticinas (HERTMAN e BEN-GURION, 1958), estafilococcina (LACHOWICZ e BRODZICKI, 1973), buriticina (CLARKE *et alii*, 1975) e com bacteriocinas de diversas espécies de *Corinebacterium* fitopatogênica (MEITERT, 1969), ou seja, os au

tores também obtiveram maior produção quando o meio continha ou, era adicionado a ele caseína ácida hidrolisada ou complexo de aminoácidos.

A adição de extrato de levedura ao meio de cultura aumentou a produção de bacteriocina em *S. mutans* (ROGERS, 1972), *R. trifolii* (SCHWINGHAMER, 1975). Com relação ao meio 523 poderia-se também, sugerir um efeito estimulatório do extrato de levedura porém, quanto ao meio TYA, caso essa substância seja estimulatória o foi em pequena proporção. Baseado nesses resultados, seria necessária a adição de extrato de levedura em diferentes concentrações nesses meios de cultura (523 e TYA) ou em meios que não o contenha (NA por exemplo) para obter-se uma conclusão satisfatória quanto ao tipo de efeito dessa droga. GROSS e VIDAVER (1979) analisando a produção de bacteriocina em espécies fitopatogênicas de *Corynebacterium* obtiveram melhor produção em meio NBY (Nutrient broth mais extrato de levedura) do que no meio 523. Diante de tais dados pode-se questionar com maior segurança a importância do extrato de levedura uma vez que a adição dessa droga ao NA sobrepujou a produção em 523 enquanto que para nós a produção foi baixíssima em NA simplesmente.

A presença de peptona no meio NA talvez tenha exercido um efeito inibitório na produção de bacteriocinas uma vez que esse fato também foi observado em *S. paratyphi* (HAMON, 1955), *Agrobacterium* (Mc CARDELL e POOTJES, 1976) e em espécies fitopatogênicas de *Corynebacterium* (GROSS e VIDAVER, 1979) porém, tal hipótese defronta com resultados antagonísticos em algumas outras espécies de *Corynebacterium* (GROSS e VIDAVER, 1979), onde adição de peptona em meio de cultura rico não definido aumentou a

produção de bacteriocina.

O cultivo de linhagem indicadora em NL, TY ou meio 523 líquido ou semi-sólido não mostrou diferença na sensibilidade das mesmas. Esses resultados são distintos dos de ROGERS (1974) que obteve diferenças na sensibilidade de *S. mutans* e *S. salivarius* quando sacarose fazia parte da composição do meio de cultura.

Baseado no fato do meio 523 ser o mais favorável para o estudo das propriedades bacteriocinogênicas, análises posteriores foram efetuadas com dados obtidos nesse meio (Tabelas 5 e 7).

A percentagem de produção de bacteriocinas por todas as 81 amostras foi bastante elevada (70,37%). Se analisarmos a percentagem de amostras bacteriocinogênicas dentro de cada gênero observamos 70,96% (22 em 31 amostras), 82,75% (24 em 29 amostras) e 55,00% (11 em 20 amostras) de linhagens *Bac*⁺ em *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas* respectivamente.

Comparando-se os dados obtidos com outros autores nota-se similaridade e discrepância com relação ao número de isolados bacteriocinogênicos. Para o gênero *Erwinia*, HAMON e PERON (1961b) obtiveram 77,5% e STANGHELLINI *et alii* (1977), 83,3%, ou seja, resultados também bastante elevados. Com relação ao gênero *Pseudomonas*, HAMON *et alii* (1961) analisando diferentes espécies obtiveram 95,0% e 44,0% para *P. pyocyanea* e *P. fluorescens* respectivamente, VIDAVER *et alii* (1972) observaram 100,0%, 55,0% e 8,0% para *P. syringae*, *P. glyciniae* e *P. phaseolicola* respectiva-

mente e BECKER (1980) observou 38,4% de produtoras em *P. glycínea*. Para o gênero *Xanthomonas*, SANTOS (1979) obteve 47,0% trabalhando com *X. campestris*.

Para justificar os casos onde houve grande discrepância na quantidade de isolados bacteriocinogênicos poderia-se sugerir a utilização de metodologia semelhante e mesmas indicadoras para ter-se base concreta de comparação.

Se analisar-se agora, em termos de espéctro de ação observa-se que este foi bastante amplo, não se restringindo apenas ao gênero em questão e sim abrangendo gêneros diferentes, ou seja, por exemplo, bacteriocinas de *Erwinia* inibiram o crescimento de amostras de *Pseudomonas*, *Xanthomonas* e *Agrobacterium* e assim por diante (Tabela 7). Essa ampla atividade foi observada por muitos autores conforme descrito na revisão da literatura (ítem 2.).

As linhagens 33, 44, 48 e 54 foram as que produziram bacteriocinas contra maior número de amostras. As linhagens 49, 66 e 78 apresentaram maior sensibilidade às bacteriocinas produzidas por outras amostras e portanto são as mais convenientes como indicadoras da produção de bacteriocinas por novas linhagens a serem isoladas e analisadas.

Dentre 81 amostras apenas 24 (29,62%) não produziram bacteriocinas contra qualquer das linhagens usadas como indicadoras. A possibilidade de tais linhagens não portarem o caráter bacteriocinogênico é bastante alta uma vez que grande número de amostras foram analisadas. Não

se pode porém descartar a hipótese de tais amostras serem Bac^+ e simplesmente não ser detectada a produção de suas bacteriocinas por falta de linhagem indicadora ideal.

Com relação ao tamanho do halo de inibição do crescimento várias hipóteses são levantadas. Comparando-se as diferentes linhagens entre si, observa-se que não existe uma relação direta entre o diâmetro da colônia produtora e o tamanho do halo de inibição, uma vez que se obteve halos de diferentes tamanhos independentemente da colônia apresentar-se com maior ou menor diâmetro (Tabela 8). Para tentar explicar tais diferenças podem ser formuladas 3 hipóteses baseadas na própria linhagem produtora, e uma com base nas amostras sensíveis. Dessa forma se sugere que a formação de diferentes tamanhos de halo dependeriam dos genes que codificam para produção de bacteriocinas apresentarem-se derreprimidos em diferentes intensidades, ou o número de células Bac^+ ser variável ou as bacteriocinas difundem-se em velocidades diferentes de uma cultura para outra. ATKINSON (1967) sugere que os grandes halos de inibição produzidos por salmonellina são devido à rápida difusão no ágar e BEN-GURION e HERTMAN (1958) atribuem alto peso molecular a pesticina devido sua fraca difusão em ágar. HIRSCH (1979) observou que os isolados produtores de bacteriocinas pequenas dão zona de inibição de 10 a 25 mm enquanto que os produtores de bacteriocinas médias formam zonas menores de 2 a 10 mm. As duas primeiras hipóteses explicariam a variação no tamanho do halo independentemente do tamanho da colônia produtora e justificariam as diferenças de tamanho do halo em diferentes culturas da mesma pro-

dutora. A terceira hipótese, no entanto, não parece muito correta uma vez que cada molécula de bacteriocina possui uma difusibilidade constante baseada em seu PM e dessa forma não ocasionaria diferenças em tamanhos de halo dentro da mesma linhagem a não ser que ocorra concomitantemente uma maior derrepressão de genes ou maior número de célula Bac^+ e consequentemente liberação de maior quantidade de moléculas acarretando maior halo de inibição. Parecem porém mais plausíveis as duas primeiras hipóteses.

A opção pelas hipóteses de derrepressão e número de fatores Bac^+ prendeu-se ao fato de se obter aumento do tamanho do halo de inibição com o aumento do tempo de incubação da produtora (Tabela 10). Dessa forma a medida que se aumenta o tempo de incubação maior número de bactérias se dividem aumentando consequentemente o número de células portadoras do fator Bac e paralelamente aumento de alguma substância que estimula os genes produtores de bacteriocina. Não se pode basear-se apenas no acréscimo do fator Bac uma vez que não observou-se proporcionalidade entre aumento da colônia e aumento do halo sugerindo então, a presença de alguma substância que no caso seria responsável pela ativação de genes produtores de bacteriocinas. VIDAVER *et alii* (1972) trabalhando com *Pseudomonas* fitopatogênicas igualmente obtiveram maior halo de inibição após 72 horas de incubação da linhagem produtora.

A quarta hipótese, relaciona-se à linhagem indicadora. Nessa hipótese sugere-se que o tamanho do halo varia de acordo com a linhagem testadora, ou seja, essa linhagem produziria alguma substância que a-

fetaria a ligação bacteriocina-receptor estimulando-a ou reprimindo-a. Variação no tamanho do halo dependendo da indicadora utilizada também foi observada por VIDAVER *et alii* (1972).

O aspecto do halo de inibição (transparência ou opacidade) não parece estar relacionado com a linhagem produtora uma vez que se obtém tanto halos transparentes como turvos dentro da mesma amostra. Diante de tais observações sugere-se que tal aspecto deve-se à linhagem testadora. ECHANDI (1976) também observou zonas claras e turvas em *C. michiganense* de acordo com a linhagem indicadora utilizada.

Para explicar a diferença na aparência do halo de inibição relacionado a linhagem indicadora poderiam ser aventadas duas hipóteses. A primeira relacionada aos tipos de receptores e a segunda com a quantidade de moléculas necessárias para desencadear o processo letal. Supondo-se que as linhagens produtoras que originam ambos os tipos de halo de inibição produzem dois tipos de bacteriocinas sugere-se que, as linhagens testadoras que possuem receptores para apenas um dos tipos de molécula, levariam à formação de halos de inibição turvos enquanto que as linhagens indicadoras que possuíssem células com receptores para um tipo e células com receptores para o outro tipo de molécula ocasionariam a formação de halos de inibição transparentes uma vez que ocorreria morte de maior número de células. A mesma bactéria produzindo mais de um tipo de bacteriocina já foi observado por exemplo com colicina (BRADLEY, 1967), aeruginocina (HOLLOWAY *et alii*, 1979) e outras bacteriocinas.

