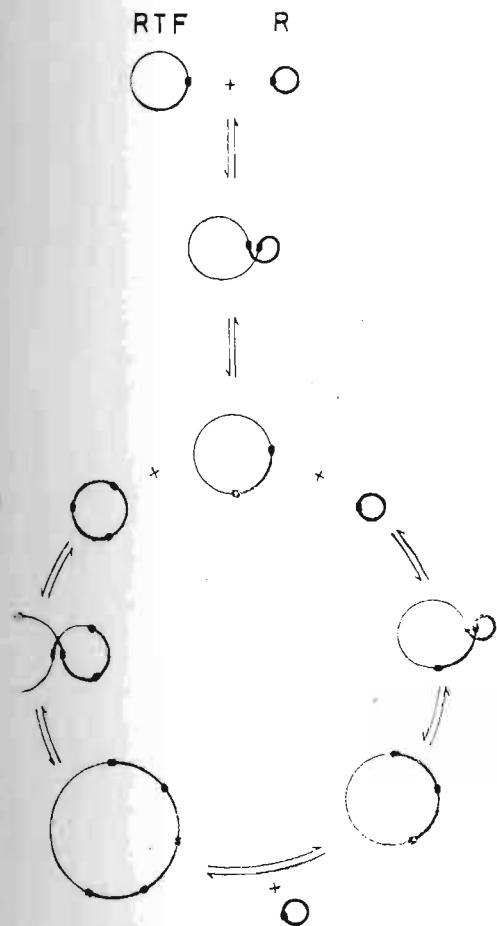
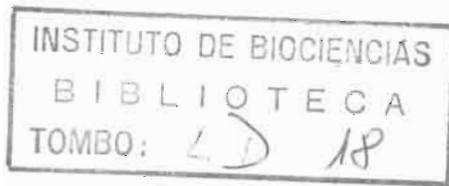


SÉRGIO OLAVO PINTO DA COSTA



Instabilidade genética da excreção de protease (gelatinase)
em *Proteus mirabilis*.



Tese apresentada para obtenção do Título
de Livre Docente junto ao Departamento
de Biologia do Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo

Nada mais triste e desolador do que um laboratório rico, limpo e vazio.

Este trabalho é dedicado àqueles jovens que, pela sua agitada presença, transformaram um laboratório pobre e nem sempre limpo, numa continua fonte de trabalho.

Muito obrigado Maria Helena Juliani, Luisa Lina Villa. Há quase 10 anos, um começo duro e, assim tem sido até hoje.

Muito obrigado Ana Clara S. Frascino, Maria Lucia Pinto Costa, Maria Christina M. Bonato e Marisa Bianco.

Muito se tem pela frente.

Muito obrigado àqueles que passaram pelo laboratório.

Convivência necessária e agradável.

J.T.A. GURGEL

O bom homem

O bom mestre

*O iniciador da Genética de Microrganismos
entre nós.*

J.L. AZEVEDO

Fiel seguidor do mestre.

*Responsável pela formação científica
de tantos.*

G.G. VILLELA

A ausência de um amigo.

O conforto de sua obra.

AGRADECIMENTOS

Pouco foi feito neste trabalho, durante esses últimos cinco anos, que não dependesse de alguém, direta ou indiretamente. Isso torna uma tarefa difícil, a lembrança de todos, o que aumenta em muito, o risco da ingratidão.

Quero agradecer àqueles que forneceram amostras bacterianas, nas pessoas dos colegas Gil V.A. Pessoa, Cláudia E.O.P. Campos, Elisa Penido, Nelson P. de Souza, Flávio Alterthum, Luís A. Archer, Sheldon Greer, José Siqueira Jr., Richard W. Lacey, Walter Colli, Diogenes S. Santos e a senhora Ethel S. Peixoto.

Agradeço também aos professores Diogenes S. Santos, Gil V.A. Pessoa, Edmar Chartone de Souza, Tomoko Higuchi, à Sra. Ioshie I. Tanaka e às Srtas. Kinue Iri no e Ruth Perelman, pela inestimável colaboração na parte experimental deste trabalho.

Sou muito grato aos professores R. W. Lacey, José Nicolau e L.R. Trabulsi pelas valiosas discussões e críticas ao presente trabalho.

Sou reconhecido ao Prof. M.Bacila pelas facilidades e recursos proporcionados, bem como ao Instituto de Química da USP, pelo auxílio e espaço concedidos, a fim de estabelecer e manter o laboratório de Genética de Microrganismos.

Agradeço aos colegas e funcionários do Departamento de Biologia do Instituto de Biociências da USP pela agradável convivência e pelas inúmeras gentilezas recebidas.

Sou ainda muito grato à minha dedicada esposa, pela eficiente colaboração no preparo da redação e ao Prof. Henrique Tastaldi pelas sugestões e pela cuidadosa correção da redação.

Quero agradecer aos funcionários da Seção de Biblioteca e Divulgação do Instituto Butantã, em especial, à Sra. Carmen Aleixo do Nascimento, bibliotecária-chefe, pela revisão das referências bibliográficas.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Proc. n°s. 73/009; 74/0156; 76/0399), e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Plano Integrado de Genética (PIG I e II), projeto CNPq-Finep 5728/75, que tornaram possível a execução deste trabalho, o meu profundo agradecimento.

*"... see what everybody else has seen,
and think what nobody else has thought."*

ALBERT SZENT-GYÖRGYI.

ÍNDICE

Pág.

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS	1
INTRODUÇÃO	5
MATERIAL E MÉTODOS.....	23
1. Amostras de bactérias e vírus utilizados	23
1.1 Amostras bacterianas	23
1.2 Amostras de vírus	29
2. Meios de cultura, drogas e soluções-tampão	29
2.1 Drogas	33
2.2 Soluções-tampão	34
3. Detecção de linhagens excretoras de protease	35
3.1 Técnica da digestão da película de gelatina de tiras de chapas radiográficas (<u>Le MI NOR & PIÉCHAUD, 1963</u>)	35
3.2 Hidrólise da gelatina contida em meio de cultura sólido (NG), método modificado de FRAZIER (1926)	36
3.3 Hidrólise da caseína, utilizando meio adicionado de leite (ML) (<u>AMARAL et al, 1967</u>)	36
3.4 Dosagem da atividade proteolítica extra-cellular	39

Continua

Continuação

4. Ocorrência de colônias P ⁻ em amostras de <u>Proteus mirabilis</u> procedentes de material clínico	40
5. Ocorrência de colônias P ⁻ em outras bactérias proteolíticas	42
6. Produção de sulfeto de hidrogênio por colônias de <u>Proteus mirabilis</u>	42
7. Síntese de urease por colônias de <u>Proteus mirabilis</u>	43
8. Ocorrência de células P ⁻ em colônias P ⁺ de <u>Proteus mirabilis</u> recentemente isoladas	43
9. Influência da permanência prolongada de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> em meio nutritivo líquido, na ocorrência de células P ⁻	44
10. Influência da estocagem prolongada de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> em meio nutritivo sólido inclinado na ocorrência de células P ⁻	44
11. Ocorrência de células P ⁻ em colônias P ⁺ de amostras de <u>Proteus mirabilis</u> estáveis e instáveis mantidas em estoque por tempo prolongado	45
12. Efeito de subcultivos repetidos em meio nutritivo líquido, na ocorrência de colônias P ⁻ em linhagens de <u>Proteus mirabilis</u>	46

Continua

Continuação

30. Ação da acriflavina (AF) no aparecimento de células P ⁻ em linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> estáveis e instáveis quanto à excreção de protease	61
31. Tratamento pelo cloridrato de guanidina (GuHCl) de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> estáveis e instáveis em relação à excreção de protease	61
32. Tratamento pela elevação da temperatura de cultivo de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u>	62
33. Método do Auxonograma	62
34. Indução de profagos	63
34.1 Permanência de cultivos por período de tempo prolongado (COETZEE & SACKS, 1959)	63
34.2 Cultivo sob alta temperatura	63
34.3 Ação da luz ultravioleta	64
34.4 Ação da mitomicina C	65
35. Determinação da presença de vírus nos filtrados	65
36. Titulação dos vírus	66
37. Preparação da bactéria indicadora.....	67
38. Preparação de estoques de vírus	67
39. Isolamento de vírus temperados	67
40. Tipos de vírus	68
41. Indução de profagos de células P ⁻ de amostras de <u>Proteus mirabilis</u>	69

