

PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS E RESISTÊNCIA A
ANTIBIÓTICOS EM *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson

MARIA MARLY DE LOURDES SILVA SANTOS

Engenheira Agrônoma - FCAP

Orientador: PROF. DR. JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO

Dissertação apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Mestre em Microbiologia Agrícola.

PIRACICABA
Estado de São Paulo - Brasil
Novembro, 1979

À minha mãe
meu esposo e
meus filhos

Andrêa
Alessandra
Neto
Junior e
Ana Paula

DEDICO

AGRADECIMENTOS

O autor expressa seus agradecimentos às pessoas e instituições que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho, especialmente:

- Prof. João Lúcio de Azevedo, pela valiosa e eficiente orientação, apoio e estímulo durante a realização e redação deste trabalho.
- Prof. Miracy Garcia Rodrigues, Chefe do Departamento Fitossanitário da Faculdade de Ciências Agrárias do Pará, pelo apoio e compreensão.
- Senador Jarbas Gonçalves Passarinho, com respeito e reconhecimento.
- Aos colegas do Curso de Pós-Graduação, em especial Eneida de Assumpção e Suely Freitas pelas sugestões e amizade.
- Prof. Evoneo Berti Filho pela revisão da versão do resumo para o inglês.
- Funcionários do Instituto de Genética da ESALQ, nas pessoas do Sr. Antonio José Rocha Campos, Luiz Próspero, Orlando Bueno Cardoso pelos serviços prestados
- Sra. Sônia Novaes Raserá, pelos serviços de datilografia.
- Faculdade de Ciências Agrárias do Pará pela oportunidade e

condições oferecidas.

- Programa de Ensino Agrícola Superior, pela concessão de Bolsa de Estudo durante a realização do Curso.
- CNPq pelo apoio financeiro às pesquisas através do Plano Integrado de Genética (PIG-II).

INDICE

	<u>página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. O patógeno	6
3.2. Produção de bacteriocina	8
3.3. Resistência a drogas	15
3.4. Transferência de resistência	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. Materiais	27
4.1.1. Meios de cultura	27
4.1.2. Antibióticos	28
4.1.3. Hospedeiros e Origem dos isolados	29
4.2. Métodos	31
4.2.1. Isolamento do patógeno	31
4.2.2. Identificação do patógeno	32
4.2.3. Inoculação de plantas e reisolamento do patógeno	33
4.2.4. Produção de bacteriocinas	33
4.2.5. Determinação dos níveis de resistência .	34
4.2.6. Isolamento de mutantes resistentes a es- treptomicina e frequência de mutação ...	35
4.2.7. Transferência das marcas de resistência.	36

5. RESULTADOS	39
5.1. Isolamento e identificação do patógeno	39
5.2. Teste de patogenicidade e reisolamento	40
5.3. Produção de bacteriocina	41
5.4. Níveis de <u>resistência</u>	44
5.5. Isolamento e frequência de mutantes resis- tentes à estreptomicina	51
5.6. Transferência da resistência	53
6. DISCUSSÃO	56
6.1. Isolamento, identificação e teste de patoge- nicidade	56
6.2. Bacteriocinas	57
6.3. Resistência a antibióticos e mutantes resis- tentes. Transferência de resistência	59
7. CONCLUSÕES	64
8. SUMMARY	65
9. LITERATURA CITADA	67

1. RESUMO

O presente trabalho teve como objetivos investigar em *Xanthomonas campestris* a produção de bacteriocinas por diferentes isolados bem como verificar os níveis naturais de resistência da bactéria a antibióticos e compará-los com níveis anteriormente obtidos, em uma tentativa de detectar um possível aumento nos mesmos ao longo dos anos e o possível envolvimento de elementos extracromossômicos nessa resistência. Para tanto, foram isoladas 17 amostras de *X. campestris* de diferentes locais do Estado de São Paulo e de diferentes variedades de *Brassica oleracea*. Os resultados indicaram que 47% dos isolados são produtores de bacteriocinas e que alguns deles se prestam como indicadores da produção dessas bacteriocinas por outros isolados, não havendo relação entre a produção dessas substâncias e local ou variedade de onde as amostras foram isoladas. Com relação à resistência a drogas os níveis de

.2.

resistência dos isolados variaram de 2 a 4 µg/ml para estreptomycin; 1 a 8 µg/ml para canamicina; 0,02 a 2 µg/ml para tetraciclina e 2 a 1024 µg/ml para penicilina. Os dados indicam que especialmente resistência a tetraciclina vem aumentando ao longo dos anos, possivelmente devido à seleção de mutantes pelo uso da droga no controle desta bactéria. Um possível plasmídeo transferível que confere resistência à penicilina foi encontrado em um dos isolados.

2. INTRODUÇÃO

A podridão negra, causada por *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939, é a principal doença que ocorre em crucíferas, acarretando grandes prejuízos para as culturas.

Essa bactéria tem sido observada em todo o país, nas mais variadas condições, e uma das medidas de controle recomendadas é o tratamento de sementes com antibióticos.

Os antibióticos são compostos produzidos por microorganismos capazes de inibir ou destruir outros microrganismos; possuem alto grau de especificidade e atuam em baixas concentrações. No entanto, as bactérias apresentam capacidade de sofrer mutações para resistência a estas drogas, tornando o tratamento ineficaz, pois nenhum agente quimioterápico foi ainda descoberto para o qual as bactérias não desenvolvessem resistência (WATANABE, 1972).

A presença de plasmídeos portadores de fatores R em bactérias Gram negativas condiciona a ocorrência de resistência múltipla a antibióticos. Em bacteriologia, o conhecimento da existência de fatores R sob o ponto de vista genético tem grande aplicação, permitindo a transferência desses fatores para outras bactérias.

A disseminação do plasmídeo R é comum, e recentemente foi constatado que certas espécies de bactérias fitopatogênicas podem recebê-lo de *Escherichia coli* "in vitro", agravando os problemas de controle de infecções bacterianas por antibióticos.

Além do plasmídeo R, outros tipos de plasmídeos conhecidos em bactérias são aqueles produtores de substâncias que podem ter atividade contra linhagens sensíveis. Essas substâncias foram estudadas primeiramente em *E. coli*, recebendo a denominação específica de colicinas. Outros estudos mostraram a presença dessas substâncias em bactérias não pertencentes ao grupo das coliformes, o que levou a uma denominação geral de bacteriocinas.

Vários pesquisadores têm utilizado a produção dessas bacteriocinas para a obtenção de melhores informações, geralmente para fins epidemiológicos, na identificação de microrganismos quando as provas bioquímicas ou serológicas não são suficientes para caracterizar bactérias da mesma espécie.

O presente trabalho teve como objetivos investigar em *Xanthomonas campestris* a produção de bacteriocinas por diferentes isolados bem como verificar os níveis naturais de resistência da bactéria a antibióticos e compará-los com níveis anteriormente obtidos, em uma tentativa de detectar um possível aumento nos mesmos ao longo dos anos e o possível envolvimento de elementos extracromossômicos nessa resistência.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. O patógeno

A primeira citação sobre a doença "podridão negra das crucíferas" foi efetuada por GARMAN em 1891, prejudicando a cultura de repolho durante os períodos de alta temperatura e excessiva umidade (MEIER, 1934).

BROWN e HARVEY (1920) confirmaram os resultados obtidos por GARMAN quanto à necessidade de alta temperatura e excessiva umidade para o desenvolvimento mais favorável da doença; mostraram que o patógeno penetra através dos estômatos e de ferimentos das raízes e do caule.

Estudando o ciclo da doença, COOK *et alii* (1925), observaram que na natureza o estômato não é uma importante via de penetração do patógeno: esta depende da continuidade líquida entre a abertura estomatal e a câmara subestomática.

A descrição dos sintomas da doença, do organismo causal, do ciclo da doença e seu controle, é feita por WALKER (1965), mostrando que desde seu primeiro isolamento o patógeno recebeu diversas denominações até ser definitivamente reconhecido como *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, 1939.

O estudo do gênero *Xanthomonas*, sua posição e variação em relação à planta hospedeira e em relação à sua taxonomia pode ser encontrado detalhadamente em uma revisão feita por STARR (1959), onde é citado que a classificação das bactérias fitopatogênicas era efetuada baseando-se principalmente na sintomatologia em hospedeiros, ocasionando um aumento pronunciado do número de espécies.

DYE (1962) apresenta um trabalho bastante completo sobre as características bioquímicas do gênero *Xanthomonas*, onde ele compara 209 culturas, compreendendo 57 espécies até então reconhecidas, e concluiu que as mesmas não poderiam ser diferenciadas por qualquer dos 30 testes por ele utilizado. Ele observou que essas bactérias formavam um grupo homogêneo, que poderia, entretanto, ser facilmente separado de outros microrganismos que também produziam pigmentos amarelos e que ele incluiu em seus estudos para fins comparativos.

DE LEY (1964) observou que a lista de 60 espécies referidas no BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (BREED *et alii*, 1957) deveria ser em breve reduzida a poucas

espécies, devido a não apresentarem características de diferenciação importantes e que estas são quase exclusivamente baseadas na especificidade fitopatogênica. Um ano mais tarde, DE LEY e FRIEDMANN (1965) fizeram considerações sobre a dificuldade da utilização de propriedades fisiológicas para a classificação dos microrganismos.

DYE e LELLIOTT (1975) observaram a necessidade da criação de dois grupos de *Xanthomonas*, onde um desses grupos, bastante homogêneo, seria representado por todas aquelas amostras do gênero *Xanthomonas* ditas típicas que apresentassem crescimento em ágar simples, caracterizado pela presença de colônias elevadas, mucóides e com pigmento amarelo característico do gênero. Segundo esses autores, todas essas amostras seriam agrupadas devido à sua semelhança, em uma única espécie: *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, 1939.

3.2. Produção de bacteriocina

GRATIA (1925), na Bélgica, observou que a amostra de *Escherichia coli* O era inibida por substância liberada por *E. coli* V. Essas substâncias produzidas por numerosas linhagens de *E. coli* e que inibiam o crescimento de linhagens aparentadas foram denominadas de colicinas (FREDERICQ, 1948) e todas elas constituem-se basicamente de proteínas.

Após a demonstração de que esse fenômeno era

muito mais geral, ocorrendo não somente em *E. coli* mas também em grande número de outras bactérias, tanto Gram positivas como Gram negativas, foi adotado o termo geral "bacteriocina" para designar essas substâncias. A partir daí, adotaram-se os termos específicos colicinas, piocina, fluocinas, carotovoricinas e pesticinas, entre outros, para designarem as bacteriocinas produzidas respectivamente por *Escherichia coli*, *Pseudomonas pyocianea*, *P. fluorescens*, *Erwinia carotovora* e *Pasteurella pestis* (REEVES, 1972).

As colicinas, que são as bacteriocinas mais estudadas, são normalmente classificadas levando-se em consideração a especificidade de sua adsorção em receptores específicos. Depois podem ainda ser classificadas em sub-tipos, de acordo com a resistência específica das bactérias, pois as células bacteriocinogênicas são resistentes às bacteriocinas que elas próprias produzem (FREDERICQ, 1957).

REEVES (1965) apresentou em uma revisão diversas famílias que possuem linhagens produtoras de bacteriocinas. Há ocorrência de linhagens produzindo mais de uma bacteriocina e mutantes resistentes a mais de um tipo de bacteriocina, trazendo dificuldades para a classificação baseada no uso de um indicador particular.

NOMURA (1967) definiu bacteriocinas como substâncias que são produzidas por certas linhagens de bactérias e

que são ativas contra outras linhagens de uma mesma espécie ou de espécies correlatas. As bacteriocinas podem conter um mesmo receptor específico, mas podem ser separadas uma das outras por sua resistência específica.

BRADLEY (1967) classificou as bacteriocinas em 2 grupos: em um grupo estão incluídas as que apresentam baixo peso molecular, sensíveis à tripsina e termoestáveis, e em um outro grupo, as substâncias de alto peso molecular, resistentes à tripsina e termolábeis. É citado que a maioria das bacteriocinas produzidas por bactérias fitopatogênicas são sensíveis ao calor e resistentes à tripsina, sugerindo que elas possuem alto peso molecular, porém agrobacteriocina 1, produzida por *Agrobacterium tumefaciens*, possui baixo peso molecular (STONIER, 1960).

MISAGHI e GROGAN (1969) e SANDS (1970) fizeram a classificação de bacteriocinas baseada primeiramente em dados nutricionais e fisiológicos.

Segundo HARTING *et alii* (1972), na elaboração de um esquema de classificação baseado na produção de bacteriocina é importante lembrar que o espectro da atividade de uma bacteriocina é constante, independente da amostra que a produziu.