Pensando-se agora em termos de quantidade de moléculas para desencadear o processo letal poderia-se sugerir que as linhagens que adsorvessem maior número de moléculas conseqüentemente produziram halos claros e linhagens que adsorvessem menor quantidade de moléculas (devido menor número de receptores ou porque seus receptores tem capacidade de baixa adsorção) ocasionariam a formação de halos turvos. Seria portanto um evento particular entre cada produtora e cada testadora.

Os halos de inibição do crescimento apresentaram-se evidentes tanto quando utilizamos placas contendo 10 ml como com 20 ml de meio 523 (Tabela 9). No entanto, para VIDAVER *et alii* (1972) a quantidade ideal na técnica de camada dupla é de 25 ml onde quantidades inferiores decresceram a visibilidade da zona e quantidades superiores obscureceram ou não afetaram o tamanho e aparência das zonas de inibição produzidas por espécies de *Pseudomonas*.

Com relação à concentração de ágar, obteve-se maior produção ou seja, halos maiores e mais evidentes quando utilizou-se meio contendo 1,5% de ágar (Tabela 9). KELSTRUP e GIBBONS (1969) também obtiveram maior produção de estreptococcina quando aumentaram a viscosidade do meio e GROSS e VIDAVER (1978) só obtiveram produção de bacteriocinas por *R. japonicum* com concentrações igual ou superior a 0,6% de ágar. Em concentração igual ou menor que 0,3% não detectaram produção. A produção de estafilococcina foi vinte vezes maior em semi-sólido do que em meio líquido (JETTEN *et alii*, 1972).

A liberação de bacteriocina em meio de cultura 523 líquido foi positiva apenas para uma linhagem (nº 58) entre 10 amostras analisadas e, essa liberação foi bastante baixa uma vez que só detectou-se atividade até diluição 1:10 (Ítem 4.6.). Obtenção de baixo título de bacteriocinas também foi observada por BEN-GURION e HERTMAN (1958) analisando pesticina e por ECHANDI (1976) e GROSS e VIDAVER (1979) trabalhando com espécies fitopatogênicas de *Corinebacterium*.

Aumento no tempo de incubação ou incubação com aeração não levou a melhores resultados, ou seja, mesmo sob essas condições favoráveis não houve liberação pelas demais linhagens e não aumentou o título da linhagem 58. SCHWINGHAMER (1975) observou em *R. trifolii* que tempo prolongado de incubação em caldo não aumenta o nível de bacteriocina e inclusive é prejudicial devido ao acúmulo de muitos polissacarídeos. Contrariamente JETTEN *et alii* (1972) obtiveram aumento de estafilococcina sob aeração.

A não produção e/ou liberação em meio de cultura líquido também ocorreu com colicina K (MATSUSHITA *et alii*, 1960), estafilococcina (LACHOWICZ, 1965; JONES e EDWARDS, 1966; GAGLIANO e HINS DILL, 1970; JETTEN *et alii*, 1972), estreptococcina (BOTTONI *et alii*, 1971), megacina A (HOLLAND e ROBERTS, 1964), salmonellina (ATKINSON, 1967) e bacteriocinas de *Pseudomonas* (VIDAVER *et alii*, 1972), *R. leguminosarum* (HIRSH, 1979) e *R. japonicum* (GROSS e VIDAVER, 1978).

Comparando-se os resultados obtidos por nós em meio sólido e líquido e os resultados desses autores poderia-se sugerir uma importân

cia fundamental do ágar. Talvez o ágar da mesma forma que outras substâncias químicas tenha um efeito indutor na derrepressão dos genes responsáveis pela produção de bacteriocinas ou na replicação do fator *Bac* ocasionando como consequência maior número de células bacteriocinogênicas.

Na análise de produção em meio líquido foram utilizadas duas técnicas de semeadura da linhagem indicadora e obteve-se melhores resultados quando a mesma foi semeada diretamente sobre o meio 523 sólido do que quando incorporada em meio semi-sólido. A melhor visualização obtida na primeira técnica talvez prenda-se ao fato das células formarem uma camada monocelular e portanto totalmente atingíveis pelas moléculas de bacteriocina enquanto que quando adicionada ao semi-sólido, as células mais internas escapam da ação letal das moléculas de bacteriocina que foram depositadas na superfície do meio.

A atividade das moléculas de bacteriocinas produzidas pela amostra 58 não se alterou após filtração. Resultados semelhantes foram obtidos com *Chondrococcus columnaris* (ANACKER e ORDAL, 1959), com *Eggerthella convexa* (BEERENS e BARON, 1965) e com *R. trifolii* (SCHWINGHAMER, 1975). No entanto perda de atividade por filtração foi observado em *S. aureus* (BARROW, 1963) e *Clostridium* (CLARKE *et alii*, 1975). Tais resultados sugerem diferentes tamanhos de moléculas de bacteriocinas produzidas por diferentes linhagens, fato aliás bastante citado na literatura.

Tratamento da suspensão de bacteriocinas da linhagem 58 com clorofórmio não acarretou perda da atividade, concluindo-se portanto que a bacteriocina é resistente a essa droga. RYAN *et alii* (1955) e BEERENS

e BARON (1965) também observaram que colicina e convexina respectivamente são resistentes ao clorofórmio. Padrões variados de resistência ou sensibilidade ao clorofórmio foi observado até mesmo dentro da mesma espécie por BROCK *et alii* (1963) analisando estreptococcinas.

Pela análise dos resultados obtido nas Tabelas 11 e 12, pode-se observar que as linhagens bacteriocinogênicas respondem diferentemente com relação à indução da produção de bacteriocinas por luz UVC uma vez que as amostras 49 e 58 aumentaram a liberação de moléculas de bacteriocinas enquanto que a linhagem 30 apresentou resultado totalmente inverso, ou seja, houve diminuição na liberação de bacteriocinas após o tratamento.

Apesar de muitas outras bacteriocinas também serem induzíveis, há casos de não indução com clostocinas B e C (HONGO *et alii*, 1968); colicinas I e E₂ (OZEKI *et alii*, 1959) e megacina B (HOLLAND e ROBERTS, 1964) e casos extremos, semelhantes ao nosso onde a produção de estafilococcina (DAJANI *et alii*, 1970a) e perfringocina (HONGO *et alii*, 1968; MAHONY e BUTLER, 1971; CLARKE *et alii*, 1975) foi diminuída após irradiação com luz ultravioleta.

A indução força as bactérias a exprimir a potencialidade que uma minoria manifesta nas culturas normais (KAYSER, 1969), ou seja, o gene estrutural para síntese de colicina é desreprimido e portanto maior quantidade de bacteriocina é liberada (AMATI, 1964). A síntese de colicina é desreprimida como resultado da rápida replicação do plasmídeo

(HAMON, 1959; AMATI, 1964; De WITT e HELINSKI, 1965; REEVES, 1972).

Todas essas afirmações justificam o aumento observado pelas linhagens 49 e 58 após indução, no entanto a linhagem 30 respondeu inversamente ao tratamento com luz ultravioleta o que nos leva a sugerir que para tal linhagem talvez haja necessidade de diferentes doses de irradiação, ou, algum mecanismo interno não conhecido está reprimindo o efeito indutor da ultra violeta tanto em relação à replicação do plasmídeo como na derrepressão dos genes estruturais para produção de bacteriocina.

Poderia-se também aventar a hipótese de uma "cura" através da luz ultravioleta curta uma vez que MAY *et alii* (1964) obtiveram eliminação de resistência a tetraciclina em *S. aureus* através de tratamento com UV.

A linhagem não bacteriocinogênica 76 mesmo após tratamento com luz ultravioleta não produziu bacteriocina. Resultados semelhantes foram obtidos por BEN-GURION e HERTMAN (1958) e HONGO *et alii*(1968). Uma vez que aumento de produção deve-se à maior replicação do fator bacteriocinogênico ou depressão de genes nele contido, é totalmente compreensível que células não bacteriocinogênicas, também não produzam bacteriocina após indução uma vez que possivelmente não possuam o fator *Bac*. Tal hipótese necessita de técnica mais apropriada para confirmação de se tratar de linhagem *Bac*.

Com relação ao tempo de irradiação, obteve-se melhores resultados com 30 segundos de irradiação tanto em meio líquido como em sólido.

do. Na maioria dos resultados houve aumento na liberação conforme aumentou-se o tempo de irradiação. HONGO *et alii* (1968) também obtiveram maior indução entre 10 e 40 segundos de irradiação enquanto que em doses altas (160 segundos) diminuiu a produção.

Exposição ao clorofórmio das linhagens induzidas em placas logo após a irradiação não ocasionou aumento na liberação de bacteriocinas. BEN-GURION e HERTMAN (1958) obtiveram resultados semelhantes. Tais resultados são condizentes com a cinética de indução uma vez que o aumento na síntese de DNA começa 15 minutos após a irradiação e atinge o máximo depois de 60 a 120 minutos (JACOB, 1954; BEN-GURION e HERTMAN, 1958).

A partir de colônias provenientes de uma só célula (semeadura) estimou-se a porcentagem de células portadoras do fator bacteriocinogênico (Tabela 13). As amostras apresentaram 100% de produtividade sugerindo grande estabilidade do fator bacteriocinogênico durante as divisões celulares. OZEKI *et alii* (1959) no entanto trabalhando com células isoladas observaram que apenas uma fração da população bacteriana produz bacteriocina.

Devido ao fato de se encontrar na literatura referências quanto a existência de dois tipos de bacteriocinas, ou seja, moléculas pequenas e partículas grandes semelhantes a fagos, efetuou-se o teste para observação da ocorrência de atividade inibitória inerente a fagos nas li-

nhagens bacteriocinogênicas 11, 30, 49, 58 e 65. Pelos resultados obtidos (Ítem 4.9.) sugere-se não se tratar de partículas fágicas uma vez que moléculas de bacteriocinas tomadas da região do halo de inibição não mostraram atividade, e bacteriocinas obtidas em cultura líquida ocasionaram formação de zonas de inibição mais claras conforme diluiu-se a solução.