Continua

Continuação

13. Efeito da gelatina no meio de cultura, na ocorrência de células P ⁻ em amostras de <u>Proteus mirabilis</u>	46
14. Curva de crescimento de células de <u>Proteus mirabilis</u> P ⁺ e P ⁻ em caldo nutritivo (NB)	47
15. Curva de crescimento de células de <u>Proteus mirabilis</u> P ⁺ e P ⁻ em caldo nutritivo adicionado de gelatina (N BG)	48
16. Influência de células P ⁺ e P ⁻ de <u>Proteus mirabilis</u> na sobrevivência de camundongos	49
17. Determinação da DL ₅₀	50
18. Influência de plasmídeo R, de resistência múltipla transferível, na excreção de protease em amostras de <u>Proteus mirabilis</u>	50
19. Sensibilidade ao desoxicolato de sódio (DS) de linhagem proteolítica de <u>Proteus mirabilis</u> abrigando plasmídeo R	50
20. Teste de reversão de linhagens P ⁻	51
21. Teste de reversibilidade de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> P ⁻ , utilizando o agente mutagênico nitrosoguanidina (NTG)	52
22. Teste de reversibilidade de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> P ⁻ pela ação da luz ultravioleta	53

Continua

Continuação

23. Teste de reversibilidade de células P ⁻ de <u>Proteus mirabilis</u> "in vivo"	54
24. Tratamento pelo brometo de etídeo (EB) de linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> instáveis e estáveis quanto à excreção de protease	55
24.1 Determinação da atividade do EB sobre o crescimento bacteriano de amostras instáveis e estáveis	56
25. Efeito do dodecil-sulfato de sódio (SDS) sobre linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> instáveis e estáveis quanto à excreção de protease	57
26. Efeito do dodecil-sulfato de sódio (SDS) na conversão de células P ⁺ e P ⁻ em <u>Proteus mirabilis</u>	58
27. Efeito do dodecil-sulfato de sódio (SDS) sobre o crescimento diferencial de células P ⁺ e P ⁻ de <u>Proteus mirabilis</u>	59
28. Ação da rifampicina no aparecimento de células P ⁻ em linhagens de <u>Proteus mirabilis</u> instáveis e estáveis quanto à excreção de protease	60
29. Tratamento de linhagens estáveis e instáveis quanto à excreção da protease de <u>Proteus mirabilis</u> pela mitomicina C (MC)	60

Continua

Continuação

42. Verificação de pseudolisogenia (estado de portador)	69
43. Investigação da ocorrência de conversão lisogênica na determinação dos fenótipos P ⁺ e P ⁻ em amostras de <u>Proteus mirabilis</u>	70
44. Transdução do caráter protease entre linhagens de <u>Proteus mirabilis</u>	71
45. Determinação dos níveis de resistência a antimicrobianos	73
46. Pesquisa de produção de bacteriocinas	75
47. Transferência de marcas genéticas	76
48. Obtenção de linhagens receptoras derivadas do <u>Proteus mirabilis</u> N-17 Gm	77
49. Técnicas de conjugação	78
49.1 Conjugação em meio líquido (SMITH, 1969)	78
49.2 Conjugação, utilizando filtro Millipore, modificada de LAI, PANOPoulos & SHAFFER (1977) ...	78
49.3 Conjugação em meio sólido	79
50. Experimentos de transferência da informação genética responsável pela síntese de protease, através de conjugação bacteriana	80
51. Experimentos de conjugação envolvendo a transferência de plasmídeos R entre linhagens de <u>Proteus mirabilis</u>	81

Continua

Continuação

52. Transferência do plasmídeo RP4 da linhagem de <u>E.coli</u> J 53 para <u>Proteus mirabilis</u>	82
53. Mobilização da informação genética da protease pelo plasmídeo RP4	84
54. Eletroforese em gel de agarose vertical, pela técnica da colônia única (SANTOS, 1978)	84
RESULTADOS	87
DISCUSSÃO	145
RESUMO	182
SUMMARY	186
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	190

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AF	- Acriflavina
Ap	- Resistência plasmidiana à ampicilina
BHI	- Meio nutritivo "Brain Hearth Infusion"
Cm	- Resistência plasmidiana ao cloranfenicol
DL ₅₀	- Dose letal 50%
DM	- (tampão) Meio mínimo de Davis & Mingoli sem glicose
DNA	- Ácido desoxirribonucleico
DS	- Desoxicólatro de sódio
EB	- Brometo de etídio
EMS	- Metanossulfonato de etila
F ⁻	- Bactéria não portadora de fator sexual
<u>gal</u>	- Incapacidade para fermentar a galactose.
GuHCl	- Cloridrato de guanidina
Hfr	- Alta frequência de recombinação
Hg	- Resistência plasmidiana ao íon mercúrio
HTA	- Meio de Hershey
IAL	- Meio de Rugai, lisina e motilidade (segundo Pessoa & Silva - Instituto Adolfo Lutz)
Km	- Resistência plasmidiana à canamicina
<u>lac</u> , Lac ⁻	- Incapacidade para fermentar a lactose
LB	- Meio de Luria

- leu - Necessidade nutricional para leucina
- m- - Modificação menos
- met - Necessidade nutricional para a metionina
- MC - Mitomicina C
- MTA - Meio de Hershey ("H-top agar")
- ML - Meio nutritivo adicionado de leite
- MM - Meio mínimo de Davis & Mingoli complementado com ácido nicotínico
- MMH - Meio de Müller-Hinton
- m.o.i. - Relação entre o número de vírus e o de bactérias receptoras num experimento de transdução
- MS - Meio nutritivo para determinar a produção de sulfeto de hidrogênio
- MSD - Meio de composição semi-definida utilizado para dosagem da atividade proteolítica extracelular em Proteus mirabilis
- MT - Meio com triptofano e citrato de ferro amoniacial (segundo Pessoa & Gelli - Instituto Adolfo Lutz)
- MU - Meio nutritivo adicionado de uréia
- NA - Ágar nutritivo ("Bacto Nutrient Agar")
- Na₂EDTA - Etilenodiamino tetracetato de sódio
- Nal^R - Resistência ao ácido nalidíxico
- NB - Caldo nutritivo ("Bacto Nutrient Broth")
- NBG - Caldo nutritivo contendo 0,5% de gelatina

- NG - "Bacto Blood Agar Base" adicionado de gelatina e ágar
- n.p.f. - Número de partículas de vírus
- NTG - N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina
- P⁺ - Células ou colônias excretoras de protease
- P⁻ - Células ou colônias não excretoras de protease
- pro - Necessidade nutricional para prolina
- r⁻ - Restrição menos
- rec A - Mutação no loco rec A
- Rif^R - Resistência à rifampicina
- RNA - Ácido ribonucleico
- RNase - Ribonuclease
- SDS - Dodecil-sulfato de sódio
- Sm - Resistência plasmidiana à estreptomicina
- str, Str^R - Resistência cromossômica à estreptomicina
- Su - Resistência plasmidiana à sulfanilamida
- Tc - Resistência plasmidiana à tetraciclina
- TCA - Ácido tricloroacético
- TEB - Tampão tris + Na₂EDTA + H₃BO₃
- TES - Tampão tris + Na₂EDTA + NaCl
- thi - Necessidade nutricional para tiamina
- thr - Necessidade nutricional para treonina
- thy - Necessidade nutricional para timina
- tra - operon envolvido na transferência de plasmídeo

- tris - hidroximetilaminometano
- trp - Necessidade nutricional para o triptofano
- TSB - Meio nutritivo "Tryptic Soy Broth" (Difco)
- u.f.p. - Unidades formadoras de placas de lise
- U.V. - Luz ultravioleta (2.537 \AA)

INTRODUÇÃO

O grupo Proteus é constituído por bacilos aeróbios gram-negativos e móveis. É muito difundido na natureza, ordinariamente saprófita e constitui parte importante da flora de putrefação da matéria orgânica de origem animal e vegetal, contaminando toda classe de substâncias tais como, terras, águas e esgoto. Não falta em carnes e pescados em putrefação e também é muito frequente no esterco.

A parte de sua existência saprofítica, pode, em determinadas situações, desenvolver-se no organismo animal, inclusive no homem, e determinar transtornos patológicos.

Bactérias pertencentes ao grupo Proteus que apresentam crescimento envasivo (bafo) foram inicialmente agrupadas em duas espécies, P. mirabilis e P. vulgaris (HAUSER, 1885), e depois, como constituídas por uma única espécie, P. hauseri (KAUFFMANN, 1951).

