

ATIVIDADE BACTERIOCINOGÊNICA E CAPACIDADE
COMPETITIVA ENTRE ESTIRPES DE *Rhizobium phaseoli*.

SÉRVIO TÚLIO ALVES CASSINI

Orientador: PROF. 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.

PIRACICABÁ
Estado de São Paulo - Brasil
Setembro - 1980

Aos meus pais,
pela alegria de viver;
Aos meus irmãos,
pela felicidade de os ter,

O F E R E Ç O.

AGRADECIMENTOS

- Ao Prof. Dr. *João Lúcio de Azevedo*, a valiosa orientação.
- À Profa. Dra. *Alaides Puppim Ruschel*, as facilidades de trabalho concedidas na Seção de Microbiologia do Solo, CENA, bem como as sugestões apresentadas na execução deste trabalho.
- À Profa. Dra. *Siu Mui Tsai Saito*, a amizade, acompanhamento constante e incentivo diário no decorrer da parte experimental.
- Ao Prof. *Walter V. Guimarães*, o alto espírito universitário demonstrado no encaminhamento do autor na pesquisa.
- À *Flávia Maria de Oliveira*, a amizade, incentivo e revisão crítica dos manuscritos.
- À *Iraci Castilho*, técnica de laboratório da Seção de Microbiologia do Solo do CENA, o prestimoso auxílio na coleta de dados.
- Ao colega *Hiroshi Noda*, o companheirismo e auxílio nas análises estatísticas.
- Aos colegas *Consuelo Margarida R. de Biagi* e *Walter Becker*, a cessão de linhagens bacterianas.
- À *Ilza Maria Sittolin*, a amizade e o valioso auxílio nos testes serológicos.

- Aos colegas de pós-graduação, especialmente *Maria José Valarini, Margarete Camargo, Teresa Losada Valle, Aline Pizzirani Kleiner, Arivaldo Sant'Anna, José Pinto de Siqueira Junior*, o elevado espírito de companheirismo e amizade.
- Aos funcionários do Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética da ESALQ, Srs. *Antonio José R. Campos, Luiz Próspero, Rodolfo Fulini e Orlando B. Cardoso*, os serviços técnicos prestados.
- Aos funcionários e estagiários da Seção de Microbiologia do solo do CENA, a solicitude e presteza no atendimento.
- À *Universidade Federal de Viçosa*, a oportunidade da realização do curso.
- Ao *Instituto de Genética (ESALQ/USP)* e ao *Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA/USP)*, as facilidades de trabalho oferecidas.

Desnecessário seria aqui reafirmar as qualidades humanas e culturais do Prof. *JOÃO LÚCIO AZEVEDO*. Porém, não poderia deixar de cair neste lugar-comum, como uma maneira simples de render-lhe uma homenagem.

O Autor.

Í N D I C E

	<u>Página</u>
1. RESUMO	1
2. INTRODUÇÃO	3
3. REVISÃO DE LITERATURA	6
3.1. Bacteriocinas	6
3.2. Resistência a drogas	13
3.3. Competição	17
4. MATERIAL E MÉTODOS	22
4.1. Material	22
4.1.1. Bactérias	22
4.1.2. Meios de cultura	25
4.1.3. Drogas e sua origem	26
4.1.4. Soluções	27
4.2. Métodos	28
4.2.1. Caracterização das estirpes	28
4.2.2. Determinação dos níveis de resistência a drogas ..	31
4.2.3. Produção de bacteriocinas	32
4.2.4. Avaliação da capacidade competitiva	33
5. RESULTADOS	42
5.1. Características culturais das estirpes	42
5.2. Eficiência de fixação de nitrogênio	43
5.3. Produção de bacteriocinas	46
5.4. Níveis de resistência a drogas antimicrobianas	48
5.5. Obtenção de mutantes resistentes a antibióticos	53
5.6. Capacidade competitiva	54

1. RESUMO

Trinta e seis estirpes de *Rhizobium phaseoli* foram estudadas quanto às suas características culturais, eficiência de fixação de nitrogênio, nível de resistência a drogas antimicrobianas, produção de bacteriocinas e capacidade competitiva entre determinadas estirpes.

A maioria das estirpes de *R. phaseoli* caracterizaram-se como produtoras de ácido e crescimento rápido (3-5 dias) em cultura pura. A eficiência de fixação de nitrogênio variou de estirpe para estirpe, verificando-se em algumas delas, uma eficiência relativa em torno de 50%.

Os níveis de resistência natural das estirpes, frente a sete drogas antimicrobianas, variaram, em $\mu\text{g}/\text{mL}$, de 1 a 10 para Estreptomicina, 1 a 20 para Espectinomicina, 1 a 50 para Cloranfenicol, 1 a 50 para Penicilina, 1 a 10 para Rifampicina, 0,01 a 0,1 para Tetraciclina e de 1 a 5 para Bicloreto, de Mercúrio. Com base nas frequências destes níveis na população ensaiada, constatou-se em praticamente todos os casos, uma distribuição unimodal que a caracteriza como uma população sensível a tais drogas.

Detectou-se a produção de bacteriocinas em 25% das estirpes analisadas, sendo que o antagonismo observado é altamente específico e a atividade bacteriocinogênica se mantém estável após passagem pela planta hospedeira.

Os ensaios de competição entre três estirpes consideradas, não evidenciaram a vantagem seletiva da bacteriocinogênica sobre as demais. Observou-se, porém, a baixa capacidade de nodulação e eficiência de fixação de nitrogênio das estirpes mutante resistentes a antibióticos em relação às mesmas estirpes normais. Verificou-se ainda, a alta capacidade competitiva das estirpes nativas em relação às estirpes normais e mutantes utilizadas como inoculante.

2. INTRODUÇÃO

O gênero *Rhizobium* é constituído por bactérias gram negativas, que normalmente fazem parte da flora autóctone do solo. Apresentam a notável peculiaridade de interação com o sistema radicular de plantas leguminosas, desenvolvendo uma simbiose mutualística através da formação de estruturas nodulares, onde se processa a fixação do nitrogênio, essencial ao desenvolvimento da planta.

Com a crise mundial do petróleo, a partir do início da década dos 70s, tornou-se imperativo a busca de fontes alternativas de adubos nitrogenados para a elevação dos níveis de produção de alimentos sem a conseqüente elevação dos seus custos. Neste particular, destaca-se o papel dos microorganismos fixadores de nitrogênio e, especialmente, *Rhizobium*, que oferecem uma fonte barata e, praticamente, inesgotável de nitrogênio combinado.

O Brasil é o maior produtor mundial de feijão (VIEIRA, 1978), fonte mais importante de proteínas vegetais na alimentação do povo

brasileiro. Entretanto, nos últimos anos, a produtividade total do país tem permanecido constante e, como a população vem aumentando, o consumo de feijão por indivíduo vem decaindo. O rendimento médio da cultura no Brasil é um dos mais baixos do mundo, girando em torno de 600 Kg/ha, superior somente aos da Índia e Paquistão (RELATÓRIO SIMONSEN ASSOCIADOS, 1976).

A inoculação do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*) praticamente não é feita no Brasil, o que não ocorre com a cultura de soja, onde 65-75% das sementes são inoculadas (ARAÚJO, 1974 *apud* SAITO, 1979).

Vários são os problemas inerentes à inoculação de *R. phaseoli* em feijoeiro. Em primeiro lugar, as estirpes autóctones apresentam baixa eficiência na fixação do nitrogênio. Por outro lado, ainda que os nódulos de feijoeiro apresentem valores altos de atividade de nitrificação, esse fato é restrito a um período muito mais curto que em soja, pois, iniciando-se nas primeiras semanas após o plantio, essa atividade cai drasticamente no final da floração e início da formação das vagens, o que ocorre aos 45-60 dias, quando a planta mais necessita de nitrogênio.

Percebe-se, assim, a grande necessidade de se procurar estirpes de *R. phaseoli* que reúnam alta eficiência de fixação, capacidade competitiva e persistência no solo, visando melhorar os padrões atuais de produtividade dessa cultura, social e economicamente tão importante ao país.

Utilizando-se 36 estirpes de *R. phaseoli*, o presente tra-

balho objetivou:

- a) Analisar suas características culturais;
- b) Determinar os padrões de eficiência de fixação de nitro
gênio;
- c) Determinar os níveis de resistência natural de cada es-
tirpe, frente a sete drogas antimicrobianas;
- d) Detectar a produção de substâncias causadoras do antago-
nismo (Bacteriocinas) entre estirpes;
- e) Avaliar a capacidade competitiva entre determinadas es-
tirpes.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Bacteriocinas

As primeiras observações sobre a atividade bacteriocinogênica foram descritas por GRATIA (1925), que demonstrou o efeito inibidor de *Escherichia coli* V (CA7) no crescimento de *E. coli* ϕ (CA81). Esta foi a razão histórica da denominação "colicina" dada por FREDERICQ (1948) a tais substâncias, sugerindo que a atividade das mesmas era uma exclusividade da enterobactéria *E. coli*. Posteriormente, verificou-se que esta é uma característica pertinente ao universo bacteriano, pois, tal atividade tem sido detectada em um grande número de espécies conhecidas.

Desde então, o critério adotado para a sua denominação não é uniforme, variando de autor para autor. Assim, a denominação pode ser baseada no gênero das estirpes produtoras, como por exemplo "Rizobiocina" de *Rhizobium spp.* (VINCENT, 1977), bem como baseada na espécie, como por exemplo a "Mutacina" de *Streptococcus mutans* (HAMADA e OOSHIMA, 1975), ou mesmo a "Colicina" da *E. coli*. Atualmente, há a tendência em se manter a denominação "Colicina" para a bacteriocina produzida por

E. coli, devido ao fato de ser a melhor estudada e caracterizada, reservando-se a denominação mais geral de "Bacteriocina", abreviadamente, Bac, para as substâncias com atuação semelhante à produzida por *E. coli*, pelas demais bactérias. REEVES (1972) propôs que, à medida que tais bacteriocinas fossem melhor estudadas, sua denominação se basearia no segundo critério, ou seja, no nome específico.

O critério de classificação dos diferentes tipos de colicinas encontrados por FREDERICQ (1946) baseava-se apenas nas suas atividades espectrais. Tal método revelou-se falho, pois, uma determinada estirpe pode produzir mais de um tipo de colicina. FREDERICQ (1948) utilizou, então, mutantes resistentes à colicinas (Col^r), obtidos a partir de colônias de estirpes sensíveis, crescidas no halo de inibição, encontrando 17 diferentes tipos de colicinas, designadas arbitrariamente por letras V, A, B, C, D, E, F, G, H, I, J, K, S1, S2, S3, S4, S5. Tal separação ainda encontrava dificuldades, pois, um mutante Col^r isolado poderia ser resistente a mais de um tipo de colicina. Assim, FREDERICQ (1956), baseando-se na capacidade de transferência genética desta marca e a imunidade que ela conferia à célula receptora, concluiu que o grupo E, na realidade, poderia ser subdividido em três sub-grupos E1, E2, E3. HAMON (1964) relata um quarto tipo E4, produzida por *E. coli* H. REEVES (1972), em um estudo extensivo da resistência a colicinas, sugere a divisão das mesmas em dois grupos: I) A, E1, E2, E3, K, L, N, S4 e X; II) B, D, G, H, I, M, S1, V e Q. Assim, bactérias resistentes a colicinas do grupo I podem ou não ser resistentes (ou tolerantes) a colicinas deste grupo, porém, nunca são resistentes a qualquer colicina do grupo II.

O inverso é verdadeiro quando mutantes são isolados para resistência a uma das colicinas do Grupo II.

Conforme salienta TAGG (1976), atualmente é ilusório tentar uma definição precisa sobre tais substâncias, devido principalmente à sua grande diversidade, havendo, entretanto, alguns critérios clássicos para a sua caracterização, tomando-se o tipo colicina como padrão. Com base nisto, HIRSCH (1978) utiliza o termo "bacteriocina" para descrever qualquer agente inibidor, de natureza proteica, capaz de causar antagonismo entre estirpes bacterianas estreitamente relacionadas. É interessante ressaltar a sua diferença fundamental com fagos, pela ausência de um mecanismo autopropagativo e com os antibióticos clássicos, pelo seu pequeno espectro de ação.

A produção de bacteriocinas por uma dada estirpe bacteriana, pressupõe um mecanismo de biossíntese letal, fato este demonstrado por OZEKI e MARGERIE (1959), onde observou-se que a semeadura de estirpe produtora sobre uma estirpe sensível pré-crescida em placa, originava lacunas ou halos de inibição. Tais halos, não continham o clone gerador da substância inibidora, concluindo que a célula produtora não é viável. Verificou-se, ainda, que somente 0,1% das células da estirpe produtora apresentava a capacidade de produção do halo de inibição, concluindo também que, na população de células produtoras, somente uma pequena parcela consegue realizar tal evento.

Vários fatores influenciam a produção de bacteriocinas, tais como: viscosidade do meio (KELSTRUP e GIBBONS, 1969, apud TAAG, 1976),

pressão osmótica (BEPPU e ARIMA, 1967), presença de açúcares como glicose e manitol (TAGG *et alii*, 1976), condições de incubação e fase do crescimento. HAMADA e OOSHIMA (1975) demonstraram que a estocagem por períodos prolongados pode levar à perda da característica bacteriocinogênica.

Tratamentos com radiação ultra-violeta (UV) ou mitomicina C constituem métodos usuais na indução de bacteriocinas, fato este demonstrado inicialmente por JACOB *et alii* (1952), em estirpes de *E. coli* ML-E. Tal indução é análoga à indução de profagos, sendo que muitas das bacteriocinas assim produzidas mostraram-se estruturalmente relacionadas com fagos, sugerindo-se que estas sejam classificadas mais como fagos defectivos do que como bacteriocinas (GARRO e MARMUR, 1970; LOTZ e MAYER, 1972).

O modo de ação das bacteriocinas pressupõe um mecanismo de união com receptores específicos do envelope celular (FREDERICQ, 1946; NOMURA, 1963), realizando-se em dois estágios: um primeiro com a adsorção física das bacteriocinas aos receptores e um segundo com o desenvolvimento de lesões bioquímicas específicas, direta ou indiretamente (PLATE e LURIA, 1972).

Cada tipo de bacteriocina tem a sua ação letal característica, porém, todas elas atuam ao nível dos ácidos nucleicos (DNA, RNA), possivelmente ativando ou se comportando como endonucleases, ou, então, diretamente na síntese proteica (HARDY, 1975).

Os determinantes genéticos para a produção de bacteriocin-

nas, nos casos até agora estudados, acham-se localizados em plasmídeos (HARDY, 1975), o que explica, aliás, o fato de algumas estirpes perderem esta característica sem a perda da viabilidade celular (REEVES, 1972). Tais plasmídeos possuem peso molecular variando de 10^5 a 10^8 daltons, o que levou HARDY (1975) a dividi-los em dois grupos: os plasmídeos menores entre $10^5 - 10^6$ daltons, e os maiores entre $10^7 - 10^8$ daltons. Muitas das propriedades genéticas e fisiológicas estão correlacionadas com essa divisão, visto que somente os plasmídeos maiores são auto-transferíveis por conjugação, enquanto que os menores somente o podem fazer através da mediação de algum outro plasmídeo auto-transferível, como por exemplo alguns plasmídeos R. Outras diferenças podem ser relacionadas, tais como o número de cópias por célula e a sua dependência das funções da célula hospedeira (estabilidade).

Com relação ao gênero *Rhizobium*, as primeiras observações sobre a atividade bacteriocinogênica foram descritas por ROSLYCKY (1967) em *Rhizobium trifolii*, *Rhizobium lupini* e *Rhizobium* sp "cowpea".

SCHWINGHAMER e BELKENGREN (1968), estudando algumas propriedades de extratos purificados de bacteriocinas de *R. trifolii*, verificaram que a alteração do pH e o tratamento com enzimas proteolíticas, tais como protease, tripsina e papaina, geravam perda de atividade do extrato. Um dado interessante encontrado pelos autores prende-se ao fato de que a adição de histidina e arginina ao meio de cultivo, acarretava a reversão dos efeitos inibitórios do extrato sobre a estirpe sensível.

LOTZ e MAYER (1972) isolaram e caracterizaram partículas

com atividade bacteriocinogênica de uma estirpe de *R. lupini*. Através de estudos ao nível de microscopia eletrônica, constataram que tais partículas eram semelhantes a fagos defectivos de *Proteus* sp. É interessante ressaltar que o isolamento somente foi possível com utilização de luz ultravioleta (UV).

SCHWINGHAMER, (1971, 1975), analisando as propriedades de bacteriocinas produzidas por seis estirpes de *R. trifolii*, encontrou, pelo menos, dois tipos que se diferenciavam na estrutura e composição. O primeiro tipo era semelhante a fagos defectivos descritos anteriormente, com sua produção também dependente da indução por luz UV. O segundo tipo incluía formas de baixo peso molecular. Verificou ainda que, apesar delas apresentarem características comuns, tais como tamanho, mobilidade em gradiente de densidade e sensibilidade ou resistência a enzimas proteolíticas, elas variavam na especificidade de ação e adsorção à membranas filtrantes, terminando por sugerir sua separação em sub-grupos.

GROSS e VIDAVER (1978) relatam a produção de bacteriocinas por estirpes de *R. japonicum* e outros *Rhizobium* de crescimento lento. Os autores observaram que estirpes de *R. japonicum*, *R. phaseoli* e *Rhizobium* sp. produziram bacteriocina ativa contra *Corynebacterium nebraskense*.

Evidência para a ocorrência de plasmídeos Bac⁺ transmissíveis em *R. leguminosarum* é relatada por HIRSCH (1979), que observou a produção de bacteriocinas entre 97 isolados desta espécie, classificando-as em dois tipos: baixo e médio peso molecular, com base nas suas taxas

de difusão em ágar. Três isolados que portavam determinantes genéticos para a produção de bacteriocinas de baixo peso molecular foram capazes de transferir tal característica para estirpes não produtoras de *R. leguminosarum*, com frequências relativamente altas de 1/10 a 1/100 células.

Outras observações indicam a origem plasmidial dos determinantes genéticos Bac⁺ em *Rhizobium*. Assim, ZELAZNA-KOWALSKA (1979) relata a produção de bacteriocinas em cinco estirpes de *R. trifolii* entre 44 estirpes ensaiadas. Tratamento das estirpes produtoras com agentes de "cura" plasmidial, tais como Acridina-orange e Dodecil-sulfato de sódio (SDS), gerava até 100% de perda na atividade bacteriocinogênica.

Uma interessante correlação foi encontrada por JOHNSTON *et alii* (1978), ao analisar a transferência de transposon Tn5 inserido no plasmídeo pJB5J1 de *R. leguminosarum* com atividade bacteriocinogênica. Quando este plasmídeo era transferido para uma estirpe não infectiva ou incapaz de promover a nodulação, tal capacidade era restaurada. Os mesmos autores verificaram, além disso, que determinadas estirpes de *R. trifolii* e *R. phaseoli*, quando receberam o plasmídeo, adquiriram a capacidade de nodular ervilhas.

BREWIN *et alii* (1980) observaram também que a transferência do plasmídeo bacteriocinogênico pRL1J1 de *R. leguminosarum* para estirpes não infectivas de *R. leguminosarum*, resultava na restauração da infectividade, sugerindo que a capacidade de nodulação é co-transferida ou mediada pelo plasmídeo bacteriocinogênico acima citado.

3.2. Resistência a Drogas

O gênero *Rhizobium*, como toda bactéria gram negativa é mais susceptível aos antibióticos de largo espectro. Seus efeitos variam de estirpe para estirpe dentro de uma mesma espécie, de tal maneira que estas mostram uma variação considerável no nível de resistência natural. A definição precisa de tais níveis pode auxiliar no processo de identificação e caracterização de *Rhizobium* (ELKAN, 1971), construção de meios seletivos (GRAHAM, 1969), bem como a utilização de mutantes resistentes como marcadores genéticos em estudos ecológicos, precedidos, porém, de uma avaliação das implicações da aquisição de resistência diante do sistema simbiótico da bactéria-planta com relação à sua capacidade de nodulação e fixação do nitrogênio.

Os diversos níveis de resistência para *R. phaseoli* relatados na literatura, para os diversos antibióticos, são relacionados na Tabela 1, na página seguinte.

Geralmente, quando são selecionadas mutações naturais ou induzidas, sob forte pressão de seleção, como é o caso de seleção de mutantes resistentes aos antibióticos e outras drogas, estas acarretam a depressão de outras funções. Assim, SCHWINGHAMER (1963, 1967) verificou que a aquisição de resistência aos determinados antibióticos em *R. leguminosarum*, *R. trifolii* e *R. meliloti*, tais como a Penicilina, Novobiocina, Vancomicina, Neomicina e Viomicina, acarretava um decréscimo nas propriedades simbióticas, como a fixação do nitrogênio, sendo que para os dois últimos antibióticos, a resistência é acompanhada da perda

Tabela 1 - Níveis de Resistência Natural aos Diversos Antibióticos em *R. phaseoli*.