A diferenciação entre molécula de bacteriocina e partícula fágica é possível uma vez que a primeira não carrega os determinantes genéticos para sua auto-reprodução em organismos susceptíveis e, consequentemente não possui capacidade de formar placas de lise quando em contato com linhagem testadora. Assim, apenas bacteriófagos podem se propagar (transmissão em série) na cultura da linhagem indicadora e formar placas de lise em diversas diluições.

Análises semelhantes para confirmação da natureza bacteriocinogênica e não lisogênica foram também realizadas com colicinas (GRATTIA, 1925; 1932; FREDERICQ, 1953; JACOB *et alii*, 1952;1953b; HAMON, 1955; RYAN *et alii*, 1955; OZEKI *et alii*, 1959; BEPPU e ARIMA, 1967), convexina (BEERENS e BARON, 1965), estreptococcina (KRAMER e BRANDIS, 1975b), pesticina (BEN-GURION e HERTMAN, 1958), piocina (JACOB, 1954), bacteriocinas de *C. michiganense* (ECHANDI, 1976), de *Pseudomonas* (HAMON *et alii*, 1961; VIDAVER *et alii*, 1972) e de *Rhizobium* (HIRSCH, 1979; ZELAZNA-KOWALSKA, 1979).

Apesar da técnica de observação de não transmissão em série dar-nos boa margem de segurança, o ideal seria a realização de microscopia eletrônica para tal confirmação.

Através de estocagem prolongada o plasmídeo bacteriocinogênico pode ser perdido. Tal fato porém não ocorreu com nossas culturas mantidas por 3 anos em meio de LIGNIÈRES. WAHBA (1963), GILLIES e GOVAN (1966) e VIDAVER *et alii* (1972) também notaram estabilidade na produção de bacteriocinas em isolados de *Pseudomonas* fitopatogênicas após estocagem prolongada. Igualmente ECHANDI (1976) obteve o mesmo padrão de bacteriocinas em *C. michiganense*.

Repiques sucessivos pode levar à perda espontânea do fator bacteriocinogênico e, de fato entre 10 amostras, uma perdeu a propriedade bacteriocinogênica após repicagens mensais por 3 anos.

A perda induzida do fator Bac foi analisada utilizando-se brometo de etídio e temperatura elevada, já sabidamente, agentes de "cura".

Através do tratamento com B.E. obtivemos eliminação do fator bacteriocinogênico nas linhagens 11, 30, 49 e 58. A porcentagem de perda do fator Bac foi diferente para as diferentes amostras (Tabela 14), porém houve uma constância com relação a dose, isto é, maior "cura" com maior concentração da droga.

Perda do fator bacteriocinogênico utilizando-se B.E. foi também conseguida por WARREN *et alii* (1974) em *S. aureus*.

O mecanismo de ação do brometo de etídio relaciona-se com a síntese de ácidos nuclêicos, intercalando-se entre pares de bases do

DNA. O complexo entre B.E. e ácidos nucléicos foi descrito por LEPECQ e PAOLETTI (1967) e, de acordo com WARING (1966) o B.E. liga-se ao DNA e RNA e inibe a DNA polimerase e RNA polimerase.

O motivo de se detectar efeito apenas no DNA plasmidial e não no cromossômico talvez ocorra por trabalhar-se com marcas seletivas plasmidiais e na realidade também está ocorrendo intercalação nas bases do DNA cromonemal.

A diferença de sensibilidade das linhagens ao brometo de etídio deve-se a diferenças na sensibilidade das enzimas DNA e RNA polimerase nas diferentes linhagens (BOUANCHAUD *et alii*, 1969).

Tratamento das linhagens com temperatura elevada não acarretou a perda do plasmídeo bacteriocinogênico. Talvez a temperatura utilizada ou o tempo de tratamento não tenham sido suficientes para concretizar-se a "cura". LACHOWICZ (1965) e TAGG *et alii* (1975) observaram que tratamento com temperatura elevada suprime totalmente a produção de estafilocoïcina.

Através do tratamento das linhagens bacteriocinogênicas 30, 49 e 58 com 8-metoxipsoralina e luz ultravioleta longa obteve-se diminuição no tamanho do halo de inibição do crescimento (Tabelas 15 e 16). Uma vez que trabalhamos com populações de células (colônias) e não com células individuais, tal diminuição no tamanho do halo de inibição poderia sugerir efeitos no DNA (eliminação) ou na própria bacteriocina (inativação).

Com relação à hipótese de atuação no DNA plasmidial, teríamos a "cura" do fator *Bac* em uma parte da população bacteriana que acarretaria como consequência diminuição no tamanho do halo. De acordo com BRIDGES *et alii* (1979) tratamento com 8-MOP e UVL forma "monoadduct" ou "crosslink" entre bases pirimídicas. Com base nessa afirmação poderíamos então, sugerir o bloqueio na replicação do plasmídio *Bac* e consequentemente sua eliminação nas células descendentes. YOAKUM e COLE (1978) sugerem que tratamento de furocumarinas e UVL causariam alterações na conformação molecular do plasmídio *Col E₁* o que acarretaria sua inativação. Finalmente, dados concretos da eliminação de plasmídio por esses dois agentes foram conseguidos por SIQUEIRA JR. (1981) trabalhando com plasmídio de resistência a tetraciclina em *S. aureus*.

Nossa segunda hipótese relaciona-se com a atuação na própria molécula de bacteriocina. BENSASSON *et alii* (1978) observaram que tratamentos de furocumarinas e UVL afetam proteínas. O efeito de 8 MOP e UVL poderia ser, agindo como uma substância que inativaria proteínas (bacteriocinas), ou como uma substância protetora da ação de bacteriocinas, semelhantemente à substância que dá imunidade ou, induzindo a depressão de alguma enzima que inativa a bacteriocina por digestão ou interferindo com o mecanismo de transmissão da ação letal.

A atuação do 8-MOP-UVL no DNA (plasmídio) ou na própria bacteriocina poderá conduzir a uma conclusão mais precisa mediante novos experimentos genéticos e bioquímicos pois até o momento são apenas hipóteses.

Tentativas de correlação entre produção de bacteriocinas com a planta hospedeira ou local de origem foram infrutíferas uma vez que o espectro de produção foi bastante amplo e independentes de fatores como hospedeiro e local de origem. SANTOS (1979) também não observou relação entre isolados produtores e não produtores bem como resistência ou sensibilidade à campestricinas quanto à planta hospedeira e seu local de origem. GARRET *et alii* (1966) no entanto observaram diferença na produção de bacteriocinas por *P. syringae* isoladas de diferentes hospedeiros. Diante desses resultados divergentes entre diferentes autores, sugere-se novos estudos para obtenção de resultados mais concretos com relação a existência ou não de correlação entre bacteriocinas, hospedeiros e localidade.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABBOT, J.D. e R. SHANNON, 1958. A method for typing *Shigella sonnei*, using colicine production as a marker. *Journal of Clinical Pathology*, 11:71-77.
- ADAMS, M.H., 1959. Colicins and other bacteria. In: HERSHEY, A.D. (ed.). *Bacteriophages*. New York, Interscience. p.388-389.
- ALFOLDI, L., 1958. La production induite de megacine en milieu synthétique. *Annales de l'Institut Pasteur*, 94:474-484.
- ALFOLDI, L., L. JACOB, E.L. WOLLMAN e R. MAZE, 1958. Sur le déterminisme génétique de la colicinogénie. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Seances de l'Academie des Sciences*, 246:3531-3533.
- AMANO, T., W.F. GOEBEL e E. MILLER-SMIDT, 1958. Colicin K. III. The immunological properties of a substance having colicine K activity. *Journal of Experimental Medicine*, 108:731-752.

- AMATI, P., 1964. Vegetative multiplication of colicinogenic factors after induction in *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology*, 8:239-246.
- ANACKER, R.L. e E.J. ORDAL, 1959. Studies on the myxobacterium *Chondrococcus columnaris*. II. Bacteriocins. *Journal of Bacteriology*, 78:33-40.
- ANASTESIO, K.L., J.A. SOUCHECK e H. SUGIYAMA, 1971. Boticinogeny and actions of the bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 107:143-149.
- ARIMA, K., Y. KATOH e T. BEPPU, 1968. Studies on colecin B. Mode of action and new extraction method from cells. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32:170-177.
- ARK, P.A., 1947. Effect of crystalline streptomycin on phytopathogenic bacteria and fungi. *Phytopathology*, 37:842.
- ARK, P.A. e M.A. STANLEY, 1956. Antibiotics as bactericides and fungicides against diseases of plants. *Plant Disease Reporter*, 4:85-92.
- ATKINSON, N., 1967. Salmonellin - a new colicin-like antibiotic. *Nature*, 213:184-185.
- AZEVEDO, J.L., 1961. Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 48p. (Tese de doutoramento).

- AZEVEDO, J.L., S.T.A. CASSINI e A. OLIVEIRA, 1980. Replicador multialça para uso geral em bacteriologia. (Submetido à publicação em *Summa Phytopathologica*).
- BARROW, G.I., 1963. The nature of inhibitory activity by *Staphylococcus aureus* type 71. *Journal of General Microbiology*, 32:255-261.
- BARRY, G.T., D.L. EVERHART, V. ABBOT e M.G. GRAHAM, 1965. Preparation, properties and relationship of substances possessing colicine A activity obtained from enterobacteriaceae. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abt. I)*, 196:248-263.
- BARRY, G.T., D.L. EVERHART e M. GRAHAM, 1963. Colicine A. *Nature*, 198:211-213.
- BAYER, M.E., 1968. Areas of adhesion between wall and membrane of *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*, 53:395-404.
- BAZARAL, M. e D.R. HELINSKI, 1968a. Circular DNA forms of colicinogenic factors E_1 , E_2 e E_3 from *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*, 36:185-194.
- BAZARAL, M. e D.R. HELINSKI, 1968b. Characterization of multiple circular DNA forms of colicinogenic factors E_1 from *Proteus mirabilis*. *Biochemistry*, 7:3513-3519.