Este grupo de bactérias, relacionado sorologicamente, foi logo a seguir subdividido em dois sub-gêneros bioquímicamente distintos, P. mirabilis e P. vulgaris (KAUFFMANN, 1956; 1966). Apesar dessa medida, encontra-se com

certa frequência na literatura, a persistência da denominação P. hauseri (RICHARD, 1972-1973) ou P. mirabilis/P. vulgaris (HEDGES, 1975).

Apesar de que essas espécies estão claramente relacionadas por muitas razões, incluindo as de ordem antigênica que envolvem receptores comuns de fagos e bacteriocinas (COETZEE, 1972), algumas enzimas que são indistinguíveis (GUO & LIU, 1965; SMIT & COETZEE, 1967), e extensiva homologia de bases, verificada em testes de hibridização DNA:DNA (BRENNER & FALKOW, 1971; COETZEE, 1972), serão consideradas neste trabalho como espécies distintas, tomando-se como base alguns caracteres diferenciais bioquímicos (reação de descarboxilação da ornitina, produção de indol, fermentação da maltose e fermentação da sacarose).

P. mirabilis e P. vulgaris tendem a afastar-se cada vez mais das Enterobactereacea, quer pelo crescimento em bafo sobre meios nutritivos sólidos, quer por possuirem enzimas que permitem a desaminação oxidativa do triptofano em ácido indolpirúvico, e da fenilalanina em ácido fenilpirúvico, hidrólise rápida da uréia e principalmente por apresentarem composição molar de bases tão diferentes (39% contra 50% de G+C nas enterobactérias). Essa distância natural pode explicar certas dificuldades na utilização direta dos conhecimentos genéticos adquiridos nas enterobac-

térias, e a impossibilidade de se utilizar inteiramente os progressos atuais da genética microbiana nestes microrganismos.

Entre as características bioquímicas do P. mirabilis existe a produção de gelatinase, uma exoenzima proteolítica que atua sobre ligações polipeptídicas da gelatina. Como essa enzima tem se mostrado também efetiva na degradação de outras proteínas, como a caseína e a albumina (BONATO, 1978), será aqui referida como protease (KELLY & HITE, 1955). Essa atividade gelatinásica é conhecida há muito tempo e serviu, juntamente com a capacidade de crescimento envasivo (bafo), para HAUSER (1885) estabelecer o gênero Proteus, onde inclui as espécies P. mirabilis e P. vulgaris.

Uma liquefação crateriforme é geralmente visível após 24 horas da inoculação, por picada, em meio de gelatina, quando se utilizam linhagens recém-isoladas. Segundo TOPLEY, WILSON & MILES (1953), linhagens mantidas por algum tempo no laboratório liquefazem a gelatina mais lentamente, não se completando o processo até que sejam transcorridas umas três semanas, ou mesmo, em algumas eventualidades, perdem essa capacidade.

Mais recentemente, RICHARD (1972-1973) no curso de Microbiologia Sistemática, realizado no Instituto

Pasteur (Paris), enquadraria entre "fontes anormais" a eventual ocorrência de Proteus hauseri (P. mirabilis e P. vulgaris) gelatinase-negativo.

A dificuldade de se encontrar atualmente referências sobre linhagens gelatinase-negativas talvez se deva ao fato de que o estudo minucioso do comportamento bacteriano voltado para a sistemática pertencer mais ao passado, quando extensas e rebuscadas tentativas de classificação eram apresentadas, ou quem sabe, ao fato de grande parte do estudo classificatório das bactérias estar em poder da Bacteriologia Médica, dotada de um sentido prático e imediato, voltada mais para o bioquímismo bacteriano de patógenos. Além disso, a prova da gelatinase não mais constitui prova rotineira, uma vez que existem outras provas que podem substituí-la com vantagem, a não ser, talvez, em alguns centros de referência de sistemática microbiológica.

Quando uma bactéria portadora de um dado caráter fenotípico, como o da produção de gelatinase, origina, em alta frequência, células variantes que não mais exibem esse caráter, surge uma razoável problemática em relação à origem da informação genética responsável por esse caráter.

A célula bacteriana pode conter, em adição ao seu cromossomo, um número de pequenas moléculas circulares, dotadas de uma certa autonomia, os plasmídeos, bem como, vários profagos integrados no cromossomo ou ligados à membrana, que funcionam como plasmídeos ou, ainda, ser portadora de infecções virais persistentes, onde o fago se multiplica numa fração da população (pseudolisogenia). Tanto os plasmídeos, como as várias situações virais descritas, podem atribuir modificações da população bacteriana. No caso particular dos vírus essas modificações podem decorrer da expressão dos genes do profago, do fago lítico ou da indução de genes bacterianos pelos vírus (BARKSDALE & ARDEN, 1974).

Também a célula bacteriana pode conter, além desses elementos, sequências de inserção menores (STARLINGER & SAEDLER, 1976) e sequências de translocação, também referidas como transposons ou translocons (HEDGES & JACOB, 1974; HEFFRON et al., 1975; KOPECKO & COHEN, 1975).

A chave característica das interrelações entre esses vários elementos genéticos, bem como a capacidade de suas interações com o cromossomo bacteriano, tem sido bem esclarecidas (COHEN, 1976; WEISBERG & ADHYA, 1977).

Recentemente um número de interações moleculares envolvendo recombinação aditiva (SCHWESINGER, 1977) tem sido descritas em sistemas microbiológicos. Nessas in-

terações, elementos genéticos recombinam-se uns aos outros e formam compostos moleculares. Quando regiões homólogas estão presentes em ambas as moléculas, esses eventos são algumas vezes mediados por mecanismos usuais de recombinação. Assim, a recombinação aditiva difere da recombinação substitutiva, na qual, sequências de DNA em segmentos homólogos são permutadas, i.e., substituídas.

Exemplos de interações moleculares, envolvendo recombinação aditiva, incluem a cointegração de replicons independentes, i.e., de um plasmídeo ou um profago com o cromossomo bacteriano, ou entre dois plasmídeos, ou mesmo entre um plasmídeo e um profago. Outros exemplos incluem a integração de várias sequências de inserção, onde espécies autônomas de DNA interagem com moléculas de DNA cro mossômico ou plasmídico (SAEDLER & HEISS, 1973).

A existência e o comportamento de tais elementos genéticos são de grande importância na flexibilidade evolucionária do genoma procariótico (SCHWESINGER & NOVICK, 1975).

ANDERSON (1966) num artigo de grande alcance, especulou: "if the long-term activity of transfer factors has influenced (bacterial) evolution, the evolutionary time-scale may have been telescoped into a shorter span than that envisaged purely in terms of the selection

of mutants with survival advantages". Quatro anos depois, uma idéia semelhante foi proposta para vírus (ANDERSON, 1970).

Realmente, elementos extracromossômicos são virtualmente dotados de ubiquidade e agem num espectro bastante diversificado de processos genéticos. Essa idéia, de que elementos extracromossômicos atuam como agentes que aceleram a evolução, tem sido muito reforçada (REANNEY & MARSH, 1973; REANNEY, 1974^{a-b}; SZYBALSKI & SZYBALSKI, 1974; ZHDANOV & TIKCHONENKO, 1974; REANNEY, 1976).

No presente momento, as bactérias possuem enzimas que são produtos finais de milhões de anos de evolução, mas não há razão para se supor que seu potencial evolucionário esteja no fim (BETZ et al., 1974).

As bactérias que vivem no solo e na água, encontram uma grande variedade de compostos orgânicos originados de processos biossintéticos naturais, que podem ser utilizados como substratos para o seu crescimento. Também produtos industriais podem criar pressões seletivas para enzimas que degradarão moléculas feitas pelo homem, como bem constatado em Pseudomonas, que pode abrigar plasmídeos contendo genes para várias vias catabólicas de cânfora, octanas, salicilato, naftaleno benzoato, tolueno, xileno, etc. (CHAKRABARTY, 1972; CHA-

KRABARTY et al., 1973; RHEINWALD, CHAKRABARTY & GUN SALUS, 1973; DUNN & GUN SALUS, 1973; WONG & DUNN, 1974; WORSEY & WILLIAMS, 1975; CHAKRABARTY, 1976).

Esses genes para vias catabólicas podem ser permutados entre plasmídeos e cromossomos, e novas mutações nesses plasmídeos, que ofereçam uma vantagem de crescimento seletivo, podem ser difundidas mais rapidamente através da população microbiana, do que permitiria a clássica interpretação da mutação e recombinação cromossômicas, seguidas de seleção.