Antibióticos	Nível de Resistência ($\mu\text{g} / \text{ml}$)	Referência
<u>Grupo I</u>		
Estreptomicina	2 - 10	SCHWINGHAMER, (1967)
Espectinomicina	2 - 20	SCHWINGHAMER <i>et al.</i> (1973)
Cloranfenicol	20 - 40 250	PANKHURST (1967) SCHWINGHAMER (1967)
Tetraciclina	< 1	DAVIS (1962). PATTINSON <i>et alii</i> (1974).
<u>Grupo II</u>		
Ac. Nalidixico	40 - 100	PANKHURST (1977); JOSEY <i>et alii</i> (1978)
Rifampicina	10	PANKHURST (1977)
<u>Grupo III</u>		
D-Cicloserina	10 - 25	SCHWINGHAMER (1967)
Novobiocina	1 - 2	DAVIS (1962). SCHWINGHAMER (1962)
Penicilina	5 - 10 50	SCHWINGHAMER (1967) GRAHAM (1963)
Vancomicina	0,5 - 2	PANKHURST (1977); SCHWINGHAMER (1967); JOSEY <i>et alii</i> (1979)
<u>Grupo IV</u>		
Viomicina	5	SCHWINGHAMER (1967)
Neomicina	15 - 30	SCHWINGHAMER (1967)
Canamicina	10 - 25	JOSEY <i>et alii</i> (1978); DAVIS (1962); PANKHURST (1977)

G.I. - Antibióticos que atuam na síntese proteica

G.II. - Atuam na inibição da síntese de ácidos nucleicos

G.III. - Atuam na parede celular

G.IV. - Atuam na síntese proteica e permeabilidade celular

total da capacidade fixadora e decréscimo na capacidade de nodulação.

As mutações associadas à aquisição da resistência aos antibióticos que atuam ao nível da parede celular (G.111), geralmente, acham-se mais relacionadas com os efeitos pleiotrópicos da perda da capacidade fixadora e, em alguns casos, da capacidade de nodulação (infectividade). ALEXANDER *et alii* (1969) constataram que a resistência à Viomicina em *Rhizobium* é decorrente de um decréscimo na absorção do antibiótico como resultado da diminuição da permeabilidade da membrana celular. Este fato sugere que a perda da integridade da membrana ou parede celular pode ser um importante fator responsável pela incapacidade da transformação do *Rhizobium* de vida livre em bacteróides nos nódulos, resultando, assim, os nódulos ineficientes (CALDWELL e VEST, 1968).

DEMERY e ALEXANDER (1969) isolaram mutantes incapazes de promover a nodulação, associados à resistência à Canamicina. Observaram ainda que tais mutantes produziam maior quantidade de muco extracelular, como polissacarídeos, do que a estirpe selvagem.

OBATON (1971), confirmando a ausência de efeitos pleiotrópicos associados à resistência à Estreptomicina em *R. meliloti*, sugeriu a possibilidade do uso de tal resistência como marcador em estudos ecológicos de *Rhizobium*, fato este estendido por SCHWINGHAMER e DUDMAN (1973) para os mutantes resistentes à Espectinomicina em *Rhizobium* sp. Tais mutações não acarretavam resistência cruzada, mudanças antigênicas e continuavam estáveis após passagem pela planta hospedeira.

Por outro lado, a perda da capacidade de nodulação foi observada em alguns mutantes resistentes à Estreptomicina em *Rhizobium*, sendo o efeito associado com a dose do antibiótico utilizado. Assim, ZELAZNA-KOWALSKA (1971) verificou que níveis iguais ou superiores a 200 µg/ml em *R. trifolii* geravam tal perda.

ALVES e AZEVEDO (1975), estudando as características de mutantes de *R. japonicum* resistentes à Estreptomicina, verificaram que doses acima de 64 µg/ml acarretavam a perda da capacidade de nodulação. Os mesmos autores relatam ainda os resultados de competição "in vitro" entre estirpes normais e mutantes resistentes à Estreptomicina, quando cultivadas em mistura, verificando-se que à medida que a população de células normais aumentava, a outra população mutante resistente decrescia, concluindo os autores que a Estreptomicina é uma droga forte para *R. japonicum*, segundo BERGAMIN FILHO (1975).

Com relação à Rifampicina, os dados obtidos na literatura evidenciam um comportamento bem diversificado, tendo em vista os efeitos pleiotrópicos associados à sua resistência. BERTALMIO (1973) constatou a retenção da capacidade fixadora do nitrogênio na maioria dos mutantes resistentes à Rifampicina isolados, bem como da sua capacidade de nodulação em *R. trifolii*. COOPER (1979), analisando mutantes Rifampicina resistentes de *R. trifolii* e *Rhizobium* sp. (Lotus), constatou a retenção da capacidade de nodulação e fixação do nitrogênio em relação aos tipos selvagens. O autor propõe, ainda, um método rápido de contagem de *Rhizobium* resistente a antibióticos no solo, empregando a marca Rif^r.

Entretanto, PANKHURST (1977) relata a perda parcial da capacidade de fixação do nitrogênio em *Rhizobium* sp. (Lotus) para mutantes Rif^r, fato esse observado também por PAIN (1978) em 11 estirpes, entre 143 ensaiadas para a resistência à Rifampicina, utilizando o baixo nível de resistência de 10 µg/ml.

3.3. Competição

A capacidade de promover da nodulação é o primeiro passo para o estabelecimento de uma simbiose efetiva entre *Rhizobium* e a planta hospedeira. Tal capacidade está na dependência de inúmeros fatores resultantes da interação bactéria-planta-solo.

Com relação à bactéria, a presença de *Rhizobium* no solo, sua sobrevivência e capacidade de competição para os sítios de nodulação constituem, dentre outros, os fatores potencialmente mais importantes para o estabelecimento da simbiose (VINCENT, 1977).

Segundo BROCKWELL (1968), a eficiência de uma determinada estirpe geralmente se acha correlacionada com a sua capacidade de competir com outros *Rhizobium* nativos, habilidade de formar nódulos e fixação simbiótica de nitrogênio. Além disso, a capacidade de crescimento da estirpe em cultura pura, veículo orgânico e sementes de planta hospedeira, constituem outros fatores correlatos na caracterização de estirpes eficientes.

Estirpes selecionadas como eficientes podem se diferen-

ciar na sua capacidade de sobrevivência no solo e colonização da rizosfera da planta, bem como na capacidade de nodulação. A predominância de certas populações de *Rhizobium* nativos em diferentes condições do ambiente, em relação a determinadas estirpes inoculadas, sugere uma alta capacidade adaptativa e uma vantagem competitiva superior destas bactérias, sob condições adversas (SCHWINGHAMER, 1977). Porém, VINCENT (1953) chama a atenção para o fato de que as estirpes nativas de *Rhizobium* geralmente são pouco eficientes com a planta hospedeira introduzida, justificando-se, assim, os estudos que incrementem a capacidade competitiva de estirpes selecionadas como mais eficientes.

BERGERSEN *et alii* (1971), analisando populações naturais e mutantes de *Rhizobium trifolii*, verificaram que cerca de 24 a 65% das estirpes de *R. trifolii*, isoladas de diferentes localidades, exibiam antagonismo frente a determinadas estirpes de *R. trifolii* utilizadas como indicadoras. Grande parte deste antagonismo se achava associado à produção de bacteriocinas ou fagos temperados por determinadas estirpes.

Os estudos de competição entre estirpes de *Rhizobium*, geralmente, são realizados utilizando-se inoculações mixtas, onde cada estirpe é combinada em proporções fixas ou variáveis, sendo que a estirpe mais competitiva deve formar maior proporção de nódulos do que seria esperado em relação à sua proporção presente no inóculo (VINCENT, 1953).

SKERDLETA e KARIMOVA (1969) verificaram que a resposta à inoculação em soja com *Rhizobium* específico é proporcional à densidade da suspensão aplicada. A competição entre diferentes serotipos utiliza

dos como inóculos duplos é relacionada com o número de células presentes porém, uma das estirpes mostrou-se mais competitiva mesmo estando em número proporcionalmente inferior a outras, na faixa de 3:5 a 1:60.

CALDWELL (1969) relata a competição entre três estirpes de *R. japonicum* em inoculações duplas, evidenciando as diferentes capacidades competitivas na formação de nódulos. Os tratamentos correspondentes às inoculações com a estirpe mais competitiva, sozinha ou em combinações, obteve maior produtividade em termos de grãos e N total.

Alguns trabalhos indicam a predominância de determinadas estirpes em relação a outras, quando inoculadas aos pares ou isoladamente em plantas hospedeiras (FREIRE *et alii*, 1976; GIBSON *et alii*, 1976; SAITO e RUSCHEL, 1980).

Embora diferentes nódulos na mesma planta possam apresentar diferentes estirpes (VINCENT e WATERS, 1953), os ensaios de competição pressupunham que os nódulos apresentassem uma única estirpe (DUDMAN e BROCKWELL, 1968). Porém, vários relatos evidenciaram a possibilidade de nódulos com infecção mixta. Assim, SKERDLÉTA (1969) e PINTO *et alii* (1974) verificaram que cerca de 10% de nódulos de trevo e soja inoculados com culturas mixtas apresentavam duas estirpes de *Rhizobium*.

JOHNSTON e BERINGER (1976) observaram a existência de nódulos com infecção mixta em ervilha inoculada com *R. leguminosarum*, utilizando marcadores genéticos como identificação das estirpes. As proporções das estirpes presentes no inóculo não afetou a frequência de

ocorrência destes nódulos mistos.

MAY e BOHLOOL (1979) inocularam lentilha (*Lens sculenta*) com culturas mistas e analisaram as estirpes presentes em cada nódulo por imunofluorescência. Constataram a estreita relação entre a competição e a ocorrência de nódulos duplamente infectados.

Outro fato interessante foi observado por WINARNO e LIE (1979), em que a capacidade de nodulação de uma estirpe de *R. leguminosa* em ervilha, é suprimida pela presença de uma estirpe não infectiva no inoculante misto. O grau de supressão variou com as estirpes consideradas. Verificou ainda que o período crítico de competição foi restrito a 24 horas após a inoculação.

A produção de substâncias antimicrobianas, tais como bacteriocinas, por determinadas estirpes de *Rhizobium*, foi aventada como possível fator incrementador da capacidade competitiva em tais estirpes, para o processo de nodulação em plantas hospedeiras (SCHWINGHAMER, 1971, 1975). A vantagem seletiva das bacteriocinas em outros microorganismos tal como *Escherichia coli*, já foi evidenciada, sugerindo-se que esta substância está implicada no processo de colonização microbiana normal e patológica do trato digestivo de mamíferos (CHARTONE - SOUZA, 1975; ASENSIO e BAQUERO, 1979).

Tal evidência em *Rhizobium* é questionada por GROSS e VIDALVER (1978), que julgam ser a atividade bacteriocinogênica desligada do processo de nodulação e fixação do N_2 , pelo menos diretamente. Entre-

tanto, SCHWINGHAMER e BROCKWELL (1978), analisando a possível vantagem competitiva de estirpes bacteriocinogênicas de *R. trifolii*, verificaram que as estirpes Bac⁺ predominaram largamente em turfa inoculada com estirpes não bacteriocinogênicas (Bac⁻), sugerindo os autores que este fato poderia ser muito importante no solo ou em turfa, quando o inoculante é utilizado em cultura mixta.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Material

4.1.1. Bactérias

Foram utilizadas 36 estirpes de *Rhizobium phaseoli*, da coleção da Seção de Microbiologia do Solo do Centro de Energia Nuclear na Agricultura (CENA), Piracicaba, SP, selecionadas segundo os critérios de maior eficiência de fixação de nitrogênio e variabilidade de origem. Tais estirpes acham-se discriminadas na Tabela 2. Para o ensaio de produção de bacteriocinas, utilizou-se também estirpes de *Pseudomonas glycin*ae, 10 isolados de bactérias fitopatogênicas e duas de *Escherichia coli*, reportadas como susceptíveis à ação de bacteriocinas correlacionadas (BECKER, 1980; BIAGI, 1980 - comunicação pessoal). Tais estirpes acham-se discriminadas na Tabela 3.

Tabela 2 - Estirpes de *R. phaseoli* utilizadas no presente trabalho.

Nº CENA	Nº ORIGINAL	PROCEDÊNCIA
C - 01	C - 01	Piracicaba, SP
C - 03	C - 03	Piracicaba, SP
C - 05	C - 05	Piracicaba, SP
C - 09	C - 09	Piracicaba, SP
C - 10	C - 10	Piracicaba, SP
C - 12	C - 12	Piracicaba, SP
C - 13	C - 13	Tietê, SP
C - 14	C - 14	Tietê, SP
C - 15	C - 15	Tietê, SP
C - 18	C - 18	Capão Bonito, SP
C - 19	C - 19	Sengês, PR
C - 20	C - 20	Vila Velha, PR
C - 21	C - 21	Vila Velha, PR
C - 22	C - 22	Itapetininga, SP
C - 23	C - 23	Itapetininga, SP
C - 25	C - 25	Itapetininga, SP
C - 28	127 K - 14	Nitragin Co, EUA
C - 29	127 K - 17	Nitragin Co, EUA
C - 33	F 310	Alegre, ES
C - 34	F 413	Alegre, ES
C - 40	CIAT 255 (Z 272)	CIAT, Colômbia
C - 44	CIAT 642	CIAT, Colômbia
C - 45	CIAT 668	CIAT, Colômbia
C - 48	SMS 445	Campinas, SP
C - 49	SMS 149	Campinas, SP
C - 50	SMS 196	Campinas, SP
C - 86	SEMIA 400	Porto Alegre, RS
C - 88	SEMIA 487	Porto Alegre, RS
C - 89	CIAT 57 (CC 511)	Csiro, Austrália
C - 90	3644	Rothamsted, Inglaterra
C - 91	QA 1062	Queensland, Austrália
C - 100	CIAT 640 (Z 632)	CIAT, Colômbia
C - 102	CIAT 632 (21)	CIAT, Colômbia
C - 103	3620	Rothamsted, Inglaterra
C - 104	CIAT 893 (M 20)	CIAT, Colômbia
C - 105	CIAT 903 (TAL 182)	CIAT, Colômbia

Tabela 3 - Outras bactérias utilizadas como indicadoras no ensaio de produção de bacteriocinas.

Bactéria	Designação	Origem
<i>Pseudomonas glycinae</i>	B - 01	Paraná
<i>Pseudomonas glycinae</i>	B - 04	Paraná
<i>Pseudomonas glycinae</i>	C - 01	Paraná
<i>Pseudomonas glycinae</i>	Cambarã	Paraná
<i>Erwinia</i> sp.	A ₄	Piracicaba, SP
<i>Xantomonas</i> sp.	E ₃	Piracicaba, SP
<i>Erwinia</i> sp.	E ₄	Piracicaba, SP
<i>Erwinina</i> sp.	E ₅	Piracicaba, SP
<i>Pseudomonas</i> sp.	C ₃	São Paulo, SP
<i>Erwinia</i> sp.	C ₅	São Paulo, SP
<i>Erwinia</i> sp.	Cb ₂	Piracicaba, SP
<i>Erwinia</i> sp.	M ₄	São Paulo, SP
<i>Erwinia</i> sp.	P ₅	Campinas, SP
<i>Escherichia coli</i>	K 12 712 R	
<i>Escherichia coli</i>	J 5	

4.1.2. Meios de Cultura

4.1.2.1. YMB - (Yeast Mannitol Broth) - Caldo Manitol

(VINCENT, 1970) mod.

K_2HPO_4	0,1 g
KH_2PO_4	0,4 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
NaCl	0,1 g
Manitol	10,0 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Água Destilada	1000 ml
pH	6,5-7,0

4.1.2.2. YMA - (Yeast Mannitol Agar) - Meio Manitol

Ao meio YMB adicionou-se 15 g de Ágar para meio sólido e 7,5 g de Ágar para meio semi-sólido.

4.1.2.3. Meio "79" A (Norris 1964) modificado

K_2HPO_4	0,4 g
KH_2PO_4	0,1 g
NaCl	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Sacarose	9,0 g
Glutamato de Sódio	1,0 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Água Destilada	1000 ml
pH	6,5-7,0

4.1.2.4. Meio "79" A Sólido e Semi-Sólido

Meio "79" A adicionado de 15 g e 7,5 g de Ágar, respectivamente.

4.1.2.5. Meio "79" B

K_2HPO_4	0,4 g
KH_2PO_4	0,1 g
NaCl	0,1 g
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0,2 g
Sacarose	5,0 g
Glutamato de Sódio	0,5 g
Extrato de Levedura	0,5 g
Água Destilada	1000 ml
pH	6,5-7,0

4.1.2.6. Ágar-Salina

Ágar	0,75%
NaCl	0,90%
EDTA - Sódio	30 mg/l
Mertiolate ou	
Azida de Sódio	0,01%

4.1.3. Drogas e Suas Origens

Bicloreto de Mercúrio	E. MERCK
Espectinomicina (Sp)	UPJOHN
Cloranfenicol	PARKE-DAVIS

Penicilina G Potássica (Pn)	SQUIBB
Rifampicina (Rf)	LEPETIT
Sulfato de Estreptomicina (Sm)	FOUTOURA-WYETH
Tetraciclina (Tc)	PFIZER
Cicloheximida	SIGMA

4.1.4. Soluções

4.1.4.1. Solução Nutritiva para Teste de Nodulação (modificada de McKNIGHT, 1949)

$\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	150,000 g
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	20,000 g
KH_2PO_4	20,000 g
KCl	30,000 g
H_3BO_3	0,286 g
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,154 g
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,022 g
$\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,008 g
$\text{H}_2\text{MoO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,012 g
FeCl_3	0,070 g
EDTA - Na	0,030 g
Água Destilada	1000 mL

pH final: 6,4

Diluir: 1:20

4.1.4.2. Sublimado Corrosivo

Para esterilização externa de sementes: solução aquosa de HgCl_2 0,2% (p/v).

Para esterilização externa de nódulos: solução aquosa de HgCl_2 0,1% (p/v).

4.1.4.3. Salina

Solução aquosa de NaCl 0,85% (p/v).

4.1.4.4. Vermelho Congo

Solução aquosa 0,25% (p/v).

4.1.4.5. Azul Bromotimol

Solução alcoólica 0,25% (p/v).

4.2. Métodos

4.2.1. Caracterização das Estirpes

4.2.1.1. Crescimento em Meio Sólido

As estirpes de *R. phaseoli* foram inoculadas em meio YMB, onde cresceram até a turbidez. Semearam-se alíquotas de 0,1 mL de diluições apropriadas para se obter colônias isoladas em placas contendo meio de YMA. Avaliou-se o tempo necessário para que cada colônia isolada atingisse o diâmetro médio de 3 mm, sendo a avaliação realizada na

própria placa com régua milimetrada e contador de colônia Baush - Lomb. Dados adicionais, tais como cor, consistência e produção de muco foram observados. Tal procedimento permitiu também avaliar a existência de possíveis contaminantes da cultura original.

4.2.1.2. Produção de Ácido ou Alkali

Para a avaliação da produção de ácido nas estirpes de *R. phaseoli*, observou-se o método descrito por NORRIS (1965). As estirpes foram inoculadas em frascos retangulares de 75 mm, providos de tampa rosqueada, contendo 10 ml de meio YMA inclinado, suplementado com 2,5 ml/l da solução estoque de azul de bromotimol como indicador da modificação do pH do meio. Para controle do experimento, usou-se um tubo sem inoculação. Após 7 dias de incubação, a 28°C, fez-se a leitura dos frascos, observando-se que a mudança de azul para amarelo indicava a redução do pH, enquanto a intensificação de azul mostrava a produção de álcali.

4.2.1.3. Eficiência da Fixação de Nitrogênio e Infectividade em Planta Hospedeira (Nodulação)

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) cv. "carioca" es-
terilizadas externamente com solução de sublimado corrosivo, segundo VINCENT (1970), foram plantadas em vasos de Leonard modificado (VINCENT, 1970), esterilizados em autoclave a 120°C por quatro horas, aos quais foram adicionados previamente vermiculita lavada (substrato) e solução nutritiva sem nitrogênio (McKNIGHT, 1949).

No tratamento sem inoculação (testemunha) com nitrogênio, acrescentou-se 70 $\mu\text{g N/ml}$, sob a forma de NH_4NO_3 , à solução nutritiva, renovada a cada 15 dias. Nos demais vasos, adicionou-se 5 $\mu\text{gN/ml}$, sob a forma de NH_4NO_3 , à solução nutritiva, como dose de "arranque".

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com 35 tratamentos, correspondentes a cada estirpe inoculada e dois controles sem inoculação, um deles com nitrogênio e outro sem nitrogênio, com 4 repetições.

No momento do plantio, procedeu-se à inoculação das estirpes através da adição de 1 ml da cultura previamente crescida em meio YMB por 3 - 5 dias (cerca de 10^8 células/ml) a cada um dos vasos do tratamento considerado.