VIDAVER *et alii* (1972) classificaram as bacte-

riocinas produzidas por *Pseudomonas syringae*, *P. phaseolicola*, *P. glycinea* em 11 grupos com base no espectro de atividade entre linhagens de uma mesma espécie, de espécies relacionadas e não relacionadas e entre gêneros.

Entre os agentes que podem induzir maior produção de bacteriocinas encontra-se a luz ultra violeta (U.V.), sendo observado primeiramente por JACOB *et alii* (1952) para a colicina ML-E.

Estudos feitos por HERTMAN e BEN-GURION (1958) mostraram que houve detecção de bacteriocina 60 minutos após a indução por ultra violeta (U.V.), e que a produção por algumas linhagens suscetíveis através da indução de certos agentes depende principalmente das condições de crescimento da bactéria no meio de cultura.

IVANOVICS (1962) observou que, sob condições normais, pouca colicina E₂ era produzida, havendo um aumento quando a bactéria foi tratada com U.V.

HAMON e PERON (1963) verificaram que o efeito da indução através da U.V. foi o de aumentar o espectro da atividade de algumas bacteriocinas, enquanto que VIDAVER (1976) observou que o espectro de atividade da bacteriocina produzida por *Pseudomonas* spp, após indução por U.V., aumentou em poucos casos.

ECHANDI (1976) verificou que *Corynebacterium michiganense* produziu bacteriocina em meio sólido e em menor quantidade em meio líquido, observando que a luz U.V. e outros agentes não induziram aumento na produção de bacteriocina, e que o tipo de bacteriocina produzida não está relacionado com virulência ou características culturais.

CUPPELS *et alii* (1978) isolou e caracterizou a bacteriocina produzida pela linhagem B₁ de *Pseudomonas solanacearum* que inibiu o crescimento de 43 linhagens entre 51 testeadas, e a produção de bacteriocina aumentou devido à exposição da bactéria à luz U.V.

O estudo das bacteriocinas relacionado com vegetais é mais ou menos recente; MISAGHI (1969) descreveu a produção de bacteriocina por três espécies de *Pseudomonas* com características fisiológicas semelhantes e patogênicas para a mesma planta, e que a presença de bacteriocina e a sensibilidade facilita a separação das espécies.

HAMON *et alii* (1961) estudaram 12 espécies de *Pseudomonas* encontraram que uma linhagem de *P. lachrymans* e uma de *P. optata* produziram bacteriocinas que foram ativas contra 5 espécies fitopatogênicas de *Pseudomonas*.

OKABE e GOTO (1963) descreveram as bacteriocinas como proteínas naturais produzidas por células lisadas sen

síveis, e os métodos para sua detecção seriam semelhantes aqueles usados para o fago. Algumas bacteriocinas agem sobre um número limitado de linhagens, outras têm uma grande faixa de ação. Estas substâncias foram detectadas em *P. solanacearum*, *Corynebacterium insidiosum* e *Agrobacterium tumefaciens*, sendo um dos primeiros estudos detalhados sobre bacteriocinas em batérias fitopatogênicas.

GARRET (1966) mostrou as diferenças existentes na produção de bacteriocinas por isolados de diferentes hospedeiros. Foram ensaiados 45 isolados de *Pseudomonas syringae* contra 8 que funcionaram como indicadores. Os isolados de pêra mostraram atividade bacteriana contra isolados de citros e vice-versa, separando as bacteriocinas em dois grupos.

Condições culturais e nutricionais, incluindo temperatura e meio de cultura, podem afetar a produção de bacteriocina. GILLES e GOVAN (1966) e GOVAN e GILLES (1969) observaram que houve maior produção de bacteriocina por *Pseudomonas aeruginosa* em temperatura abaixo de temperatura ótima para a bactéria. Também *P. solanacearum*, que apresenta o ótimo de temperatura a 32°C, produziu bacteriocina a 30°C (CUPPELS, *et alii*, 1978). DE VAY *et alii* (1968) mostraram que a atividade de de bacteriocinas em *Pseudomonas syringae* foi paralizada quando se adicionou peptona ao meio de cultura.

VIDAVER *et alii* (1972) estudaram que *Xanthomo-*

nas syringae, *P. phaseolicola* e *P. glycinea* produziram e foram sensíveis a bacteriocinas utilizando meio sólido e meio líquido para detecção. A produção de bacteriocinas foi afetada pela profundidade do ágar, idade da cultura, tipo da colônia, quantidade do inóculo e temperatura. Também foi citado nesse mesmo trabalho que 100% de *P. syringae* produziram bacteriocina, 55% de *P. glycinea* e 8% de *P. phaseolicola* em temperatura entre 20 a 24°C, quando o ótimo das bactérias é 28°C.

Estudos com *Corynebacterium* spp visando à produção de bacteriocinas utilizando diferentes meios de cultura, foram feitos por ECHANDI (1976) e GROSS e VIDAVER (1970).

Na possível utilização das bacteriocinas como controle das doenças de plantas, os trabalhos de KERR (1972), NEW e KERR (1972) e HTAY e KERR (1974) mostram que os autores obtiveram cerca de 90% de sucesso nesse sentido, quando inocularam sementes ou raízes de pêssigo e cereja com bacteriocina produzida por uma linhagem não patogênica de *Agrobacterium radiobacter*. O controle foi obtido inoculando inicialmente a bacteriocina. Quando o patógeno foi inoculado primeiramente houve diminuição no controle.

ROBERTS e KERR (1974) verificaram que uma linhagem avirulenta de *Agrobacterium tumefaciens* foi sensível às mesmas bacteriocinas que outra linhagem virulenta, sugerindo que a patogenicidade não está associada à sensibilidade.

KERR e HTAY (1974) novamente obtiveram sucesso controlando galha de coroa pela linhagem 84 de *Agrobacterium radiobacter*, mostrando correlação entre sensibilidade da linhagem patogênica à bacteriocina 84 "in vitro" e o controle biológico em plantas. Porém uma linhagem de *A. tumefaciens*, produziu bacteriocina que foi ativa contra a linhagem 84 de *A. radiobacter*, mostrando que ao mecanismo de controle é muito mais complexo do que a simples morte pela bacteriocina.

VIDAVER (1976) em sua revisão sobre bacteriocinas mostra a possibilidade de controle de doenças de plantas através dessas substâncias, existindo algumas que já foram purificadas e ensaiadas contra certas doenças de plantas.

MOORE (1979) apresentou uma revisão detalhada sobre a linhagem 84 de *A. radiobacter* produtora de bacteriocina e seu emprego no controle da galha da coroa, mostrando que a bacteriocina possui um efeito preventivo e não curativo.

3.3. Resistência a drogas

As pesquisas sobre a resistência de bactérias a antibióticos e sobre o mecanismo genético dessa resistência referem-se na quase totalidade a bactérias de interesse médico, e as revisões de BRYSON e SZYBALSKI (1957), SCHNITZER e GRUNBERG (1957), WATANABE (1963), HELINSKI (1973) e TRABULSI, (1973) mostraram a complexidade do assunto.

Sobre a atividade de antibióticos em bactérias fitopatogênicas e desenvolvimento de resistência os trabalhos são menos frequentes. GILLIVER (1946) observou a ação de treze antibióticos em fungos e bactérias fitopatogênicas, incluindo *X. campestris*.

ARK (1947) verificou que estreptomicina em solução de 200 µg/ml era tóxica para catorze espécies de bactérias fitopatogênicas, para tratamento de sementes.

KATZNELSON E SUTTON (1951) estudando a atividade de seis antibióticos sobre bactérias fitopatogênicas, incluindo *X. campestris*, observaram que aureomicina foi o mais eficiente, inibindo o crescimento da maioria das espécies de *Xanthomonas* à concentração de 0,01 a 0,05 µg/ml.

SUTTON e BELL (1954), considerando a eficiência de aureomicina no controle de *X. campestris*, ensaiaram várias concentrações desse antibiótico e comprovaram que aureomicina em solução de concentração 1:1000 no tratamento de sementes foi o mais eficiente no combate da bactéria.

Alguns antibióticos, como terramicina, aureomicina, tetraciclina, neomicina, cuja ação eficiente contra bactérias fitopatogênicas, incluindo *X. campestris*, foi comprovada "in vitro", quando aplicados nas plantas mostraram-se fitotóxicos (ARK e STANLEY, 1956).

THIRUMALACHER *et alii* (1956) ensaiaram "in vitro" a eficiência de aureomicina, terramicina, penicilina, estreptomicina e cloranfenicol em trinta e duas espécies de *Xanthomonas*. Os antibióticos foram ensaiados por difusão em meio sólido nas concentrações de 20 µg/ml dos estreptomicina, 50 µg/ml de penicilina e 60 µg/ml dos outros antibióticos. Houve formação do halo de inibição para *X. campestris* de todos os antibióticos ensaiados, exceção feita à penicilina.

LINDENFELSER *et alii* (1958) verificaram que *X. campestris* era inibida por 80 µg/ml de duraminicina.

Trabalhos realizados por ECHEGARRY (1958), em laboratório e casa-de-vegetação e campo utilizando vários antibióticos, mostraram que estreptomicina sozinha ou combinada com outra substância foi a droga mais eficiente para o controle de bactérias fitopatogênicas.

Observando a ação de vancomicina sobre trinta espécies de bactérias fitopatogênicas, MEHTA *et alii* (1959) verificaram que *X. campestris* era inibida à concentração de 0,5 µg/ml.

QUADLING (1960) obteve mutantes resistentes de *Xanthomonas*, que também eram dependentes de estreptomicina; estudando a taxa de mutação espontânea e várias propriedades dos mutantes resistentes, observou que a resistência a altas con-

centrações de estreptomicina não afetou a patogenicidade da bactéria.

KLISIEWICZ e POUND (1961) conseguiram a inibição de *X. campestris* "in vitro" a 3000 ppm, empregando soluções aquosas de terramicina, agrimicina, estreptomicina, aureomicina e combinações de antibióticos.

AZEVEDO (1961) isolou mutantes de *X. campestris* resistentes a estreptomicina, penicilina e aureomicina.

KULYKOV'S'KA (1962) encontrou que a virulência de mutantes de *X. campestris* era mais fraca que da linhagem original.

Os estudos efetuados por AZEVEDO e NEDER (1963) revelaram que, dentre os mutantes resistentes e sensíveis à aureomicina, apenas o resistente teve taxa de crescimento sensivelmente reduzida em comparação com a linhagem selvagem e que misturas de linhagens sensíveis e resistentes a este antibiótico mostraram que com o tempo havia redução na porcentagem de células resistentes na população. O crescimento da linhagem original não diferiu do crescimento dos mutantes resistentes a estreptomicina e penicilina.

Em novos estudos, AZEVEDO *et alii* (1965) obtiveram mutantes resistentes a cinco antibióticos: penicilina, estreptomicina, aureomicina, cloranfenicol e eritromicina. Houve

um aumento de resistência em relação à linhagem original de quatro vezes para a penicilina, oito para o cloranfenicol, trinta e duas para a aureomicina e dezesseis a cento e vinte e oito vezes para a eritromicina e estreptomicina respectivamente. Em nenhum dos casos houve resistência cruzada ou sensibilidade colateral.

DESAL *et alii* (1967) verificaram que estreptomina inibiu o crescimento de dezenove espécies dos gêneros *Xanthomonas* e *Pseudomonas* "in vitro", sugerindo o uso desse antibiótico para o controle de doenças causadas por essas bactérias.

LEMOS (1969) isolou linhagens de *X. campestris* que naturalmente já eram resistentes a 1 µg/ml de aureomicina, ou seja, já eram cinquenta vezes mais resistentes que as linhagens obtidas oito anos antes. A linhagem mutante resistente a aureomicina começou a ser inibida "in vitro" com doses superiores a 8 µg/ml e "in vitro" com doses superiores a 16 µg/ml. Também foram obtidos mutantes resistentes a 64 µg/ml de estreptomicina observando-se que esses mutantes foram mais patogênicos que a linhagem da bactéria sensível (LEMOS *et alii*, 1972).

NAMASIVA e HEDGE (1971), trabalhando com cinco isolados de *X. campestris*, observaram que tetraciclina foi mais eficiente do que estreptomicina.

KNAUSS (1972) verificou que pulverizações com estreptomicina em plantas foram ineficientes no controle de *X. campestris*, sendo o patógeno isolado de meio com estreptomicina, mostrando o crescimento de colônias em altas concentrações da droga.

AZEVEDO (1973) demonstrou a importância do conhecimento do mecanismo genético da resistência a drogas, para que na prática se possa fazer um controle eficiente das doenças em plantas pelo uso de antibióticos. Controle foi obtido com sucesso em sementes pré-tratadas com aureomicina e que apresentaram uma percentagem muito baixa de plântulas infectadas por *X. campestris* após inoculação.

HABTE e ALEXANDER (1975) isolaram um mutante resistente a estreptomicina e que quando inoculado em solo, não perdeu sua viabilidade.