Assim, de posse dos conhecimentos de que se dispõe atualmente, um caso de instabilidade genética bacteriana envolve uma maior complexidade, porque se o determinante genético responsável pelo caráter em questão está ligado ao cromossomo, os variantes negativos podem decorrer de genes mutadores (COX, 1976; KONRAD, 1978), variação de fase (LEDERBERG, 1957; IINO & LEDERBERG, 1964; GREEN & COLARUSSO, 1964; PEARCE & STOCKER, 1967), deleções (WEISBERG & ADHYA, 1977). Se o determinante está ligado a elementos extracromossômicos, os variantes negativos podem decorrer de vírus (BARKSDALE & ARDEN, 1974; HOWE & BADE, 1975; COURTURIER, 1976; BUKHARI & LJUNGQUIST, 1978), elementos de inserção (STARLINGER & SADLER, 1976; SHAPIRO, 1977), sequências de translocações (HEDGES & JACOB, 1974; BARTH et al., 1976), e plas-

mídeos (RICHMOND, 1968; NOVICK, 1969; RICHMOND, 1972; HELINSKI, 1976; CHAKRABARTY, 1976; STARLINGER, 1977).

Entre os elementos extracromossômicos, o mais representativo constuma ser o plasmídeo, já que, entre algumas espécies bacterianas, a troca de informações genéticas mediada por tais estruturas tornou-se um mecanismo comum de herança (HELINSKI, 1973; SHERRATT, 1974; ROWBURY, 1977). Nesse caso, os determinantes genéticos estariam ligados a ele, e variantes negativas representariam perda parcial ou total desse plasmídeo.

Deve-se ainda considerar que se os plasmídeos estão envolvidos em tais situações, eles devem não ser essenciais para a viabilidade das células hospedeiras (SCAIFE, 1967; CLOWES, 1972).

Devido ao estado avançado da análise genética entre as Enterobacteriaceae, particularmente E. coli o reconhecimento da herança extracromossônica nesses organismos tem-se mostrado muito facilitado. Provavelmente, por essa razão, somente há poucos anos tem-se encontrado na literatura problemas envolvendo identificação de elementos extracromossômicos em outros gêneros que, com exceção da Pseudomonas, carecem de um contingente de informações mais substancial.

Análise genética de Proteus mirabilis pode ser realizada através de transdução (COETZEE & SACKS, 1960_{a-b}) conjugação (FALKOW et al., 1964_{a-b}), transfecção (Van RENSBURG et al., 1969) e transformação (Van RENSBURG, 1971). Na realidade, a transdução é o método que tem-se mostrado mais eficiente para tal análise nesse organismo.

Diversos marcadores têm sido transduzidos em P. mirabilis, incluindo resistência à estreptomicina (COETZEE & SACKS, 1960_b); crescimento envasivo (bafo) (COETZEE, 1963); auxotrofia para prototrofia (BÖHME, 1964; PROZESKY, 1968; GRABOW, 1970, 1972); transdução abortiva para motilidade (APPELBAUM et al., 1972); transferência de fatores R (COETZEE, DATTA & APPELBAUM, 1973); transferência de marcadores canamicina (COETZEE, 1974), ampicilina e canamicina (COETZEE, 1975), estreptomicina-sulfonamida e estreptomicina-sulfonamida-canamicina (COETZEE, 1976); transferência de auxotrofia e resistência a antibióticos (COETZEE, KRIZSA-NOVICH-WILLIAMS, 1976).

Transdutantes de P. mirabilis não transferem, por conjugação, fatores R e, possivelmente, somente determinantes não-conjugativos são transduzidos. Os marcadores não parecem se integrarem no cromossomo da célula receptora, de vez que a maioria dos transdutantes perde rapidamente todos os marcadores em ambiente não seletivo (ROWND,

NAKAYA & NAKAMURA, 1966).

Transferência de cromossomo bacteriano, por conjugação, entre P. mirabilis, P. vulgaris e P. morgani não foi conseguida (HUTCHINSON & MEDILL, 1954). Através de cruzamentos com linhagens de E. coli Hfr, porções de cromossomos puderam ser transferidas para P. mirabilis, em muito baixa frequência, não formando, contudo, recombinantes, e sim diploides parciais instáveis (GEMSKI, WOHLHIETER & BARON, 1967; BARON et al., 1968; BRENNER, CITARELLA & FALKOW, 1968; WOHLHIETER, GEMSKI & BARON, 1969).

Linhagens de Proteus podem transferir plasmídeos por conjugação para E. coli (FALKOW et al., 1964_a; DATTA & KONTOMICHALOU, 1966; SMITH & ARMOUR, 1966; MITSUHASHI et al., 1967; TERAWAKI, TAKAYASU & AKIBA, 1967; NAIDE et al., 1967; DOBOZY & HAMMER, 1968; PITTON, 1970; POTY, GOZE & GAGNON, 1971; ODAKURA, TANAKA & MITSUHASHI, 1971).

Também, plasmídeos R de diferentes grupos de compatibilidade podem ser transferidos de E. coli para Proteus. Contudo, não ocorre transferência de plasmídeos "I-like" numa frequência detectável, e a taxa de transferência de vários outros tipos de plasmídeos é menor do que aquela decorrente de cruzamento entre linhagens de E. coli (DATTA & HEDGES, 1972; HEDGES, 1975).

Numerosos autores (para revisão veja COETZEE, 1972) constataram que alguns plasmídeos R, que na E. coli existem como moléculas de DNA únicas, dissociam-se no P. mirabilis em fatores de transferência (COHEN & MILLER, 1970) e, presumivelmente, em plasmídeos não-autotransferíveis, carregando genes para resistência, que se replicam sob controle relaxado.

O comportamento molecular e replicativo de um plasmídeo R pode variar enormemente em diferentes hospedeiros bacterianos (ROWND, NAKAYA & NAKAMURA, 1968; FALKOW et al, 1969; COHEN & MILLER, 1970; FALKOW et al, 1971; ROWND, KASAMATSU & MICKEL, 1971; KOPECKO & PUNCK, 1971; COHEN et al, 1971). Como se sabe (SILVER & FALKOW, 1970_b; COHEN & MILLER, 1970), o DNA do plasmídeo R, R1, pode ser isolado de E. coli K-12, como uma molécula circular covalentemente fechada, com peso molecular de 64×10^6 dáltons e conteúdo G+C de 51,5%. Uma única molécula costuma estar presente por cromossomo bacteriano. Contudo, se essa mesma molécula de DNA do plasmídeo R for transferida para P. mirabilis PM-1, pode-se agora isolar 3 moléculas circulares covalentemente fechadas, dotadas de replicação independente (FALKOW, HAAPALA & SILVER, 1969; COHEN & MILLER, 1970). Uma dessas 3 espécies moleculares é idêntica àquela referida em E. coli (64×10^6 dáltons). As outras duas são menores; uma tem peso mole-

cular de 52×10^6 dáltons, e composição de bases, 48% G+C, enquanto a outra tem peso molecular correspondente a 12×10^6 dáltons, e composição de bases, 56% G+C. Isso foi interpretado como se as duas espécies moleculares menores constituíssem subunidades da molécula maior, uma vez que a associação aditiva das duas moléculas menores equivale à molécula composta, que é de 64×10^6 dáltons e 51,5% G+C.

A proporção entre as espécies moleculares, assim como o número de cópias, varia no hospedeiro P. mirabilis, dependendo da fase de crescimento (ROWND, NAKAYA & NAKAMURA, 1966; ROWND, 1969). Durante o início da fase exponencial de crescimento, predomina a presença da espécie molecular maior (64×10^6 dáltons), em número de aproximadamente 5 cópias por cromossomo. Quando as células de P. mirabilis atingem o início da fase estacionária de crescimento, ocorre um grande aumento de síntese do plasmídeo R que perdura por um período de 4 a 6 horas. Essa replicação é desigual, desde que ocorre nas proporções 5:5:50 das espécies 64×10^6 , 52×10^6 e 12×10^6 dáltons, respectivamente, o que equivale dizer, 5 cópias do plasmídeo R completo (RTF + r), 5 de (RTF) e 50 de r (somente genes determinantes de resistência a drogas).