Após sete semanas de crescimento, as plantas foram retiradas dos vasos, seccionando-se sua parte aérea e radicular. A parte radicular foi imediatamente acondicionada em frascos de 250 ml para avaliação da atividade de nitrogenase, através da técnica da redução de acetileno (BURRIS, 1974), sendo, em seguida, destacados os seus nódulos e pesados, após secagem em estufa. A parte aérea foi seca em estufa a 60°C por 5 dias e, a seguir, pesada e moída, sendo o seu teor de nitrogênio percentual avaliado pelo método de semi-microKjeldahl, conforme SARRUGE e HAAG (1974).

A eficiência relativa de cada tratamento foi calculada segundo BERGERSEN *et alii* (1971), através da fórmula:

$$E_f = \frac{\text{m\u00e9dia mat\u00e9ria seca planta inoculada}}{\text{m\u00e9dia mat\u00e9ria seca planta test. c/ N}} \times 100$$

4.2.2. Determina\u00e7\u00e3o dos N\u00edveis de Resist\u00eancia a Drogas

Para a verifica\u00e7\u00e3o do n\u00edvel de resist\u00eancia natural de ca da estirpe frente a 7 drogas antimicrobianas, utilizaram-se solu\u00e7\u00f5es-padr\u00e3o de 10 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Penicilina G Pot\u00e1ssica, Sulfato de Estreptomicina, Cloranfenicol, Rifampicina, Tetraciclina, Espectinomicina e Bicloreto de Merc\u00fario. Tais solu\u00e7\u00f5es foram preparadas no momento de seu uso, com os diluentes recomendados. Para o caso espec\u00edfico de Tetraciclina e Rifampicina, foi utilizado metanol como diluente, no volume correspondente a 10% do volume total da solu\u00e7\u00e3o; para os demais antibi\u00f3ticos, utilizou-se \u00e1gua destilada esterilizada.

O n\u00edvel de resist\u00eancia foi determinado pelo m\u00e9todo da dilui\u00e7\u00e3o em placas, segundo CHARTONE-SOUZA (1975), onde cada droga foi adicionada ao meio YMA, mantido a 45°C , de tal maneira a se conseguir concentra\u00e7\u00f5es finais por placa de 1, 5, 10, 20, 50, 100 e 500 μg da droga por mL do meio de cultura. No caso da tetraciclina, utilizou-se concentra\u00e7\u00f5es 10 vezes menores. Ap\u00f3s homogeneiza\u00e7\u00e3o e solidifica\u00e7\u00e3o, eliminou-se o excesso de umidade na superf\u00edcie do meio, entreabrindo-se as placas em ambiente ass\u00e9ptico, durante um per\u00edodo de at\u00e9 2 horas, sendo, a seguir, utilizadas.

As amostras de *R. phaseoli* foram preparadas atrav\u00e9s de sua inocula\u00e7\u00e3o em meio YMB l\u00edquido e incubadas por 3 a 5 dias a 28°C

até a turvação. Após diluição apropriada, cada estirpe foi inoculada nas placas previamente preparadas com o antibiótico, através de multialça de 17 unidades descrita por AZEVEDO *et alii* (1980). Para constatar a viabilidade das amostras foram utilizadas placas-controle do mesmo meio YMA, porém, isento de drogas.

Após incubação por 3 a 5 dias a 28°C, as placas foram observadas, sendo considerado como nível de resistência a concentração da droga imediatamente inferior àquela que impedia o crescimento da amostra.

4.2.3. Produção de Bacteriocinas

Para se detectar a produção de bacteriocinas entre as estirpes de *R. phaseoli* relatadas na Tabela 2, procedeu-se conforme a técnica descrita por COSTA (1973). Deste modo, as amostras foram crescidas em meio "79" A líquido, até a turbidez, e inoculadas com multialça de 17 unidades em placas contendo meio "79" B sólido. Incubou-se as placas a 28°C, até as colônias apresentarem crescimento bem evidente e uniforme (3 a 5 dias). A seguir, as placas foram invertidas e 1 ml de clorofórmio foi colocado na tampa de cada uma delas. Após 15 minutos, foram entreabertas em ambiente asséptico durante 30 minutos para a eliminação do clorofórmio residual.

Sobre cada uma das placas inativadas com o clorofórmio, adicionou-se 5 ml de meio "79" B semi-sólido, previamente inoculado com 0,1 ml da estirpe indicadora crescida em meio "79" A líquido, de tal modo a formar uma fina película sobre as colônias inativadas e que permi-

tiu o crescimento da estirpe indicadora inoculada. Após 3 a 5 dias de incubação a 28°C, as placas foram analisadas e a leitura foi feita através da constatação ou não do halo de inibição em torno das colônias inativadas.

O esquema de análise utilizado teve como objetivo avaliar todas as estirpes como possíveis produtoras frente às mesmas, utilizadas como indicadoras.

Outras bactérias relatadas na Tabela 3 e reportadas como susceptíveis a bacteriocinas correlacionadas, foram posteriormente utilizadas como indicadoras frente àquelas estirpes de *R. phaseoli* que mostraram atividade bacteriocinogênica.

4.2.4. Avaliação da Capacidade Competitiva

4.2.4.1. Seleção de Estirpes

Com a finalidade de verificar-se a possível vantagem seletiva da característica de produção de bacteriocinas, selecionaram-se as seguintes estirpes: C.40 - produtora de bacteriocina (Bac⁺), C.88 - sensível à bacteriocina produzida por C-40 (Bac^S), C.100 - não produtora e insensível à bacteriocina produzida por C.40 (Bac⁻).

Para cada uma, obteve-se antissoro específico, bem como mutantes resistentes a antibióticos, utilizados como marcas seletivas no processo de recuperação e identificação das estirpes após passagem pela planta hospedeira.

4.2.4.2. Produção do Antissoro

Cada estirpe selecionada foi crescida em meio "79" A líquido, por cinco dias, a 28°C (cerca de 10⁹ células/mL). A seguir, foram centrifugadas a aproximadamente 5000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspenso em solução salina em um volume suficiente para se conseguir uma suspensão densa. Como preservativo da suspensão, adicionou-se Mertiolate na concentração final de 0,01%. Esta suspensão assim obtida foi utilizada para a imunização de coelhos através de injeções intravenosas, segundo o esquema ilustrado na Tabela 4.

Tabela 4 - Esquema de imunização de coelhos, por via intravenosa, com estirpes de *R. phaseoli* (BOHLOOL, 1975).

Dia	Volume Injetado (mL)
01	0,5
02	1,0
03	1,5
04-06	descanso
07	1,5
08	2,0
09	2,0

A seguir, os coelhos foram colocados em repouso por uma

semana, após a qual, foi realizada a sangria parcial através da veia marginal da orelha. O sangue coletado foi deixado em repouso por uma hora, à temperatura ambiente, recolhendo-se, em seguida, o soro, o qual foi centrifugado a aproximadamente 5000 rpm por dez minutos e utilizou-se o sobrenadante para o teste de aglutinação em tubos, a fim de determinar-se o título de anticorpos.

Coelhos que mostraram um título suficientemente alto, ou seja, igual ou superior a 1/1280, foram deixados em jejum por 24 horas e, logo após, sangrados por punção cardíaca, recolhendo-se aproximadamente 50 mL de sangue, o qual seguiu a mesma rotina anteriormente descrita para obtenção do soro. Adicionou-se Mertiolate na concentração final de 0,01%, sendo estocados a -16°C . Coelhos que não exibiram títulos suficientemente altos, foram injetados com 2 mL de suspensão antigênica ("Booster"), via intradérmica e sangrados por punção cardíaca uma semana após.

4.2.4.3. Obtenção de Mutantes Resistentes a Antibióticos

Culturas das estirpes C.40, C.88 e C.100 foram crescidas, cada uma delas, em meio "79" A líquido por cinco a seis dias a 28°C . Em seguida, as culturas foram centrifugadas a cerca de 5000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o sedimento ressuspendido em solução salina esterilizada até conseguir-se uma suspensão densa, com cerca de 10^9 células/mL. A seguir, 0,2 mL da suspensão de cada uma das estirpes foram espalhados em placas com 20 mL de meio "79" A sólido, suplementado com um antibiótico específico na concentração final de $100 \mu\text{g}/\text{mL}$.

Os antibióticos utilizados, bem como os fenótipos selecionados, encontram-se discriminados na Tabela 5.

Tabela 5 - Antibióticos utilizados na obtenção de mutantes resistentes, e o respectivo fenótipo selecionado para cada estirpe.

Estirpe	Antibiótico Utilizado	Fenótipo Selecionado
C.40	Estreptomicina (Sm)	Sm ^r
C.88	Espectinomicina (Sp)	Sp ^r
C.100	Rifampicina (Rf)	Rf ^r

As colônias emergentes observadas após a incubação por 3 a 5 dias a 28°C, foram repicadas para meio "79" A líquido suplementado com o respectivo antibiótico na concentração final de 100 µg/ml e incubado a 28°C até a turvação, sendo, então, novamente repicada para meio "79" A sólido, sem o antibiótico. Este procedimento objetivou a eliminação de possíveis células não-mutantes.

Posteriormente, avaliou-se a possível existência de resistência cruzada entre os antibióticos utilizados, inoculando-se separadamente os mutantes obtidos em placas com meio "79" A sólido suplementado com doses de 20, 50 e 100 µg/ml do antibiótico para o qual não foram selecionados.

4.2.4.4. Ensaio em Casa de Vegetação

Foram conduzidos dois ensaios em casa de vegetação, sendo um deles em vasos de Leonard esterilizados e o outro em vasos contendo solo não esterilizado.

No ensaio com vasos de Leonard, utilizou-se vermiculita lavada como substrato e solução nutritiva sem nitrogênio (McKNIGHT, 1949). Tais vasos foram autoclavados a 120°C por 4 horas. No outro ensaio, utilizou-se vasos de plástico de 1 litro, com solo e vermiculita na proporção de 1:1.

Em ambos os ensaios utilizaram-se duas séries de estirpes de *R. phaseoli* como inoculante, sendo uma delas constituída de células normais e a outra de células mutantes resistentes a antibióticos, obtidos conforme o item 4.2.4.3.

Sementes de feijão (*Phaseolus vulgaris*) var. "Carioca", previamente esterilizadas externamente segundo VINCENT (1970) e pré-germinadas por 2 dias em ambiente esterilizado, foram transplantadas para os vasos de modo a obter-se duas plântulas viáveis por vaso. Em seguida, inoculou-se as estirpes em combinações simples, duplas e triplas, observando-se um volume final de 3 mL. No momento da inoculação, foi realizado o plaqueamento das estirpes utilizadas, com diluições apropriadas, em meio "79" A sólido, para a contagem do número de células viáveis.

O delineamento estatístico, em ambos os ensaios, foi inteiramente casualizado, com 15 tratamentos totais, sendo 14 corresponden

tes às inoculações e um controle não inoculado, com 4 repetições, conforme o esquema ilustrado na Tabela 6. Durante a condução dos ensaios, foi mantida a temperatura de 25°C.

Tabela 6 - Tratamentos referentes aos dois ensaios de competição.

Tratamentos	Estirpes Inoculadas
<u>1. Estirpes Normais</u>	
A	C.40
B	C.88
C	C.100
AB	C.40 x C.88
AC	C.40 x C.100
BC	C.88 x C.100
ABC	C.40 x C.88 x C.100
<u>2. Estirpes Mutantes</u>	
A	C.40 Sm ^r
B	C.88 Sp ^r
C	C.100 Rf ^r
AB	Sm ^r x Sp ^r
AC	Sm ^r x Rf ^r
BC	Sp ^r x Rf ^r
ABC	Sm ^r x Sp ^r x Rf ^r
Controle	sem inoculação

No ensaio com solo utilizou-se latossolo vermelho-escuro sêrie Luiz de Queiroz, pH 5,35, escolhido de uma área onde se constatou o plantio prévio de feijão da mesma variedade, com nodulação evidente.

Após 30 dias de crescimento, as plantas foram retiradas dos vasos, seccionada a parte aérea e radicular. A parte radicular foi utilizada para avaliação da atividade de nitrogenase através da técnica de redução do acetileno. Logo após, foram retirados os nódulos, contados, pesados e avaliados com relação à estirpe predominante. A parte aérea foi seca em estufa a 60°C por 5 dias, pesada e analisada no seu teor de nitrogênio percentual através do método semi-microKjeldahl (SAR-RUGE e HAAG, 1974).

4.2.4.5. Atividade de Nitrogenase

A atividade de nitrogenase dos nódulos radiculares foi avaliada pela técnica da redução de acetileno. Assim, o sistema radicular foi colocado em frasco de 250 mL e, após a sua vedação com rolha de borracha, retirou-se 25 mL de ar com seringa apropriada, sendo, a seguir, injetado igual volume de acetileno (C₂H₂) no frasco. Após meia hora de incubação à temperatura ambiente, amostras de 0,5 mL foram retiradas da atmosfera do frasco e analisadas por cromatografia gasosa em aparelho BECKMAN GC modelo 65. Os cálculos para a atividade de nitrogenase foram realizados segundo a fórmula:

$$C_e = L \times A \times K$$

onde: C_e = concentração do etileno evoluído

L = leitura da amostra

A = atenuação

K = fator de correção das amostras.

O fator K foi calculado observando-se:

$$K = K' \cdot 1/\text{tempo incubação} \cdot 1/\text{volume injetado} \cdot \text{volume do frasco}$$

onde K' constitui o fator de correção do padrão injetado, sendo calculado por

$$K' = \frac{\text{Concentração de Etileno}}{L \cdot R}$$

onde: L = leitura do padrão (500 ppm C₂H₄)

R = "Range" do cromatógrafo

(o volume de etileno injetado foi de $0,5 \times 10^{-3}$ /ml do padrão).

4.2.4.6. Recuperação e Identificação das Estirpes dos Nódulos

Na identificação das estirpes normais predominantes nos nódulos de cada tratamento, nos dois ensaios, empregou-se a técnica de imunodifusão em Ágar (DUDMAN e BROCKWELL, 1968). Para as estirpes mutantes, utilizou-se meios seletivos com antibióticos.

Para a análise serológica foram tomados aleatoriamente, 12 nódulos de cada vaso. Tais nódulos foram esterilizados externamente,

esmagados individualmente com bastão de vidro e repicados para placas com meio YMA, conforme metodologia descrita por VINCENT (1970). Após crescimento visível e abundante, a massa bacteriana proveniente de cada nódulo foi raspada com espátula apropriada e diluída em solução salina até se conseguir uma suspensão densa. Alíquotas da suspensão foram colocadas em poços previamente preparados em Ágar-salina, constituindo-se o antígeno; em outro poço central foi adicionado o antissoro específico. Através da difusão simultânea, observou-se a formação de uma zona de precipitação entre os poços do antissoro (Ac) e o antígeno (Ag) correspondente.

No processo de recuperação e identificação das estirpes dos nódulos provenientes dos tratamentos com mutantes resistentes a antibióticos, tomaram-se também, aleatoriamente, 20 nódulos por vaso. Após passarem pelo mesmo processo de esterilização anteriormente citado, foram esmagados individualmente e repicados sucessivamente e na mesma posição, para placas com meio YMA suplementadas com um antibiótico específico, bem como para placa com o mesmo meio, porém, isento de droga (placa de viabilidade ou controle). Tais placas eram quadriculadas na parte inferior, de tal maneira a obter-se 20 quadrantes/placa, onde em cada um deles inoculou-se o nódulo esmagado. Este procedimento permitiu avaliar o crescimento em um determinado meio seletivo e sua ausência no outro meio seletivo, concluindo-se, então, da origem da estirpe em questão. No ensaio com solo as estirpes nativas foram avaliadas por exclusão. A atividade bacteriocinogênica da estirpe C.40, tanto normal quanto mutante, (Sm^r), foi avaliada após a passagem pela planta hospedeira, utilizando-se a estirpe C.88 normal e mutante (sp^r) como indicadoras.

5. RESULTADOS

5.1. Características Culturais das Estirpes

A análise do tempo de crescimento em meio sólido, mostrou que as colônias de *R. phaseoli* levam, em média, 3 a 5 dias para atingir o diâmetro de 3 mm, sendo que, eventualmente, algumas estirpes mostraram-se extremamente lentas em relação às demais, levando em média 5 a 6 dias para atingir tal crescimento, como no caso das estirpes C.28 e C.50.

Em todas as estirpes com crescimento de 3 dias, observou-se a produção de muco extracelular, sendo que, em alguns casos, a produção é intensa, salientando-se das demais. De uma maneira geral, as estirpes de crescimento mais rápido apresentam uma produção de muco, enquanto que nas estirpes de crescimento mais lento tal produção de muco é mais discreta ou até mesmo ausente, caracterizado por uma consistência "seca" perceptível no momento da realização de repiques para outros meios.

A produção de ácido foi observada na maioria das estirpes analisadas em meio "79"A suplementado com indicador Azul de Bromotimo.

As estirpes C.29, C.18 e C.14 caracterizaram-se como produtoras de álcali nas mesmas condições anteriores. Cerca de sete estirpes (C.01, C.05, C.12, C.25, C.28, C.50, C.89) permaneceram com a cor do meio inalterada. Tais estirpes foram mantidas por mais sete dias a 28°C, sendo então evidenciada a ligeira alteração de cor do meio, indicando pH ácido.

Os resultados encontram-se descritos na Tabela 7.

5.2. Eficiência de Fixação de Nitrogênio

Os dados de acúmulo de matéria seca, N% e N-total da parte aérea, acúmulo de matéria seca de nódulos e sua atividade de Nitrogenase, bem como a eficiência relativa de cada estirpe considerada, encontram-se na Tabela 8.

A análise dos dados evidenciou o aumento no acúmulo de matéria seca e teores de N-total nos tratamentos com inoculação, em relação ao tratamento testemunha sem inoculação e sem suprimento de Nitrogênio mineral. Cada estirpe mostrou sua determinada capacidade em contribuir para o desenvolvimento da planta, em termos de suprimento de nitrogênio, que foi avaliada com base na sua eficiência relativa.

A eficiência relativa baseada no acúmulo de matéria seca evidenciou valores percentuais superiores a 40% para as estirpes C.34, C.48, C.88. A eficiência relativa baseada nos teores de N-total evidenciou valores superiores a 40% nas estirpes C.05, C.14, C.18, C.19, C.22,

Tabela 7 - Características culturais das estirpes de *R. phaseoli* em meio "79"A.

Estirpe	Tempo de Cresc. em Meio Sólido (dias)	Produção de Muco	Produção ¹		Observ.
			Ácido	Alcali	
C.01	03	++	+	-	
C.03	03	++	+	-	
C.05	05	-	+	-	
C.09	05	+	+	-	
C.10	03	+	+	-	
C.12	05	-	+	-	
C.13	04	-	+	-	
C.14	04	-	-	+	
C.15	05	-	+	-	
C.18	05	-	-	+	
C.19	03	+	+	-	
C.20	03	++	++	-	
C.21	04	+	++	-	
C.22	03	+	++	-	
C.23	03	+	+	-	
C.25	05	+	+	-	
C.28	06	-	+	-	
C.29	04	+	-	++	
C.33	03	++	-	-	Neutro
C.34	04	+	+	-	
C.40	04	+	+	-	
C.44	04	+	+	-	
C.45	05	-	+	-	
C.48	04	+	+	-	
C.49	03	++	+	-	
C.50	06	-	+	-	
C.86	05	+	+	-	
C.88	03	+	+	-	
C.89	05	+	+	-	
C.90	03	+	+	-	
C.91	03	+	++	-	
C.100	03	++	-	-	Neutro
C.102	03	++	-	-	Neutro
C.103	04	+	++	-	
C.104	03	++	+	-	
C.105	04	+	++	-	

1

- ++ produção intensa
- + produção discreta
- não produtoras

Tabela 8 - Efeito da inoculação de 33 estirpes de *R. phaseoli* em feijoeiro var. "carioca", em vaso de Leonard, após 7 semanas de crescimento, em relação a duas testemunhas não inoculadas, sem nitrogênio (T s/N) e com nitrogênio (T c/N) (média de 4 repetições).