O uso intensivo de drogas na agricultura é estudado por BERGAMIN FILHO *et alii* (1975), onde foram estabelecidos conceitos e técnicas desenvolvidas para identificação de drogas, antes de sua comercialização quanto ao possível tempo de eficiência. Foram definidos três grupos de drogas de acordo com a modificação nas taxas de crescimento do mutante resistente em relação à linhagem original: drogas fortes, fracas e neutras. Outros aspectos do conceito de froça de drogas foram discutidos, inclusive suas implicações na terapia múltipla, no

valor evolutivo dos fatores R bacteriano e sua extensão a outros grupos.

Trabalhos detalhados sobre o uso de antibióticos no controle de doenças de plantas são mostrados por: STODDARD e DIMOND (1949), WEINDLING *et alii* (1950), ARK e STANLEY (1956), ZAUMEYER (1958), BARNETT (1959), DEKKER (1963) e PRADO FILHO (1975).

3.4. Transferência de resistência

À medida que o uso das drogas aumentava, as bactérias tornavam-se resistentes, mostrando que a mutação era causa do fenômeno e que as drogas, eliminando as bactérias sensíveis, favoreciam os mutantes resistentes. Essas pesquisas tomaram grande impulso quando foi demonstrado que a resistência múltipla a sulfonamida, estreptomicina, tetraciclina e cloranfenicol podia ser transferida entre *Shigella* e *Escherichia coli*, quando cultivadas juntas em meio líquido (WATANABE, 1963), e a expressão Fator R foi usada para significar fator de resistência facilmente transferível de célula para célula. Este fator R poderia ser considerado como composto de 2 unidades geneticamente distintas: um fator de transferência, o RTF ("resistance transfer factor"), e uma unidade que contém os genes para resistência ("r determinants").

WATANABE e FUKASAWA (1961) ao usarem amostras

F⁻ de *Escherichia coli* K₁₂ com várias marcas cromossômicas, observaram que os fatores responsáveis pela resistência eram transferidos, nas culturas mistas, independentemente da transferência do cromossomo e apresentaram a hipótese de que a transferência de resistência múltipla a drogas era feita por elemento extracromossômico de natureza epissômica, o Fator R.

Conforme cita MITSUHASHI (1969) a transferência múltipla é feita por conjugação, isto é, pelo contato de células com célula, uma vez que em presença de agitação a transferência não ocorre. Além disso, a resistência pode ser eliminada espontaneamente ou artificialmente.

ANDERSON (1968) e COHEN e MILLER (1970), através de evidências físicas e genéticas, sugeriram que em algumas amostras, tanto o RTF como os determinantes da resistência replicavam-se independentemente e que a replicação era regulada por diferentes mecanismos de controle.

Segundo DAVIS e ROWND (1972), a estabilidade da associação entre RTFs e "r determinants" para várias drogas parece variar com diferentes fatores R e, para um determinado Fator R, parece depender da célula hospedeira.

KERN (1969) demonstrou a transferência da resistência a três antibióticos de *Rhizobium japonicum* para *Agrobacterium tumefaciens* através de mecanismos de troca genética

que exclui a transformação e a transdução.

DATTA e HEDGES (1971) e WILLETS (1972) mostraram que muitas vezes não há transferência da marca para resistência e que essa perda pode envolver a presença de plasmídeos incompatíveis.

STANISICH (1972) verificou que *Pseudomonas aeruginosa*, recombinao com linhagens que apresentam plasmídeo para resistência a sal de mercúrio (NOVICK e RICHMOND, 1965), que é usado em desinfecção de sementes, adquirem essa resistência.

O sistema de conjugação entre *Erwinia amylovora*, patógeno de planta, foi estabelecido por CHATTERJEE e STARR (1973), e também houve sucesso na transferência do Fator R de outros membros da família Enterobacteriaceae para *Erwinia* spp (CHATTERJEE e STAR, 1972).

CHO *et alii* (1975) estudaram a transferência de plasmídeo do grupo P de espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas para *Erwinia* spp "in vitro".

PUGASSETTI e STARR (1975) mostram que determinantes genéticos de virulência em *Erwinia amylovora* podem ser transferidos por conjugação de um doador virulento para uma linhagem receptora avirulenta, tendo o primeiro trabalho com *Erwinia* mostrado isso. O doador foi tratado com acridina e

brometo de etídio e não perdeu a virulência, sugerindo que o determinante para virulência em *E. amylovora* é um elemento do cromossomo, ou, se for extracromossômico, ele é resistente ao tratamento com acridina e brometo de etídio sob as condições usadas.

A transferência por conjugação foi efetuada "in vitro" e na planta entre espécies de *Pseudomonas* fitopatogênicas LACY e LEARY (1975); os autores sugerem que a transferência do plasmídeo entre células fisiologicamente capazes não é limitado pelo hospedeiro ou não necessita de um relacionamento patogênico. A transferência parece ser independente do hospedeiro e é muito importante para a epidemiologia da resistência a antibióticos entre fitopatógenos.

PANOPOULOS *et alii* (1975) mostraram o mecanismo de transferência através da conjugação entre *Pseudomonas aeruginosa* com resistência a carbecilina, neomicina, canamicina e tetraciclina para espécies fitopatogênicas como *P. phaseolicola*, *P. pisi*. A frequência de transferência em alguns casos aumentou pela adição de sulfato de sódio ao meio de cultura e diferiu de acordo com o receptor. A fonte de variação não foi investigada com detalhes, mas inclui: diferentes tempos de incubação, variação na densidade de células, na taxa do doador para receptor, na presença ou ausência de nutrientes e estágio do crescimento da cultura doadora.

A transferência por conjugação tem sido estabelecida entre poucas espécies de bactérias fitopatogênicas e estudos preliminares com mapeamento de genes que determinam virulência em plantas foram feitos por PUGASETTI e STARR (1975).

WATSON *et alii* (1975) e ZAENEM *et alii* (1974) mostraram que a perda de plasmídeo resulta em perda de patogenicidade, enquanto que a introdução de plasmídeo virulento em uma linhagem avirulenta resulta em ganho de virulência.

Conjugação entre *Agrobacterium tumefaciens* na ausência da planta hospedeira foi descrita por LEVIN *et alii* (1976), onde *A. tumefaciens* funciona como doador ou receptor com razoável eficiência. O plasmídeo RP₄ foi transferido de *E. coli* para *A. tumefaciens* e desta para outras linhagens de *Agrobacterium*.

LAI *et alii* (1977), em uma primeira documentação sobre transmissão genética entre espécies de *Xanthomonas* através da conjugação, mostram a transferência de plasmídeos RP₄ e RK₂ de *E. coli* para *X. vesicatoria*. As linhagens que adquiriram a resistência foram capazes de transmiti-la a outras *Xanthomonas*, a *P. phaseolicola*, *E. chrysanthemi* e *A. tumefaciens*, mas não a *Corynebacterium michiganense*. Todos os transconjugantes exibiram resistência múltipla, e diferentes fontes de carbono no meio podem apresentar diferença na eficiência da

frequência de transmissão.

LACY (1979) apresentou uma revisão sobre o desenvolvimento do sistema genético em bactérias fitopatogênicas como resultado da transmissão de plasmídeo de *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Materiais

4.1.1. Meios de cultura

Os seguintes meios com suas respectivas fórmulas foram usados no presente trabalho:

Caldo nutriente

Extrato de carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Água destilada	1000 ml
pH final	7,2

Ágar nutriente

Caldo nutriente adicionado de 15 g de ágar.

Ágar nutriente semi-sólido:

Caldo nutriente adicionado de 7,5 g de ágar.

Meio com succinato de sódio

K_2HPO_4	7 g
KH_2PO_4	3 g
$(NH_4)_2SO_4$	1 g
$MgSO_4$	0,1 g
Succinato de sódio	5,0 g
Água destilada	100 ml

Os meios foram autoclavados a $121^{\circ}C$ durante 15 minutos.

4.1.2. Antibióticos

Os antibióticos usados e os laboratórios que os produzem são:

Penicilina G Patássica (Pn)	SQUIBB
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	Fontoura Wyeth INDústrias Farma cêuticas S/A.
Tetraciclina (Tc)	Pfizer Inc.
Sulfato de canamicina (Km)	Laboraterapêuti- ca Bristol S/A.

As soluções de antibióticos foram sempre preparadas momentos antes de serem utilizadas, dissolvendo-se a quantidade apropriada dos mesmos em água destilada esterilizada.

4.1.3. Hospedeiros e Origem dos isolados

Os isolados de *Xanthomonas campestris* (Pammel, 1895) Dowson, 1939, foram obtidos de plantas pertencentes ao gênero *Brassica*, provenientes de três regiões do Estado de São Paulo e são apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Relação dos isolados de *X. campestris* obtidos de diferentes variedades de *Brassica oleracea* e suas respectivas procedências.

Nº do isolado	Hospedeiro	Localidade
XC1	Repolho	Piracicaba
XC2	Repolho	Piracicaba
XC3	Couve	Piracicaba
XC4	Couve	Piracicaba
XC5	Repolho	Atibaia
XC6	Repolho	Atibaia
XC7	Repolho	Piracaia
XC8	Repolho	Piracaia
XC9	Couve	Piracaia
XC10	Repolho	Piracaia
XC11	Repolho	Atibaia
XC12	Couve	Atibaia
XC13	Repolho	Atibaia
XC14	Brócolos	Piracicaba
XC15	Couve	Piracicaba
XC16	Repolho	Atibaia
XC17	Repolho	Piracaia

4.2. Métodos

4.2.1. Isolamento do patógeno

Das folhas com lesões típicas da doença foi feito o isolamento do patógeno, adotando-se a técnica descrita por MASUDA e TOKESHI (1978), com algumas modificações. Essa técnica consistiu das seguintes etapas:

1. Corte de pedaços do tecido foliar na zona de transição entre a parte sadia e a parte afetada.

2. Esses pedaços foram lavados em solução de hipoclorito de sódio 0,5% durante 1 minuto e, em seguida, água destilada esterilizada.

3. O material foi colocado em uma lâmina esterilizada e, sobre o mesmo, adicionado uma gota de água esterilizada.

4. Foi feita a focalização da extremidade do vaso da região lesionada sob a lupa, observando-se intenso fluxo bacteriano.

5. Com auxílio de uma pipeta de Pasteur, tocou-se a extremidade do vaso, ocorrendo o desvio do fluxo para o interior da pipeta.

6. Esse material foi transferido para placas de

Petri contendo meio de ágar nutriente e espalhado com o auxílio da alça de Drigalsky.

7. As placas foram colocadas em estufa a 28°C.

Após 48 horas, foi possível observar crescimento de colônias individuais, sendo feita a transferência para tubos de ensaio contendo ágar nutriente.

4.2.2. Identificação do patógeno

Para a identificação das bactérias foram feitos os seguintes testes morfológicos e bioquímicos, segundo a metodologia de MANUAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS (1957) e ROMEIRO (1976): tipo de crescimento da cultura em tubos com caldo nutriente, tipo da colônia em placas com ágar nutriente, forma, motilidade, coloração de Gram, produção de gás silfídrico, redução de nitrato, hidrólise do amido, produção de indol, reação de vermelho de metila, prova de Voges Proskauer, fermentação em carboidratos.

O inóculo utilizado para os testes foi sempre proveniente dos isolados das bactérias cultivadas em tubos contendo 10 ml de caldo nutriente e incubados a 28°C durante 96 horas.

Para a classificação, usou-se o BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (BUCHANAN e GIBBONS, 1975).

4.2.3. Inoculação de plantas e reisolamento do patógeno

Para o preparo dos inóculos, os isolados das bactérias foram transferidos para 250 ml de caldo nutriente contidos em frascos erlenmeyer e incubados a 28°C durante 96 horas.

Após a incubação os inóculos foram diluídos em água destilada na proporção de 1:1, à qual se adicionou 1 gota do espalhante adesivo Tween 80.

As suspensões foram inoculadas por pulverização em plantas submeticas às condições de câmara úmida por 24 horas. Após a pulverização de toda a superfície das folhas, as plantas foram recolocadas na câmara úmida, onde permaneceram por mais 24 horas.

As plantas-controle foram pulverizadas apenas com o meio de cultura líquido diluído. Após 20 dias foi feito o reisolamento do patógeno, seguido de nova identificação.

4.2.4. Produção de bacteriocinas

Para se verificar a produção de bacteriocina, procedeu-se de acordo com a técnica descrita por AZEVEDO e COSTA (1973).

Os isolados eram transferidos para ágar nutrien

te e semeados com alça em forma de círculo com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro. Após 48 horas de incubação a 28°C, as placas eram irradiadas com luz ultra violeta distantes 15 cm das placas, durante 10 segundos, embrulhadas em papel laminado e novamente incubadas por mais 24 horas.