- BECKER, W.F., 1980. Atividade bacteriocinogênica, resistência a antibióticos e métodos rápidos para determinação da patogenicidade em *Pseudomonas glycinea* Coerper. Piracicaba, ESALQ/USP, 107p. (Dissertação de mestrado).
- BEERENS, H. e G. BARON, 1965. Mise en évidence de bactériocines élaborées par les bactéries anaérobies a Gram négatif appartenant au genre *Eggerthella*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 2:255-256.
- BEN-GURION, R., 1970. Chloramphenicol and puromycin as inducers of colicinogenic bacteria. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 40:1281-1288.
- BEN-GURION, R. e I. HERTMAN, 1958. Bacteriocin-like material produced by *Pasteurella pestis*. *Journal of General Microbiology*, 19:289-297.
- BEPPU, T. e K. ARIMA, 1967. Protection of *Escherichia coli* from the lethal effect of colicins by high osmotic pressure. *Journal of Bacteriology*, 93:80-85.
- BENSASSON, R.V., E.J. LAND e C. SALET, 1978. Triplet excited state of furocoumarins: reaction with nucleic bases and amino acids. *Photochemical and Photobiology*, 27:273-280.
- BHATTACHARYYA, P., L. WENDT, E. WHITNEY e S. SILVER, 1970. Colicin-tolerant mutants of *Escherichia coli*: resistance of membranes to colicin E₁. *Science*, 168:998-1000.

- BOTTONE, E., J. ALLERHAND e M.A. PISANO, 1971. Characteristics of bacteriocin derived from *Streptococcus faecalis* var. *zymogenes* antagonistic to *Diplococcus pneumoniae*. *Applied Microbiology*, 22:200-204.
- BOUANCHAUD, D.H., M.R. SCAVIZZI e Y.A. CHABBERT, 1969. Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in enterobacteria and staphylococci. *Journal of General Microbiology*, 54:417-425.
- BOWMAN, C.M., J. SIDIKARO e M. NOMURA, 1971. Specific inactivation of ribosomes by colicin E₃ "in vitro" and mechanism of immunity in colicinogenic cells. *Nature New Biology*, 234:133-137.
- BRADLEY, D.E., 1965. The isolation and morphology of some new bacteriophages specific for *Bacillus* and *Acetobacter* species. *Journal of General Microbiology*, 41:233-242.
- BRADLEY, D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 31:230-314.
- BRADLEY, D.E. e C.A. DEWAR, 1966. The structure of phage-like objects associated with non-induced bacteriocinogenic bacteria. *Journal of General Microbiology*, 45:399-408.

- BRAUDE, A.I. e J.S. SIEMIENSKI, 1965. The influence of bacteriocins on resistance to infection by gram-negative bacteria. I. The effect of colicin on bactericidal power of blood. *Journal of Clinical Investigation*, 44:849-859.
- BRAUN, V., K. SCHALLER e M.R. WABL, 1974. Isolation, characterization, and action of colicin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 5:520-533.
- BRAUN, V. e H. WOLFF, 1973. Characterization of the receptor protein for phage T5 and colicin M in the outer membrane of *E. coli* B. *Federation of European Biochemical Societies Letters*, 34:77-80.
- BREED, R.S., E.G.D. MURRAY e N.R. SMITH, 1957. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 7^a ed. Baltimore, The Williams e Wilkins Co., 1094p.
- BRIDGES, B.A., R.P. MOTTERSHEAD e A. KNOWLES, 1979. Mutation induction and killing of *Escherichia coli* by DNA adducts and crosslinks: a photobiological study with 8-methoxypsoralen. *Chemico-Biological Interaction*, 27:221-233.
- BROCK, T.D., B. PEACHER e D. PIERSON, 1963. Survey of the bacteriocins of enterococci. *Journal of Bacteriology*, 86:702-707.
- BROWN, A.G. e A.M. BOYLE, 1944. Penicillin treatment of crown gall. *Science*, 100:528.

- BRUBAKER, R.R. e M.J. SURGALLA, 1961. Pesticins. I. Pesticin-bacterium interrelationships, and environmental factors influencing activity. *Journal of Bacteriology*, 82:940-949.
- CAPALDI, R.A. e D.E. GREEN, 1972. In: HOLLAND, I.B., 1975. Physiology of colicin action. *Advances in Microbial Physiology*, 12:56-140.
- CHANG, Y.Y. e L.P. HAGER, 1970. Inhibition of colicin E2 activity by bacterial lipopolysaccharide. *Journal of Bacteriology*, 104:1106-1109.
- CHANGEUX, J.P. e J. THIERY, 1967. On the mode of action of colicins: a model of regulation at the membrane level. *Journal of Theoretical Biology*, 17:315-318.
- CHENGAPPA, M.M. e G.R. CARTER, 1977. Demonstration of bacteriocin activity in bovine and bison strains of *Pasteurella multocida*. *American Journal of Veterinary Research*, 38:1183-1185.
- CLARKE, D.J. e J.G. MORRIS, 1976. Butyricin 7423: a bacteriocin produced by *Clostridium butyricum* NCIB 7423. *Journal of General Microbiology*, 95:67-77.
- CLARKE, J.D., R.M. ROBSON e J.G. MORRIS, 1975. Purification of two *Clostridium* bacteriocins by procedures appropriate to hydrophobic proteins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:256-264.

- CLOWES, R.C., 1963. Colicin factors and episomes. *Genetical Research*, 4:162-165.
- COSTA, S.O.P., 1973. Produção de colicinas em *Escherichia coli*. In: AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, Org. *Exercícios práticos de genética*. São Paulo, Companhia Ed. Nacional, p.186-188.
- CRAMER, W.A. e S.K. PHILLIPS, 1970. Response of an *Escherichia coli* - bound fluorescent probe to colicin E1. *Journal of Bacteriology*, 104:819-825.
- CRAMER, W.A., S.K. PHILLIPS e T.W. KEENAN, 1973. On the role of membrane phase in the transmission mechanism of colicin E1. *Biochemistry*, 12:1177-1181.
- CUPPELS, D.A., R.S. HANSON e A. KELMAN, 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *Journal of General Microbiology*, 109:295-303.
- DAJANI, A.S., E.D. GRAY e L.W. WANNAMAKER, 1970a. Bactericidal substance from *Staphylococcus aureus*. Biological properties. *Journal of Experimental Medicine*, 131:1004-1015.
- DAJANI, A.S., E.D. GRAY e L.W. WANNAMAKER, 1970b. Effect of bactericidal substance from *Staphylococcus aureus* on group A streptococci. I. Biochemical alterations. *Infection and Immunity*, 1:485-490.

- DAJANI, A.S. e L.W. WANNAMAKER, 1969. Demonstration of a bactericidal substance against β -hemolytic streptococci in supernatant fluids of staphylococcal cultures. *Journal of Bacteriology*, 97:985-991.
- DAJANI, A.S. e L.W. WANNAMAKER, 1973. Kinetic studies on the interaction of bacteriophage type 71 staphylococcal bacteriocin with susceptible bacteria. *Journal of Bacteriology*, 114:738-742.
- DAVIE, J.M. e T.D. BROCK, 1966a. Action of streptolysin S, the group D hemolysin, and phospholipase C on whole cells and spheroplasts. *Journal of Bacteriology*, 91:595-600.
- DAVIE, J.M. e T.D. BROCK, 1966b. Effect of teichoic acid on resistance to the membrane-lytic agent of *Streptococcus zymogenes*. *Journal of Bacteriology*, 92:1623-1631.
- De GRAAF, F.K., L.E. GOEDVOLK-DE GROOT e A.H. STOUTHAMER, 1970. Purification of a bacteriocin produced by *Enterobacter cloacae* DF13. *Biochimica et Biophysica Acta*, 221:566-575.
- De GRAAF, F.K., E.A. SPANJAERDT-SPECKMAN e A.H. STOUTHAMER, 1969. Mode of action of a bacteriocin produced by *Enterobacter cloacae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 35:287-306.
- De GRAAF, F.K., G.A. TIEZE, S.W. BONGA e A.H. STOUTHAMER, 1968. Purification and genetic determination of bacteriocin production in enterobacteriaceae. *Journal of Bacteriology*, 95:631-640.

- DEKKER, J., 1963. Antibiotics in the control of plant diseases. *Annual Review of Microbiology*, 17:243-262.
- DEPOUX, R. e Y. CHABBERT, 1953. Étude de l'activité antibiotique d'une colicine. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84:798-801.
- DESAL, S.G., M.K. PATEL e M.V. DESAL, 1967. "In vitro" activity of streptocycline against bacterial plant pathogens. *Indian Phytopathology*, 20:296-300.
- De WITT, W. e D.R. HELINSKI, 1965. Characterization of colicinogenic factor E₁ from a non-induced and a mitomycin C-induced *Proteus* strain. *Journal of Molecular Biology*, 13:692-703.
- Di MASI, D.R., J.C. WHITE, C.A. SCHNAITMAN e C. BRADBEER, 1973. Transport of vitamin B₁₂ in *Escherichia coli*: common receptor sites for vitamin B₁₂ and the E colicins on the outer membrane of the cell envelope. *Journal of Bacteriology*, 115:506-513.
- ECHANDI, E., 1976. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathology*, 66:430-432.
- ECHEGARAY, A., 1958. Los antibioticos en el control de las bacterias fitopatogenas. Escuela Nacional de Agricultura. México, p.463-469.
- ELGAT, M. e R. BEN-GURION, 1969. Mode of action of pesticin. *Journal of Bacteriology*, 98:359-367.