Estirpes Inoculadas	Parte Aérea			Nódulos		Eficiência ² Relativa (%)	Eficiência ³ Relativa (%)
	Matéria Seca (g/planta)	(N) %	N Total (g/planta)	Matéria Seca (g/planta)	Atividade ¹ N-ase		
01	1,572	3,17	49,587	0,178	18,40	36,60	38,79
03	1,037	4,51	38,885	0,105	14,30	24,16	30,42
05	1,649	3,14	51,885	0,201	10,73	38,42	40,57
09	1,519	3,34	50,411	0,183	3,76	35,39	39,44
10	1,417	3,05	42,889	0,105	7,53	33,01	33,55
12	0,943	2,66	24,505	0,090	12,43	21,97	19,17
13	0,467	1,78	8,093	0,068	2,79	10,88	6,33
14	1,333	4,27	56,994	0,159	19,13	31,05	44,59
15	0,727	1,94	14,435	0,153	5,53	16,93	11,29
17	1,024	2,38	24,023	0,137	14,46	23,85	18,79
18	1,435	4,47	64,050	0,202	13,66	33,43	50,11
19	1,517	3,67	56,123	0,242	23,27	35,34	43,91
20	1,174	2,05	24,082	0,201	6,80	27,35	18,84
21	0,929	4,28	40,004	0,241	6,66	21,64	31,30
22	1,261	4,45	55,094	0,086	13,01	29,38	43,10
23	1,653	4,33	71,858	0,166	15,08	38,51	56,22
25	1,095	2,85	31,638	0,138	10,97	25,51	24,75
28	1,631	3,50	55,154	0,115	4,97	38,00	43,15
29	1,352	3,42	45,810	0,240	6,27	31,50	35,84
33	1,662	3,61	58,193	0,203	11,40	38,72	45,53
34	1,766	3,10	54,304	0,325	17,92	41,14	42,48
40	1,426	2,69	38,215	0,226	14,65	33,22	29,90
48	1,855	1,98	36,447	0,309	15,07	43,21	28,51
49	0,895	3,17	28,461	0,144	6,41	20,80	22,26
50	1,365	3,11	42,423	0,154	17,13	31,80	33,19
66	1,517	3,00	46,997	0,419	9,13	35,34	36,77
88	2,115	3,23	67,573	0,476	19,41	49,27	52,87
89	0,649	2,98	19,641	0,253	4,75	15,12	15,36
91	1,220	2,33	28,555	0,242	3,69	28,42	22,342
100	1,090	2,29	24,841	0,303	20,94	25,39	19,43
102	1,108	2,74	30,594	0,223	10,80	25,81	23,39
104	0,928	2,15	20,115	0,140	3,95	21,62	15,73
105	0,917	2,31	21,405	0,101	24,90	21,36	16,74
T s/N	0,402	2,74	12,071	0	0	9,36	9,44
T c/N	4,292	2,98	127,808	0	0	100,00	100,00
F	13,90**	8,21**	11,454**	4,27**	11,01**		
DMS	0,967	1,51	36,950	0,273	11,08		
C.V. (%)	25,74	17,53	31,56	52,29	35,538		

¹ $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{planta/h}$.

² avaliada conforme item 4.2.1.3. (Material e Métodos)

³ avaliada conforme a relação:
$$\text{Efr} = \frac{\text{Média N-Total Planta Inoculada}}{\text{Média N-Total Planta Test. c/N}} \times 100$$

Obs.: Não foram analisadas as estirpes C.44, C.45, C.90 e C.103. A estirpe C.17 foi incluída, apesar de não estar relacionada na Tabela 2.

C.28, C.33, C.34, C.88.

Comparando-se os dados de atividade de Nitrogenase e Eficiência Relativa, verificou-se que, em um número considerável de tratamentos, não foi observada uma proporcionalidade, visto que aqueles que apresentaram alta eficiência nem sempre evidenciaram alta atividade de fixação de nitrogênio.

5.3. Produção de Bacteriocinas

Os resultados do ensaio de produção de bacteriocinas entre as 36 estirpes de *R. phaseoli*, contra as mesmas estirpes tomadas como indicadores, encontram-se na Tabela 9.

Nela podemos observar que 9 estirpes (25%) manifestaram-se como produtoras e 17 estirpes (47,2%) evidenciaram-se como susceptíveis à ação de tais substâncias.

O espectro de atividade das estirpes produtoras geralmente foi baixo, ficando restrito de 1 a 3 estirpes sensíveis, com exceção da estirpe C.40 que apresentou amplo espectro de ação, cuja bacteriocina foi ativa contra 8 estirpes. O tamanho do halo de inibição produzido nesta estirpe foi bem distinto da maioria observada, caracterizando-se por ser maior de 3 mm, tomado da sua borda externa até os bordos da colônia produtora.

Entre as estirpes indicadores, verificou-se que 17 delas

Tabela 9 - Estirpes de *R. phaseoli* produtoras e não produtoras de bacteriocinas, em relação às mesmas estirpes utilizadas como indicadoras (I).

ESTIRPES ENSAIADAS COMO PRODUTORAS	
I	1 3 5 9 10 12 13 14 15 18 19 21 22 23 25 28 29 33 34 40 44 45 48 49 50 86 88 89 90 91 100 102 103 104 105
1(+).(+)......(+)......
3(++).....
5
9
10(++).....
12(+)......
13
14(+)......
15
18(+)......
19
20
21
22
23(+)......
25
28(++).....
29
33(+)......
34
40
44(++).....(+)
45(++).....
48
49(+)......
50
86(++).....
88(++).....(+)......(+)
89
90(+)......
91
100
102
103
104(+)......
105(+)......

- Ausência de halo de inibição. Não Produtora.
 (+) Presença de halo de inibição < 3 mm. Produtora.
 (++) Presença de halo de inibição ≥ 3 mm. Produtora.

mostraram-se susceptíveis a bacteriocinas das estirpes produtoras consideradas, sendo as demais resistentes a qualquer tipo de bacteriocina produzida. Tal susceptibilidade foi esparsa e restrita a 1 ou 3 tipos de bacteriocinas, à exceção da estirpe C.88, que mostrou um amplo espectro de susceptibilidade, considerando-se as bacteriocinas produzidas por 5 estirpes.

Confirmou-se, também o fato já relatado por FREDERICQ (1957), no qual a população de células bacteriocinogênicas apresenta imunidade contra a própria bacteriocina produzida.

A Figura 1 ilustra a produção de bacteriocinas pela estirpe C.40, frente à estirpe C.88, tomada como indicadora, evidenciada através da presença de halo de inibição em torno da colônia inativada.

5.4. Níveis de Resistência a Drogas Antimicrobianas

Os resultados dos níveis de resistência para cada estirpe, bem como a frequência destes níveis na população ensaiada, encontram-se na Tabela 10 e Figuras 2 e 3, respectivamente.

Em termos gerais, as figuras mostram que a maioria das drogas utilizadas apresenta uma distribuição unimodal, à exceção do Clo-ranfenicol e, talvez também, a Espectinomicina, que apresentaram uma tendência à bimodalidade, embora tal situação não esteja bem caracterizada como em outros resultados descritos para outros microorganismos, onde a

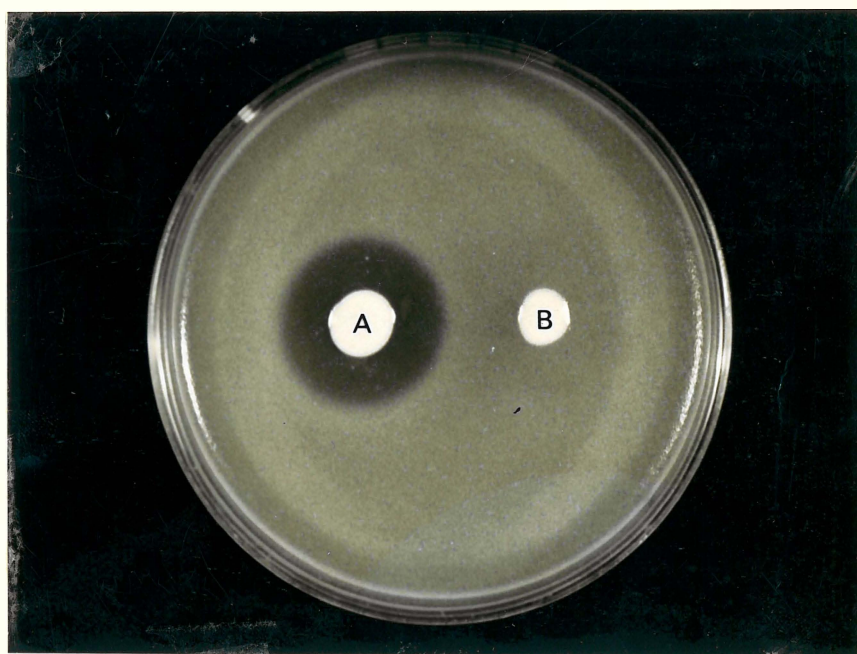


Figura 1 - A - Atividade bacteriocinogênica da estirpe C.40, frente à estirpe C.88 (indicadora, crescida em toda a placa), evidenciada através do halo de inibição em torno da colônia produtora.

B - Estirpe C.86 não produtora de bacteriocina frente à estirpe indicadora C.88.

Tabela 10 - Níveis de resistência (NR) de 36 estirpes de *R. phaseoli* frente a 7 drogas antimicrobianas.

Estirpes	Drogas ($\mu\text{g}/\text{mL}$)						
	Sm	Sp	Cl	Pn	Rf	Tc	Hg
C.01	2	1	20	<1	5	0,02	2
C.03	<1	1	5	2	<1	0,05	2
C.05	<1	1	1	1	<1	0,02	1
C.09	2	1	20	5	5	0,1	1
C.10	2	1	10	20	2	0,1	1
C.12	5	1	10	5	2	0,2	1
C.13	<1	1	1	2	1	0,2	2
C.14	1	1	10	1	5	0,05	1
C.15	1	2	1	<1	10	0,05	1
C.18	5	1	5	5	2	0,05	1
C.19	<1	2	5	10	10	0,2	1
C.20	5	20	20	10	5	0,05	1
C.21	1	1	10	10	2	0,1	1
C.22	<1	5	10	5	2	0,05	<1
C.23	2	1	5	1	1	0,05	2
C.25	1	1	10	20	2	0,2	5
C.28	1	1	1	5	2	0,2	2
C.29	10	5	2	20	1	0,1	1
C.33	5	5	10	2	10	0,05	1
C.34	5	5	20	1	2	0,1	1
C.40	1	2	20	2	2	0,05	1
C.44	1	2	20	5	5	0,1	2
C.45	1	5	20	1	10	0,2	5
C.48	5	20	10	5	10	0,05	1
C.49	1	5	1	5	2	0,05	5
C.50	1	1	50	10	5	0,1	2
C.86	1	1	<1	<1	5	0,05	1
C.88	1	5	50	20	5	0,2	1
C.89	2	5	10	5	5	0,1	1
C.90	2	2	1	5	5	0,1	2
C.91	1	1	20	5	2	0,1	2
C.100	10	10	10	20	10	0,1	1
C.102	2	1	1	10	5	0,01	2
C.103	10	2	10	50	<1	0,1	2
C.104	2	2	10	5	2	0,1	1
C.105	2	5	10	2	1	0,1	2

Sm: Estreptomicina; Sp: Espectinomicina; Cl: Cloranfenicol; Pn: Penicilina; Rf: Rifampicina; Tc: Tetraciclina; Hg: Mercúrio

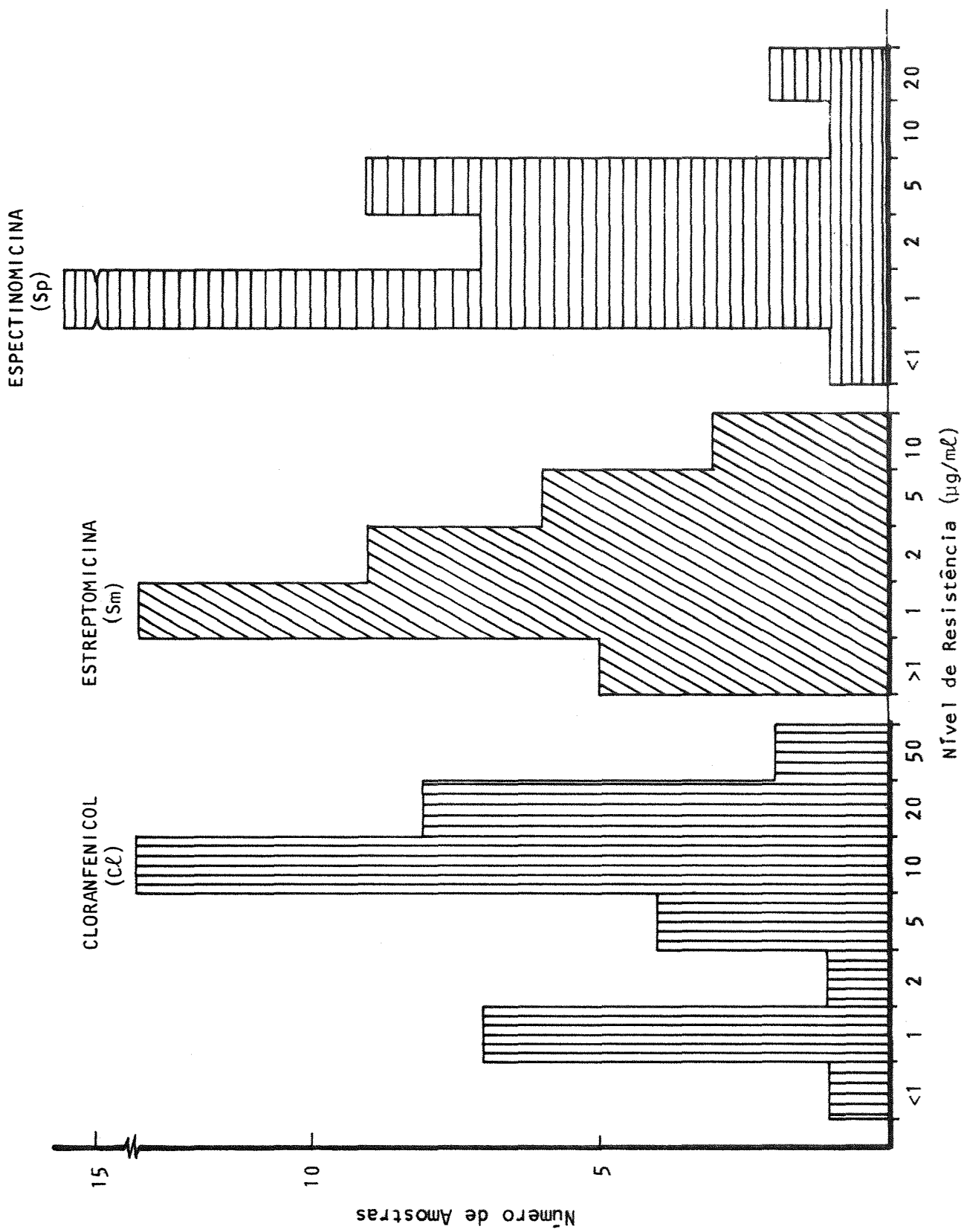


Figura 2 - Frequência dos Níveis de Resistência em uma população de 36 estirpes de *R. phaseoli*, frente a Cloranfenicol, Estreptomina e Espectinomicina.

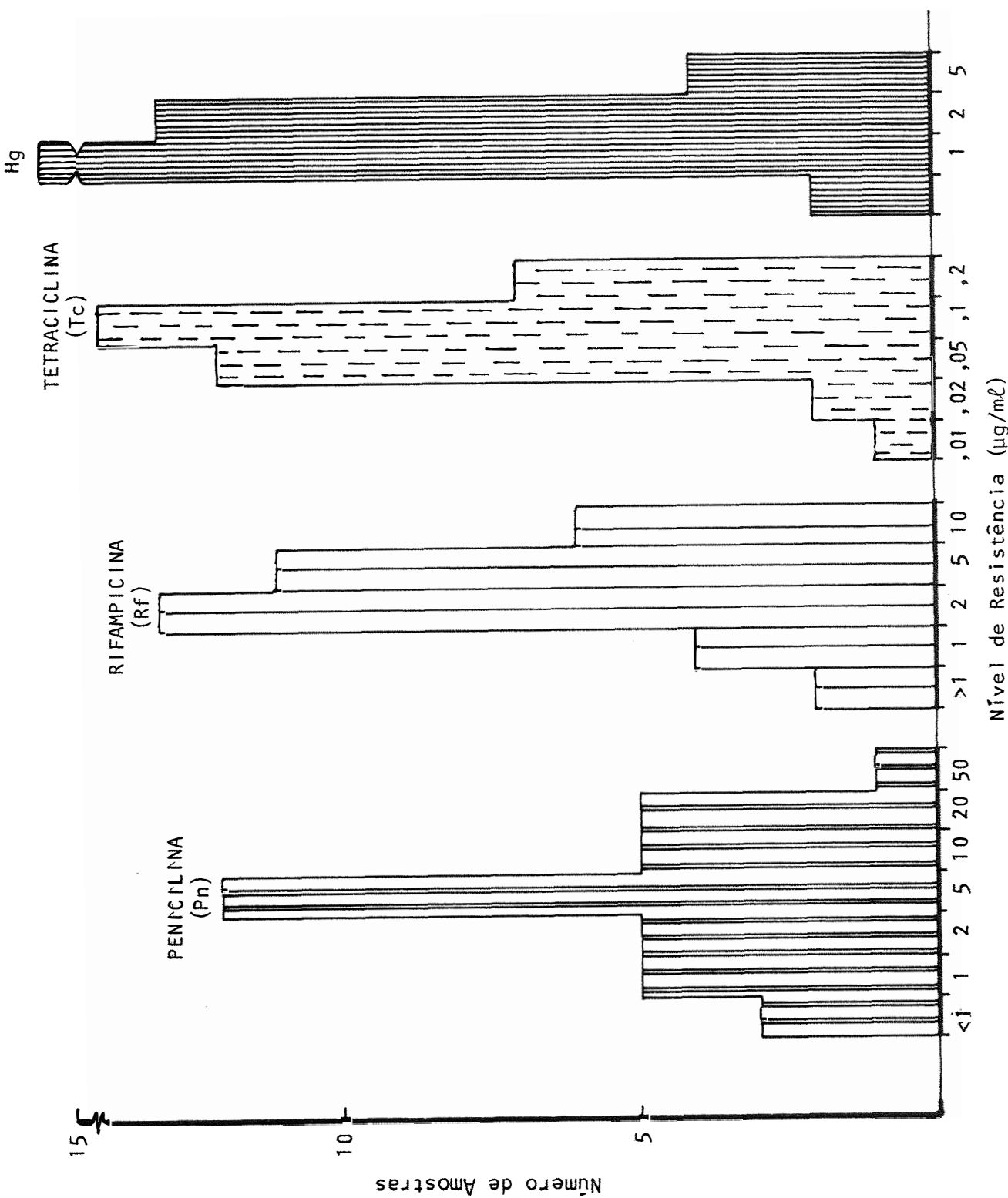


Figura 3 - Frequência dos Níveis de Resistência (NR) em uma população de 36 estirpes de *R. phaseoli* frente a Penicilina, Rifampicina, Tetraciclina e Bicloreto de Mercúrio.

caracterização de populações resistentes e sensíveis se dá através de uma nítida separação entre dois grupos (TRABULSI, 1971; CHARTONE-SOUZA, 1975).

Os menores níveis de resistência foram observados nos tratamentos com tetraciclina, onde 100% das estirpes apresentaram nível de resistência inferior a 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Este antibiótico foi, então, ensaiado para concentrações 10 vezes mais baixas que os níveis originais, verificando-se, então, a sua distribuição unimodal.

Para os demais antibióticos, os níveis de resistência situaram-se na faixa de 1 a 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Com relação ao mercúrio, os níveis de resistência encontrados foram baixos, também com uma distribuição unimodal e com a frequência maior em torno de 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

5.5. Obtenção de Mutantes Resistentes a Antibióticos

No processo de obtenção das estirpes mutantes resistentes a antibióticos, relatado no item 4.2.4.3. de "Material e Métodos", verificou-se o crescimento de poucas colônias nas placas com os respectivos antibióticos na concentração final de 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Note-se que a avaliação da frequência de mutação não foi realizada tendo em vista os objetivos práticos da obtenção dos referidos mutantes.

A possível existência de resistência cruzada entre os mu-

tantes resistentes assim obtidos, foi excluída, visto que não se observou o seu crescimento nas placas suplementadas com os antibióticos, tomados separadamente, para os quais não foram selecionados.

5.6. Capacidade Competitiva

Com base nos resultados do ensaio de produção de bacteriocinas (Tabela 9), foram selecionadas as seguintes estirpes: C.40 (Bac⁺), C.88 (Bac^S) e C.100 (Bac⁻). Tais estirpes, após procedimento detalhado no item 4.2.4.1. de "Material e Métodos", foram utilizadas nas inoculações (tratamentos) aplicadas nos dois ensaios de competição, visando a verificação da possível vantagem seletiva da estirpe bacteriocinogênica sobre as demais.

O número de células viáveis/ml do meio de cultura de cada estirpe utilizada como inoculante, nos dois ensaios de competição (vaso Leonard esterilizado e vaso com solo), encontra-se na Tabela 11.

Tabela 11 - Número de células viáveis/ml das culturas líquidas de *R. phaeo*, utilizadas como inoculante, nos dois ensaios de competição (média de 3 placas).