Esses estudos mostraram a ocorrência de múltiplas cópias de plasmídeos R em P. mirabilis, enquanto aparecem em número bem menor em E. coli e Serratia marces-

cens. Experimentos adicionais mostraram que a transferência do fator conjugativo e o elemento que abriga genes determinantes de resistência (não-conjugativo) dissociam e reassociam na linhagem hospedeira, fornecendo um mecanismo pelo qual o número de cópias não-conjugativas (e portanto de genes de resistência a drogas) por célula, pode ser regulado (ROWND, 1967; ROWND et al, 1970). Esse fenômeno, que é observado em vários plasmídeos R fi^+ de P. mirabilis (NISIOKA, MITANI & CLOWES, 1969; SILVER & FALKOW, 1970; ROWND & MICKEL, 1971; ROWND, PERLMAN & GOTO, 1974), contém um elemento IS (IS 1), localizado nas duas junções entre o elemento conjugativo e o não-conjugativo, envolvido assim na dissociação e reassociação acima referida (PTASHNE & COHEN, 1975; HU et al, 1975).

GRINSTED et al (1972) verificaram que o plasmídeo R^{Pl} do grupo de compatibilidade P, originário de Pseudomonas aeruginosa (LOWBURY et al, 1969; FULLBROOK, ELLISON & SLOCUMBE, 1970; SYKES & RICHMOND, 1970), pode transferir seus marcadores (carbenicilina, tetraciclina e canamicina-neomicina) para P. mirabilis.

Um outro plasmídeo R, que se originou da P. aeruginosa, pertencente ao mesmo grupo de compatibilidade P, é o RP4 (BLACK & GIRDWOOD, 1969; DATTA et al, 1971), que foi transferido para E. coli e várias bactérias, inclusive

algumas fitopatogênicas (LAI, PANOPPOULOS & SHAFFER, 1977), se-
rá transferido para P. mirabilis neste trabalho.

Plasmídeos conjugativos especificam suas próprias transferências e frequentemente facilitam a transfe-
rência de pequenos plasmídeos. Para a transferência do DNA entre células, por conjugação, deve ocorrer algum tipo de união e, associado a isso, o DNA a ser transferido deve se abrir na origem de transferência, ori T (presumivelmente pe-
la ação de uma endonuclease especificada pelo plasmídeo), e um fio único desse DNA plasmídico será mobilizado. O contato celular no caso de muitos plasmídeos conjugativos é adqui-
rido por intermédio das fímbrias sexuais ("sex pili"). Mui-
tos plasmídeos pequenos, contudo, não contém DNA suficiente para especificar a produção de tais fímbrias. Eles são,
contudo, capazes de usar as fímbrias sexuais especificadas por outros plasmídeos. Concomitantemente com a presença das fímbrias sexuais dos organismos doadores, para uma conjuga-
ção eficiente, também é necessário que a célula receptora apresente propriedades específicas da superfície (MONNER et al, 1971; BEARD & BISHOP, 1971).

Em adição ao "F-pili" e "I-pili", tres novas classes de fímbrias sexuais são especificadas por plasmídeos dos grupos de compatibilidade W, T e P (RP4 per-
tence a este último grupo). Enquanto que as propriedades

de transferência dos plasmídeos "F-like" e "I-like" são que se que invariavelmente reprimidas, a produção de fimbrias sexuais é desreprimida em células transportando plasmídeos dos grupos P, W ou T (BRADLEY, 1974; 1976).

Exemplos de mobilização de plasmídeos não-conjugativos (aqui inclui, também, plasmídeos R compostos somente de elementos não-conjugativos) são as transferências através de plasmídeos F e outros (FRÉDÉRICQ & BETZBARAU, 1953; HARADA et al., 1964; ANDERSON & LEWIS, 1965; HARA DA et al., 1967; REEVE & BRAITHWAITE, 1970; FRÉDÉRICQ et al., 1971; DATTA & HEDGES, 1972; SILVA, 1974).

O plasmídeo RP4 já foi transferido para um bom número de bactérias gram-negativas (SYKES & RICHMOND, 1970; DATTA et al., 1971; ROE, JONES & LOWBURY, 1971; DATTA & HEDGES, 1972; PÜHLER, BURKARDT & HEUMANN, 1972; OLSEN & SHIPLEY, 1973; BERINGER, 1974), mas não para P. mirabilis.

Sabe-se que RP4, assim como outros plasmídeos do grupo P são capazes de mobilizar cromossomos de outras bactérias, tais como Pseudomonas aeruginosa (STANISICH & HOLLOWAY, 1971), E. coli (MARTIN, SOKATCH & UNGER, 1975), Pseudomonas glycinea (LACY & LEARY, 1975; 1976_{a-b}), Pseudomonas phaseolicola e Erwinia chrysanthemi (GUIMARÃES, 1976), Acinetobacter calcoaceticus (TOWNER & VIVIAN, 1976).

Linhagens de P. mirabilis lac⁺ estão associadas a um plasmídeo conjugativo (FALKOW et al., 1964 a-b). Trata-se do único plasmídeo (P - lac⁺) de que se tem conhecimento nesta bactéria. Em E. coli, P - lac⁺ é normalmente reprimido, mas pode ser induzido para produzir altos níveis de galactosidase. Em P. mirabilis, esse elemento extracromossômico tem um apreciável nível de síntese constitutivo, o qual é dobrado pela indução. Pode haver 2 ou 3 cópias de P - lac⁺ em E. coli, mas, em P. mirabilis, 10% do DNA total pode estar associado com essa unidade (WOHLHIEDER et al., 1964).

Desconhecem-se referências sobre instabilidade da informação genética da excreção de protease em outras bactérias. Os poucos estudos genéticos sobre protease em Bacillus mostram um claro envolvimento cromossômico (ITO & SPIZIZEN, 1973; UEARA et al., 1974; BALASSA, DOD & ZUCCA, 1975; PRIEST, 1977).

A instabilidade de um dado caráter fenotípico tem se constituído numa importante pista a favor da herança extracromossônica (BARBER, 1949, BOROWISKI, 1963; NOVICK, 1969; RICHMOND, 1972; MCKAY, BALDWIN & ZOTTOLA, 1972; KOZAK, RAJCHERT-TRZPIL & DOBRZANSKI, 1974; CORDS, MCKAY & GUERRY, 1974; COOK, 1976).

Este trabalho busca, inicialmente, caracterizar geneticamente um fenômeno de instabilidade em relação à excreção de protease, em linhagens de Proteus mirabilis. Pretende, ainda, conseguir algumas informações que contribuam para o esclarecimento dessa instabilidade, em relação aos elementos extracromossômicos.

MATERIAL E MÉTODOS

1. AMOSTRAS DE BACTÉRIAS E VÍRUS UTILIZADOS

1.1 Amostras bacterianas

As amostras bacterianas usadas neste trabalho, bem como suas propriedades mais relevantes, estão discriminadas nas Tabelas 1 e 2. Os símbolos para genótipos e fenótipos de bactérias e plasmídeos estão de acordo com as recomendações de DEMEREC et al (1966) e NOVICK et al (1976). As amostras de Proteus mirabilis, com exceção de N-17 e suas derivadas, e a da série AT, chegaram ao laboratório logo após seu isolamento.

Essas amostras estão sendo mantidas em ágar nutritivo semi-sólido, contido em frascos do tipo penicilina, fechados com tampa de borracha, em temperatura ambiente.

O controle de pureza das amostras durante o período de trabalho foi feito utilizando o meio de Ruggai, lisina e motilidade, e periódicas reclassificações confirmatórias dessas linhagens foram feitas por G.V.A. Pessoa, no laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz.