- ELLISON, J.S. e J.A. KAUTTER, 1970. Purification and some properties of two boticins. *Journal of Bacteriology*, 104:19-26.
- ENDO, H., K. AYABE, K. AMAKO e K. TAKEYA, 1965. Inducible phage of *Escherichia coli* 15. *Virology*, 25:469-471.
- FASTIER, L.B., 1949. An antibiotic substance produced by a member of the Shigella group. *Journal of Immunology*, 62:399-403.
- FIELDS, K.L. e S.E. LURIA, 1969. Effects of colicins E₁ and K on cellular metabolism. *Journal of Bacteriology*, 97:64-77.
- FOULDS, J.D. e D. SHEMIN, 1969. Concomitant synthesis of bacteriocin and bacteriocin inactivator from *Serratia marcescens*. *Journal of Bacteriology*, 99:661-666.
- FRAMPTON, E.W. e B.R. BRINKLEY, 1965. Evidence of lysogeny in derivatives of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 90:446-452.
- FREDERICQ, P., 1946. Sur la spécificité des actions antibiotiques. *Schweizerische Zeitschrift für Allgemeine Pathologie und Bakteriologie*, 9:385-390.
- FREDERICQ, P., 1947. Recherche comparée des propriétés biochimiques et des propriétés antibiotiques dans le groupe Coli-Aerogenes. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 29:359-361.

- FREDERICQ, P., 1948a. Production des substances antibiotiques par certaines souches de *Shigella*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 142:399-403.
- FREDERICQ, P., 1948b. Actions antibiotiques réciproques chez les *Enterobacteriaceae*. *Revue Belge de Pathologie et de Médecine Expérimentale*, 19:1-107.
- FREDERICQ, P., 1950. Recherches sur les caractères et la distribution des souches productrices de colicine B. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 144:1287-1298.
- FREDERICQ, P., 1952a. Recherche des propriétés lysogènes et antibiotiques chez les *Salmonella*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 146:298-300.
- FREDERICQ, P., 1952b. Action bactéricide de la colicine K. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 146:1295-1297.
- FREDERICQ, P., 1953. Colicines et bactériophages. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84:294-313.
- FREDERICQ, P., 1957. Colicins. *Annual Review of Microbiology*, 11:7-22.
- FREDERICQ, P., 1963. Colicines et autres bacteriocins. *Ergebnisse der Mikrobiologie, Immunitätsforschung und Experimentelle Therapie*, 37:114-161.

FREDERICQ, P. e M. BETZ-BAREAU, 1948. Présence régulière et constante d'*Escherichia freundii* dans l'urine des malades atteints de fièvre typhoïde. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 142:1078-1080.

FREDERICQ, P. e M. BETZ-BAREAU, 1953a. Transfert génétique de la propriété colicinogène chez *E. coli*. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 147:1110-1112.

FREDERICQ, P. e M. BETZ-BAREAU, 1953b. Transfert génétique de la propriété de produire un antibiotique. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 147:1653-1656.

FREDERICQ, P. e M. BETZ-BAREAU, 1953c. Transfert génétique de la propriété colicinogène en rapport avec la polarité F des parents. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 147:2043-2045.

FREDERICQ, P. e G. DELCOUR, 1953. Sur la cinétique de l'action bactéricide des colicines E et K. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 147:1310-1313.

FREDERICQ, P., E. JOIRIS, M. BETZ-BAREAU e A. GRATIA, 1949. Recherche des germes producteurs des colicines dans les selles des malades atteints de fièvre paratyphoïde B. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 143:556-559.

- FREDERIQ, P. e M. LEVINE, 1947. Antibiotic interrelationships among the enteric groups of bacteria. *Journal of Bacteriology*, 54:785-792.
- GAÁL, V. e G. IVÁNOVICS, 1972. Synthesis of inducible phospholipase A with antibacterial activity by *Bacillus cereus*. *Zeitschrift für Allgemeine Mikrobiologie*, 12:393-402.
- GAGLIANO, V.J. e R.D. HINS DILL, 1970. Characterization of a *Staphylococcus aureus* bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 104:117-125.
- GARRET, C.M.E., C.G. PANAGOPOULOS e J.E. CROSSE, 1966. Comparasion of plant pathogenic pseudomonads from fruit trees. *Journal of Applied Bacteriology*, 29:342-356.
- GILLIES, R.R. e J.R.W. GOVAN, 1966. Typing of *Pseudomonas pyocyanea* by pyocine production. *Journal of Pathological Bacteriology*, 91:339-345.
- GILLIVER, K., 1946. The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic bacteria and fungi. *Annals of Botany*, 10:271-282.
- GOEBEL, W.F., 1962. The chromatographic fractionation of colicine K. *Proceeding of the National Academy of Science. USA*, 48:214-219.

- GOEBEL, W., 1973. The nature of colicin K of *Escherichia coli* K 235. *Proceeding of the National Academy of Science. USA*, 70:854-858.
- GOEBEL, W.F. e G.T. BARRY, 1958. Colicine K. II. The preparation and properties of a substance having colicine K activity. *Journal of Experimental Medicine*, 107:185-209.
- GOEBEL, W.F., G.T. BARRY, M.A. JESAITIS e E.M. MILLER, 1955. Colicin K. *Nature*, 176:700-701.
- GRATIA, A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonism entre deux souches de Colibacille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 93:1040-1041.
- GRATIA, A., 1932. Antagonisme microbien et "bactériophagie". *Annales de l'Institut Pasteur*, 48:413-437.
- GRATIA, A. e P. FREDERICQ, 1946. Diversité des souches antibiotiques de *B. coli* et étendue variable de leur champ d'action. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie*, 140:1032-1033.
- GROSS, D.C. e A.K. VIDAVER, 1978. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing Rhizobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 36:936-943.

GROSS, D.C. e A.K. VIDAVER, 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. *Canadian Journal of Microbiology*, 25:367-374.

GUTERMAN, S.K. e S.E. LURIA, 1969. *Escherichia coli*: strains that excrete an inhibitor of colicin B. *Science*, 164:1414.

GUZE, L.B., E.G. HUBERT e G.M. KALMANSON, 1969. Pyelonephritis. X. Microbial interference in streptococcal infections in the rat kidney. *Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 74:274-287.

HALBERT, S.P., 1948a. The relation of antagonistic coliforme organisms to *Shigella* infections. *Journal of Immunology*, 60:23-26.

HALBERT, S.P., 1948b. The relation of antagonistic coliform organisms to *Shigella* infections. II. Observations in acute infections. *Journal of Immunology*, 60:359-381.

HALBERT, S.P., C. SONN KAZAR e L.S. SWICK, 1954. Mixed bacterial infections in relation to antibiotic activities. I. *Clostridium septicum* - micrococcus infections. *Journal of Immunology*, 73:169-179.

HALBERT, S.P., C. SONN KAZAR e L.S. SWICK, 1957. Mixed bacterial infections in relation to antibiotic activities. II. The role of staphylococcal antibiotic in a *Clostridium septicum* - *Staphylococcus albus* infection. *Antibiotics and Chemotherapy*, 7:235-242.

- HALBERT, S.P. e L.W. SWICK, 1950. In vivo antibiotic production by *Escherichia coli*. *Journal of Immunology*, 65:675-686.
- HALLE, E.M. e R.D. HINS DILL, 1973. Characterization of a bacteriocin from *Staphylococcus aureus* strain 462. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:634-640.
- HALE, E.M. e R.D. HINS DILL, 1975. Biological activity of staphylococcin 462: bacteriocin from *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:74-81.
- HAMON, Y., 1955. Étude d'une colicine élaborée par une culture de *S. paratyphi B*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 88:193-204.
- HAMON, Y., 1956. Contribution à l'étude des pyocines. *Annales de l'Institut Pasteur*, 91:82-90.
- HAMON, Y., 1959. Étude comparative des propriétés colicinogène et lysogène. *Comptes Rendus Hebdomadaire de Séances de l'Académie des Sciences*, 249:478-480.
- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1961a. Étude de la propriété bactériocinogène dans le genre *Serratia*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 100:818-821.

- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1961b. Las propiedades antagonistas recíprocas
parmi les *Erwinia*. Discussion de la position taxonomique de ce
genre. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des
Sciences*, 253:913-915.
- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1962. Étude du pouvoir bactériocinogène dans le
genre *Listeria*. I. Propriétés générales de ces bactériocines. *Annales
de l'Institut Pasteur*, 103:876-889.
- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1963a. Étude du pouvoir bactériocinogène dans le
genre *Listeria*. II. Individualité et classification des bactériocines
en cause. *Annales de l'Institut Pasteur*, 104:55-65.
- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1963b. Étude du pouvoir bactériocinogène dans le
genre *Cloaca*. *Annales de l'Institut Pasteur*, 104:127-131.
- HAMON, Y. e Y. PÉRON, 1966. Sur la nature des bactériocines produites par
Listeria monocytogenes. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de
l'Académie des Sciences*, 263:198-200.
- HAMON, Y., M. VÉRON e Y. PÉRON, 1961. Contribution a l'étude de
propriétés lysogènes et bactériocinogènes dans le genre *Pseudomonas*.
Annales de l'Institut Pasteur, 101:738-753.
- HARDY, K.G., 1975. Colicinogeny and related phenomena. *Bacteriological
Reviews*, 39:464-515.

- HEATLEY, N.G. e H.M. DOERY, 1951. The preparation and some properties of purified micrococcin. *Biochemical Journal*, 50:247-253.
- HELINSKI, D.R. e D.B. CLEWELL, 1971. Circular DNA. *Annual Review of Biochemistry*, 40:899-942.
- HELINSKI, D.R. e H.R. HERSCHMAN, 1967. Effect of rec^- mutations on the activity of colicinogenic factor. *Journal of Bacteriology*, 94:700-706.
- HERTMAN, I. e R. BEN-GURION, 1958. A study on pesticin biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 21:135-143.
- HERSCHMAN, H.R. e D.R. HELINSKI, 1967. Purification and characterization of colicin E₂ and colicin E₃. *Journal of Biological Chemistry*, 242:5360-5368.
- HIGERD, T.B., C.A. BAECHLER e R.S. BERK, 1967. In vitro and in vivo characterization of pyocin. *Journal of Bacteriology*, 93:1976-1986.
- HINS DILL, R.D. e W.F. GOEBEL, 1964. The chemical nature of bacteriocins. *Annales de l'Institut Pasteur*, 107:54-66.
- HINS DILL, R.D. e W.F. GOEBEL, 1966. Colicin K. VII. The transfer of type K colicinogeny to *Shigella sonnei*. *Journal of Experimental Medicine*, 123:881-895.