Inóculo	Ensaio Vaso Leonard (nº células/ml)	Ensaio Vaso c/ Solo (nº células/ml)
1. Estirpes Normais		
C.40	4,0 x 10 ⁸	3,8 x 10 ⁸
C.88	6,9 x 10 ⁸	4,35 x 10 ⁸
C.100	5,0 x 10 ⁸	3,05 x 10 ⁸
2. Estirpes Mutantes		
C.40 Sm ^r	6,1 x 10 ⁷	4,03 x 10 ⁸
C.88 Sp ^r	1,43 x 10 ⁸	2,8 x 10 ⁸
C.100 Rf ^r	9,3 x 10 ⁷	1,0 x 10 ⁸

As Figuras 4 e 5 ilustram os aspectos gerais da condução dos referidos ensaios, em casa de vegetação.

5.6.1. Efeito das inoculações (tratamentos) na planta-hospedeira nos dois ensaios de competição

5.6.1.1. Vaso de Leonard

Os dados de acúmulo de matéria seca, N%, N-total da parte aérea, acúmulo de matéria seca na raiz, bem como o número, matéria úmida e atividade de Nitrogenase dos nódulos, após 30 dias de crescimento das plantas nos diversos tratamentos considerados, encontram-se na Tabela 12.

A análise de variância dos valores obtidos para N-total da parte aérea e nodulação, encontram-se na Tabela 13. Nela podemos observar que o efeito dos vários tipos de inoculação (tratamentos) entre estirpes originais (C.40, C.88 e C.100) não promoveu diferenças significativas nas características analisadas, com exceção dos valores de N-total da parte aérea nas inoculações simples, com estirpes normais. Com relação aos tratamentos correspondentes às estirpes mutantes, verificou-se também o mesmo fato, ou seja, as diferenças detectadas entre as inoculações simples, duplas e grupos não foram significativas.

Na comparação entre os tratamentos com estirpes normais e mutantes, observou-se diferenças significativas para todos os caracteres analisados, que corresponderam, em termos gerais, a uma diminuição dos valores encontrados nas estirpes mutantes em relação às estirpes nor



Figura 4 - Aspectos gerais da condução do ensaio de competição em vaso de Leonard esterilizado, mostrando as plantas (feijoeiro var. "carioca") com 30 dias de crescimento.



Figura 5 - Aspectos gerais da condução do ensaio de competição em vaso com solo não estéril, mostrando plantas (feijoeiro var. "carioca") com 28 dias de crescimento.

Tabela 12 - Efeito das inoculações simples, duplas e triplas de 3 estirpes de *R. phaseoli* (normais e mutantes) sobre a parte aérea, raiz e nodulação de feijoeiro var. "carioca", com 30 dias de crescimento, em vaso de Leonard (média de 4 repetições).

Tratamentos (Inoculações)	Parte Aérea			Raiz		Nodulação	
	Matéria Seca (g/planta)	N (%)	N Total (mg/planta)	Matéria Seca (mg/planta)	Número (planta)	Matéria Úmida (mg/planta)	Atividade ¹
1. Originais							
A - C.40	0,547 a	3,66 a	20,09 a	112,90 bc	189,50 a	683,51 a	6,13 a
B - C.88	0,492 ab	3,51 a	17,45 a	119,18 bc	157,75 a	641,11 a	9,62 a
C - C.100	0,334 ab	3,52 a	11,92 ab	97,42 bc	139,75 a	562,58 a	8,65 a
AB - C.40 x C.88	0,426 ab	3,66 a	15,60 a	137,55 a	141,12 a	646,01 a	5,89 a
AC - C.40 x C.100	0,309 ab	4,00 a	12,48 ab	116,02 bc	142,50 a	625,43 a	7,73 a
BC - C.88 x C.100	0,343 ab	3,69 a	12,63 ab	104,76 bc	188,50 a	667,66 a	5,55 a
ABC - C.40 x C.88 x C.100	0,424 ab	3,59 a	15,33 a	110,03 bc	122,37 a	570,1 a	6,63 a
2. Mutantes							
A - C.40 Sm ^r	0,303 ab	4,34 a	13,09 ab	74,57 c	81,62 a	260,8 a	3,18 a
B - C.88 Sp ^r	0,308 ab	3,75 a	11,59 ab	81,00 bc	74,12 a	333,05 a	7,31 a
C - C.100 Rf ^r	0,259 b	3,71 a	9,66 ab	110,22 bc	148,62 a	405,7 a	6,76 a
AB - Sm ^r x Sp ^r	0,294 ab	3,64 a	10,78 ab	79,76 b	111,75 a	355,45 a	4,79 a
AC - Sm ^r x Rf ^r	0,382 ab	3,96 a	14,80 a	77,28 bc	132,12 a	402,63 a	4,18 a
BC - Sp ^r x Rf ^r	0,392 ab	3,71 a	15,07 a	98,02 bc	134,50 a	439,8 a	7,39 a
ABC - Sm ^r x Sp ^r x Rf ^r	0,343 ab	3,33 a	11,62 ab	89,57 bc	112,75 a	246,18 a	3,53 a
T s/inoculação	0,193 b	1,30 b	2,82 b	182,2 a	0 b	0 b	0 b
F	2,79**	10,61**	3,16**	5,02**	3,97**	4,97**	2,44*
DMS (Tukey 5%)	0,274	1,04	11,22	62,88	120,65	449,67	7,90
C.V. (%)	30,29	11,52	33,87	23,25	19,90	20,61	20,34

¹ - $\mu\text{moles C}_2\text{H}_4/\text{planta}/\text{h}$.

Valores dentro da mesma coluna, com a mesma letra, não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey)

Tabela 13 - Valores e significância dos quadrados médios para N-total da parte aérea e três características referentes à nodulação em feijoeiro, no ensaio de competição em Vaso de Leonard, este realizado.

FV	(G.L.)	Parte Aérea		Nodulação	
		N Total	Número	Matéria Úmida	Atividade
Tratamentos (Inoculações)	(14)	61,43**	38,62**	168,76**	1,32**
a) <u>Estirpes Normais</u>	(6)				
a.1 - Inoc. simples	(2)	69,60**	4,69 ns	7,48 ns	0,32 ns
a.2 - Inoc. duplas	(2)	12,36 ns	3,55 ns	0,20 ns	0,18 ns
a.3 - Grupos	(2)	25,69 ns	4,01 ns	2,83 ns	0,24 ns
b) <u>Estirpes Mutantes</u>	(6)				
b.1 - Inoc. simples	(2)	11,82 ns	15,57*	17,28*	0,89*
b.2 - Inoc. duplas	(2)	23,07 ns	1,09 ns	3,34 ns	0,02 ns
b.3 - Grupos	(2)	14,54 ns	4,08 ns	36,01 ns	0,39 ns
c) <u>Normal vs Mutante</u>	(1)	101,93*	50,92**	613,01**	2,44**
d) <u>Test. vs Inoc.</u>	(1)	443,93**	423,84**	1615,30**	11,97**
e) <u>Resíduo</u>	(45)	19,39	4,49	17,19	0,23
CV (%)		38,87	19,90	20,61	20,34
unidade		mg / planta	$\sqrt{x+0,5}$	$\sqrt{x+0,5}$ x=mg/planta	$\sqrt{x+0,5}$ x= μ moles C_2H_4 / planta/hora

* - significativo a 5% - Teste F

** - significativo a 1%

mais. Os dados referentes aos tratamentos inoculados evidenciaram também diferenças significativas para todos os caracteres analisados, em relação à testemunha sem inoculação.

5.6.1.2. Vaso com Solo

Os dados de acúmulo de matéria seca, N%, N-total da parte aérea, acúmulo de matéria seca na raiz, bem como o número, matéria úmida e atividade de Nitrogenase dos nódulos, encontram-se na Tabela 14.

A análise de variância dos valores obtidos para N-total e nodulação encontram-se na Tabela 15. Através desta, evidenciou-se diferenças significativas entre os tratamentos considerados, com exceção do peso da matéria úmida dos nódulos.

Com relação ao efeito da inoculação entre as estirpes normais, sobre os caracteres analisados, nos tratamentos correspondentes, verificou-se uma certa homogeneidade dos valores obtidos entre as inoculações simples, duplas e entre grupos. Este último, revelou diferenças significativas para peso da matéria úmida de nódulos somente.

Entre as estirpes mutantes, diferenças significativas foram detectadas para N-total, considerando-se as inoculações entre grupos, bem como o número de nódulos fornecidos através das inoculações simples.

Verificou-se, ainda, diferenças significativas entre estirpes normais e mutantes, para os valores obtidos de N-total, número e

Tabela 14 - Efeito das inoculações simples, duplas e triplas de 3 estirpes de *R. phaseoli* (normais e mutantes) sobre a parte aérea, raiz e nodulação de feijoeiro var. "carioca", com 30 dias de crescimento, em vaso com solo (média de 4 repetições).

Tratamentos (Inoculações)	Parte Aérea .			Raiz	Nodulação		
	Matéria Seca (g/planta)	N (%)	N Total (mg/planta)	Matéria Seca (mg/planta)	Número	Matéria Úmida (mg/planta)	Atividade ¹
1) Estirpes Normais							
A - C.40	0,858 a	1,55 cd	13,39 ab	307,13 ab	80,87 a	185,87 a	1,27 ab
B - C.88	0,748 ab	1,53 cd	11,41 ab	323,06 a	68,62 a	120,80 a	1,61 ab
C - C.100	0,828 a	1,45 d	12,15 ab	347,41 a	74,45 a	159,82 a	2,07 a
AB - C.40 x C.88	0,748 ab	1,64 bcd	12,08 ab	305,47 ab	57,5 a	176,75 a	1,20 ab
AC - C.40 x C.100	0,742 ab	1,43 d	10,57 a	248,97 ab	79,75 a	186,57 a	0,99 ab
BC - C.88 x C.100	0,708 abc	1,57 cd	11,00 b	270,25 ab	75,50 a	198,15 a	1,26 ab
ABC - C.40 x C.88 x C.100	0,817 a	1,45 d	11,88 ab	264,75 ab	85,37 a	228,33 a	1,35 ab
2) Estirpes Mutantes							
A - C.40 Sm ^f	0,668 abc	1,81 abcd	12,21 ab	185,95 b	43,87 b	134,33 a	0,69 ab
B - C.88 Sp ^f	0,549 bc	1,95 abcd	10,75 b	237,13 ab	47,87 a	142,25 a	1,29 ab
C - C.100 Rf ^f	0,487 c	2,14 ab	10,39 b	185,17 b	47,37 a	102,52 a	0,44 b
AB - Sm ^f x Sp ^f	0,777 a	2,00 abc	15,62 a	277,75 ab	55,75 a	192,50 a	0,59 ab
AC - Sm ^f x Rf ^f	0,702 abc	2,23 a	15,74 a	238,77 ab	57,25 a	205,85 a	0,76 ab
BC - Sp ^f x Rf ^f	0,711 ab	1,88 abcd	13,43 ab	242,13 ab	67,00 a	196,07 a	1,01 ab
ABC - Sm ^f x Sp ^f x Rf ^f	0,751 ab	1,79 abcd	13,44 ab	242,23 ab	59,12 a	192,70 a	1,25 ab
T s/ inoculação	0,720 ab	1,99 abc	10,33 b	250,82 ab	62,25 a	199,82 a	0,40 b
F	5,01**	8,01**	4,14**	3,61**	2,20*	0,77 ns	2,10*
DMS (Tukey 5%)	0,222	0,524	4,353	134,5	40,36	208,08	1,59
C.V. (%)	12,07	10,60	13,88	18,35	28,44	43,57	56,84

¹µmoles C₂H₄/planta/h.

Valores dentro da mesma coluna, com a mesma letra, não diferem estatisticamente ao nível de 5% (Tukey)

Tabela 15 - Valores e significância dos quadrados médios para N-total da parte aérea e três características referentes à nodulação em feijoeiro, no ensaio de competição em vaso com solo.

FV	(G.L.)	Parte Aérea		Nodulação		Atividade
		N Total	Número	Matéria Úmida		
Tratamentos (inoculações)	(14)	12,08**	727,61*	5027,21 ns		0,77*
a) <u>Estirpes Normais</u>	(6)					
a.1 - Inoc. simples	(2)	3,99 ns	150,18 ns	4283,24 ns		0,64 ns
a.2 - Inoc. duplas	(2)	2,42 ns	558,08 ns	458,98 ns		0,07 ns
a.3 - Grupos	(2)	3,65 ns	313,61 ns	8584,32*		0,74 ns
b) <u>Estirpes Mutantes</u>	(6)					
b.1 - Inoc. simples	(2)	3,70 ns	19,00*	1888,95 ns		0,36 ns
b.2 - Inoc. duplas	(2)	6,75 ns	149,25 ns	190,26 ns		0,18 ns
b.3 - Grupos	(2)	43,98**	568,17 ns	17244,63 ns		0,42 ns
c) <u>Normais vs Mutantes</u>	(1)	23,66**	6629,40**	2382,14 ns		4,50**
d) <u>Test. vs Inoc.</u>	(1)	16,48*	40,61 ns	2698,10 ns		1,42*
e) <u>Resíduo</u>	(45)	2,91	330,53	5797,40		0,37
CV (%)		13,88	28,44	43,57		56,84
unidade		mg/planta	$\sqrt{x+0,5}$	$\sqrt{x+0,5}$	$\sqrt{x+0,5}$	$\sqrt{x+0,5}$ x=µmoles C ₂ H ₄ /planta/hora

* - significativo a 5% - Teste F

** - significativo a 1%

atividade de nódulos. Os valores obtidos não evidenciaram diferenças significativas.

O confronto dos valores obtidos para os tratamentos inoculados frente à testemunha sem inoculação, revelou diferenças significativas para N-total e atividade de Nitrogenase dos nódulos, porém, os valores encontrados para número e peso de matéria úmida não evidenciaram diferenças significativas.

As Figuras 6 e 7 ilustram os tratamentos com inoculações simples de estirpes normais (N) e mutantes (M), respectivamente, em relação ao controle não inoculado.

5.6.2. Recuperação das estirpes inoculadas

5.6.2.1. Ensaio em vaso de Leonard

5.6.2.1.1. Estirpes Mutantes

Os dados referentes à porcentagem de recuperação das estirpes mutantes resistentes a antibióticos, nos diversos tratamentos considerados, encontram-se na Tabela 16 e Figura 8.

Através delas, podemos observar que os tratamentos com inoculações simples (S_m^r (A) e S_p^r (B)) geraram 100% de recuperação, enquanto que o tratamento com R_f^r gerou 86,25% de recuperação. Nos tratamentos correspondentes às inoculações duplas, observou-se uma maior porcentagem de recuperação das estirpes S_p^r (AB e AC), enquanto que no tra-



Figura 6 - Detalhe das plantas (feijoeiro var. "carioca") pertencentes aos tratamentos correspondentes às inoculações simples com as estirpes normais (N) C.40, C.88 e C.100, em relação à testemunha não inoculada, no ensaio de competição em vaso de Leonard esterilizado, com 30 dias de crescimento.



Figura 7 - Detalhe das plantas (feijoeiro var. "carioca") pertencentes aos tratamentos correspondentes às inoculações simples com estirpes mutantes resistentes a antibióticos (M) C.40 Sm^r , C.88 Sp^r e C.100 Rf^r , em relação à testemunha não inoculada, no ensaio de competição em vaso de Leonard esterilizado, aos 30 dias de crescimento.

Tabela 16 - Percentual de recuperação das estirpes mutante-resistentes nos diversos tratamentos do ensaio de competição em vaso de Leonard esterilizado (80 nódulos por tratamento).

Tratamentos (Inoculações)	% Recuperação					
	Meio sem Antibiótico	Sm	Sp	Rf	Sm e Sp ^{a/}	Sp e Rf ^{a/}
A-C.40 (Sm ^r)	100,00	100,00	-	-	-	-
B-C.88 (Sp ^r)	100,00	-	100,00	-	-	-
C-C.100 (Rf ^r)	100,00	-	-	86,25	-	-
AB-Sm ^r x Sp ^r	100,00	13,75	82,50	-	3,75	-
AC-Sm ^r x Rf ^r	100,00	97,75	-	0,00	-	-
BC-Sp ^r x Rf ^r	100,00	-	95,00	2,50	-	1,25
ABC-Sm ^r x Sp ^r x Rf ^r	100,00	21,25	73,75	0,00	3,75	0,00

- não ensaiadas

^{a/} crescimento duplo

Sm: Estreptomicina; Sp: Espectinomicina; Rf: Rifampicina.

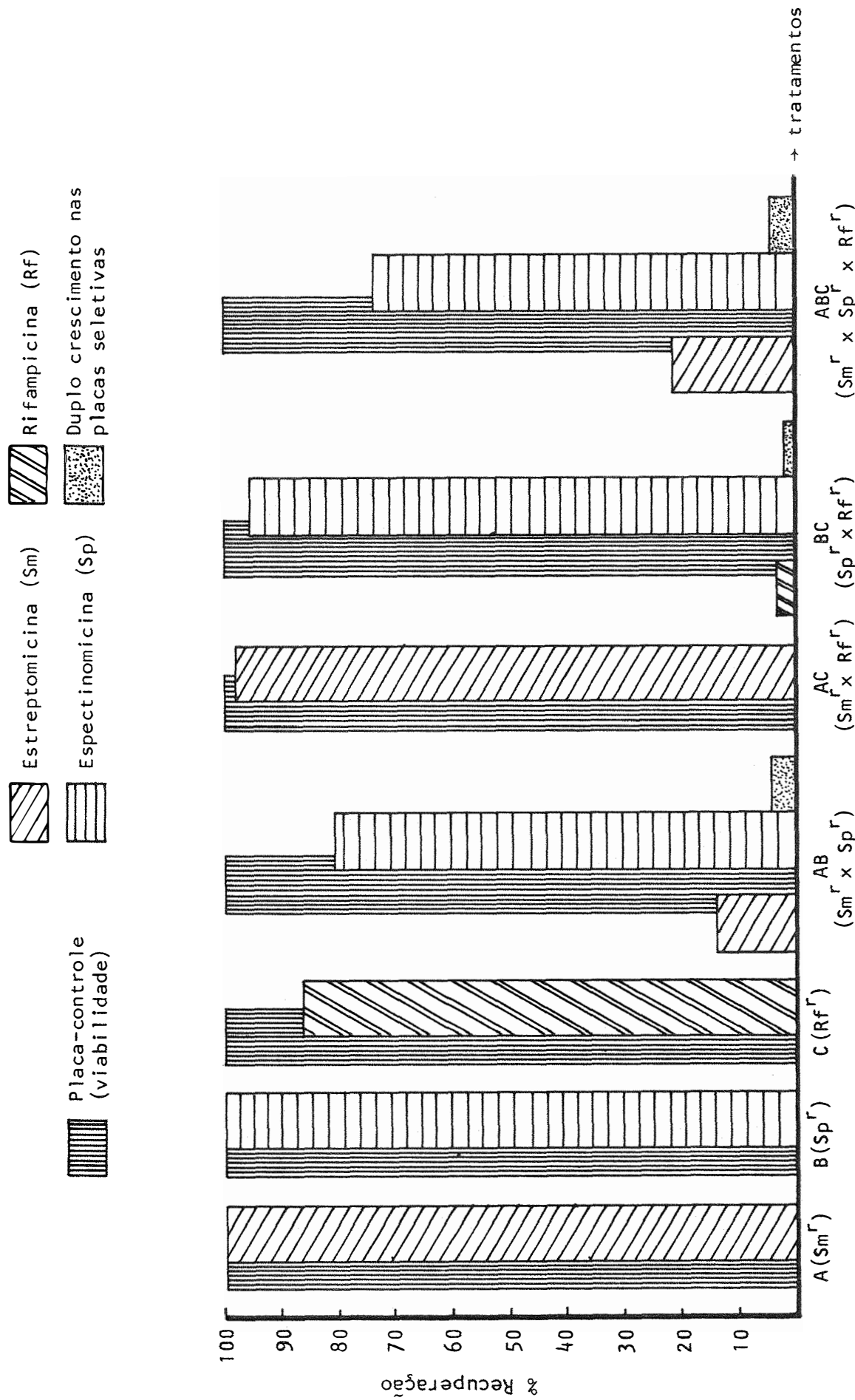


Figura 8 - Percentual de recuperação das estirpes mutante-resistentes a antibióticos, dos nódulos de cada tratamento no ensaio em vaso de Leonard esterilizado.

tamento AC a quase totalidade recuperada foi S_m^r . No tratamento com inoculações triplas (ABC) prevaleceu a maior porcentagem de nódulos S_p^r . Observou-se ainda duplos crescimentos nos tratamentos AB (3,75%), BC (1,25%) e ABC (3,75%).

Tais crescimentos duplos foram analisados mais detalhadamente, e os resultados encontram-se na Tabela 17. Deste modo, observou-se que nenhum clone proveniente destes nódulos cresciam em placas seletivas com dois antibióticos, correspondentes ao tratamento considerado.

5.6.2.1.2. Estirpes normais

A porcentagem de estirpes normais, presentes em cada um dos nódulos dos tratamentos considerados no ensaio em vaso de Leonard, encontra-se na Tabela 18.