Após esse período, as placas eram invertidas e 1 ml de clorofórmio era colocado na tampa de cada uma delas; depois de 15 minutos estas eram entreabertas em ambiente asséptico durante 30 minutos para evaporação do clorofórmio.

A seguir, sobre o meio de cultura de cada placa, eram distribuídos 6 ml de ágar nutriente semi-sólido a 45°C, aos quais foi adicionado 1 ml de caldo nutriente previamente inoculado, contendo cada um dos isolados da bactéria, de modo a se obter uma película homogênea. Após 48 horas de incubação a 28°C, fazia-se a leitura através do halo de inibição. Cada isolado foi ensaiado como produtor de bacteriocina contra todos os isolados.

4.2.5. Determinação dos níveis de resistência

Os níveis de resistência foram determinados pelo método da diluição em placas, usando-se concentração crescente das drogas.

As placas foram preparadas no dia do uso, nelas vertendo-se 20 ml de ágar nutriente, mantido a cerca de 45°C,

e as soluções das drogas, para se obterem as concentrações finais de 1, 2, 4, 8, 16, 32 e 64 µg de estreptomicina e canamicina e 1, 2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512 e 1024 µg de penicilina por ml do meio de cultura. Para a tetraciclina, as seguintes concentrações finais foram usadas: 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64; 1,28 e 2,56 µg/ml do meio de cultura.

Depois de solidificado o meio, o excesso de umidade da superfície das placas era eliminado entreabrindo-se estas em ambiente asséptico.

Para a preparação das amostras, procedia-se da seguinte maneira: cada um dos 17 isolados de *X. campestris* era incubado a 28°C durante 96 horas e transferido para as placas com alça de níquel-cromo (multi-alça com 17 unidades).

Como controle da viabilidade das amostras, para uma placa era transferido apenas o meio de cultura.

Os resultados foram verificados após 72 a 96 horas de incubação a 28°C. Foi considerada como nível de resistência a concentração da droga imediatamente inferior aquela que impedia o crescimento da amostra.

4.2.6. Isolamento de mutantes resistentes a estreptomicina e frequência de mutação

O isolado que apresentou crescimento na maior

concentração de estreptomicina foi escolhido para funcionar como receptor no processo de transferência de resistência. Esse isolado foi transferido para 50 ml de caldo nutriente e, após 96 horas de incubação a 28°C, foi centrifugado a 3020 g (Sorvall RC2-B), por 30 minutos e ressuspensão em 5 ml de caldo nutriente.

Foi semeado 0,2 ml da ressuspensão em 25 placas com ágar nutriente mais 100 µg de estreptomicina por ml do meio de cultura. As colônias desenvolvidas após incubação a 28°C durante 96 horas correspondem às bactérias mutantes.

Para confirmação da mutação para resistência, essas colônias foram novamente transferidas para placas de Petri contendo ágar nutriente mais 0, 2, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000, 2000 e 5000 µg/ml de estreptomicina e incubadas a 28°C durante 96 horas, e o resultado foi comparado com a linhagem original.

O título da ressuspensão foi calculado semeando-se 0,1 ml de uma diluição conhecida em ágar nutriente sem estreptomicina, contando-se o número de colônias desenvolvidas após 96 horas de incubação a 28°C.

4.2.7. Transferência das marcas de resistência

Foi usado o processo de conjugação para a transferência da amostra possivelmente doadora (resistente a 1024

$\mu\text{g/ml}$ de penicilina + 8 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina), para as amostras receptoras (mutantes str_4 , str_{12} , str_{14} , obtidos da linhagem XC_5).

As amostras doadora e receptoras foram cultivadas isoladamente em 5 ml de caldo nutriente por um período de 18 horas. Após o cultivo, 1,5 ml da cultura doadora e 3 ml da cultura receptora foram transferidas para um mesmo tubo de ensaio, onde permaneceram por 18 horas a 28°C . Foi retirada uma alíquota de 0,1 ml da cultura mista e semeada em placas seletoras contendo 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina + 8 $\mu\text{g/ml}$ da canamicina + 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina.

Para a preparação das placas-controle, as amostras doadoras e receptoras foram inoculadas por estria, em posições opostas, nas placas preparadas da seguinte maneira:

a. a placa com ágar nutriente + 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina.

b. placa com ágar nutriente + 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina.

c. placa com ágar nutriente + 8 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina.

d. placa com ágar nutriente + 8 $\mu\text{g/ml}$ de canamicina + 100 $\mu\text{g/ml}$ de penicilina + 100 $\mu\text{g/ml}$ de estreptomicina.

e. placa com ágar nutriente sem droga.

Todas as placas foram incubadas durante 96 horas a 28°C.

A verificação da capacidade da amostra doadora de transferir a resistência para a amostra receptora foi feita de acordo com o quadro abaixo, onde o sinal + significa presença de crescimento e o sinal -, ausência de crescimento.

Placa	Crescimento esperado			
	Amostra receptora		Amostra doadora	
	Pn ⁻	Str ⁺	Pn ⁺	Str ⁻
a		+		-
b		-		+
c		-		+
d		-		-
e		+		+

Foi realizado um segundo experimento, onde o processo de transferência seguiu os mesmos passos do processo anterior, com a diferença apenas de que as amostras doadora, receptoras e as culturas mistas foram cultivadas em meio com succinato de sódio (LAI, *et alii*, 1977).

5. RESULTADOS

5.1. Isolamento e identificação do patógeno

Após a purificação dos 17 isolados, que foram obtidos a partir de plantas do gênero *Brassica* tipicamente infectadas (Tabela 1), e as aplicação dos testes morfológicos e bioquímicos para identificação (item 3.2.), esses isolados apresentaram as seguintes características morfológicas e bioquímicas:

Tipo de crescimento em caldo nutriente: turvação com formação de anel e película.

Tipo de colônia em ágar nutriente: amarela, redonda, lisa, brilhante, bordos inteiros.

Forma: bacilos

Motilidade: móveis

Temperatura ótima para desenvolvimento 28⁰C a 30⁰C.

Coloração de Gram: Gram negativa.

Produção de gás sulfídrico: positiva.

Redução de nitrato: negativa.

Hidrólise de amido: positiva.

Produção de indol: fracamente produzido.

Produção de vermelho de metila: negativa.

Prova de Voges Proskauer: negativa.

Fermentação em carboidratos: produziram ácido, mas não produziram gás de glucose, galactose, sacarose e lactose.

Pela chave de classificação do BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY, (BUCHANAN e GIBBONS, 1975), os 17 isolados foram classificados dentro do gênero *Xanthomonas*, e, na chave das espécies desse gênero, foram enquadrados em *X. campestris* (Pammel, 1895), Dowson, 1939.

5.2. Teste de patogenicidade e reisolamento.

No teste de patogenicidade, as plântulas apresentaram sintomas típicos de doença 7 dias após a inoculação.

Foi feito o reisolamento do patógeno, os quais foram submetidos a novos testes de identificação, mostrando tratar-se dos mesmos isolados.

5.3. Produção de bacteriocina

Quando se realizaram os testes cruzados para verificação da produção de bacteriocinas, utilizando os 17 isolados já citados neste trabalho, verificou-se que 8 (47%) foram capazes de produzir bacteriocinas.

A relação dos isolados produtores e dos isolados sensíveis a bacteriocinas encontra-se nas Tabelas 2 e 3.

Verifica-se que XC₁, produziu bacteriocina contra o maior número de isolados, porém foi também o que apresentou maior sensibilidade às bacteriocinas produzidas pelos outros isolados.

Os dados permitem-nos observar que 7 dos isolados indicadores foram resistentes a todos os tipos de bacteriocinas e, entre estes, 5 não produziram bacteriocinas.

Observa-se que todos os isolados produtores foram imunes à sua própria bacteriocina, sendo tal resultado compatível com o que se conhece sobre o mecanismo que rege a produção de bacteriocina (FREDERICQ, 1957).

Tabela 2. Sensibilidade dos 17 isolados de *X. campestris* como indicadores de bacteriocinas em comparação com os mesmos isolados como produtores.

Produtores	indicadores																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17
1	-	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-
2	±	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-
3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
8	+	-	-	±	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-
9	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	±	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ = presença do halo de inibição (ausência de crescimento da amostra indicadora).

- = ausência do halo de inibição (presença de crescimento da amostra indicadora).

± = pequeno halo de inibição.

Tabela 3. Relação dos isolados de *X. campestris* produtores de bacteriocinas e dos isolados sensíveis utilizados como indicadores.

Isolados Produtores	Isolados Sensíveis
XC ₁	XC ₂ , XC ₃ , XC ₄ , XC ₇ , XC ₈ , XC ₁₂ , XC ₁₃
XC ₂	XC ₁ , XC ₁₂ , XC ₁₃
XC ₄	XC ₁ , XC ₃ , XC ₇ , XC ₁₂
XC ₆	XC ₁ , XC ₃ , XC ₇ , XC ₈
XC ₇	XC ₁ , XC ₁₀
XC ₈	XC ₁ , XC ₄ , XC ₁₀ , XC ₁₃ , XC ₁₄
XC ₁₁	XC ₇ , XC ₈
XC ₁₂	XC ₁ , XC ₈

5.4. Níveis de resistência

Os resultados da distribuição dos níveis de resistência a drogas encontram-se na Tabela 4 e foram lançados em gráficos, um para cada droga (gráficos 1-4).

Com relação à penicilina, verificou-se que 58,6% dos isolados foram resistentes às concentrações de 8 a 16 $\mu\text{g/ml}$.

Para a estreptomicina, foi encontrado que 53% dos isolados apresentavam resistência a 2 $\mu\text{g/ml}$.

Os resultados referentes à canamicina foram bastantes variáveis; 35,3% dos isolados mostraram resistência a 1 $\mu\text{g/ml}$, havendo um decréscimo mais ou menos regular do número de isolados com o aumento da concentração do antibiótico.

O comportamento dos isolados frente à tetraciclina mostra que a quase totalidade, 70,59%, apresenta resistência a concentrações menores que 1 $\mu\text{g/ml}$ (Gráfico 5).

Tabela 4. Níveis de resistência de 17 isolados de *Xanthomonas campestris* expressa em μg da droga por ml de meio de cultura.

Isolados	Drogas			
	Pn	SM	KM	TC
XC ₁	2	4	2	< 1
XC ₂	4	2	4	2
XC ₃	8	2	8	< 1
XC ₄	8	4	4	< 1
XC ₅	4	8	1	< 1
XC ₆	4	2	1	< 1
XC ₇	8	4	1	< 1
XC ₈	16	4	4	< 1
XC ₉	16	2	1	< 1
XC ₁₀	16	4	1	1
XC ₁₁	1024	2	8	1
XC ₁₂	16	2	1	< 1
XC ₁₃	8	2	2	< 1
XC ₁₄	8	4	2	2
XC ₁₅	4	4	2	< 1
XC ₁₆	32	2	4	1
XC ₁₇	16	2	2	< 1