- HIRSCH, P.R., 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of General Microbiology*, 113:219-228.
- HOLLAND, I.B., 1961. The purification and properties of megacin, a bacteriocin from *Bacillus megaterium*. *Biochemical Journal*, 78:641-648.
- HOLLAND, I.B., 1962. Further observations on the properties of megacin, a bacteriocin formed by *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiological*, 29:603-614.
- HOLLAND, I.B., 1963. Effect of a bacteriocin preparation (megacin C) on DNA synthesis in *Bacillus megaterium*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 13:246-250.
- HOLLAND, I.B., 1965. A bacteriocin specifically affecting DNA synthesis in *Bacillus megaterium*. *Journal of Molecular Biology*, 12:429-438.
- HOLLAND, I.B., 1975. Physiology of colicin action. *Advances in Microbial Physiology*, 12:56-140.
- HOLLAND, E.M. e I.B. HOLLAND, 1970. Induction of DNA breakdown and inhibition of cell division by colicin E₂. Nature of some early steps in the process and properties of the E₂ - specific nuclease system. *Journal of General Microbiology*, 64:223-239.
- HOLLAND, E.M. e I.B. HOLLAND, 1972. Kinetics of colicin E₂ solubilization and fragmentation of *Escherichia coli* DNA in vivo. *Biochimica et Biophysica Acta*, 281:179-191.

- HOLLAND, I.B. e C.F. ROBERTS, 1964. Some properties of a new bacteriocin formed by *Bacillus megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 35:271-285.
- HOLLOWAY, B.W., V. KRISHNAPILLAI e A.F. MORGAN, 1979. Chromosomal genetics of *Pseudomonas*. *Microbiological Reviews*, 43:73-102.
- HOMMA, J.Y., N. HAMAMURA, M. NAOI e F. EGAMI, 1958. Recherches chimiques sur l'endotoxine de *Pseudomonas aeruginosa* II. *Bulletin de la Société de Chimie Biologique*, 60:647-664.
- HOMMA, J.Y. e G.S. SHIONOYA, 1967. Relationship between pyocine and temperate phage of *Pseudomonas aeruginosa*. II. Isolation of pyocines from strain P₁-111 and their characteristics. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 37:373-393.
- HOMMA, J.Y., H. SHIONOYA, M. MEGURO e Y. TANABE, 1967. A short communication on pyocine 28 produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 37:511-513.
- HOMMA, J.Y. e N. SUZUKI, 1964. "Cell-wall protein A" of *Pseudomonas aeruginosa* and its relationship to original endotoxin protein. *Journal of Bacteriology*, 87:630-646.
- HOMMA, J.Y. e N. SUZUKI, 1966. The protein moiety of the endotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 133:508-526.

- HOMMA, J.Y., N. SUZUKI e F. ITO, 1963. The surface structure of *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of Immunology*, 90:819-828.
- HOMMA, J.Y., H. WATABE e Y. TANABE, 1968. The temperate phages having serological relationship with the "phage bound pyocine". *Japanese Journal of Experimental Medicine*, 38:213-224.
- HONGO, M., A. MURATA, S. OGATA, K. KONO e F. KATO, 1968. Characterization of a temperate phage and four bacteriocins produced by nonpathogenic *Clostridium* species. *Agricultural and Biological Chemistry*, 32:773-780.
- HSU, C.Y. e G.M. WISEMAN, 1967. Antibacterial substance from staphylococci. *Canadian Journal of Microbiology*, 13:947-955.
- HTAY, K. e A. KERR, 1974. Biological control of crown gall seed and root inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 37:523-530.
- HUTTON, J.J. e W.F. GOEBEL, 1961. Colicine V. *Proceeding of the National Academy of Sciences. USA*, 47:1498-1500.
- HUTTON, J.J. e W.F. GOEBEL, 1962. The isolation of colicine V and a study of its immunological properties. *Journal of General Physiological*, 45 (Suppl.):125-141.
- IIDA, W., 1975. On the tolerance of plant pathogenic fungi and bacteria to fungicides in Japan. *Japan Pesticide Information*, 23:13-16.

- INOUE, K. e H. IIDA, 1968. Bacteriophages of *Clostridium botulinum*.
Journal of Virology, 2:537-540.
- IONESCO, H., A. RYTER e P. SCHAEFFER, 1964. Sur un bactériophage héberge
par la souche Marburg de *Bacillus subtilis*. *Annales de l'Institut
Pasteur*, 107:764-776.
- ISHII, S.I., Y. NISHI e F. EGAMI, 1965. The fine structure of a pyocin.
Journal of Molecular Biology, 13:428-431.
- IVANOV, N.A., 1970. Staphylococcins, their properties, classification, and
use for typing of Staphylococci. *Bulletin of Experimental Biology and
Medicine*, 69:559-560.
- IVÁNOVICS, G. e L. ALFOLDI, 1957. Bacteriocinogenesis in *Bacillus
megaterium*. *Journal of General Microbiology*, 16:522-530.
- IVÁNOVICS, G., L. ALFOLDI e E. NAGY, 1959. Mode of action of megacin.
Journal of General Microbiology, 21:51-60.
- IVÁNOVICS, G. e E. NAGY, 1958. Hereditary aberrancy in growth of some
Bacillus megaterium strains. *Journal of General Microbiology*,
19:407-418.
- JACOB, F., 1954. Biosynthèse induite et mode d'action d'une pyocine,
antibiotique de *Pseudomonas pyocyanea*. *Annales de l'Institut Pasteur*,
86:149-160.

JACOB, F., L. SIMINOVITCH e E. WOLLMAN, 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. *Annales de l'Institut Pasteur*, 83:295-315.

JACOB, F., A. LWOFF, A. SIMINOVITCH e E. WOLLMAN, 1953a. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84:222-224.

JACOB, F., L. SIMINOVITCH e E.L. WOLLMAN, 1953b. Comparaison entre la biosynthèse induite de la colicine e des bactériophages et entre leur mode d'action. *Annales de l'Institut Pasteur*, 84:313-318.

JACOB, F. e E.L. WOLLMAN, 1958. Les épisomes, éléments génétiques ajoutés. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences*, 247:154-156.

JAKES, K., N.D. ZINDER e T. BOON, 1974. Purification and properties of colicin E₃ immunity protein. *Journal of Biological Chemistry*, 249:438-444.

JAYAWARDENE, A. e F. FARKAS-HIMSLEY, 1968. Particulate nature of vibriocin: a bacteriocin from *Vibrio comma*. *Nature*, 219:79-80.

JESAITIS, M., 1970. The nature of colicin K from *Proteus mirabilis*. *Journal of Experimental Medicine*, 131:1016-1038.

- JETTEN, A.M. e G.D. VOGELS, 1972a. Nature and properties of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. *Journal of Bacteriology*, 112:243-250.
- JETTEN, A.M. e G.D. VOGELS, 1972b. Mode of action of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2:456-463.
- JETTEN, A.M. e G.D. VOGELS, 1973a. Characterization and extrachromosomal control of bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:49-57.
- JETTEN, A.M. e G.D. VOGELS, 1973b. Effects of colicin A and staphylococcin 1580 on amino acid uptake into membrana vesicles of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. *Biochimica et Biophysica Acta*, 311:483-495.
- JETTEN, A.M. e G.D. VOGELS, 1974. Characteristics of the killing effect of a *Staphylococcus epidermidis* bacteriocin. *Antonie van Leeuwenhoek*, 40:177-183.
- JETTEN, A.M., G.D. VOGEL e F. DE WINDT, 1972. Production and purification of a *Staphylococcus epidermidis*. *Journal of Bacteriology*, 112:235-242.

JONES, G.W. e S.J. EDWARDS, 1966. Examination of an antibiotic produced by coagulase negative staphylococci isolated from the bovine udder. *Journal of Dairy Research*, 33:271-276.

KADO, C.I. e M.G. HESKETT, 1970. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. *Phytopathology*, 60:969-976.

KAGEYAMA, M., 1964. Studies of a pyocin. I. Physical and chemical properties. *Journal of Biochemistry*, 55:49-53.

KAGEYAMA, M., 1970a. Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in *Pseudomonas aeruginosa*. I. Mapping of pyocin R₂ factor by conjugation. *Journal of General and Applied Microbiology*, 16:523-530.

KAGEYAMA, M., 1970b. Genetic mapping of a bacteriocinogenic factor in *Pseudomonas aeruginosa*. II. Mapping of pyocin R₂ factors by transduction with phage F116. *Journal of General and Applied Microbiology*, 16:531-535.

KAGEYAMA, M. e F. EGAMI, 1962. On the purification and some properties of a pyocin, a bacteriocin produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Life Sciences*, 9:471-476.

KAYSER, A., 1969. Les bactériocines. *Bulletin de l'Institut Pasteur*, 67:919-945.

KAZIRO, Y. e M. TANAKA, 1965. Studies on the mode of action of pyocin.

I. Inhibition of macromolecular synthesis in sensitive cells.

Journal of Biochemistry, 57:689-695.

KEKESY, D.A. e J.D. FIGUET, 1971. Bactériocinogênese et typisation de

Streptococcus faecalis. *Pathologia et Microbiologia*, 37:113-121.

KELSTRUP, J. e R.J. GIBBONS, 1969. Bacteriocins from human and rodent

streptococci. *Archives of Oral Biology*, 14:251-258.

KENNEDY, C., 1971. Induction of colicin production by high temperature or

inhibition of protein synthesis. *Journal of Bacteriology*, 108:10-19.