TABELA 1

Amostras de Proteus mirabilis utilizadas

Amostras	Características	Origem
N-2 a N-17	Isol. de mat. clínico humano	N.P. de Souza ^a
S-3 e S-4	Idem	Idem
N-17-1 a N-17-24	Originadas colônia N-17-P ⁺	Este trabalho
N-17-C	Origininada de colônia N-17 (instável)	Idem
N-17-8-13	Origin. de colônia N-17-8-P ⁺ (estável)	Idem
N-17-9-13	Origin. de colônia N-17-9 (instável)	Idem
N-17-I a N-17-VIII	Originadas de colônias N-17-P ⁻	Idem
N-17 Gm	Originada da N-17 ^b ; popula- ção mista (P ⁺ e P ⁻)	Idem
N-17-G-1-R-P ⁻	Originada da N-17 Gm Rif ^R	Idem
N-17-G-2-RS-P ⁻	Originada da N-17 Gm Rif ^R Str ^R	Idem
N-17-G-2A-P ⁺	Transconjugante (RP4) ^c	Idem
N-17-G-6A-P ⁺	Idem	Idem
N-17-G-21A-P ⁺	Idem	Idem
N-17-G-22A-P ⁺	Idem	Idem
N-17-G-26A-P ⁺	Idem	Idem
N-17-G-28A-P ⁺	Idem	Idem
N-17-G-7B-RS-P ⁻	Idem	Idem

Continua

Continuação da Tabela 1

Amostras	Características	Origem
N-17-G-10C-R-P ⁻	Transconjugante Sm, Km, Hg ^d	Este trabalho
N-17-G-134C-R-P ⁻	Transconjugante Sm, Hg ^d	Idem
N-17-G-1-NA-P ⁺	Originada da N-17 Gm, NaI ^R	Idem
N-17-G-2-NA-P ⁻	Idem	Idem
N-17-EB (P ⁻)	Originada da N-17 Gm, curada pelo EB	Idem
L-1 a L-168	Isoladas de material clínico humano	G.V.A.Pessoa ^e
L-22	População P ⁺ estável	Este trabalho
L-70	Idem	Idem
L-79	População P ⁺ instável	Idem
L-68 m	População mista (P ⁺ e P ⁻)	Idem
L-68-73-P ⁺	Originada da L-68 m	Idem
L-68-81-P ⁻	Idem	Idem
L-68-79-P ⁺ (R)	Originada da L-68 m, Sm, Km, Ap, Hg	Idem
L-68-79A-P ⁻ (R)	Idem	Idem
L-68-1-NA-P ⁺	Originada da L-68 m NaI ^R	Idem
L-68-2-NA-P ⁻	Idem	Idem
L-68-1-R-P ⁺	Originada da L-68 m Rif ^R	Idem
L-68-2-R-P ⁻	Originada da L-68 m Rif	Idem
L-68-1-P ⁺	Originada da L-68 m (estável)	Idem

Continua

Continuação da Tabela 1

Amostras	Características	Origem
L-68-2-P ^a	Originada da L-68 m (está- vel)	Este trabalho
BM-1 a BM-50	Isoladas de material clínico humano	C.E.O.P. Cam- pos ^f
AT-26 a AT-38	Idem	E.Penido ^g

- a. Laboratório da Santa Casa de Misericórdia de Curitiba. Pr;
- b. As linhagens da série N-17 foram reclassificadas por G.V.A. Pesso;
- c. Linhagem obtida por conjugação com E. coli J 53 (RP4). O plasmídeo RP4 carrega resistência para os antibióticos, canamicina, tetraciclina e ampicilina (DATTA et al, 1971);
- d. Linhagem obtida por conjugação com a L-68-79;
- e. Instituto Adolfo Lutz, SP.;
- f. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatú-UNESP;
- g. Instituto de Microbiologia UFRJ;

O significado das abreviaturas acham-se em "Abreviaturas e Símbolos".

TABELA 2
Amostras de outras bactérias utilizadas

Amostras	Características	Origem
<u>E. coli</u> J 53	<u>pro met thi</u> (RP4) ^a	D.S. Santos ^b
<u>E. coli</u> HB 101	F ⁻ <u>leu pro lac gal thi str-r</u> <u>recA r m</u>	Idem
<u>Ps.aeruginosa</u>	1 Isolado de material clínico	G.V.A. Pessoa ^c
	31 Idem	Idem
	33 Idem	Idem
	42 Idem	Idem
	51 Idem	Idem
	52 Idem	Idem
	56 Idem	Idem
	1851 Idem	Idem
	1864 Idem	Idem
	1877 Idem	Idem
	1946 Idem	Idem
	1957 Idem	Idem
	1967 Idem	Idem
	2014 Idem	Idem
<u>B.subtilis</u>	18 Tipo selvagem	L.P. Archer ^d
	19 <u>trp thy</u>	Idem
	26 <u>his</u>	Idem
	27 <u>trp, his</u>	W. Colli ^e
	F1 Tipo selvagem	F.Alterthum ^f
	W23 Idem	S. Greer ^g

Continua

Continuação da Tabela 2

Amostras		Características	Origem
<u>B. megatherium</u>	F	Tipo selvagem	F. Alterthum
	F1	Idem	Idem
	F2	Idem	Idem
	1A	Idem	Este laboratório
<u>B. cereus</u>	F91	Tipo selvagem	F. Alterthum
	1	Idem	Este laboratório
	2	Idem	Idem
	3	Idem	Idem
<u>S. aureus</u>	3A6	Tipo selvagem	J. Siqueira Jr. ^h
	3A10	Idem	Idem
	3A45	Idem	Idem
	13136	Idem	R.W. Lacey ⁱ
	196E	Idem	J.N. Baldwin ^j
	PC1	Idem	Idem
	4	Idem	N.P. Souza ^k

E.coli= Escherichia coli; Ps.aeruginosa= Pseudomonas aeruginosa;
B.subtilis= Bacillus subtilis; B.megatherium= Bacillus megatherium;
B.cereus= Bacillus cereus; S.aureus= Staphylococcus aureus.

- a. RP4, um plasmídeo que carrega genes para resistência à canamicina, tetraciclina e ampicilina (DATTA et al, 1971);
- b. Departamento de Microbiologia e Imunologia da Escola Paulista de Medicina;
- c. Laboratório de Bacteriologia do Instituto Adolfo Lutz - SP;
- d. Instituto Gulbenkian de Ciências, Portugal;
- e. Instituto de Química, Universidade de São Paulo;
- f. Instituto de Química, Universidade de São Paulo;
- g. Universidade de Miami, U.S.A.;
- h. Departamento de Genética da Escola Superior de Agronomia "Luiz de Queiroz";

i. King's Lynn General Hospital, Norfolk, Inglaterra;

j. Universidade de Georgia, U.S.A.;

k. Laboratório da Santa Casa de Curitiba, Pr.

O significado das abreviaturas acham-se em "Abreviaturas e Símbolos"

1.2 Amostras de vírus

Os vírus utilizados foram obtidos a partir da indução de 60 amostras bacterianas da série L (Tabela 1) e a sua relação acha-se na Tabela 28.

2. MEIOS DE CULTURA, DROGAS E SOLUÇÕES-TAMPÃO

O meio de cultura e componentes isolados que aparecem sob forma desidratada, são da marca Difco. As substâncias inorgânicas foram todas de boa procedência, tratando-se de reagentes pró-análise.

A composição dos meios de cultura é expressa em gramas por litro de água destilada.

NA - Ágar nutritivo:

Extrato de carne, 3g; peptona, 5g; ágar, 15g.

NB - Mesma composição do NA, com exclusão do ágar.

NG - Meio nutritivo "Bacto-Blood Agar Base":

Infusão de ceração, 500g; triptose, 10g; cloreto de sódio, 5g; ágar, 15g, adicionado de gelatina 7,5 g, acrescentado de mais 10g de ágar.

IAL - Meio de Rugai, lisina e motilidade. Fase inferior do meio (PESSOA & SILVA, 1972):

Extrato de levedura, 3g; glicose, 0,5g; nitrato

de potássio, 0,5; L-lisina, 5g; ágar, 4,0g; púrpura de bromocresol, 0,2g; pH 6,4. Interfase: mistura de vaselina líquida-carnaúba, 90 ml/10g. Fa_se superior, base: triptona, 10g; extrato de carne, 2g; cloreto de sódio, 5g; fosfato dissódico, 2g; L-triptofano, 1g; solução alcoólica de azul de bromotimol a 1,5%, 2 ml; ágar, 11 g; pH 7,4. Solução de indicador e substratos: citrato de ferro amoniacal, 2g; tiossulfato de sódio, 2 g; sacarose, 80g; glicose, 10g; uréia, 40g; água destilada, 85 ml. Para o preparo final do meio, juntar 14 ml da solução indicadora e substratos em 800 ml da base. Reativo de indol (*p*-dimetilaminobenzaldeído, 1g; ácido ortofosfórico, 20g; álcool, 50 ml; água destilada, 100 ml) aplicado no tampão de algodão hidrófilo.

ML - Meio com leite. Meio NA com dupla concentração, esterilizado, 500 ml; solução de leite desnatado em pó a 2%, 500 ml.

MU - Meio com uréia, modificado de COOK (1976): Peptona, 1g; cloreto de sódio, 5g; fosfato monopotássico, 0,8g; fosfato dissódico, 1,2g; solução de vermelho de fenol, 0,2%, 6 ml; ágar, 20g; pH 6,8. Preparar solução de uréia a 40%, à parte.