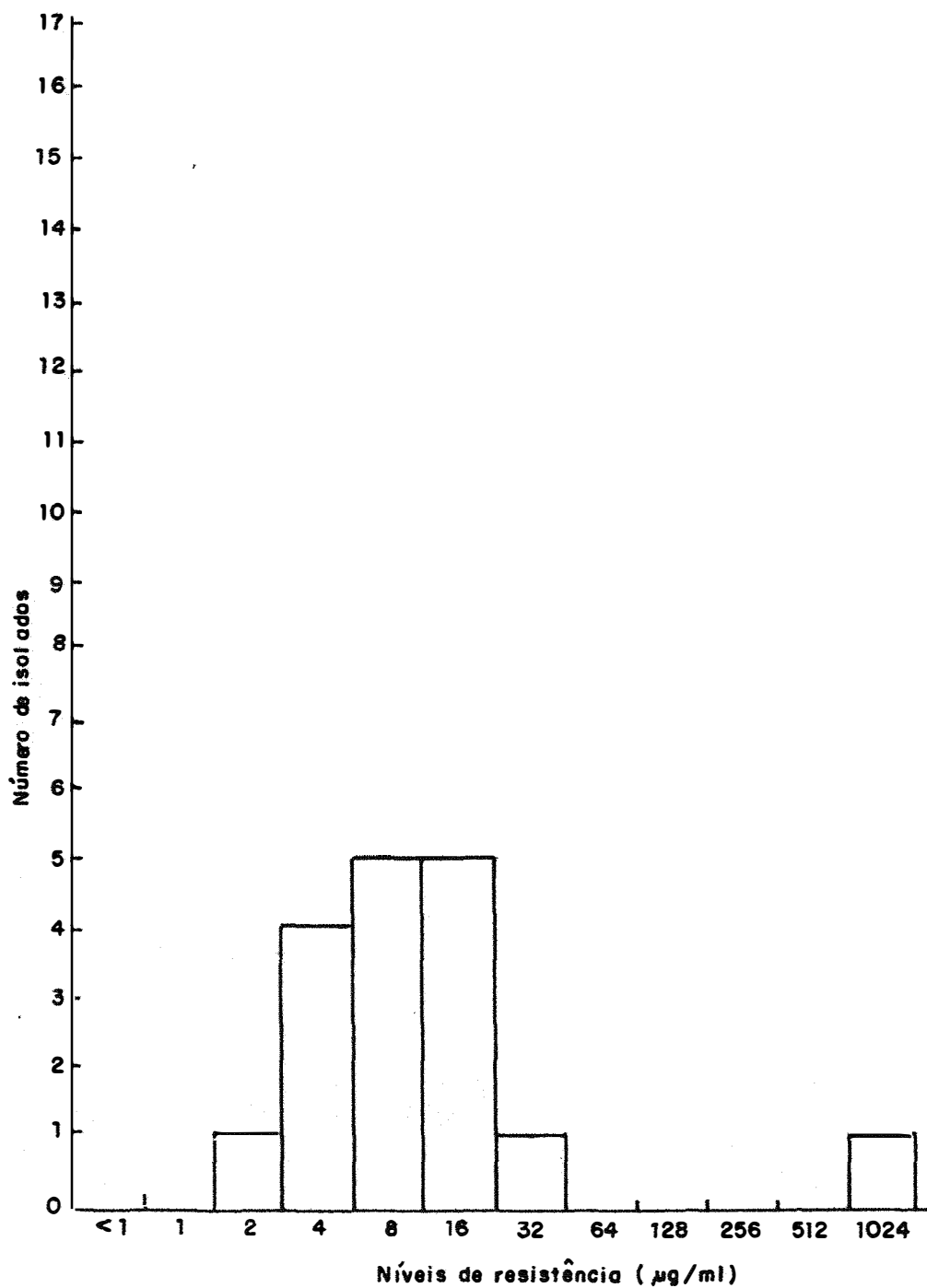


Gráfico 1. Distribuição dos níveis de resistência de 17 isolados de *Xanthomonas campestris* com relação a penicilina.

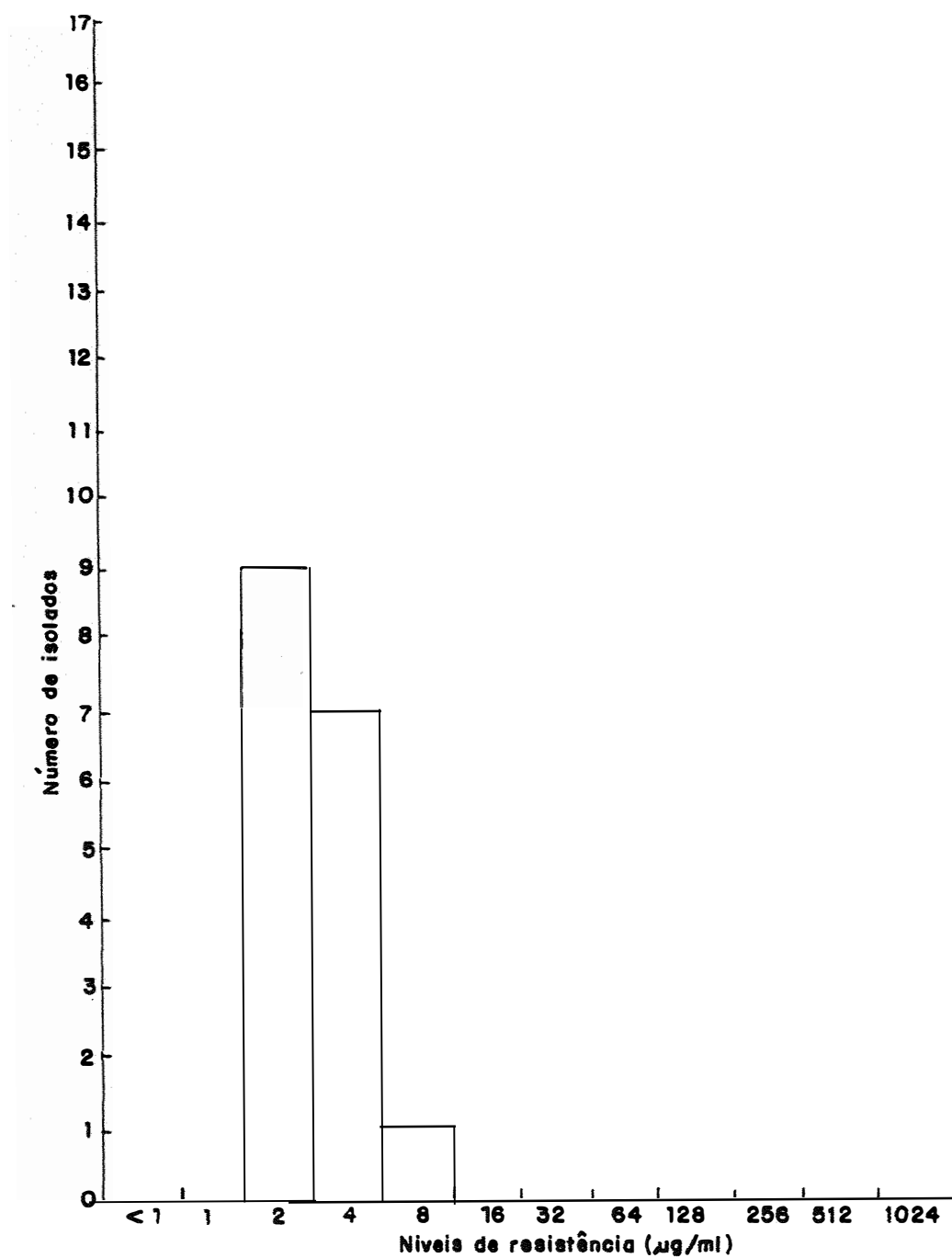


Gráfico 2. Distribuição dos níveis de resistência de 17 isolados de *Xanthomonas campestris* com relação a estreptomicina.

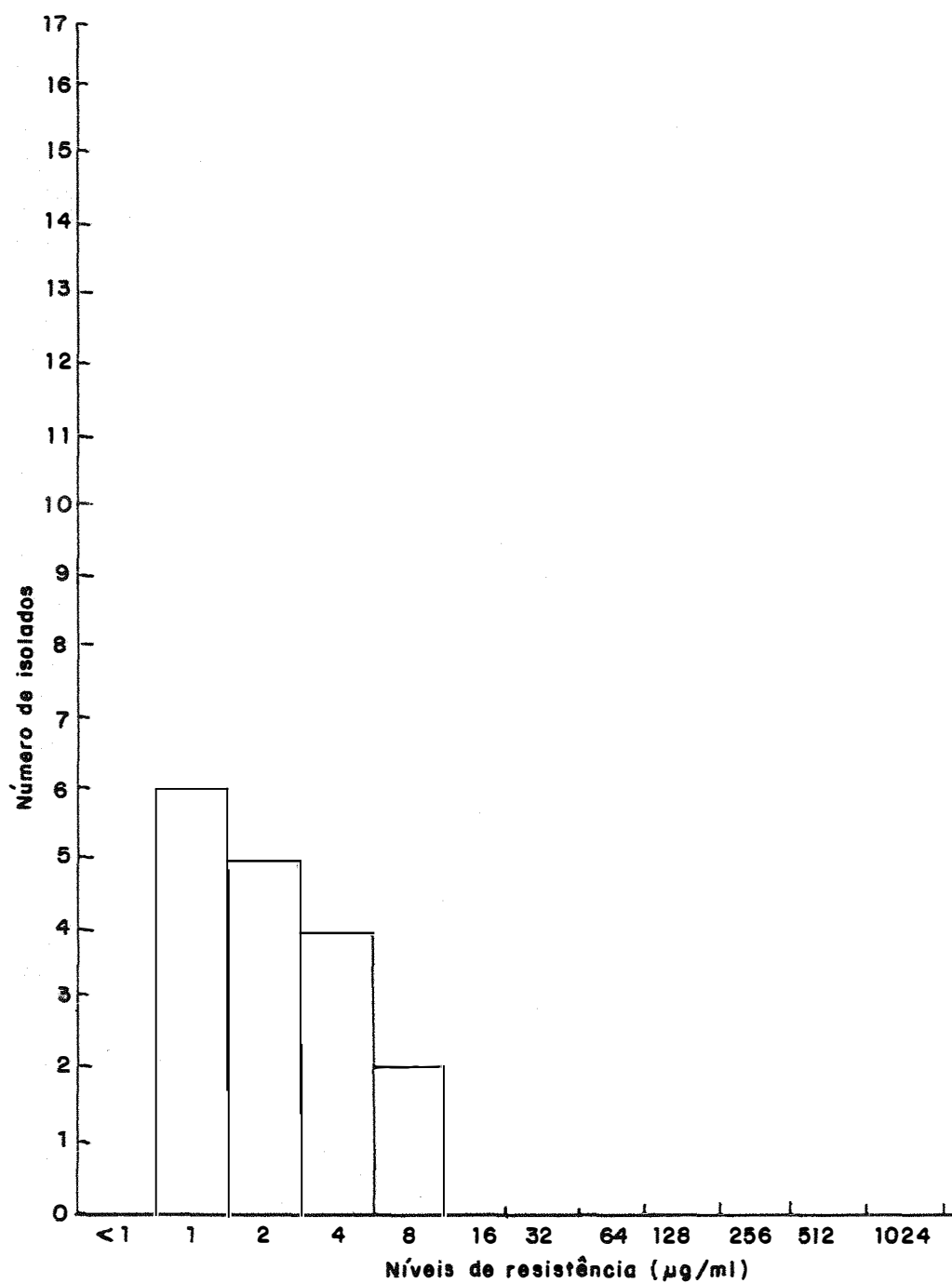


Gráfico 3. Distribuição dos níveis de resistência de 17 isolados de *Xanthomonas campestris* com relação à canamicina.

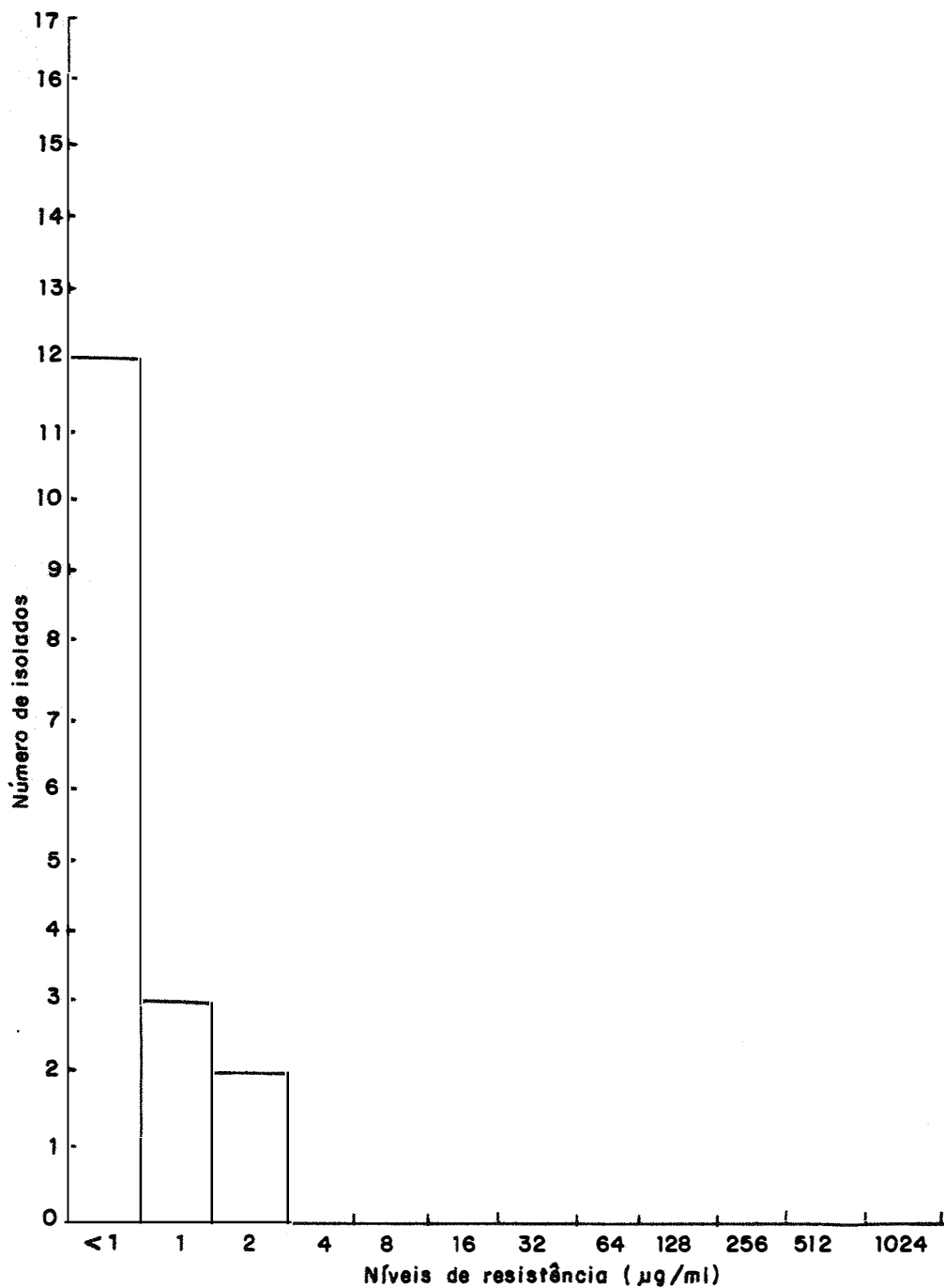


Gráfico 4. Distribuição dos níveis de resistência de 17 isolados de *Xanthomonas campestris* com relação à tetraciclina.