KERR, A., 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation.

Journal of Applied Bacteriology, 35:493-497.

KERR, A. e K. HTAY, 1974. Biological control of crown gall through

bacteriocin production. *Physiology of Plant Pathology*, 4:495-500.

KLEINSCHMIDT, A.K., 1968. Monolayer techniques in electron microscopy

of nucleic acid molecules. *Methods in Enzymology*, XIIB:361-377.

KLISIEWICZ, J.M. e G.S. POUND, 1961. Studies on control of black rot

of crucifera by treating seeds with antibiotics. *Phytopathology*,

51:495-500.

- KONISKY, J. e B.S. COWELL, 1972. Interaction of colicin Ia with bacterial cells: direct measurement of Ia - receptor interaction. *Journal of Biological Chemistry*, 247:6524-6529.
- KONISKY, J. e F.M. RICHARDS, 1970. Characterization of colicin Ia and colicin Ib: purification and some physical properties. *Journal of Biological Chemistry*, 245:2972-2978.
- KRAMER, J. e H. BRANDIS, 1975a. Mode of action of two *Streptococcus faecium* bacteriocins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:117-120.
- KRAMER, J.K. e H. BRANDIS, 1975b. Purification and characterization of two bacteriocins from *Streptococcus faecium*. *Journal of General Microbiology*, 88:93-100.
- KUWABARA, M., K. KIYOTANI, Y. MATSUO e H. SAITO, 1977. Bacteriocin typing of *Serratia marcescens*. *Journal of the Hiroshima Medical Association*, 30:38-43.
- LACHOWICZ, T., 1965. Investigations on Staphylococcins. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abt. I)*, 196:340-351.
- LATARJET, R. e P. FREDERICQ, 1955. An X-ray study of a colicine and of its relationship to bacteriophage T₆. *Virology*, 1:100-107.

- LAU, A.H.S., R.Z. HAWIRKO e C.T. CHOW, 1974. Purification and properties of boticin P produced by *Clostridium botulinum*. *Canadian Journal of Microbiology*, 20:385-390.
- LEMONS, M.A., 1969. Comportamento de mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson resistentes à aureomicina e a estreptomicina em relação ao tratamento de sementes de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) com esses antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP, 60p. (Dissertação de mestrado).
- LEPECQ, J.B. e G. PAOLETTI, 1967. A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. *Journal of Molecular Biology*, 27:87-106.
- LEVISOHN, R., J. KONISKI e M. NOMURA, 1968. Interaction of colicin with bacterial cells. IV. Immunity breakdown studied with colicins Ia e Ib. *Journal of Bacteriology*, 96:811-821.
- LOEB, L.J., A. MOYER e R.G.E. MURRAY, 1950. An antibiotic produced by *Micrococcus epidermidis*. *Canadian Journal of Research*, 28:212-216.
- LOTZ, W. e F. MAYER, 1972. Isolation and characterization of a bacteriophage tail-like bacteriocin from a strain of *Rhizobium*. *Journal of Virology*, 9:160-173.
- LOURES, E.G. e W.V. GUIMARÃES, 1974. *Microbiologia* (Técnicas de Laboratório). 2.^a ed. Viçosa, Editora da UFV. 43p.

LURIA, S.E., 1964. On the mechanism of action of colicins. *Annales de l'Institut Pasteur*, 107:67-73.

LWOFF, A., F. JACOB, E. RITZ e M. GAGÉ, 1952. Induction de la production de bactériophages et d'une colicine par les peroxydes, les ethyleneimines et les halgénéalcoylamines. *Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Academie des Sciences*, 234:2308-2310.

MacPHEE, D.G., 1970. Recombination - deficiente mutants of colicinogenic *Salmonella typhimurium* detected by their failure to produce colicin. *Journal of Bacteriology*, 104:345-350.

MAEDA, A. e M. NOMURA, 1966. Interaction of colicins with bacterial cells. I. Studies with radioactive colicins. *Journal of Bacteriology*, 91:685-694.

MAHONY, D.E., 1974. Bacteriocin susceptibility of *Clostridium perfringens*: a provisional typing schema. *Applied Microbiology*, 28:172-176.

MAHONY, D.E. e M.E. BUTLER, 1971. Bacteriocin of *Clostridium perfringens*. 1. Isolation and preliminary studies. *Canadian Journal of Microbiology*, 17:1-6.

MAHONY, D.E., M.E. BUTLER e R.G. LEWIS, 1971. Bacteriocins of *Clostridium perfringens*. 2. Studies on mode of action. *Canadian Journal of Microbiology*, 17:1435-1442.

- MARJAI, E.H. e G. IVÁNOVICS, 1962. A second bacteriocin-like principle of *Bacillus megaterium*. I. The characteristics of the bactericidal principle. *Acta Microbiologica Academiae Scientiarum Hungaricae*, 9:285-295.
- MATSUSHITA, H., M.S. FOX e W.F. GOEBEL, 1960. Colicine K. IV. The effect of metabolites upon colicine synthesis. *Journal of Experimental Medicine*, 112:1055-1068.
- MAY, J.W., R.H. HOUGHTON e C.J. PERRET, 1964. The effect of growth at elevated temperature on some heritable properties of *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 37:157-169.
- MCCARDELL, B.A. e C.F. POOTJES, 1976. Chemical nature of agrocin 84 and its effect on a virulent strain of *Agrobacterium tumefaciens*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 10:498-502.
- MENNIGMANN, H.D., 1965. Electron microscopy of the antibacterial agent produced by *Escherichia coli* 15. *Journal of General Microbiology*, 41:151-154.
- MEYERS, J.A., D. SANCHEZ, L.P. ELWELL e S. FALKOW, 1976. Simple agarose gel electrophoretic method for the identification and characterization of plasmid deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 127:1529-1537.
- MISATO, T., K. KO e I. YAMAGUCHI, 1977. Use of antibiotics in agriculture. *Advances in Applied Microbiology*, 21:53-88.

- MOORE, L.W., 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annual Review of Phytopathology*, 17:163-179.
- NAGEL DE ZWAIG, R., 1969. Mode de action of colicin A. *Journal of Bacteriology*, 99:913-914.
- NAMASIVA, Y.L. e R.K. HEDGES, 1971. Studies on the black rot of crucifers caused by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Agricultural Sciences*, 5:322-334.
- NEW, P.B. e A. KERR, 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *Journal of Bacteriology*, 35:279-287.
- NOMURA, M., 1963. Mode of action of colicines. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28:315-324.
- NOMURA, M., 1964. Mechanism of action of colicines. *Proceedings of the National Academy of Science. USA*, 52:1514-1521.
- NOMURA, M., 1967. Colicins and related bacteriocins. *Annual Review of Microbiology*, 21:257-284.
- NOMURA, M. e A. MAEDA, 1965. Mechanism of action of colicines. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abt. I)*, 196:216-239.

- NOMURA, M. e M. NAKAMURA, 1962. Reversibility of inhibition of nucleic acids and protein synthesis by colicin K. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 7:306-309.
- NUSKE, R., G. HOSEL, H. VENNER e H. ZINNER, 1957. Über ein colicin aus *Escherichia coli* SG 710. *Biochemische Zeitschrift*, 329:346-360.
- OCHI, T., K. YANO e T. AMANO, 1971. An improved method for purification of megacin A inhibitor. *Bikens Journal*, 14:423-424.
- OKABE, N. e M. GOTO, 1963. Bacteriophages of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*, 1:397-418.
- OKAMOTO, K., J.A. MUDD, J. MANGAN, W.M. HUANG, T.V. SUBBAIAH e J. MARMUR, 1968. Properties of the defective phage of *Bacillus subtilis*. *Journal of Molecular Biology*, 34:413-428.
- ONISHI, Y., 1969. Effects of pyocin 28 on sensitive bacteria. *Fukuoka Acta Medica*, 60:577-590.
- OZAKI, M., Y. HIGASHI, H. SAITO, T. AN e T. AMANO, 1966. Identity of megacin A with phospholipase A. *Bikens Journal*, 9:201-213.
- OZEKI, H., 1965. The behavior of colicinogenic factors in *Salmonella typhimurium*. *Zentralblatt für Bakteriologie, Parasitenkunde, Infektionskrankheiten und Hygiene (Abt. I)*, 196:160-173.

- OZEKI, H., B.A.D. STOCKER e H. MARGERIE, 1959. Production of colicine by single bacteria. *Nature*, 184:337-339.
- OZEKI, H., B.A.D. STOCKER e S.M. SMITH, 1962. Transmission of colicinogeny between strain of *Salmonella typhimurium* grown together. *Journal of General Microbiology*, 28:671-687.
- PLATE, C.A. e S.E. LURIA, 1972. Stages in colicin K action, as revealed by the action of trypsin. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*, 69:2030-2034.
- POPOV, V.I., 1958. Vascular bacteriolysis of cabbage. In: LEMOS, M.A., 1969. Comportamento de mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson resistentes à aureomicina e à estreptomicina em relação ao tratamento de sementes de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*, L.) com esses antibióticos. Piracicaba, ESALQ/USP. 60p. (Dissertação de mestrado).
- QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *Canadian Journal of Microbiology*, 6:387-396.
- REEVES, P., 1963. Preparation of a substance having colicin F activity from *Escherichia coli* CA 42. *Australian Journal of Experimental Biology and Medical Science*, 41:163-170.
- REEVES, P., 1965. The bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 29:24-45.
- REEVES, P., 1972. *The Bacteriocins*. Springer Verlag, N.Y. 142p.