MS - Meio para determinação da produção de sulfeto de hidrogênio:

Triptona, 10g; extrato de carne, 2g; cloreto de sódio, 5g; glicose, 1g; ágar, 20g; solução indicadora (citrato de ferro amoniacial, 2g; tiossulfato de sódio, 2g; água destilada, 85 ml). Depois de autoclavados (120°C por 20 min) o meio e a solução indicadora, juntar, sob condições estéreis, 30 ml da solução indicadora em 1000ml do meio. Preparar placas com 30 ml de meio.

HTA - Meio de Hershey ("H-top agar") (HERSHEY, KALMANSON & BRONFENBRENNER, 1944):

Triptona, 13g; cloreto de sódio, 8g; cloreto de cálcio para dar concentração final 10^{-2}M ; ágar 7g; pH 7,0.

LB - Meio de Luria (MILLER, 1972):

Triptona, 10g; extrato de levedura, 5g; cloreto de sódio, 10g. O pH é ajustado para 7,2. O meio sólido recebe 15-20g de ágar. Cada placa recebe cerca de 30 ml de meio e é submetida em estufa a 37°C para secagem relativa da superfície do meio.

MT - Meio contendo triptofano e citrato de ferro amoniacal (PESSOA & GELLI, 1972):

Peptona 20g; lactose, 10g; cloreto de sódio 5g; L-triptofano, 4g; citrato de ferro amoniacal, 2g; cristal violeta, 0,001g; vermelho neutro, 0,03g; sais biliares, 1,5g; ágar, 1,5g; pH 7,0.

TSB - "Tryptic Soy Broth":

Triptona, 15g; soytone, 5g; cloreto de sódio, 15 g; ágar, 15g.

MSD - Meio de composição semi-definida:

Sulfato de magnésio ($7\text{H}_2\text{O}$), 100 mg; citrato de sódio ($2\text{H}_2\text{O}$), 470 mg; sulfato de amônio, 1 g; Tris/HCl, 0,2M; pH 7,4; extrato de levedura, 5g; ácido nicotínico, 7,5 mg.

MH - Meio de Müller-Hinton:

Infusão de carne, 300g; hidrolisado de caseína, 17,5g; amido, 1,5g; ágar, 17g.

MM - Meio mínimo (DAVIS & MINGIOLI, 1950):

Fosfato bi-básico de potássio, 7g; fosfato mono-básico de potássio, 3g; sulfato de magnésio ($7\text{H}_2\text{O}$) 0,1g; citrato de sódio, 0,5g; sulfato de amônio, 1 g; pH final 7,0. Esta mistura é autoclavada a 120°C por 20 minutos e estocada em volumes de

100 ml. Para o uso, adicionar 1 ml de uma solução de glicose 40%, 1 ml de uma solução de sulfato de magnésio ($7\text{H}_2\text{O}$) 10% e 0,1 ml de uma solução de ácido nicotínico 7,5 mg/ml. Para o cultivo de amostras auxotróficas, adicionar aminoácidos numa concentração final de 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Para a tiamina, a concentração final usada foi de 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$.

BHI - Infusão de coração e cérebro:

Infusão de cérebro, 200g; infusão de coração, 250 g; proteose peptona, 10g; glicose, 2g; cloreto de sódio, 5g; fosfato dissódico, 2,5g.

2.1 Drogas

As principais drogas utilizadas tiveram as seguintes procedências: a) Sigma Chemical Co.: ficoll, urease, aminoácidos, N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina, brometo de etídeo, acriflavina, dodecil-sulfato de sódio, cloridrato de guanidina, mitomicina C, ácido nicotínico, tiamina, sulfanilamina-azocaseína; b) E. Merck: desoxicolato de sódio, bicloreto de mercúrio; c) Seakem-MCI-Biomedical: agarose; d) Hortington Laboratories: RNase, lisozima; e) Wintrop Products Inc.: ácido nalidíxico; f) Park Davis Ltda: cloranfenicol; g) Fontoura-Wyeth Ind. Farmacêuticas S/A: sulfato de

estreptomicina; h) Laborterápica Bristol S/A: sulfato de ca
namicina, ampicilina; i) Pfizer Inc.: tetraciclina; j) Lab.
Lepetit: rifampicina.

2.2 Soluções-tampão

-Solução salina tamponada:

Solução A:

KH_2PO_4 , 9,78g; água destilada, 1000 ml.

Solução B

Na_2HPO_4 , 17,86 g; água destilada 1000ml.

Para preparo do tampão, misturar 10 ml da solução A, 40 ml da solução B e acrescentar NaCl, 8,5 g, e água des-tilada para 1000 ml; pH 7,4.

Tampão DM:

Meio mínimo descrito no ítem 2, sem glicose e ácido nicotínico.

Tampão TEB:

Tris OH 89 mM; Na_2EDTA , 2,5 mM; H_3BO_3 , 89 mM; pH 8,2.

Tampão Tris-acetato:

Tris-acetato, pH 8,3, 0,16 M; acetato de sódio, 0,08M; Na_2EDTA , 0,008M.

Tampão Tris-maléico:

Meio mínimo, no qual os fosfatos foram substi-tuídos por tris e ácido maléico, cada um numa concentração fi-nal de M/20. O pH foi ajustado com NaOH para 6,0.

3. DETECÇÃO DE LINHAGENS EXCRETORAS DE PROTEASE

3.1 Técnica da digestão da película de gelatina de tiras de chapas radiográficas (Le MINOR & PIÉCHAUD, 1963)

Esta técnica foi descrita, inicialmente, para demonstrar a proteólise da camada de gelatina contendo sulfato de prata de filme fotográfico, após a exposição à luz e revelado. A utilização de tiras de chapa radiográfica revelada, substitui aqui o método original.

Tira de chapa radiográfica, medindo aproximadamente 5 mm x 50 mm, é colocada no interior do tubo de cultura, crescida por uma noite em NB a 37°C. Incubar em banho a 37°C e observar a hidrólise da película de gelatina cada 2 horas. Um cultivo de E. coli (não proteolítica) acompanha o experimento como controle. Após toda gelatina ser digerida, a porção da tira radiográfica, em contato com a cultura, mostra-se transparente, em contraste com a porção superior livre, enegrecida.

3.2 Hidrólise da gelatina contida em meio de cultura sólido (NG), método modificado de FRAZIER (1926)

Consiste em semear a bactéria crescida por uma noite em NB a 37°C, pelo sistema de estria ou de colônias isoladas, em placa contendo meio NG. Após incubação por uma noite, a presença de linhagem P⁺ é "revelada", cobrindo-se a superfície do meio com uma solução saturada a quente, de sulfato de amônio granulado (May & Baker Ltd. Dagenham) por 15-30 minutos. Estria ou colônias cercadas por halo transparente evidenciam atividade da enzima sobre a gelatina do meio (Figura 1). Placas contendo meio NG se prestam para este teste, mesmo quando adicionadas de antibióticos, tais como estreptomicina, ácido nalidíxico, tetraciclina, canamicina e rifampicina (Figura 2).

3.3 Hidrólise da caseína, utilizando meio adicionado de leite (ML) (AMARAL *et al.*, 1967)

Bactérias crescidas por uma noite a 37°C em NB são semeadas em placas contendo ágar mais 1 a 2% de leite desengordurado, previamente esterilizado por tindalização. Um volume de NA com dupla concentração de ágar pode também ser misturado com um volume de leite em pó desengordurado, dissolvido em água (2%), segundo HOFSTEN & TJE-