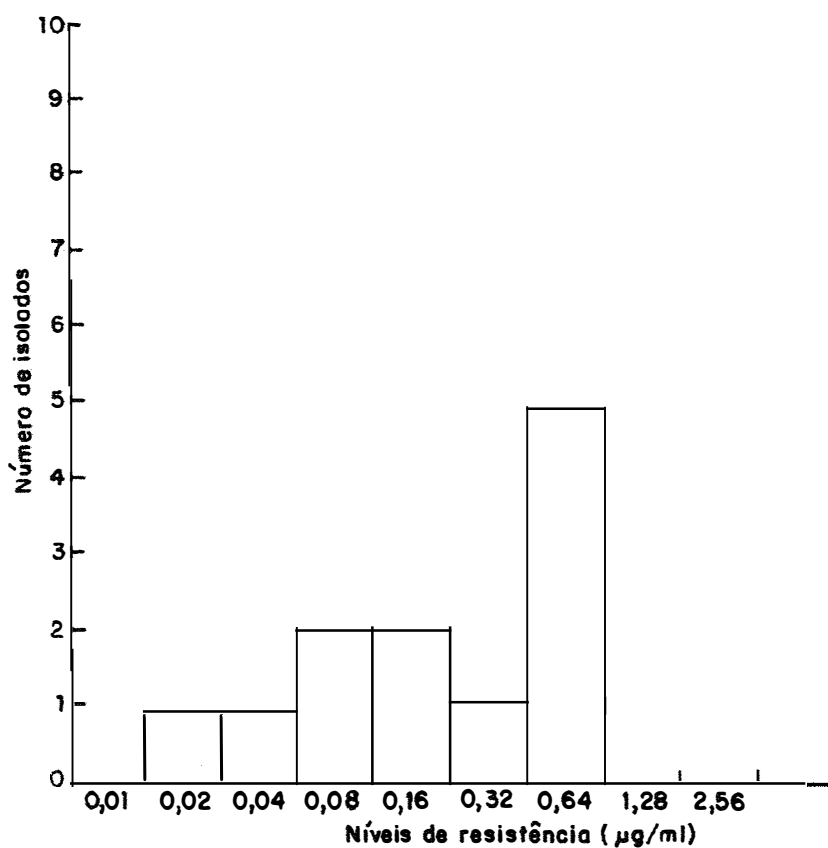


Gráfico 5. Distribuição dos níveis de resistência dos 12 isolados de *X. campestris* a concentrações menores que 1 µg/ml de tetraciclina.

5.5. Isolamentos e frequência de mutantes resistentes à estreptomicina.

Do isolado XC₅, que apresentou maior nível de resistência à estreptomicina (8 µg/ml), foram selecionadas 16 colônias que cresceram em ágar nutriente + 100 µg/ml de estreptomicina (item 3.2.6.). A comparação entre o isolado original e os mutantes, quanto aos níveis de resistência, é mostrada na Tabela 5.

Pelo controle feito, pode-se saber que nas 25 placas foi semeada uma população de 5×10^{10} de bactérias. Portanto, 16 colônias mutantes em uma população de 5×10^{10} bactérias sensíveis permitem dizer que a frequência de mutação nessa população e com essa concentração de antibióticos foi um mutante em $3,125 \times 10^9$ células de bactérias.

Tabela 5. Crescimento do isolado original (XC₅) em comparação com os 16 mutantes resistentes à estreptomicina em meio de ágar nutriente e diferentes concentrações da droga.

	concentração de estreptomicina (ug/ml)												
	0	1	2	5	10	20	50	100	200	500	1000	2000	5000
XC ₅	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
str ₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
str ₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
str ₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
str ₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
str ₅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
str ₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
str ₇	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
str ₈	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
str ₉	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
str ₁₀	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
str ₁₁	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
str ₁₂	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
str ₁₃	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
str ₁₄	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
str ₁₅	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
str ₁₆	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ = crescimento

- = ausência de crescimento

5.6. Transferência da resistência

A Tabela 6 apresenta o resultado obtido através do cruzamento entre o isolado de *X. campestris* (XC₁₁) que funcionou como doador e os mutantes str₉, str₁₄ e str₁₆, obtidos do isolado XC₅, que apresentaram resistência a 2000 µg/ml de estreptomicina e que funcionaram como receptores no processo de conjugação.

Tabela 6. Número de colônias resultantes do cruzamento entre o isolado doador XC₁₁, e as amostras receptoras em dois meios de cultura.

Meios de cultura	Amostras receptoras			
	str ₉	str ₁₄	str ₁₆	Controle
Ágar nutriente	25	34	11,66	0
Succinato de sódio	55	60	50	0

0,1 ml semeado

média de 6 placas.

As culturas doadora e receptora e as culturas mistas foram inoculadas em um primeiro experimento em ágar nutriente e, em um experimento posterior, em meio com succinato de sódio; porém, após o período de conjugação (18 horas), os

transconjugantes de ambos os experimentos foram semeados em meio de ágar nutriente. O Gráfico 6 mostra a diferença no resultado da conjugação nos dois meios de cultura.

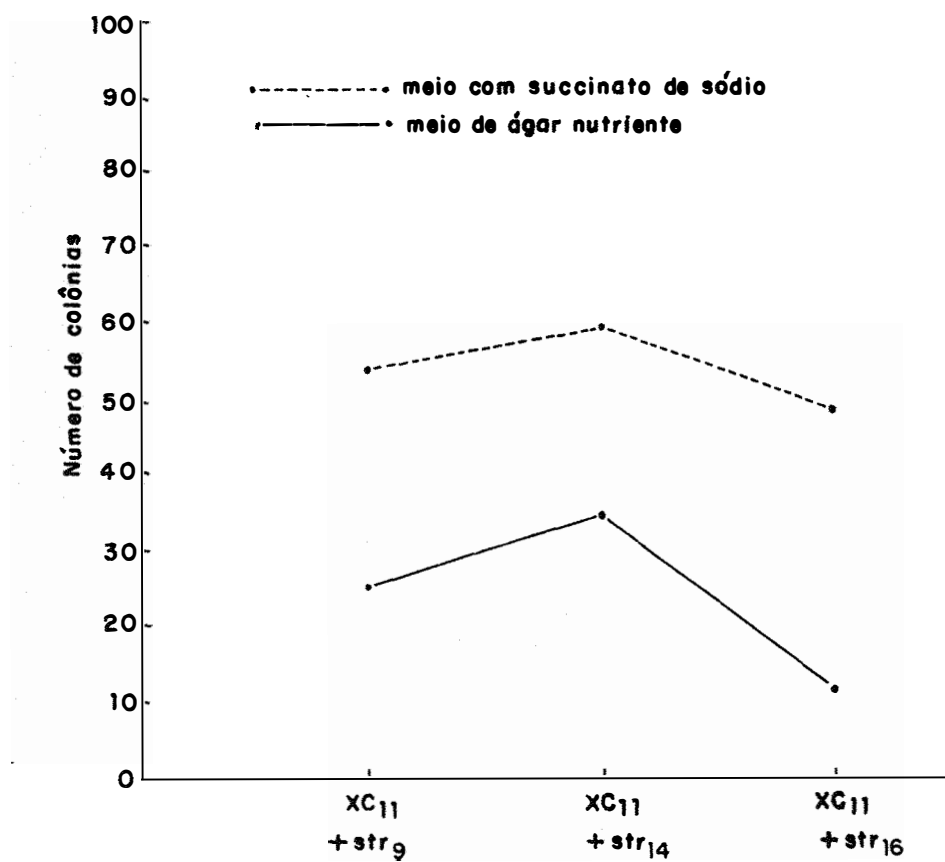


Gráfico 6. Número de transconjugantes, onde as culturas doadoras, receptoras e mistas foram inoculadas em dois diferentes meios de cultura.

6. DISCUSSÃO

6.1. Isolamento, identificação e teste de patogenicidade

O método de isolamento utilizado se prestou eficientemente para obtenção de *X. campestris* de várias plantas do gênero *Brassica*. As características morfológicas e bioquímicas apresentadas pelos 17 isolados coincidiram com as indicadas pelo BERGEY'S MANUAL OF DETERMINATIVE BACTERIOLOGY (BUCHANAN e GIBBONS, 1975), e comparando os isolados de diferentes espécies do gênero *Brassica* constatou-se que estes não apresentaram diferenças nos testes realizados, confirmando a opinião de HAYWARD (1966), de que a classificação de espécies dentro do gênero *Xanthomonas* deve ser baseada primeiramente em seu hospedeiro de origem.

No teste de patogenicidade todos os isolados foram eficientes, mostrando que *X. campestris* apresenta uma adaptabilidade a diferentes hospedeiros.

6.2. Bacteriocinas

Os resultados obtidos mostram que 47% dos isolados de *X. campestris* utilizados no presente trabalho produziu, bacteriocinas (Tabela 2). O número de isolados produtores de bacteriocinas na natureza varia de acordo com a espécie, como é citado por AZEVEDO (1977); assim, cerca de 15% de *Pseudomonas arizonae* isoladas da natureza produzem arizonacinas, 27% de *Enterobacter cloacae* produzem cloacinas, 35% de *Klebsiella pneumoniae* produzem pneumocinas, e, entre as bactérias fitopatogênicas, essa variação também se faz sentir. De fato, em *Erwinia carotovora* encontram-se 80% de isolados produtores de bacteriocinas e entre certas espécies de *Pseudomonas* (VIDAVER *et alii*, 1972) foram encontradas 100% de produtoras em *P. syringae*, 55% em *P. glycinae* e 8% em *P. phaseolicola*; isto indica que o caráter produção de bacteriocinas é importante, pois pode fornecer valiosas informações para a epidemiologia e caracterização dessas espécies bacterianas.

Os resultados aqui obtidos também mostram que não há relação entre isolados produtores e não produtores bem como resistência ou sensibilidade às bacteriocinas quanto a planta hospedeira e seu local de origem (Tabelas 1 e 3).

Dentre os 17 isolados analisados, o XC₁ é o que mais se presta como indicador da produção de bacteriocinas por outros isolados; de fato, através dele foi detectada produção de bacteriocina em 6 outros isolados (XC₂; XC₄; XC₆; XC₇; XC₈

e XC₁₂). Interessante também é o fato de que o isolado XC₁ é produtor de bacteriocina ou bacteriocinas, como indicado na Tabela 2. Talvez se o fator ou fatores responsáveis por essa produção fossem eliminados teríamos uma ótima linhagem testadora, pois apenas um isolado produtor de bacteriocina, o XC₁₁, não foi detectado como tal por XC₁. Se XC₁₁ produz um tipo de bacteriocina semelhante ao produzido por XC₁, este seria resistente a ela, mas, com eliminação dessa produção, talvez houvesse a possibilidade de obtenção de um XC₁ que fosse também indicador de bacteriocina produzida por XC₁₁. Em sequência ao isolado XC₁, também o XC₇ e XC₈ conseguem detectar um bom número de produtores de bacteriocinas (4 em 8).

Observa-se também que diversos isolados não produziram bacteriocinas pelo menos detectáveis com os isolados analisados. É o caso de XC₃, XC₅, XC₉, XC₁₀, XC₁₃, XC₁₄, XC₁₅, XC₁₆ e XC₁₇. No entanto, alguns deles têm diferentes comportamentos na sua sensibilidade a bacteriocinas dos isolados produtores e devem ser linhagens diferentes. Outros têm o mesmo comportamento, como acontece com XC₅, XC₉, XC₁₅, XC₁₆ e XC₁₇, que não produzem bacteriocinas e também não são inibidos por qualquer bacteriocina dos isolados em estudo. Outros testes, incluindo-se os serológicos, podem ser realizados para a verificação desses e outros isolados, caracterizando-se assim inclusive linhagens diferentes. Muito mais estudos, evidentemente, terão que ser realizados no intuito de uma melhor caracterização das bacteriocinas produzidas por *X. campestris*. A es-

pecificidade das mesmas, sua natureza química, sua observação em microscopia eletrônica são alguns passos a serem seguidos daqui para frente e que permitirão definir melhor tais bacteriocinas como campestricinas.