- REYNOLDS, B.L. e P. REEVES, 1963. Some observations on the mode of actions of colicine F. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 11:140-145.
- REYNOLDS, B.L. e P. REEVES, 1969. Kinetics and adsorption of colicin CA 42-E₂ and reversal of its bactericidal activity. *Journal of Bacteriology*, 100:301-309.
- ROBERTS, W.P., M.E. TATE e A. KERR, 1977. Agrocin 84 is a 6-N-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue. *Nature*, 265:379-381.
- ROGERS, A.H., 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. *Applied Microbiology*, 24:294-295.
- ROGERS, A.H., 1974. Bacteriocin production and susceptibility among strains of *Streptococcus mutans* grown in the presence of sucrose. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 6:547-550.
- ROMEIRO, R.S., 1976. *Identificação de bactérias fitopatogênicas*. Viçosa, Editora da UFV. 91p.
- ROTH, T.F. e D. HELINSKI, 1967. Evidence for circular DNA forms of a bacterial plasmid. *Proceedings of National Academy of Sciences. USA*, 58:650-657.

- RYAN, F., P. FRIED e F. MUKAI, 1955. A colicin produced by cells that are sensitive to it. *Biochimica et Biophysica Acta*, 18:131.
- SABET, S.F. e C.A. SCHNAITMAN, 1971. Localization and solubilization of colicin receptors. *Journal of Bacteriology*, 108:422-430.
- SABET, S.F. e A. SCHANAITMAN, 1973. Purification and properties of the colicin E₃ receptor of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*, 248:1797-1806.
- SADATSUNE; T., M. KUWABARA, T. WATANABE e Y. MATSUO, 1978. Bacteriocin typing of enterococci. *Hiroshima Journal of Medical Sciences*, 27:241-246.
- SAKURAI, H., H. NAITO e S. FUJITA, 1976. Sensitivity distribution of phytopathogenic bacteria and fungi to antibiotics. *Journal of Antibiotics*, 29:1230-1236.
- SANDOVAL, H.K.; H.C. REILLY e B. TANDLER, 1965. Colicin 15: possibly a defective bacteriophage. *Nature*, 205:522-523.
- SANTOS, M.M.L.S., 1979. Produção de bacteriocinas e resistência a antibióticos em *Xanthomonas campestris* (Pammel) Downson. Piracicaba, ESALQ/USP. 81p. (Dissertação de mestrado).
- SCHLEGEL, R. e H.D. SLADE, 1972. Bacteriocin production by transformable group H streptococci. *Journal of Bacteriology*, 112:824-829.

- SCHLEGEL, R. e H.D. SLADE, 1973. Properties of a *Streptococcus sanguis* (group H) bacteriocin and its separation from the competence factor of transformation. *Journal of Bacteriology*, 115:655-661.
- SCHLEGEL, R. e H.D. SLADE, 1974. Alteration of macromolecular synthesis and membrane permeability by a *Streptococcus sanguis* bacteriocin. *Journal of General Microbiology*, 81:275-277.
- SCHWARTZ, S.A. e D.R. HELINSKI, 1968. Purification and characterization of colicin E₁. *Bacteriological Proceedings*, 53.
- SCHWARTZ, S.A. e D.R. HELINSKI, 1971. Purification and characterization of colicina E₁. *Journal of Biological Chemistry*, 246:6318-6327.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *Journal of General Microbiology*, 91:403-413.
- SEAMAN, E., E. TARMY e J. MARMUR, 1964. Inducible phages of *Bacillus subtilis*. *Biochemistry*, 3:607-613.
- SENIOR, B.W., 1968. In: HOLLAND, I.B., 1975: Physiology of colicin action. *Advances in Microbial Physiology*, 12:56-140.
- SHAFFER Jr., W.H. e R.N. GOODMAN, 1962. Progression in vivo, rate of growth in vitro, and resistance to streptomycin, as indices of virulence of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*, 52:1201-1207.

- SHARMA, D.P., L. SHRINIWAS e R.A. BHUJWALA, 1976. Enterococcin typing of group D streptococci. *Japanese Journal of Microbiology*, 20:559-560.
- SHERWOOD, N.P., B.E. RUSSELL, A.R. JAY e K. BOWMAN, 1949. Studies on streptococci. III. New antibiotic substances produced by beta hemolytic streptococci. *Journal of Infections Disease*, 84:88-91.
- SIDIKARO, J. e M. NOMURA, 1974. E₃ immunity substance. A protein from E₃ - colicinogenic cells that accounts for their immunity to colicin E₃. *Journal of Biological Chemistry*, 249:445-453.
- SILVER, S. e H. OZEKI, 1962. Transfer of deoxyribonucleic acid accompanying the transmission of colicinogenic properties by cell mating. *Nature*, 195:873-874.
- SIQUEIRA Jr., J.P., 1981. Efeito da 8-metoxipsoraleina associada à luz ultravioleta em profagos e plasmídeos de *Staphylococcus aureus*. Piracicaba, ESALQ/USP, 60p. (Tese de doutoramento).
- SMARDA, J., 1975. Novel approaches to the mode of action of colicins. *Folia Microbiologica*, 20:264-271.
- SMARDA, J. e B. LANEK, 1971. Possibility of use of colicin-refractory mutants in the study of localization of colicin receptors. *Folia Microbiologica*, 16:481-484.

- SMARDA, J. e U. TAUBENECK, 1968. Situation of colicin receptor in surface layers of bacterial cells. *Journal of General Microbiology*, 52:161-172.
- SMIT, J.A., H.C. DE KLERK e J.N. COETZEE, 1968. Properties of a *Proteus morgani* bacteriocin. *The Journal of General Microbiology*, 54:67-75.
- SMITH, S.M., H. OZEKI e B.A.D. STOCKER, 1963. Transfer of col E₁ and col E₂ during high-frequency transmission of col I in *Salmonella typhimurium*. *Journal of General Microbiology*, 33:231-242.
- STANGHELLINI, M.E., D.C. SANDS, W.C. KRONLAND e M.M. MENDONÇA, 1977. Serological and physiological differentiation among isolates of *Erwinia carotovora* from potato and sugarbeet. *Phytopathology*, 67:1178-1182.
- STICKLER, D.L., R.G. TUCKER e D. KAY, 1965. Bacteriophage-like particles released from *Bacillus subtilis* after induction with hydrogen peroxide. *Virology*, 26:142-145.
- STOCKER, B.A.D., S.M. SMITH e H. OZEKI, 1963. High infectivity of *Salmonella typhimurium* newly infected by the col I factor. *Journal of General Microbiology*, 30:201-221.
- TAGG, J.R., A.S. DAJANI, L.W. WANNAMAKER e E.D. GRAY, 1973. Group A streptococcal bacteriocin. Production, purification and mode of action. *Journal of Experimental Medicine*, 138:1168-1183.

TAGG, J.R., A.S. DAJANI e L.W. WANNAMAKER, 1975. Bacteriocin of a group B streptococcus: partial purification and characterization. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:764-772.

TAGG, J.R., A.S. DAJANI e L.W. WANNAMAKER, 1976. Bacteriocins of Gram-positive bacteria. *Bacteriological Reviews*, 40:722-756.

TAGG, J.R., R.S.D. READ e A.R. MCGIVEN, 1973. Bacteriocin of a group A streptococcus: partial purification and properties. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:214-221.

TAKAGAKI, Y., K. KUNUGITA e M. MATSUHASHI, 1973. Evidence for the direct action of colicin K on aerobic ^{32}P , uptake in *Escherichia coli* in vivo and in vitro. *Journal of Bacteriology*, 113:42-50.

TAKEYA, K., Y. MINAMISHIMA, K. AMAKO e Y. OHNISHI, 1969. Rod shaped pyocin 28. *Journal of General Virology*, 4:145-149.

THIRUMALACHAR, M.J., M.K. PATEL, N.B. KULKARNI e G.W. DHANDE, 1956. Effects in vitro of some antibiotics on thirty-two *Xanthomonas* species occurring in India. *Phytopathology*, 46:486-488.

TIMINIS, K., 1972. Purification and characterization of colicin D. *Journal of Bacteriology*, 109:12-20.

- TRABULSI, L.R. e M.E. ZULIANI, 1969. Estudos sobre a *E. coli* 0111:B4. III. Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11:323-334.
- TRUST, T.J., 1970. Antagonism by a Gram-positive coccus. *Canadian Journal of Microbiology*, 16:661-665.
- TUBYLEWICZ, H., 1968. Experimental studies on bacteriocinogeneity in *Clostridium perfringens* tupe A. III. Chemical structure of isolated bacteriocines. *Bulletin de l'Académie Polanaise des Sciences. Série des Sciences Biologiques*, 16:279-284.
- TZANNETIS, S., J. LEONARDOPOULOS e J. PAPAVALASSILIOU, 1970. Enterocinogeny and lysogeny in enterococci. *Journal of Applied Bacteriology*, 33:358-362.
- UPRETI, G.C. e R.D. HINSDILL, 1973. Isolation and characterization of a bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 4:487-494.
- UPRETI, G.C. e R.D. HINSDILL, 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 7:139-145.
- VIDAVER, A.K., M.L. MATHYS, M.E. THOMAS e M.L. SCHUSTER, 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* and *P. phaseolicola*. *Canadian Journal of Microbiology*, 18:705-713.

- WAHBA, A.H., 1963. The production and inactivation of pyocines. *Journal of Hygiene*, 61:431-441.
- WARING, H.J., 1966. Cross-linking and intercalation in nucleic acids. *Symposium of the Society for General Microbiology*, 16:235-248.
- WARREN, R., M. ROGOLSKI, B.B. WILEY e L.A. GLASGOW, 1974. Effect of ethidium bromide on elimination of exfoliative toxin and bacteriocin production in *Staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 118:980-985.
- WELTZIEN, H.U. e M.A. JESAITIS, 1971. The nature of the colicin K receptor of *Escherichia coli* Cullen. *Journal of Experimental Medicine*, 133:534-553.
- YOAKUM, G.H. e R.S. COLE, 1978. Cross-linking and relaxation of supercoiled DNA by psoralen and light. *Biochimica et Biophysica Acta*, 521:529-546.
- ZELAZNA-KOWALSKA, I., 1979. Bacteriocinogeny of *Rhizobium trifolii*. *Acta Microbiologica Polonica*, 28:39-45.