Tabela 17 - Análise das estirpes isoladas de nódulos que apresentaram resistência a dois ou mais antibióticos isoladamente, no ensaio em Vaso de Leonard esterilizado (20 colônias por isolado).

Tratamentos	Isolado ^{1*}	Marcas Analisadas	Nº Crescido em Placas				Ausência ² de Crescimento
			Sm e Sp	Sm e Rf	Sm	Sp	
AB	IV (1E)	Sm ^r e Sp ^r	0	-	8	11	1
	IV (2A)	Sm ^r e Sp ^r	0	-	6	14	-
	IV (4A)	Sm ^r e Sp ^r	0	-	10	8	2
BC	III (2A)	Sm ^r e Rif ^r	-	0	18	-	2
ABC	I (1B)	Sm ^r e Sp ^r	0	-	9	11	-
	I (4B)	Sm ^r e Sp ^r	0	-	12	8	-

^{1*} - Conforme Tabela 1A

² - Analisados por exclusão (ausência de crescimento nas placas seletivas com 1 antibiótico)

Tabela 18 - Percentual de estirpes normais presentes em cada nódulo, identificados através de testes serológicos, nos tratamentos correspondentes, do ensaio em vaso de Leonard (12 nódulos analisados por planta)

Tratamentos (Inoculações)	% Avaliada de Cada Estirpe			
	C.40	C.88	C.100	Reações Duplas ^{a/}
A - C.40	100,0	-	-	-
B - C.88	-	100,0	-	-
C - C.100	-	-	100,0	-
AB - C.40 x C.88	33,3	58,4	-	8,3
AC - C.40 x C.100	58,4	-	41,6	-
BC - C.88 x C.100	-	66,6	33,4	-
ABC - C.40 x C.88 x C.100	25,0	50,0	16,7	8,3

^{a/} positivo para dois antissoros específicos

5.6.2.2. Ensaio em vaso com solo

5.6.2.2.1. Estirpes mutantes

A porcentagem de recuperação das estirpes mutantes resistentes a antibióticos, nos diversos tratamentos considerados, encontra-se na Tabela 19 e Figura 9. Através delas, evidencia-se a alta porcentagem de nódulos portadores de estirpes nativas (% não recuperada) em relação às estirpes mutantes. Nos tratamentos correspondentes às inoculações duplas e triplas, predominaram os nódulos portadores de estirpes Sm^r (AB, AC, ABC).

5.6.2.2.2. Estirpes normais

O percentual das estirpes normais presentes em cada nódulo dos diversos tratamentos do ensaio em vaso com solo, analisados por serologia, encontra-se na Tabela 20.

Tabela 19 - Frequência de recuperação (%) das estirpes mutantes resistentes nos diversos tratamentos do ensaio de competição em solo (80 nódulos por tratamento).

Tratamento	% Recuperadas			% <u>a/</u> Não Recuperada
	Sm ^r	Sp ^r	Rf ^r	
A	28,75	-	-	71,25
B	-	6,25	-	93,75
C	-	-	5,00	95,0
AB	55,00	3,75	-	41,25
AC	51,25	5,00	-	43,75
BC	-	8,75	10,00	81,25
ABC	35,00	2,50	-	62,50
T	-	-	-	100,00
\bar{x}	42,5	5,31	2,23	84,10

a/ Ausência de crescimento nas placas seletivas com antibióticos correspondentes ao tratamento considerado.

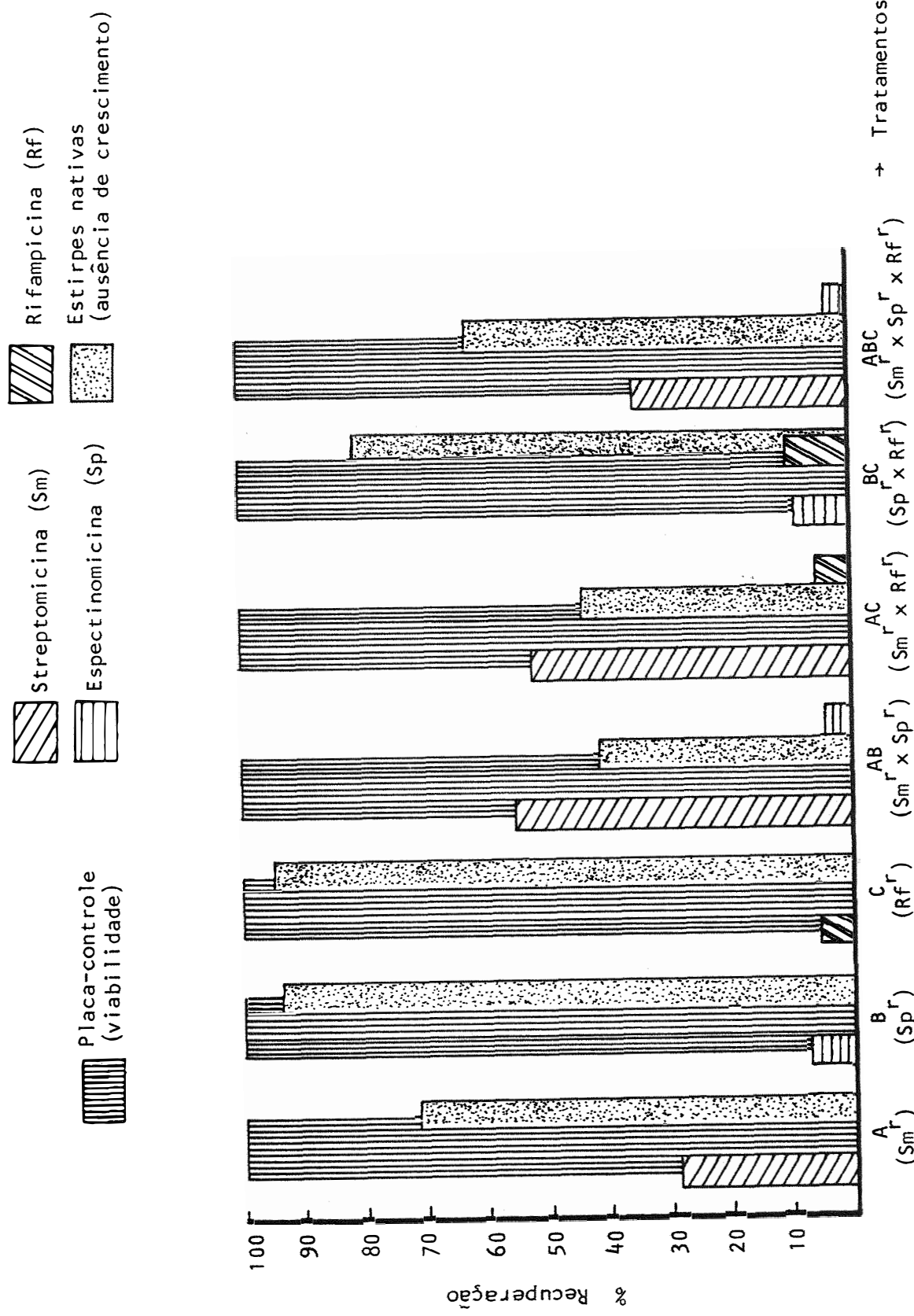


Figura 9 - Percentual de recuperação das estirpes mutante-resistentes a antibióticos, dos nódulos de ca- da tratamento no ensaio em vaso com solo.

Tabela 20 - Percentual das estirpes originais presentes em cada nódulo, identificadas através de testes serológicos, nos tratamentos correspondentes, do ensaio em vaso com solo (12 nódulos por planta)

Tratamentos (Inoculações)	% Avaliada em Cada Estirpe			
	C.40	C.88	C.100	Nativas ^{a/}
A - C.40	41,6	-	-	58,4
B - C.88	-	58,3	-	41,6
C - C.100	-	-	33,3	66,6
AB - C.40 x C.88	33,4	41,6	-	25,0
AC - C.40 x C.100	25,0	-	16,6	58,3
BC - C.88 x C.100	-	41,6	25,0	33,3
ABC - C.40 x C.88 x C.100	25,0	33,4	16,6	25,0
T s/Inoc	-	-	-	100,0

^{a/} avaliadas por exclusão (ausência de reação)

5.6.3. Atividade bacteriocinogênica após passagem pela planta hospedeira

A análise da atividade bacteriocinogênica das estirpes recuperadas de nódulos provenientes de tratamentos de inoculações simples com estirpes C.40 (normal e mutante) do ensaio em vaso de Leonard esterilizado, frente à estirpe C.88 (normal e mutante) tomadas como indicadoras, encontra-se na Tabela 21. Através dela, podemos constatar que a estirpe C.40 normal recuperada conservou a sua atividade em 100% dos isolados analisados. A atividade bacteriocinogênica da estirpe C.40 (Sm^r) foi estável em cerca de 83% dos isolados analisados. O isolado n° 8 da estirpe C.40 (Sm^r) apresentou atividade contra estirpe C.88 normal, mas não com a estirpe C.88 (Sp^r).

Tabela 21 - Avaliação da atividade bacteriocinogênica em 17 isolados de nódulos provenientes da inoculação simples com estirpes C.40 (normal e mutante), em vaso de Leonard esterilizado, frente à estirpe C.88 (normal e mutante), tomadas como indicadoras.

		Produtoras																
		C.40 (normal)																
Indicadoras		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
C.88 normal		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
C.88 (Sp ^r)		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
		C.40 (Sm ^r)																
Indicadoras		01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16	17
C.88 normal		+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+
C.88 (Sp ^r)		+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	+	+	+

+ Presença de halo de inibição
 - Ausência de halo de inibição

6. DISCUSSÃO

6.1. Características culturais das estirpes de *R. phaseoli*

Os resultados encontrados com relação às características culturais das estirpes analisadas foram consistentes com os dados relatados na literatura (VINCENT, 1977; BUCHANAN e GIBBONS, 1974; NORRIS, 1965). Na análise do tempo de crescimento em meio sólido, verificou-se que as colônias isoladas de *R. phaseoli* levam, em média, de 3 a 5 dias para atingir o diâmetro de 3 mm, fato este que o coloca entre os *Rhizobium* de crescimento rápido. Este crescimento, geralmente é acompanhado da produção de material extracelular em forma de goma ou muco. NUTMAN (1965) sugere que a produção deste material é um importante fator no estabelecimento de microcolônias no seu meio ambiente, na medida em que facilitaria a agregação de partículas do solo.

A produção de ácido também foi observada na maioria das estirpes. A natureza e implicações deste fato ainda são discutíveis, ressaltando, alguns autores, (NORRIS, 1965; HOLDING e LOWE, 1971) possíveis implicações ecológicas para o *Rhizobium*, principalmente em solos tropi-

cais e sub-tropicais com características ácidas. Se a produção de ácido observada em cultura pura processar-se no seu microhabitat, há a possibilidade da modificação do pH, com as naturais consequências na sobrevivência e multiplicação dos microorganismos presentes. Esta hipótese é corroborada pelos dados apresentados por NORRIS (1965) onde constatou-se que os *Rhizobium* de crescimento lento associados a determinadas leguminosas tropicais de solos ácidos, produziam reação alcalina ou menos ácida em relação aos *Rhizobium* de regiões temperadas de solos levemente alcalinos, os quais produziam reações ácidas em meio de cultura.

Entretanto, HOLDING e LOWE (1971) salientam que o pH da rizosfera de determinadas plantas que crescem em solos ácidos, podem apresentar valores de pelo menos uma unidade a mais do que o solo que as suportam, fato este que poderia gerar um efeito "tampão" através da absorção de parte da produção de ácido dos microorganismos que nela se localizam. Os mesmos autores constataram também, que não há correlação entre o pH final em meio de cultura e o pH de solos dos quais os *Rhizobium* foram isolados. Além disso, DATE e HALLIDAY (1979) verificaram que o pH final em meio de cultura varia conforme a fonte de carbono disponível (arabinose, manitol, sacarose). Assim, é questionável se a produção de ácido ou álcali observada em cultura, se expresse em condições naturais no solo ou se essa característica tenha realmente valor seletivo em solos ácidos. As estirpes analisadas no presente trabalho, provenientes de diversos locais, com diferenças na acidez do solo, não apresentaram também, ao que tudo indica, relação entre o local de coleta (Tabela 2) e produção de ácido ou álcali em meio de cultura (Tabela 7).

Alguns ácidos produzidos por *Rhizobium* têm sido identificados no sobrenadante de culturas líquidas, constituindo-se, principalmente, de ácido acético, isobutírico, butírico e pirúvico, sendo o ácido isobutírico aquele observado em maior concentração e o ácido pirúvico observado em maior constância. DUDMAN e HEILDEBERGER (1969) observaram que os íons piruvato são importantes constituintes dos polissacarídeos extracelulares de *Rhizobium*, sendo possível que a secreção de piruvato se ache correlacionada com a produção de material extracelular. VINCENT (1977), analisando quantitativamente tais polissacarídeos, verificou que, dentre outros componentes, os *Rhizobium* produtores de ácido apresentam maior percentual de ácidos urônicos, piruvato e acetato. Com base nestes dados, poder-se-ia pensar na existência de uma correlação entre a produção de ácido e produção de muco. Porém, pelos dados obtidos no presente trabalho (Tabela 7), verificou-se não haver em todos os casos, tal correlação, pois, em algumas estirpes, a produção de muco observada não era acompañada da respectiva acidez no meio de cultura e vice-versa. Convém salientatar no entanto, que o método de avaliação da produção de muco foi apenas visual e não quantitativo, o que torna o método um tanto quanto subjetivo.

Entre as estirpes de *R. phaseoli* analisadas, três delas (C.14, C.18 e C.29) caracterizaram-se como produtoras de álcali e crescimento mais lento. Este fato talvez, seja o reflexo da alta variabilidade observada em relação às características analisadas, dentro de uma mesma espécie. Esta variabilidade possivelmente é devida ao critério taxonômico utilizado para as diferentes espécies de *Rhizobium*, o qual se baseia, fundamentalmente, na sua capacidade de nodular leguminosas específicas. Assim, células com acentuadas diferenças genotípicas, cromossômini

cas ou talvez até mesmo plasmidiais, mas que retiveram a capacidade de no dulação, são consideradas como pertencentes a um único grupo. Percebe-se assim a necessidade de futuros trabalhos com outras características na tentativa de separar grupos dentro de uma mesma espécie. Pode-se pensar também, em estudos da variabilidade dentro de um mesmo clone, onde uma ca racterística tal como a produção de álcali, poderia ser analisada quanto à sua estabilidade. A detecção de uma alta instabilidade nesses casos, indicaria a possibilidade de ocorrência de fatores extra-cromossômicos en volvidos.

As características culturais analisadas, não parecem in terferir na produção de bacteriocinas ou resistência a drogas antimicrobi an as. As curvas unimodais das frequências dos níveis de resistência a tais drogas e a alta especificidade das bacteriocinas na população ensaia da, indicam que todas as estirpes devem pertencer à mesma espécie e que essas características culturais (produção de muco, tempo de crescimento em meio sólido e produção de ácido ou álcali) não definiriam bem o *R. pha* *seoli* tanto quanto a sua capacidade de interação com a planta hospedeira.

6.2. Eficiência de fixação de nitrogênio

A avaliação da eficiência de fixação de nitrogênio em *Rhi* *zobium* constitui uma etapa importante no processo de seleção de estirpes, tendo em vista a sua aplicabilidade na agricultura, através da sua utilização em inoculantes para sementes de leguminosas.

A eficiência pode ser avaliada diretamente através do teor

de N-total ou indiretamente pela avaliação do peso da matéria seca da planta pois, estes dois parâmetros são altamente correlacionados. Porém, a avaliação realizada através do peso da matéria seca da planta pode dar origem a uma margem de erro maior, visto que algumas plantas que apresentam baixo acúmulo de matéria seca podem apresentar teores de N-total maiores do que plantas com maior acúmulo de matéria seca, conforme dados referentes às estirpes C.21 e C.48 (Tabela 8).

A capacidade de nodulação, abrangendo a especificidade hospedeira, peso da matéria seca de nódulos e sua atividade de nitrogenase, constituem outros fatores de avaliação. Com relação ao peso da matéria seca de nódulos, geralmente seu valor é diretamente proporcional à eficiência de fixação de nitrogênio, embora nem sempre possa ser observada tal proporcionalidade, como é o caso dos valores encontrados para a estirpe C.22 (Tabela 8) que apresentou nódulos com pequeno acúmulo de matéria seca e elevada taxa de fixação de nitrogênio.

A atividade de nitrogenase, avaliada com base na evolução de etileno/planta/hora, nem sempre correspondeu aos valores encontrados para N-total. Uma possível explicação para o fato prende-se ao processo de amostragem, pois, a avaliação da atividade de nitrogenase através da redução de acetileno foi ocasional, assumindo-se que a atividade é constante durante todo o período de crescimento da planta, o que não ocorre. Por outro lado, a avaliação da fixação de nitrogênio através do teor de N-total representa, na realidade, um somatório de toda a atividade de nitrogenase nos nódulos, durante todo o crescimento da planta. Para se minimizar tal efeito, dever-se-ia realizar várias amostragens da atividade

de nitrogenase em diversos períodos, durante o crescimento da planta.

É interessante ressaltar a alta variabilidade observada entre as estirpes, para as características analisadas (Tabela 8). Esta variabilidade natural, no aspecto genético, é salutar na medida em que os mecanismos genéticos de recombinação bacteriana, tais como conjugação, transformação e transdução, possam vir a ser utilizados após uma seleção das estirpes, sem a necessidade de indução de mutações. Recentemente, estes sistemas de transferência genética envolvendo *Rhizobium* e até mesmo outros fixadores de nitrogênio, têm sido ensaiados com razoável sucesso e vários exemplos encontram-se relatados (BRILL, 1975; SCHWINGHAMER, 1977; McNEIL, 1978), confirmando a viabilidade da manipulação genética das características pertinentes à nodulação, fixação de nitrogênio e capacidade competitiva da bactéria.

Por outro lado, parte desta alta variabilidade observada, pode ser creditada também à planta hospedeira, visto que possíveis variações genotípicas dentro de um mesmo cultivar de uma mesma espécie podem alterar a interação bactéria x planta hospedeira. Este fato poderia ser minimizado em futuros trabalhos, através da utilização de cultivares os mais isogênicos possíveis.

6.3. Níveis de resistência a drogas antimicrobianas

De um modo geral, os níveis de resistência observados frente a sete drogas antimicrobianas (Tabela 10), situaram-se dentro da faixa de resistência natural a vários antibióticos relatados na literatura

(Tabela 1), principalmente quanto à Estreptomina, Espectinomicina, Cloranfenicol, Penicilina, Rifampicina e Tetraciclina.

A determinação precisa de tais níveis encontra uma aplicabilidade imediata, conforme salienta JOSEY *et alii* (1979), através da identificação de estirpes, no solo ou nódulos, usando-se a sua resistência intrínseca a determinados antibióticos, possibilitando, assim, estudos ecológicos sem a necessidade da utilização de mutantes ou serologia.

Com relação à frequência destes níveis na população ensaiada, verificou-se uma distribuição tipicamente unimodal para Estreptomina, Penicilina, Rifampicina e Tetraciclina, para os quais pode-se afirmar que a referida população é sensível, conforme o método de classificação de TRABULSI *et alii* (1970). No caso do Cloranfenicol e Espectinomicina, observou-se desvios desta frequência. Apesar de não existir uma caracterização tipicamente unimodal para a frequência do nível de resistência a estes dois antibióticos na população, a caracterização como bimodal, dentro do modelo adotado, é também duvidosa, mesmo porque é difícil supor um mecanismo pelo qual as amostras de *Rhizobium* tomem contato continuamente com o antibiótico, a ponto de gerar estirpes com resistência atípica. Exemplos de uma distribuição bimodal típica, em outras bactérias, são relatados por CHARTONE-SOUZA (1975), onde observa-se uma nítida separação entre a população sensível e a população resistente. Neste caso, as populações resistentes encontram-se em condições de forte pressão de seleção através do contato com altas doses de antibióticos. Talvez, os desvios da unimodalidade observados para o Cloranfenicol e Espectinomicina na população de *R. phaseoli* ensaiada, sejam decorrentes de flu

tuações aleatórias, enquadrando-se então como os demais, ou seja, a população é sensível aos dois antibióticos.

Não houve correlação entre os diferentes níveis de resistência encontrados e as diferentes eficiências de fixação de N_2 . Isso é uma indicação de que os níveis encontrados são devidos à resistência natural e não de mutantes revertentes, pois, estes apresentam, em geral, eficiências reduzidas. Então, as curvas são realmente unimodais e as diferenças observadas podem ser atribuídas à variabilidade natural dentro da espécie.