6.3. Resistência a antibióticos e mutantes resistentes.

Transferência de resistência

O comportamento dos isolados frente aos antibióticos (Tabela 4) mostra ser ainda a tetraciclina o antibiótico mais efetivo contra *X. campestris*, confirmando resultados encontrados por AZEVEDO (1961) e LEMOS (1969).

Foram encontrados níveis de resistência variando entre 2 a 4 µg/ml para estreptomicina, 1 a 8 µg/ml para canamicina, 2 a 1024 µg/ml para penicilina e 0,02 a 2 µg/ml para tetraciclina. Esses dados, embora tenham sido obtidos por uma metodologia um pouco diferente, podem ser comparados com aqueles obtidos por AZEVEDO (1961) e LEMOS (1969) para a estreptomicina, penicilina e tetraciclina. De fato, os níveis de resistência a estreptomicina encontrados nos isolados utilizados no presente trabalho foram bastante semelhantes aos encontrados por aqueles autores, incidando que não está havendo seleção de mutantes para resistência a esse antibiótico pelo menos nos locais onde os isolados foram obtidos. O mesmo já não se pode dizer com relação aos outros dois antibióticos; para a penicilina, níveis de cerca de 10 a 20 µg/ml foram encontrados

por AZEVEDO (1961), o que concorda com os níveis da maiorias dos isolados aqui analisados. No entanto, uma alta resistência à penicilina foi encontrada em um isolado (XC₁₁), sugerindo inclusive a presença de um plasmídeo de resistência, o que foi confirmado por cruzamento e transferência de resistência como será discutido logo mais adiante. Talvez, no entanto, o caso mais espetacular do aumento de resistência tenha sido encontrado com relação ao antibiótico tetraciclina. AZEVEDO, em 1961, encontrou níveis de resistência ao redor de 0,02 µg/ml para a espécie; oito anos mais tarde, LEMOS (1969) já encontrava níveis de resistência cerca de 50 vezes maiores (1 µg/ml) para essa droga. Esses dados foram discutidos por AZEVEDO (1973) que atribui esse aumento de resistência ao uso indiscriminado e abusivo da tetraciclina no tratamento de sementes da *Brassica*, o que estaria selecionando mutantes resistentes. Como o mecanismo de resistência é poligênico para esse antibiótico, o aumento de resistência é gradual e foi preconizado um maior nível de resistência em anos futuros caso o antibiótico continuasse a ser usado no tratamento de sementes de *Brassica*. De fato, os dados aqui obtidos confirmam essas previsões pois dois dos isolados (XC₂ e XC₁₄, Tabela 4) já são naturalmente resistentes a 2 µg/ml de tetraciclina, ou seja, um aumento de 100 vezes em relação aos dados obtidos em 1961.

A resistência à tetraciclina talvez não tenha atingido níveis ainda mais elevados (resistência maior que 2

µg/ml) devido à menor viabilidade de linhagens resistentes. Como bem explicado por BERGAMIN FILHO *et alii* (1975) através do conceito de drogas forte, neutra e fracas, foi mostrado como regra geral que, com a ausência da droga, há vantagem seletiva para células sensíveis em relação às resistentes. Assim, após algum tempo a população sensível acaba sobrepujando a população de células resistentes (GURGEL e AZEVEDO, 1975); BERGAMIN FILHO *et alii*, 1975).

Para a canamicina, níveis de resistência de 4 a 8 µg/ml foram encontrados, mas a literatura não cita dados com esse antibiótico em *X. campestris*, uma vez que ele praticamente não é usado no controle de doenças de plantas.

Com relação à frequência de mutação para resistência à estreptomicina, em um isolado analisado (XC₅) obteve-se a frequência de 1 mutante em $3,125 \times 10^9$ células de bactérias, o que concorda com a frequência obtida por LEMOS (1969), que foi de $3,04 \times 10^9$ células de bactérias.

Mutantes com níveis de resistência variando de 200 a 2000 µg/ml de estreptomicina foram obtidos (Tabela 5) mostrando que podem ocorrer mutações em diferentes sítios do mesmo gene que confere resistência à droga em questão e que condicionam diferentes respostas de resistência ao antibiótico. No entanto, nenhum deles foi dependente da droga pois houve crescimento em placas sem o antibiótico.

A utilização de XC₅ para obtenção de mutantes resistentes a estreptomicina foi baseada no fato de ser este isolado resistente a todas as bacteriocinas, não as produzindo, no entanto, o que o torna favorável para cruzamentos com outros isolados.

Três mutantes (str₉; str₁₄ e str₁₆) foram utilizados em cruzamentos com o isolado XC₁₁, que apresentou a característica de ser resistente a 1024 µg/ml de penicilina. Esses cruzamentos foram feitos no intuito de verificar se essa alta e inusitada resistência do isolado XC₁₁ à penicilina era devido a um elemento extracromossômico.

Houve a transferência de resistência à penicilina de XC₁₁, através de conjugação, para mutantes resistentes a estreptomicina do isolado XC₅. Nos dois meios de cultura utilizados, houve maior frequência no de succinato de sódio, confirmando as observações feitas por LAI *et alii* (1977), onde os autores sugerem que a adição de succinato de sódio seria o responsável pelo aumento na conjugação.

O isolado XC₁₁ com resistência elevada à penicilina deve ser então portador de um plasmídeo. Se isso é verdade, seria interessante verificar a origem de tal plasmídeo. Uma possibilidade, no entanto, é ter sido ele transferido para o isolado na natureza por uma bactéria portadora do plasmídeo R de resistência, uma vez que a pressão seletiva de uma *X. campestris* a esse antibiótico não é tão grande quanto a que ocorre

em outras espécies como, por exemplo, espécies de Enterobactérias. Embora Enterobactérias e bactérias fitopatogênicas vivam em habitats distintos, existem possibilidades amplas de contacto entre elas, como, por exemplo, através de água de irrigação contaminada.

A transferência de plasmídeos entre diferentes espécies e gêneros de bactérias já é bem estudada. Relacionado com bactérias fitopatogênicas, CHATERJEE e STARR (1972) obtiveram transferência de fator F'lac de *Escherichia coli* para diversas espécies de *Erwinia lac*; LACY e LEARY (1974) transferiram o plasmídeo RP₁ que confere resistência a drogas para *Pseudomonas glycinae* e *P. phaseolicola* e PANOPOULOS *et alii* (1975) transferiram um plasmídeo que confere resistência a drogas para *Pseudomonas* sp. BIAGI e AZEVEDO (1976) obtiveram sucesso na transferência de um plasmídeo R de *E. coli* para espécies de *Pseudomonas* e LAI *et alii* (1977) observaram a transferência dos plasmídeos RP₄ e RK₂ de *E. coli* para *Xanthomonas vesicatoria* e desta para outras espécies de *Xanthomonas*, para *Pseudomonas phaseolicola*, *Erwinia carotovora* e *Agrobacterium tumefaciens*. Evidentemente, outros estudos deverão ser efetuados para comprovar a existência de plasmídeo no isolado XC₅, tais como estudos com agentes que eliminam plasmídeo, seu isolamento e caracterização e sua relação com produção de bacteriocina. Estes estudos, se confirmarem a presença de um plasmídeo, poderão também elucidar a origem do mesmo.

7. CONCLUSÕES

Pelos dados obtidos durante a realização do presente trabalho foi possível concluir que:

1. Praticamente metade dos isolados de *X. campestris* estudados produziram bacteriocinas. No entanto, não houve relação entre produção de bacteriocinas, planta hospedeira e local de origem dos isolados.

2. Especialmente com relação à tetraciclina tem-se constatado um aumento de resistência natural da espécie ao longo dos anos, e isso deve ser devido ao uso desse antibiótico no tratamento de sementes para o controle da doença causada pela bactéria.

3. Um possível caso de plasmídeo transferível conferindo alta resistência à penicilina foi encontrado em um dos isolados analisados.

8. SUMMARY

This research was carried out aiming the detection of bacteriocins by *Xanthomonas campestris* isolates. It aimed also a study of the isolates resistance levels against antibiotics and a comparison among such levels and other previously found as a tentative to detect possible increases in these levels and possible actuation of extrachromossomic elements.

Seventeen *X. campestris* samples were isolated from different regions of the state of São Paulo and different *Brassica oleracea* varieties. The results indicated that 47% of the isolates are bacteriocins producers and some of them can be used as indicators for bacteriocins production by other isolates. There is no relation between such substances production and the variety or place from where the samples were isolated.

Concerning drug resistance, the resistance levels were: 2-4 $\mu\text{g/ml}$ to streptomycin; 1-8 $\mu\text{g/ml}$ for kanamycin, .02-2.00 $\mu\text{g/ml}$ for tetracycline and 2-1.024 $\mu\text{g/ml}$ for penicillin such data show that the tetracycline resistance has been increasing through the years, possibly due to mutants selection by the use of drugs in the bacteria control. A possible transferable plasmid which confers resistance to penicillin was found in one of the isolates.

9. LITERATURA CITADA

- ANDERSON, E.S., 1968. The ecology of transferable drug resistance in the enterobacteria. *Annual Review of Microbiology*, 22:131-180.
- 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.
- AZEVEDO, J.L., 1961. Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson, em relação a alguns antibióticos . Piracicaba ESALQ/USP, 48 p (Tese de Doutorado).

- AZEVEDO, J.L. e R.N. NEDER, 1963. Comparação entre o crescimento de *Xanthomonas campestris* (Pammel) linhagens mutantes resistentes a antibióticos e linhagens não mutantes. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba. 20:164-176.
- AZEVEDO, J.L.; R.N. NEDER e T.J.B. MENESES, 1965. Comportamento "in vitro" de uma bactéria fitopatogênica. *Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"*, Piracicaba. 22:61-79.
- AZEVEDO, J.L., 1973. Resistência aos antibióticos em bactérias fitopatogênicas. *Ciencia e Cultura* 25(4):326-329.
- AZEVEDO, J.L. e S.O.P. COSTA, 1973. *Exercícios Práticos de Genética*. São Paulo. Companhia Editora Nacional e Editora Universidade de São Paulo, 288 p.
- AZEVEDO, J.L., 1977. Tópicos de genética microbiana e molecular. *Genética de Procariotos*. Piracicaba, 207 p.
- BARNETT, H.L., 1959. Plant disease resistance. *Annual Review of Microbiology*. 13:191-210.
- BERGAMIN FILHO, A.; H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica* 1:31-42.

- BIAGI, C.M.R. e J.L. AZEVEDO, 1976. Transferência de plasmídeo R para espécies de *Pseudomonas*. In: Resumo do IX Congresso Brasileiro de Fitopatologia, Instituto Agronômico de Campinas, p. 66.
- BRADLEY, D.E., 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Reviews* 31:230-314.
- BROWN, N.A. e R.B. HARVEY, 1920. Heat rot, rib rot and leaf spot of chinese cabbage. *Phytopathology* 10: 81-90.
- BRYSON, V. e W. SZYBALSKI, 1957. Microbial drug resistance. *Advances in Genetics* 7:1-47.
- BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS (co-editors), 1975. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Eight Edition. Baltimore, Williams & Wilkins Company, 1268 p.
- CHATTERJEE, A.K. e M.P. STARR, 1972. Genetic transfer of episomic elements among *Erwinia* species and other Enterobacteria: F'^{lac}. *Journal of Bacteriology*, 111:169-176.
- CHATTERJEE, A.K. e M.P. STARR, 1973. Transfer among *Erwinia* spp., and other Enterobacteria of antibiotic resistance carried on R factors. *Journal of Bacteriology*, 112:576-584.
- CHO, J.J.; N.J. PANOPOULOS e M.N. SCHROTH, 1975. Genetic transfer of *Pseudomonas aeruginosa* F. factors to plant pathogenic *Erwinia* species. *Journal of Bacteriology*, 122: 192-198.

- COHEN, S.N. e C.A. MILLER, 1970. Non-chromosomal antibiotic resistance in bacteria. II. Molecular nature of R factors isolated from *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Journal Molecular Biology*; 50:671-687.
- COOK, A.A.; J.C. WALKER e R.H. LARSON, 1952. Studies on the disease cycle of blackrot of cruciferous. *Phytopatology*, 42:162-167.
- 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.
- DATTA, N. e R.W. HEDGES, 1971. Host ranges of R factors. *Journal of General Microbiology*, 70:453-460.
- DAVIES, J.E. e R. ROWND, 1972. Transmissible multiple drug resistance in *Enterobacteriaceae*. *Science*, 176:758-768.
- DEKKER, J., 1963. Antibiotics in the control of plant diseases. *Annual Review of Microbiology*, 17:243-262.
- DE LEY, J., 1964. *Pseudomonas* and related genera. *Annual Review of Microbiology*, 18:18-39.
- DE LEY, J. e J. FRIEDMAN, 1965. Similarity of *Xanthomonas* and *Pseudomonas* deoxyribonucleic acid. *Journal of Bacteriology*, 89:1306-1309.