No caso da Tetraciclina observou-se um baixo nível de resistência ($<1 \mu\text{g}/\text{mL}$) para todas as estirpes analisadas. Este fato é relatado também para outros *Rhizobium* (DAVIS, 1962; PATTINSON *et alii*, 1974) e pode ser objeto de algumas especulações. CHOPRA e HOWE (1978), comparando a resistência à Tetraciclina entre bactérias gram negativas e positivas, inferiu que há casos excepcionais em que certos antibióticos ou metais pesados penetram na célula utilizando os mecanismos normais de absorção e transporte de nutrientes celulares. Sendo a Tetraciclina um antibiótico de largo espectro que atua ao nível da síntese de proteínas impedindo a ligação do aminoacil t-RNA ao ribossomo bacteriano, é de se supor um mecanismo de passagem e acúmulo do antibiótico através da membrana e parede celular para a sua posterior ação. Se há diferenças ao nível de parede celular e membrana entre as células bacterianas, pode-se inferir a existência de diferentes mecanismos de transporte entre as células. Esta hipótese é corroborada através da constatação de que o envelope celular das células mutante resistentes à tetraciclina é alterado

CHOPRA e HOWE (1978).

A resistência a altas doses de Tetraciclina, nos casos até agora estudados, é devida à aquisição de plasmídeos que podem ou não apresentarem elementos de inserção ou transposons, evidenciado pelo fato de que a resistência cromossomal de "único-passo" não foi obtida para qualquer tipo de bactéria (CHOPRA e HOWE, 1978). O sistema de transporte da tetraciclina pode, entretanto, fazer parte do complexo de membrana essencial à viabilidade celular. Deste modo, os produtos dos genes plasmidiais envolvidos na aquisição de resistência reduziriam especificamente a afinidade do sistema de transporte para a tetraciclina, sem alterar a integridade da membrana. Por outro lado, alguns receptores de proteínas podem estar envolvidos, como componentes de ligação altamente específicos, de um sistema de transporte, de substratos presentes em pequenas quantidades no meio ambiente; tais componentes não essenciais poderiam, assim, ser utilizados como receptores de outros agentes antimicrobianos, tais como, bacteriófagos e bacteriocinas, sendo que uma mutação que leva a uma perda destes receptores poderia conferir uma resistência a bacteriófagos ou bacteriocinas, sem causar a inviabilidade celular.

6.4. Isolamento de mutantes resistentes a antibióticos

Baseando-se em informações preliminares do modelo de resistência em *Rhizobium* para três antibióticos (Estreptomina, Espectinomicina e Rifampicina) (ALVES e AZEVEDO, 1975; SCHWINGHAMER, 1972; BERTALMIO, 1971), observou-se o crescimento de colônias em meio de cultura com doses altas (100 µg/ml) de cada antibiótico, confirmando-se assim, primariamente

te, o modelo de resistência monogênico ou de "único-passo" para os referidos antibióticos, cuja resistência é determinada por uma mutação em um único gene principal. Ressalvando-se poucas exceções, geralmente os mutantes resistentes a antibióticos, em *Rhizobium*, que seguem este modelo, apresentam a sua capacidade de nodulação e fixação, ao contrário daqueles obtidos através de resistência poligênica ou "múltiplos-passos" (SCHWINGHAMER, 1967, 1977; ZELAZNA-KOWALSKA, 1971; PANKHURST, 1977; PAIN, 1978).

6.5. Produção de Bacteriocinas

Entre as estirpes de *R. phaseoli* ensaiadas, constatou-se que 25% delas apresentavam atividade bacteriocinogênica frente a 47% das mesmas estirpes tomadas como indicadoras ou sensíveis (Tabela 9). Segundo AZEVEDO (1977), o percentual de produção de bacteriocinas varia com a espécie considerada, não havendo, portanto, limites rígidos. O percentual de estirpes de *Rhizobium* que apresentam atividade bacteriocinogênica (Bac^+) relatada na literatura varia consideravelmente. ROSLYCKY (1967) observou que 24,5% de um total de 136 estirpes de *Rhizobium* ensaiadas, produziram bacteriocinas, sendo que no caso específico de *R. phaseoli*, constatou a atividade em 6 estirpes de um total de 13 ensaiadas. SCHWINGHAMER (1971) verificou a presença de 13,7% de estirpes Bac^+ de *R. trifolii* de um total de 28 estirpes ensaiadas. Deve-se ressaltar, porém, que a maioria dos dados relatados não podem ser rigidamente comparados tendo em vista que a detecção da atividade bacteriocinogênica variou conforme o sistema produtor/indicador utilizado, bem como a presença ou não de agentes indutores, tal como a radiação ultra-violeta (UV). Além disso, a carac-

terização de uma estirpe como não produtora é relativa, pois, a metodologia usualmente empregada na sua detecção requer o encontro da bactéria sensível àquela bacteriocina produzida. Este percentual de atividade pode aumentar na medida em que outras estirpes indicadoras vão sendo ensaiadas contra aquelas estirpes em que não foi observada a atividade bacteriocinogênica.

Nos casos até agora estudados, os determinantes genéticos para a produção de bacteriocinas, localizam-se em plasmídeos. (REEVES, 1972; HARDY, 1975; ZELAZNA-KOWALSKA, 1979; HIRSCH, 1979). Este fato poderia acarretar algumas implicações, tais como a perda da característica de produção por alguns clones de bactérias e a sua transmissão ou mobilidade com alta frequência na população, o que contribuiria ainda mais para alterar os valores percentuais de estirpes produtoras e não produtoras dentro de uma mesma espécie.

O antagonismo entre estirpes se manifestou em placa de Petri, através da produção de halo de inibição do crescimento da estirpe indicadora em torno da colônia produtora inativada. Os tamanhos destes halos variaram consideravelmente, podendo ser divididos arbitrariamente em halos iguais ou maiores que 3 mm e menores que 3 mm. Este fato indica que há diferenças qualitativas entre as bacteriocinas produzidas, visto que a sua difusibilidade no ágar depende, entre outros fatores, do peso e conformação moleculares. A avaliação quantitativa através da leitura do halo de inibição não teria muito significado, pois, uma grande produção desta substância, porém, com baixa difusibilidade, pode dar origem a um pequeno halo de inibição e vice-versa.

A especificidade de ação das bacteriocinas em estudo, avaliada com a utilização de bactérias indicadoras sabidamente sensíveis a bacteriocinas de outras bactérias (Tabela 3), indicou que estirpes de *R. phaseoli* apresentaram atividade bacteriocinogênica intra-específica, pois não se evidenciou o antagonismo em nenhuma das combinações tomadas, em relação àquelas bactérias indicadoras.

Na avaliação da estabilidade da marca Bac⁺ das estirpes C.40 N (normal) e C.40 Sm^r (mutante resistente à Estreptomicina), após passagem pela planta hospedeira (Tabela 21), verificou-se que 100% dos isolados de nódulos provenientes de plantas inoculadas com estirpe C.40 N, mostraram atividade frente às estirpes indicadoras C.88 N e C.88 Sp^r. Cerca de 17% dos isolados de nódulos provenientes de inoculação com estirpe C.40 Sm^r não apresentaram atividade frente às mesmas estirpes indicadoras. Algumas hipóteses poderiam ser levantadas acerca deste fato. Em primeiro lugar, esta perda de atividade poderia ser inerente ao próprio processo de obtenção dos mutantes, nos quais selecionam-se clones que apresentaram a mutação para a resistência, sem nos preocuparmos com a sua atividade bacteriocinogênica. Neste caso, toda a população do inóculo não apresentaria a característica Bac⁺, se o clone selecionado para resistência não apresentar o determinante genético ou plasmídeo codificador da produção de bacteriocina.

Outra hipótese que poderia ser aventada, prende-se ao processo de infecção e recuperação das estirpes. É sabido que, normalmente, o processo de infecção se inicia por uma única bactéria e que nem todos os indivíduos de uma estirpe caracterizada como Bac⁺ apresentam

a capacidade de produzir bacteriocinas, pelo fato de não portarem o plasmídeo (AZEVEDO, 1977). Assim, a possibilidade do processo de infecção se iniciar por uma célula não produtora, originando um clone *Bac* no nódulo pode ser considerada. Além disso, o processo de recuperação da estirpe do nódulo requer várias etapas de inoculação e crescimento em meio de cultura, nas quais poderia haver a seleção de colônias que não apresentam o plasmídeo

Não foi observada qualquer correlação entre a capacidade de produção de bacteriocinas e outras características analisadas tais como produção de muco, produção de ácido ou álcali e eficiência de fixação de nitrogênio.

Futuros trabalhos nesta área devem ser conduzidos visando melhor caracterização destas substâncias. Deste modo, pode-se sugerir a ampliação do sistema produtor/indicador através da utilização de maior número de estirpes, bem como a caracterização físico-química de suas bacteriocinas isoladas através da determinação de peso molecular, difusibilidade através de membranas, susceptibilidade a enzimas proteolíticas e obtenção de antissoro específico. A possibilidade de localização plasmidial dos genes envolvidos em sua produção, confirmada em outros *Rhizobium* (ZELAZNA-KOWALSKA, 1979), pode servir de base na manipulação genética deste caráter, através dos processos clássicos de recombinação bacteriana ou por engenharia genética, utilizando-se plasmídeos *Col* como vetores.

6.6. Capacidade competitiva

6.6.1. Dados referentes à planta hospedeira

Os dois ensaios de competição intraespecífica conduzidos, sendo um em vaso de Leonard e outro em vaso com solo, evidenciaram diferenças significativas entre os tratamentos (inoculações), com relação às várias características das plantas, tais como acúmulo de matéria seca, N%, N-total da parte aérea, acúmulo de matéria seca da raiz e nodulação.

No primeiro ensaio, em vaso de Leonard, a inoculação de 3 estirpes normais em combinações simples, duplas e triplas mostraram diferenças significativas apenas para os valores obtidos para N-total da parte aérea (Tabela 13), correspondente a um menor acúmulo de nitrogênio devido à baixa eficiência da estirpe C.100 em relação às estirpes C.40 e C.88, o que aliás, corresponde aos dados da Tabela 8, onde se constata a baixa eficiência desta estirpe em relação às outras duas. Com relação às inoculações com estirpes mutantes, observaram-se diferenças significativas apenas nas inoculações simples, para número, peso da matéria úmida e atividade de nitrogenase dos nódulos, em relação à inoculação com estirpe C.100 Rf^r.

No confronto entre estirpes normais e mutantes, verificou-se diferenças significativas para todas as características analisadas. Tais diferenças corresponderam, em última análise, a uma queda dos valores obtidos para as estirpes mutantes em relação às estirpes normais.

Este fato, pode ser melhor discutido com base no mecanismo

genético das mutações e suas naturais implicações na fisiologia celular. Segundo BERGAMIN FILHO *et alii* (1975), se considerarmos que o gene que confere a resistência a drogas não foi adicionado ao cromossomo do microorganismo e sim alterado da sua função original, ligado, portanto, a uma determinada função no metabolismo celular, é razoável supor que os mutantes resistentes obtidos, apresentem o seu metabolismo alterado. Esta alteração pode se manifestar ao nível de uma função importante, refletindo-se, então, na alteração de sua taxa de crescimento. Se, porém, esse gene controlasse uma função secundária, como por exemplo, a morfologia ou até mesmo a capacidade de nodulação e fixação de nitrogênio, o mutante resistente a drogas não teria, necessariamente, a sua taxa de crescimento alterada. No primeiro caso, a droga é considerada forte. No segundo caso a droga é considerada fraca e nos casos intermediários a droga é considerada neutra.

Os efeitos pleiotrópicos associados à aquisição de resistência cromossômica podem se manifestar de diferentes modos. Assim, ALVES e AZEVEDO (1975) isolaram e caracterizaram mutantes resistentes à Estreptomicina de *R. japonicum*, verificando que os mutantes Sm^r obtidos, perderam a capacidade de nodulação. Baseando-se na informação de que o gene responsável pela resistência à Estreptomicina em bactérias está diretamente relacionado com a produção da proteína ribossômica S12 da subunidade 30S, a qual é alterada impedindo a ação do antibiótico, a hipótese de que mutações em diferentes sítios desse gene pudesse produzir diferentes efeitos foi aventada.

Deste modo, a mutação em um determinado sítio poderia oca

sionar alteração na sequência de aminoácidos da proteína e, conseqüentemente, alteração na conformação da mesma, dando origem a uma aquisição de resistência da bactéria mutada, sem alterar a capacidade de nodulação ou fixação de nitrogênio. Por outro lado, o sítio mutado poderia ocasionar a produção de uma proteína que simultaneamente acarretaria a resistência e perda das características de nodulação e fixação de nitrogênio. É provável que, na maioria dos casos, ocorra uma situação intermediária, na qual a capacidade de nodulação e fixação são retidas, porém, com o seu potencial reduzido, conforme observado nas estirpes de *R. phaseoli* ensaiadas no presente trabalho.

No segundo ensaio, em vaso com solo, foram aplicados os mesmos tratamentos e analisadas as mesmas características anteriormente citadas (Tabelas 14 e 15). O confronto entre as inoculações das estirpes normais e mutantes evidenciou diferenças significativas observadas para N-total, número e atividade de nitrogenase dos nódulos, aos quais também corresponderam, em termos gerais, uma diminuição significativa nos valores encontrados para tais características nas estirpes mutantes em relação às estirpes normais. Outro fato interessante foi observado no confronto entre tratamentos inoculados com o tratamento sem inoculação (testemunha), onde constatou-se diferenças significativas para N-total e atividade de nitrogenase mas não para o número de matéria úmida dos nódulos. Isto mostra que as estirpes nativas não apresentaram boa eficiência de fixação, porém, nodulam em igualdade de condições com as estirpes inoculadas (normais e mutantes) no solo. As causas e possíveis implicações deste fato serão discutidas mais adiante, no tópico referente à recuperação de estirpes no ensaio de competição em vaso com solo.

6.6.2. Recuperação das estirpes

No ensaio em vaso de Leonard, o percentual de recuperação das estirpes mutante resistentes (Tabela 16), foi maior para a estirpe C.88 Sp^r, nas inoculações duplas e triplas. Porém, através de uma análise mais detalhada do número de células presentes no inóculo aplicado (Tabela 11), verificar-se-á que esta diferença é, possivelmente, devida ao maior número de células no inóculo, não significando, assim, uma vantagem seletiva em favor desta estirpe em relação às demais. Nas inoculações simples com a estirpe C.100 Rf^r, observou-se um percentual de recuperação de apenas 86,25%, quando o esperado seria 100%, fato esse que poderia estar ligado à possível presença de células revertentes ao tipo normal, no inóculo utilizado ou mesmo no processo de multiplicação da bactéria no interior dos nódulos. Futuros estudos da taxa de reversão dos mutantes Rf^r em *R. phaseoli* e competição "in vitro" entre células normais e mutantes, venham, talvez, esclarecer as reais causas desse percentual de recuperação observado, desde que esta é uma resistência condicionada por um único gene atuando ao nível da RNA polimerase.

Clones dos isolados de nódulos que apresentaram crescimento duplo nas placas seletivas com um antibiótico específico (Sm e Sp; Sp e Rf), quando foram ensaiados em placas seletivas com os dois antibióticos específicos e não apresentaram crescimento, enquanto que seu crescimento era observado nas placas com um antibiótico (Tabela 17). Tal fato descarta a possibilidade de células recombinantes e sugere a presença de nódulos com infecção mixta. A ausência de crescimento de alguns destes clones nas placas com antibiótico pode ser devida, talvez, à reversão ao

tipo normal.

No ensaio em vaso com solo, o percentual de recuperação das estirpes mutante resistentes, nos tratamentos com inoculações duplas e triplas, foi maior para a estirpe C.40 Sm^r. Verifica-se aqui, também que este percentual foi proporcional ao inóculo aplicado, visto que esta estirpe apresentava maior número de células/ml (Tabela 11).

Verificou-se ainda, a alta competitividade das estirpes nativas em relação às estirpes mutante resistentes inoculadas, bem como em relação às estirpes normais (Tabelas 18 e 20) identificadas através de análise serológica.

A alta competitividade das estirpes nativas em relação às estirpes inoculadas é um fato já relatado na literatura (VINCENT e WATERS, 1953), sendo da mais alta importância para o caso da interação *R. phaseoli* x *Phaseolus vulgaris* pois, as tentativas de inoculação em larga escala de estirpes selecionadas, em feijoeiro, não têm apresentado bons resultados, para as condições brasileiras.

Pode-se levantar a hipótese de que as estirpes nativas apresentam uma maior capacidade de instalação ou estabilidade no solo e uma maior "agressividade" em relação às estirpes inoculadas. A maior capacidade de instalação ou estabilidade pode ser facilmente compreendida, com base no fato de que tais estirpes já passaram por um processo de seleção natural no meio ambiente do solo; assim, é razoável supor que a introdução de estirpes selecionadas somente para as características de nodu

lação e capacidade de fixação de nitrogênio não se encontrem aptas para as demais condições do solo. A maior "agressividade" poderia ser o reflexo, talvez, da produção de substâncias antimicrobianas específicas, como, por exemplo, bacteriocinas, as quais poderiam atuar contra as estirpes inoculadas. Neste particular, seria interessante avaliar a atividade bacteriocinogênica nas estirpes nativas frente às estirpes selecionadas para a fixação de nitrogênio como indicadores. Por outro lado, pode-se pensar também nas próprias condições do solo, onde fatores tais como o pH, baixa tolerância ao alumínio e antibióticos, poderiam formar um quadro altamente desfavorável às estirpes inoculadas.

Provavelmente, a seleção natural no solo, atua no sentido de promover os indivíduos mais aptos às condições do solo e com capacidade de nodulação. A capacidade de fixação de nitrogênio seria decorrente e não objetivo fundamental desta seleção, visto que a manutenção do *Rhizobium* no solo ou em associação com a planta, não implica necessariamente na sua capacidade de fixação.

Portanto, a estirpe de *R. phaseoli* ideal para a utilização como inoculante em solos brasileiros seria aquela que apresentasse, ao lado do alto potencial de fixação de nitrogênio, uma alta capacidade competitiva e persistência no solo, características estas, fundamentais para a formação de nódulos eficientes. A possibilidade de manipulação genética destas características torna plausível a construção desta estirpe, reunindo um alto potencial de fixação e os fatores genéticos que concorrem para o incremento da sua competitividade no solo.

As duas técnicas de identificação das estirpes dos nódulos nos dois ensaios de competição, envolvendo o uso de mutantes resistentes a antibióticos e análise serológica por imunodifusão em ágar, cumpriram os seus objetivos no presente estudo. O uso de mutantes resistentes, apresenta a vantagem da facilidade de seu isolamento, tendo em vista o emprego de meios seletivos que exclui os possíveis contaminantes. Porém, é uma técnica em que se trabalha com células alteradas e que, na maioria dos casos, não correspondem totalmente às estirpes normais. Por outro lado, a técnica serológica dá excelentes resultados, desde que se obtenha o antissoro altamente específico para cada estirpe, com total ausência de reações cruzadas, o que, às vezes, limita um pouco esta técnica, visto que utilizam-se estirpes de uma mesma espécie. As possibilidades desta técnica superam aquelas que envolvem o uso de mutantes, devido principalmente à utilização de células normais além da sua acurácia na identificação das estirpes. Pode-se tentar, no futuro, como variante desta técnica, a utilização de extratos de nódulos tornando-se, assim, mais rápida a identificação das estirpes nele presentes.

Não foi evidenciada a predominância da estirpe de *R. phaseoli* produtora de bacteriocina em relação às demais estirpes, com resultados semelhantes àqueles encontrados por GROSS e VIDAVER (1978), nos quais a vantagem competitiva das estirpes de *R. japonicum* não parece estar correlacionada com a capacidade de produção de bacteriocinas "in vitro". Porém, esta assertiva é passível de algumas considerações, que podem auxiliar na condução de futuros ensaios nesta área.

Em primeiro lugar, o sistema de inoculação utilizado, tal-

vez, não favoreceu a plena expressão do caráter produção de bacteriocinas observada em meio de cultura. Para maximizar este efeito, as inoculações poderiam ser realizadas no vaso com solo em períodos anteriores ao plantio das sementes, ou então, utilizar plantios sucessivos para a avaliação da sua persistência no solo. Pode-se questionar também, se este caráter se expresse no solo. Não há dados relatados de casos onde este não se expressa. Possivelmente, este antagonismo observado é realçado em meio de cultura, devido às condições ótimas oferecidas.

Entretanto, tais estudos nesta área devem continuar, pois a produção de bacteriocinas pode se manifestar como uma importante ferramenta para a obtenção de uma estirpe de *R. phaseoli* que se aproxime daquele tipo ideal.

7. CONCLUSÕES

1) A variabilidade das estirpes de *Rhizobium phaseoli* é bastante ampla para todas as características analisadas.

2) Distribuição unimodal dos níveis de resistência foi obtida, ensaiando-se as estirpes de *R. phaseoli* frente a sete drogas antimicrobianas, caracterizando-as como uma população sensível.

3) Cerca de 25% das estirpes de *R. phaseoli* analisadas, apresentaram atividade bacteriocinogênica. O caráter é estável mesmo após a passagem pela planta hospedeira e não determinou vantagem competitiva nas condições ensaiadas.

4) Em geral, não há diferenças significativas entre as inoculações simples, duplas e triplas para as características analisadas, nos dois ensaios de competição.

5) As estirpes mutantes resistentes a antibióticos mostraram uma diminuição significativa na capacidade de nodulação e fixação de

nitrogênio, em relação às estirpes normais correspondentes.

6) As estirpes nativas de *R. phaseoli* apresentaram alta capacidade competitiva em relação às estirpes normais e mutantes, utilizadas como inoculante.

7) A inoculação, nos dois ensaios de competição, determinaram aumentos significativos nos teores de N-total e atividade de nitrôgenase, em relação ao controle não inoculado.

8. SUMMARY

Thirty six strains of *Rhizobium phaseoli* were studied in relation to several growth characteristics, infectiveness and effectiveness on plant host, levels of resistance to antimicrobial drugs, bacteriocin production and competitive ability among strains.

Most of the strains were acid producers and showed rapid growth (3-5 days) in pure culture. Nitrogen fixation varied among strains, some showing an effectiveness of about 50%.

The strain natural level of resistance in relation to seven antimicrobial drugs varied, in $\mu\text{g}/\text{mL}$, from 1 to 10 for Streptomycin, 1 to 20 for Spectinomycin, 1 to 50 for Chloranphenicol, 1 to 50 for Penicilin, 1 to 10 for Rifampicin, 0.01 to 0.1 for Tetracyclin and 1 to 5 fo HgCl_2 .

An unimodal distribution was found for practically all drugs tested. It can be them concluded that the strains are non-resistant to these drugs.

Bacteriocin production was found in 25% of the strains analysed. Such bacteriocins are very specific and their activity is maintained even after growth of the bacteria in the host plant.

There are no selective advantage of the bacteriocinogenic strain in competition with two non-producers strains. On the other hand, antibiotic resistant strains, showed low infectiveness and low effectiveness when compared with normal strains. High competitive advantage for indigenous strains in relation to normal and mutant strains used as inoculant, was also observed.

9. LITERATURA CITADA

ALEXANDER, D.C.; D.C. JORDAN e M. MCKAGUE, 1969. Inhibition by viomycin of cell-free protein synthesis in sensitive and resistant strains of *R. mililoti*. *Canadian Journal of Biochemistry*, 47: 1092-1094.

ALVES, M.F.A. e J.L. AZEVEDO, 1975. Isolamento e características de mutantes de *Rhizobium japonicum* resistentes à estreptomicina. *Summa Phytopathologica*, 1: 206-212.

ASENSIO, C. e F. BAQUERO, 1979. Las microcininas. *Investigacion y Ciencia*, 35: 106-115.

AZEVEDO, J.L., 1977. Tópicos de genética microbiana e molecular de procariotos. Piracicaba, 207 p.

AZEVEDO, J.L.; S.T.A. CASSINI e A. OLIVEIRA, 1980. Replicador multi-alça para uso geral em bacteriologia. (Submetido à publicação em *Summa Phytopathologica*).

- 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.
- BERGAMIN FILHO, A., H. KIMATI e J.L. AZEVEDO, 1975. O conceito de força de drogas. *Summa Phytopathologica*, 1: 31-42.
- BERGERSEN, F.J.; J. BROCKWELL; A.H. GIBSON e E.A. SCHWINGHAMER, 1971. Studies of natural populations and mutants of *Rhizobium* in the improvement of legume inoculants. *Plant and Soil*. Special Volume: 3-16.
- BERTALMIO, M.B., 1973. Effectiveness and rifampicin-resistance in *Rhizobium trifolii*. GIAM IV, São Paulo, Brasil. p. 25-27.
- BOHLOOL, B.B., 1975. *Serological methods in microbial ecology*. Univ. of Hawaii, Honolulu. 25 p.
- BREWIN, N.J.; J.E. BERINGER; A.W.B. JOHNSTON e P.R. HIRSH, 1980. Transfer of simbiotic genes with bacteriocinogenic plasmids in *Rhizobium leguminosarum*. *Journal General Microbiology*, 116: 261-270.
- BRILL, W.J., 1975. Regulation and genetics of bacterial nitrogen fixation. *Annual Review of Microbiology*, 29: 109-125.
- BROCKWELL, J.; W.F. DUDMAN; A.G. GIBSON; F.W. HELY e A.C. ROBINSON, 1968.

An integrated programme of the improvement of legume inoculant strains. *Transactions of the 9th. Int. Cong. Soil Science*, Adelaide, 2: 103-114.

BUCHANAN, R.E. e N.E. GIBBONS, Eds. 1974. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. 8 ed. Williams and Wilkins, Baltimore. p. 261-264.

BURRIS, R.H., 1974. Methodology. *In: The Biology of Nitrogen Fixation*. A. Quispel, Ed. North Holland Publ., Amsterdam, p. 9-33.

CALDWELL, B.E., 1969. Initial competition of root nodule bacteria on soybeans in a field environment. *Agronomy Journal*, 63: 813-815.

CALDWELL, B.E. e G. VEST, 1968. Nodulation interactions between soybean genotypes and serogroups of *Rhizobium japonicum*. *Crop Science*, 8: 680-682.

CHARTONE-SOUZA, E., 1975. Resistência a drogas e propriedade colicinogênica em *Escherichia coli*. Belo Horizonte, UFMG, 79 p. (Tese de Mestrado).

CHOPRA, I. e T.G.B. HOWE, 1978. Bacterial resistance to the tetracyclines. *Microbiological Reviews*, 42: 707-724.

COOPER, J.E., 1979. Rapid method for counting antibiotic-resistant

Rhizobia in soils. *Soil Biology Biochemistry*, 11: 433-435.

COSTA, S.O.P., 1973. Produção de colicinas em *Escherichia coli*. In: "*Exercícios práticos de genética*". J.L. AZEVEDO e S.O.P. COSTA Orgs. Companhia Ed. Nacional, São Paulo. p. 186-188.

DATE, R.A. e J. HALLIDAY, 1979. Selecting *Rhizobium* for acid, infertile soils of the tropics. *Nature* (London), 277: 62-64.

DAVIS, R.J., 1962. Resistance of *Rhizobium* to antimicrobial substances. *Journal of Bacteriology*, 84: 187-188.

DEMERY, J.T. e M. ALEXANDER, 1969. Physiological differences between effective & ineffective strains of *Rhizobium*. *Soil Science*, 108: 209.

DUDMAN, W.F. e J. BROCKWELL, 1968. Ecological studies of root nodule bacteria introduced into a field environments. I. A survey of field performance of clover inoculants by gel immune diffusion serology. *Australian Journal of Agricultural Research*, 19: 739-747.

DUDMAN, W.F. e M. HEIDELBERGER, 1969. Immunochemistry of newly found constituents of polysaccharides of *Rhizobium* species. *Science*, 164:954-955.

ELKAN, G.H., 1971. Biochemical and genetical aspects of the taxonomy of *Rhizobium japonicum*. *Plant and Soil*, Special Volume: 85-104.

- FREDERICQ, P., 1946. Sur la classification des *B. coli* d'après leurs caractères antibioques. *Comptes Rendu de la Societé de Biologie*. (Paris).
- FREDERICQ, P., 1948. Actions antibioques reciproques chez le entero-bacteriaceae. *Revue Belge de Pathologie et de Médecine Experimentale*, 19: 1-107.
- FREDERICQ, P., 1956. Resistance et immunité aux colicines. *Comptes Rendu de la Societé de Biologie* (Paris), 150: 1514-1517.
- FREDERICQ, P., 1957. Colicins. *Annual Review of Microbiology*, 11: 7-22.
- FREIRE, J.R.J.; J. KOLLING; I.T. GODINHO e J.S. PEREIRA, 1976. Competição, sobrevivência e especialização de estirpes de *Rhizobium japonicum* em variedade de soja. Resumos da VIII Reunião Latinoamericana sobre *Rhizobium* (RELAR) - CIAT, Cali, Colômbia. p. 18-19.
- GARRO, A.J. e J. MARMUR, 1970. Defective bacteriophages. *Journal Cellular Physiology*, 76: 253-264.
- GIBSON, A.H.; R.A. DATE e J. BROCKWELL, 1976. A comparison of competitiveness and persistence amongst five strains of *Rhizobium trifolii*. *Soil Biology Biochemistry*, 8: 395-401.
- GRAHAM, P.H., 1963. Antibiotic sensitivities of the root nodule

bacteria. *Australian Journal of Biological Sciences*, 16: 557.

GRAHAM, P.H., 1969. Selective medium for growth of *Rhizobium*. *Applied Microbiology*, 17(5): 769-770.

GRATIA, A., 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de *Colibacille*. *Comptes Rendu de la Société de Biologie* (Paris).

GROSS, D.C. e A.K. VIDAVER, 1978. Bacteriocin like substances produced by *Rhizobium japonicum* and other slow-growing *Rhizobia*. *Applied Environmental Microbiology*, 36(6): 936-943.

HAMADA, S. e T. OOSHIMA, 1975. Inhibitory spectrum of a bacteriocin-like substance (mutacin) produced by some strains of *Streptococcus mutans*. *Journal of Dental Research*, 54: 140-145.

HAMON, Y., 1964. Les bacteriocines. *Annales de l'Institut Pasteur* (Paris), 107: 18-53 (supl. n° 5).

HARDY, K.G., 1975. Colicigeny and related phenomena. *Bacteriological Reviews*, 39: 464-515.

HIRSCH, P.R., 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *Journal General Microbiology*, 113: 219-243.

- HOLDING, A.J. e J.F. LOWE, 1971. Some effects of acidity and heavy metals on the *Rhizobium*-Leguminous plant association. *Plant and Soil*, Special Volume: 153-166.
- HOLLAND, I.B., 1975. Physiology of colicin action. *Advances in Microbial Physiology*, 12: 56-133.
- JACOB, F.; L. SIMINOVITCH e E. WOLLMAN, 1952. Sur la biosynthèse d'une colicine et son mode d'action. *Annales de l'Institut Pasteur* (Paris), 83: 295-315.
- JOHNSTON, A.W.B. e J.E. BERINGER, 1975. Identification of the *Rhizobium* strains in pea root nodules using genetic markers. *Journal General Microbiology*, 87: 343-350.
- JOHNSTON, A.W.B. e J.E. BERINGER, 1976. Pea root nodule containing more than one *Rhizobium* species. *Nature* (London), 163: 502-504.
- JOHNSTON, A.W.B.; J.L. BEYNON; P.R. HIRSH e J.E. BERINGER, 1978. Transfer of the drug-resistance transposon Tn5 to *Rhizobium*. *Nature* (London), 276: 633-636.
- JOSEY, D.P.; J.L. BEYNON; A.W.B. JOHNSTON e J.E. BERINGER, 1979. Strain identification in *Rhizobium* using intrinsic antibiotic resistance. *Journal Applied Bacteriology*, 46: 343-350.
- LOTZ, W. e F. MAYER, 1972. Isolation and characterization of a

- bacteriophage Tail-Like Bacteriocin from a strain of *Rhizobium*.
Journal of Virology, 2: 160-173.
- MAY, M. e B.B. BOHLOOL, 1979. Mixed-infections in lentil nodules and its relationship to competitiveness of *Rhizobium* strains. Proc. of 7th American Rhizobium Conference, Texas University, 17-21/06.
- McKNIGHT, T., 1949. Efficiency of isolates of *Rhizobium* in the cowpea group with proposed additions to this group. *Queensland Journal of Agricultural Science*, Brisbane, 6: 61-76.
- McNEIL, D.; T. McNEIL e W.J. BRILL, 1978. Genetic modifications of N₂-fixing systems. *Bioscience*, 28: 576-579.
- NOMURA, M., 1963. Mode of action of colicines. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 28: 315-324.
- NORRIS, D.O., 1964. Techniques used in work with *Rhizobium*. In: "Some concepts and methods in sub-tropical pasture research". *Commonwealth Bureau of Pastures and Field Crops Bulletin*, 47: 186-198.
- NORRIS, D.O., 1965. Acid production by *Rhizobium*. A unifying concept. *Plant and Soil*, 22: 143-166.
- NUTMAN, P.S., 1975. *Rhizobium* in the soil. In: *Soil Microbiology: A critical review*. N. Walker Ed. Butterworths, London, C. 6, p. 111-132.

- OBATON, M.M., 1971. Utilization de mutants spontanés résistants aux antibiotiques pour l'étude écologique des *Rhizobium*. *Comptes Rendu Hebdomadaires des Séances de la Academie des Sciences, Série D* (Paris), 272: 2630-2633.
- OZEKI, H. e H. DE MARGERIE, 1959. Production of colicine by single bacteria. *Nature* (London), 184: 337-339.
- PAIN, A.N., 1979. Symbiotic properties of antibiotic-resistant and auxotrophic mutants of *Rhizobium leguminosarum*. *Journal of Applied Bacteriology*, 47: 53-64.
- PANKHURST, C.E., 1977. Simbiotic effectiveness of antibiotic-resistant mutants of fast and slow-growing strains of *Rhizobium* nodulating species. *Canadian Journal Microbiology*, 23: 1026-1033.
- PATTINSON, A.C. e F.A. SKINNER, 1974. The effects of antimicrobial substances on *Rhizobium* spp, and their use on selective media. *Journal of Applied Bacteriology*, 37: 239-250.
- PINTO, M.C.; Y.P. YAO e J.M. VINCENT, 1974. Nodulating competitiveness amongst strains of *Rhizobium meliloti* and *Rhizobium trifolii*. *Australian Journal of Agricultural Research*, 25: 317-329.
- PLATE, C.A. e S.E. LURIA, 1972. Stages in colicin K action. *Proceedings of National Academy of Sciences* (Washington), 69: 2030-2034.

- REEVES, P., 1972. *The bacteriocins*. Springer Verlag, N.Y. 141 p.
- RELATÓRIO SIMONSEN ASSOCIADOS, 1976. Projeto Feijão, Planejamento e Marketing. CNEM, São Paulo. 28 p.
- ROSCLYCKY, E.B., 1967. Bacteriocin production in the *Rhizobia* bacteria. *Canadian Journal of Microbiology*, 13: 431-433.
- SAITO, S.M.T., 1979. O *Rhizobium phaseoli* e sua contribuição para o feijoeiro (*Phaseolus vulgaris*). 2º Congresso Paulista de Agronomia, São Paulo (SP), 30 de julho a 03 de agosto de 1979.
- SAITO, S.M.T. e A.P. RUSCHEL, 1980. Capacidade competitiva e sobrevivência no solo de uma estirpe de *Rhizobium phaseoli* como inoculante. *Ciência e Cultura*, 32: 888-892.
- SARRUGE, J.R. e H.P. HAAG, 1974. *Análises químicas em plantas*. ESALQ/USP, Piracicaba. 27 p.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1962. Studies on induced variation in the *Rhizobia*. *American Journal of Botany*, 49: 269-271.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1964. Association between antibiotic resistance and ineffectiveness in mutant strains of *Rhizobium* spp. *Canadian Journal of Microbiology*, 10: 221-233.
- SCHWINGHAMER, E.A., 1967. Effectiveness of *Rhizobium* as modified by

mutation for resistance to antibiotic. *Antonie van Leeuwenhoek*, 33: 121-136.

SCHWINGHAMER, E.A., 1971. Bacteriocin production in *Rhizobium trifolii*. *Soil Biology Biochemistry*, 3: 355-359.

SCHWINGHAMER, E.A., 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *Journal General Microbiology*, 91: 403-413.

SCHWINGHAMER, E.A., 1977. Genetic aspects of nodulation and dinitrogen fixation by legumes: the microsymbiont. *In: Treatise on dinitrogen fixation*. Section III - Biology. R.W.F. HARDY & W.S. SILVER Ed. John Wiley & Sons, N.Y., C. 12, p. 577-622.

SCHWINGHAMER, E.A. e R.P. BELKENGREN, 1968. Inhibition of *Rhizobia* by a strain of *Rhizobium trifolii*. Some properties of the antibiotic and of the strain. *Archiv fuer Mikrobiologie*, 64: 130-145.

SCHWINGHAMER, E.A. e J. BROCKWELL, 1978. Competitive advantage of bacteriocin and phage producing strains of *Rhizobium trifolii* in mixed culture. *Soil Biology Biochemistry*, 10: 383-387.

SCHWINGHAMER, E.A. e W.F. DUDMAN, 1973. Evaluation of spectinomycin resistance as a marker for ecological studies with *Rhizobium* spp. *Journal Applied Bacteriology*, 36: 263-272.

SCHWINGHAMER, E.A.; C.E. PANKHURST e P.R. WHITFIELD, 1973. A phage-

like bacteriocin of *Rhizobium trifolii*. *Canadian Journal of Microbiology*, 19: 359-368.

SKERDLETA, V. e J. KARIMOVA, 1969. Competition between two somatic serotypes of *Rhizobium japonicum* used as double-strain inocula. *Archiv fuer Mikrobiologie*, 66: 25-28.

TAGG, J.R.; A.S. DAJANI e L.V. WANNAMARKER, 1976. Bacteriocins of gram positive bacteria. *Bacteriological Reviews* 40: 722-756.

TRABULSI, L.R.; M.E. ZULIANI e M.R.F. TOLEDO, 1970. Resistance to nine drugs of *Shigella* strains isolated in São Paulo between 1963-1968. *Revista de Microbiologia*, 1: 71-77.

VIEIRA, C., 1978. *Cultura do feijão*. Imprensa Universitária, Universidade Federal de Viçosa. Viçosa (MG). 146 p.

VINCENT, J.M., 1970. *Manual for the practical study of root nodule bacteria*. IBP Handbook n° 15. Blackwell Scs. Publ. London. 163 p.

VINCENT, J.M., 1977. *Rhizobium: General microbiology*. In: *A treatise on dinitrogen fixation*. Section III Biology. R.W.F. HARDY and W.S. SILVER Ed. John Wiley & Sons, N.Y. C. 7 p. 278-355.

VINCENT, J.M. e L.M. WATERS, 1953. The influence of the host on

competition amongst clover root-nodule bacteria. *Journal General Microbiology*, 9: 357-370.

ZELAZNA-KOWALSKA, I., 1971. Correlation between streptomycin resistance and infectiveness in *Rhizobium trifolii*. *Plant and Soil*, Special Volume: 67-71.

ZELAZNA- KOWALSKA, I., 1979. Bacteriocigeny of *Rhizobium trifolii*. *Acta Microbiologica Polonica*, 28: 39-45.

WINARNO, R. e T.A. LIE, 1979. Competition between *Rhizobium* strains in nodule formation. Interaction between nodulating and non nodulating strains. *Plant and Soil*, 51: 135-142.

A P E N D I C E

Tabela 1 A - Recuperação das estirpes mutante-resistentes, em placas seletivas (antibióticos), nos diversos tratamentos do ensaio de competição em vaso de Leonard esterilizado (20 nódulos/placa)

Tratamentos (Inoculações)	Placas																				
	Controle					Sm					Sp					Rf					
	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	
A I	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A II	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A III	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A IV	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B I	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
B IV	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 1 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
C I	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
C IV	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
AB I	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
AB II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
AB IV	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 1 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
AC I	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
AC II	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
AC III	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
AC IV	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
BC I	1	+	+	+	+	+						-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BC II	1	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
BC III	1	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						+	-	+	+	+	+	+	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						-	+	+	+	+	+	-	-	-	-
BC IV	1	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						+	+	+	+	+	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 1 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
ABC I	1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ABC II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ABC III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-
ABC IV	1	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-

+ : crescimento

- : ausência de crescimento

Sm : Estreptomina; Sp: Espectinomicina; Rf: Rifampicina

Tabela 2 A - Recuperação das estirpes mutante-resistentes, em placas seletivas (antibióticos), nos diversos tratamentos do ensaio de competição em vaso com solo (20 nódulos/placa)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
A I	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A II	1	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
A IV	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B I	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
B II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
B III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
B IV	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 2 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
C I	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+
C III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
C IV	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB I	1	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB III	1	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AB IV	1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 2 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
AC I	1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	+	-	?						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-
AC II	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-						-	-	-	-	+
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-						-	-	-	-	-
AC III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+						-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-						-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-						-	-	-	-	-
AC IV	1	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+						+	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-						+	-	+	-	-
	3	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+						-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-
BC I	1	+	+	+	+	+						-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
BC II	1	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	+	-	+	-	-
	2	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						+	+	-	-	-	-	-	-	+	-
	4	+	+	+	+	+						+	+	-	-	-	+	+	-	+	-
BC III	1	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
BC IV	1	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
	2	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+						-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

(continua)

(Tabela 2 A, continuação)

Tratamentos (Inoculações)		Placas																			
		Controle					Sm					Sp					Rf				
		A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E	A	B	C	D	E
ABC I	1	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABC II	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABC III	1	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
ABC IV	1	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T s/inoc.	1	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	2	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	3	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	4	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ : crescimento

- : ausência de crescimento

Sm : Estreptomicina; Sp: Espectinomicina; Rf: Rifampicina