- DESAL, S.G.; M.K. PATEL e M.V. DESAL, 1967. "In vitro" activity of streptocycline against bacterial plant pathogens. *Indian Phytopathology* 20(4):296-300.
- DE VAY, J.E.; F.L. LUKEZIC, S.L. SINDEN, H. ENGLISH e D.L. COPLIN, 1968. A biocide produced by pathogenic isolates of *Pseudomonas syringae* and its possible role in the bacterial canker disease of peach trees. *Phytopathology*, 58:95-101.
- DYE, D.W., 1962. The inadequacy of the usual determinative tests for the identification of *Xanthomonas* spp. *New Zealand Journal of Science*, 5:393-416.
- DYE, D.W. e R.A. LELLIOTT, 1975. Genus II. *Xanthomonas* Dowson 1939. In: BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS (co-editors). *Bergey's Manual fo Determinative Bacteriology* 8. ed. Baltimore, Williams & Wilkins Company, p. 243-249.
- 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.
- FREDERICQ, P., 1948. Actions antibiotiques réciproques chez les Enterobateriaceae. In: REEVES, P., 1972. *The bacteriocins*. Molecular Biology, Biochemistry and Biophysics. Springer Verlag, New York 11:142 p.

- FREDERICQ, P., 1957. Colicins. *Annual Review of Microbiology* 11:7-22.
- 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.
- GILLES, 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. *Annual of Botany*. 10:271-282.
- GOVAN, J.R.W. e R.R. GILLES, 1969. Further studies in the pyocine typing of *Pseudomonas pyocyanea*. *Journal Microbiology* 2:17-25.
- GROSS, D.C. e A.K. VIDAVER, 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corybacterium* species. *Canadian Journal of Microbiology* 25(3):367-374.
- GURGEL, J.T.A. e J.L. AZEVEDO, 1975. Resistência de microrganismos aos antibióticos. In: LACAZ, C.S. *Antibióticos*, 3a. Edição. São Paulo. Edgard Blücher Editora, p. 234-253.
- HABTE, M. e M. ALEXANDER, 1975. Protozoa as agents responsible for the decline of *Xanthomonas campestris* in soil. *Applied Microbiology*, 29:159-164.

- HAMON, Y.; M. VERON e Y. PERON, 1961. Contribution a l'etude des proprietes lysogenes et bacteriocinogenes dans le genre *Pseudomonas*. *Annales de L'Institut Pasteur* Paris. 101: 738-753.
- HAMON, Y. e Y. PERON, 1963. Étude du pouvoir bactériocinogène dans le genre *Cloaca*. *Annales de L'Institut Pasteur*. Paris 104:127-131.
- HARTING, A.M.; A.J. HEDGES e R.C.W. BERKELEY, 1972. Methods for studying bacteriocins. In: NORRIS, J.R. e D.W. RIBBONS. *Methods in Microbiology*. New York, Academic. v. 7A p. 315-422.
- HAYWARD, A.C., 1966. Methods of identification in the genus *Xanthomonas*. In: GIBBS, B.M. e F.A. SKINNER. *Identification methods for Microbiologists*. London Academic part A. p. 9-14.
- HELINNSKI, D.R., 1973. *Annual Review of Microbiology* 27:437-470.
- HERTMAN, I. e R. BEN-GURION, 1958. A study of pesticin biosynthesis. *Journal of General Microbiology*, 21:135-143.
- HTAY, K. e A. KERR, 1974. Biological control of crown gall seed and root inoculation. *Journal of Applied Bacteriology*, 37:525-530.

- IVÁNOVICS, G., 1962. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. *Bacteriological Reviews*, 26: 108-118.
- JACOB, F.; L. SIMONOVITCH e E. WOLLMAN, 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et sur son mode d'action. *Annales de L'Institut Pasteur* 83: 295-315.
- KATZNELSON, H. e M.D. SUTTON, 1951. Inhibition of plant pathogenic bacteria "in vitro" by quaternary ammonium compounds. *Canadian Journal*, 29:270-278.
- KERN, H., 1969. Interspecific transformations of *Agrobacterium tumefaciens* and *Rhizobium leguminosarum*. *Archiv Mikrobiologie* 56:63-69.
- 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* 4:37-44.
- 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.
- KNAUS, J.F., 1972. Resistance of *Xanthomonas* isolates to streptomycin. *Plant Disease Reporter* 56(5): 394-397.

- KULYOVS'KA, M.D., 1962. Changes in certain biological properties of *Xanthomonas campestris* under the effect of thiosulfe-acid ethers (Abstract). *Biology Abstract* 39: 20651.
- LACY, G.H. e J.V. LEARY, 1975. Transfer of antibiotic resistance plasmid RP₁ into *Pseudomonas glycinea* and *Pseudomonas phaseolicola* in vitro and in plant. *Journal General of Microbiology* 88:49-57.
- LACY, G.H., 1979. Systems in phytopathogenic bacteria. *Annual Review of Phytopathology* 17:181-202.
- LAI, M.; N.J. PANOPOULOS e S. SHAFFER, 1977. Transmission of R plasmid among *Xanthomonas* spp. and other plant pathogenic bacteria. *Phytopathology* 67:1044-1050.
- LEMOS, M.A., 1969. Comportamento de mutantes de *Xanthomonas campestris* (Pam.) Dowson resistentes à aureomicina e à estreptomomicina em relação ao tratamento de sementes de repolho (*Brassica oleracea* var. *capitata*) com êsses antibióticos. Piracicaba ESALQ/USP. 60 p. (Tese de Mestrado).
- LEMOS, M.A.; R.N. NEDER e J.L. AZEVEDO, 1972. *Revista da Microbiologia*.
- LEVIN, R.A.; S.K. FARRAND, M.P. GORDON e E.W. NESTER, 1976. Conjugation in *Agrobacterium tumefaciens* in the absence of plant tissue. *Journal of Bacteriology*, 127:1331-1336.

- LINDENFELSER, L.A.; T.G. PRIDHAM; O.L. SHOTWELL e F.H. STODOLA, 1958. Antibiotics against plant disease. IV. Activity of duramycin against selected microorganisms. *Antibiotics Annual* 58:241-247.
- MANUAL OF MICROBIOLOGICAL METHODS, 1957. Society of American Bacteriologists. Committee on bacteriological technic McGraw-Hill, New York, 315 pp.
- MASUDA, Y. e H. TOKESHI, 1978. A useful method for diagnosis and isolation of *Xanthomonas albilineans* (ASHY) Dowson, causal agent of leaf scald in sugarcane. *Sugarcane Pathologists Newsletter* maio: 20-22.
- MEIER, D., 1934. A cytological study of the early infection stages of the blackrot of cabbage. *Bulletin Torrey Botany*, 61:173-190.
- MEHTA, P.P.; D. GOTTLIEB e D. POWELL, 1959. Vancomycin, a potencial agent for plant disease prevention. *Phytopathology* 49:177-183.
- MISAGHI, J. e R.G. GROGAN, 1969. Nutritional and biochemical comparasions of plant pathogenic and saprophytic fluorescent pseudomonads. *Phytopathology*, 59:1435-1450.
- MITSUHASHI, S., 1969. The R factors. *Journal Infect. Disease* 119:89-100.

- MOORE, L.W., 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Annual Review of Phytopathology* 17:163-179.
- NAMASIVAYAM, L. e R. K. HEDGE, 1971. Studies on the black rot of crucifers caused by *Xanthomonas campestris*. *Journal of Agricultural Sciences* 5 (3):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., 1967. Colicins and related bacteriocins. *Annual Review of Microbiology*, 21:257-284.
- NOVICK, R.P. e M.H. RICHMOND, 1965. Nature and interactions of the genetic elements governing penicillinase synthesis in *staphylococcus aureus*. *Journal of Bacteriology*, 90: 467-480.
- OKABE, N. e M. GOTO, 1963. Bacteriophages of plant pathogens. *Annual Review of Phytopathology*. 1: 397-418.
- PANOPOULOS, N.J.; W.V. GUIMARÃES; J.J. CHO e M.N. SCHROTH, 1975. Conjugative transfer of *Pseudomonas aeruginosa* R factors to plant pathogenic *Pseudomonas* spp. *Phytopathology*. 65:380-388.

- PRADO FILHO, L.G., 1975. Emprego de antibiótico na agricultura. In: LACAZ, C.S. *Antibióticos*, São Paulo, 3a. ed. Edgard Blücher Editora p. 472-509.
- PUGASETTI, B.K. e M.P. STARR, 1975. Conjugational transfer of genes determining plant virulence in *Erwinia amylovora*. *Journal of Bacteriology*, 122:485-491.
- QUADLING, C., 1960. Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *Canadian Journal of Microbiology*. 6:387-396.
- REEVES, P., 1965. The bacteriocins. *Bacteriological Reviews*, 29:24-45.
- REEVES, P., 1972. *The bacteriocins*. Springer-Verlag. New York, 142 p.
- ROBERTS, W.P. e A. KERR, 1974. Crown gall induction serological reactions C and to bacteriocin, of pathogenic and non-pathogenic strains of *Agrobacterium radiobacter*. *Physiology Plant Pathology*. 4:81-91.
- ROMEIRO, R.S., 1976. Manual de classificação de bacterias fitopatogênicas. Viçosa. Minas Gerais, 91 p.
- SANDS, D.C.; M.N. SCHROTH e D.C. HILDEBRAND, 1970. Taxonomy of phytopathogenic pseudomonads. *Journal of Bacteriology* 101: 9-23.

- SCHNITZER, R.J. e E. GRUMBERG, 1957. *Drug resistance of micrororganisms*. New York. Academic Press. 395 p.
- STANISICH, V.A., 1972. Interaction between an R-factor and a mercury resistance determinant in *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal General of Microbiology* 73:11.
- STARR, M.P., 1959. Bacteria as plant pathogens. *Annual Review of Microbiology* 13:211-238.
- STODDARD, E.M. e A.E. DIMOND, 1949. The chemotherapy of plant diseases. *Botany Review* 15(6): 345-376.
- STONIER, T., 1960. *Agrobacterium tumefaciens* Conn II. Production of an antibiotic substance. *Journal of Bacteriology*. 79:889-898.
- SUTTON, M.D. e W. BELL, 1954. The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of blackrot (*Xanthomonas campestris*). *Plant Disease Reporter* 38:547-552.
- THIRUMALACHER, M.J.; M.K. PATEL, N.B. KULKARNI e G.H. DHAND, 1956. Effects "in vitro" of some antibiotics on thirty-two *Xanthomonas* species occurring in India. *Phytopathology* 46: 486-488.
- TRABULSI, L.R., 1973. Aspectos médicos da resistência bacteriana a drogas. *Revista da Microbiologia*. Suplemento especial.

- VIDAVER, A.K.; M.L. MATHYS; M. THOMAS e M. SCHUSTER, 1972.
Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea* e *P. phaseolicola*. *Canadian Journal of Microbiology*. 18:705-713.
- VIDAVER, A.K., 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. *Annual Review of Phytopathology* 14:451-465.
- WALKER, J.C., 1965. *Patlogia vegetal*. Barcelona. Editora Omega. 818 p .
- WATANABE, T. e T. FUKASAWA, 1961. Epissome-mediated transfer of drug resistance in *Enterobacteriaceae*. I. Transfer of resistance factors by conjugation. *Journal of Bacteriology* 81:669-678.
- WATANABE, T., 1963. Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. *Bacteriological Reviews*. 27:87-115.
- WATANABE, T., 1972. Infectious drug resistance in bacteria. *Current topics in Microbiology and Immunology*. 56:43-98.
- WATSON, B.; T.C. CURRIER; M.P. GORDON; M.D. CHILTON e E.W. NESTER, 1975. Plasmid required for virulence of *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bacteriology*. 123:255-264.

- WEINDLING, R.; H. KATZNELSON e H.P. BEALE, 1950. Antibiotics in relation to plant disease. *Annual Review of Microbiology*. 4:247-260.
- WILLETS, N.S., 1972. *Annual Reviews of Genetics*. 5:257-268.
- ZAENEN, I.; N. VAN LAREBEKE; H. TEUCHY; M. VAN MONTAGUE e J. SCHELL, 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall-inducing *Agrobacterium* strains. *Journal Molecular Biology*. 86:109-127.
- ZAUMEYER, W., 1958. Antibiotics in the control of plant diseases. *Annual Review of Microbiology*. 12:415-440.