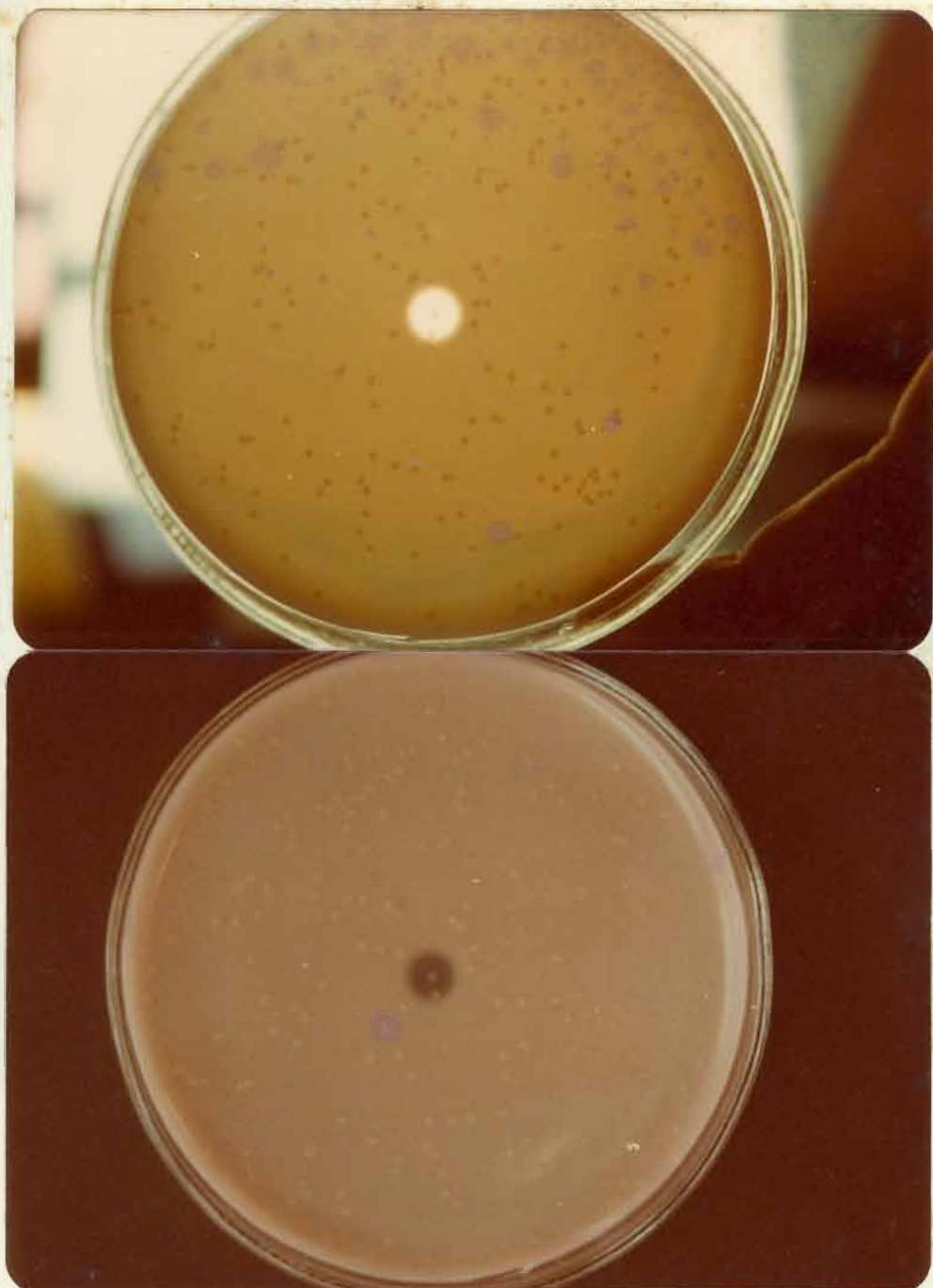


FIGURA 1. Colônias P⁻ e uma P⁺ (no centro da placa) de *Proteus mirabilis*, cultivadas em meio NG por 24 horas a 37°C e "reveladas" pela técnica da hidrólise da gelatina, segundo método modificado de FRAZIER (1926). (MATERIAL E MÉTODOS, item 3.2).

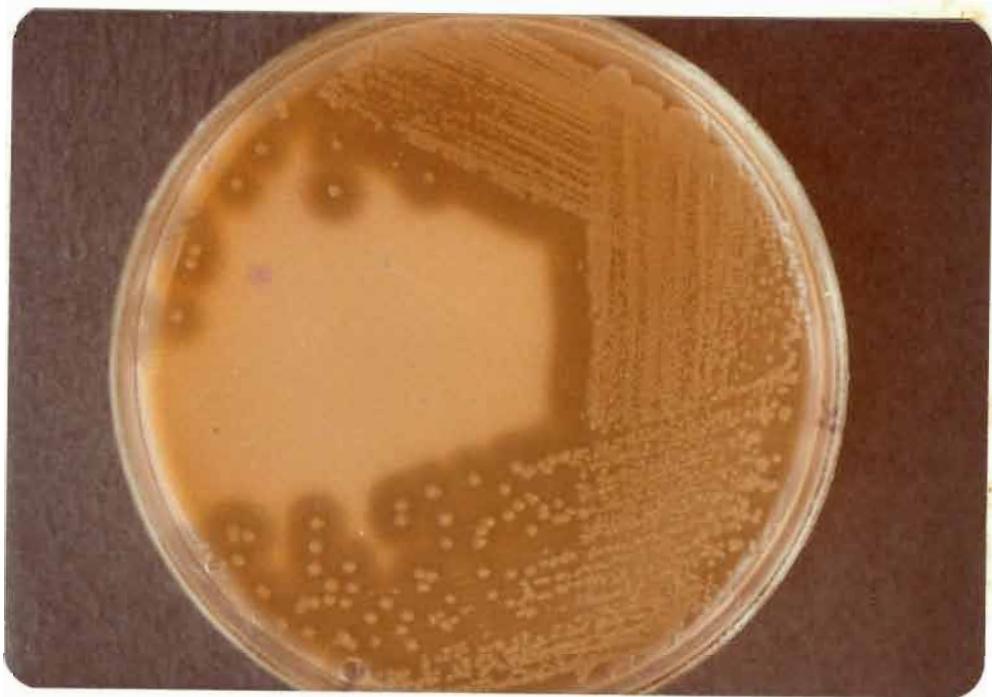


FIGURA 2. Colônias P⁺ resistentes à rifampicina, cultivadas em meio NG adicionado de 100 µg/ml de rifampicina e "reve-ladas" pela técnica da hidrólise da gelatina pela ação de solução saturada de sulfato de amônio (MATERIAL E MÉTODOS, ítem 3.2).

DER (1965). Estrias ou colônias cercadas por halo de transparência evidenciam atividade proteolítica da bactéria.

3.4 Dosagem da atividade proteolítica extra-celular

Aliquotas de 1,5 ml de linhagens bacterianas crescidas em caldo nutritivo (BHI), após incubação a 37°C por uma noite, serviram de inóculo em 100 ml de meio de cultura de composição semi-definida (MSD). Esse sistema foi incubado a 37°C com agitação reciprocante (100 por minuto) por 9 horas. Após centrifugação (5000 rpm/10 minutos) o sobrenadante foi coletado (BONATO, 1978).

Para a determinação da atividade proteolítica foi utilizado, como substrato, sulfanilamina-azocaseína (CHARNEY & TOMARELLI, 1947).

A mistura de reação era constituída de 0,5 ml de azocaseína (solução de 48 mg/ml em tampão glicina-NaOH, 0,5M, pH 9,0); 15 ml de tampão glicina-NaOH, 0,5M, pH 9,0; 1,0 ml do sobrenadante da cultura em MSD. Após incubação a 38°C, a reação foi interrompida pela adição de 0,3 ml de TCA 50% e o sistema foi mantido à temperatura de 0°C por 15 minutos, após o que, foi submetido à filtração em papel Whatmann nº 1. Após neutralização do filtrado pela adição de 0,25 ml da NaOH 10 N e aguardar por 10 minutos, foi

feita a leitura da densidade óptica (440 nm) em espectrofotômetro Coleman Junior II (mod. 6/20).

Para cada amostra foi feito um branco constituído pelo próprio sobrenadante utilizado na reação, porém a enzima e o TCA foram colocados, ao mesmo tempo, em contato com o substrato para impedir qualquer atividade enzimática.

Os dados apresentados representam a média aritmética de três amostras.

Os resultados da atividade proteolítica extracelular foram expressados em unidades de protease por mililitro, por mg de proteína. A unidade de protease foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para digerir 500 µg de azocaseína a 38°C em 30 minutos.

A proteína foi determinada pelo método de LOWRY et al (1951).

4. OCORRÊNCIA DE COLÔNIAS P⁻ EM AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis* PROCEDENTE DE MATERIAL CLÍNICO

Cada linhagem foi cultivada em NB por uma noite a 37°C e, após isso, a cultura foi diluída convenientemente em solução salina 0,15M, e alíquotas de 0,1ml foram espalhadas na superfície de várias placas contendo meio

NG, preparadas na véspera e mantidas a 37°C (o meio de cultura deve estar relativamente seco para dificultar a formação do crescimento em forma de bafo e, consequentemente, a confluência de colônias). Após incubação por uma noite a 37°C, foi feito o teste revelador com solução saturada de sulfato de amônio. Tão logo os halos tornaram-se nítidos, rejeitou-se a solução de sulfato de amônio deixando-a escorrer bem, pela inclinação prolongada da placa sobre papel absorvente e procedeu-se à contagem diferencial de colônias P⁺ e P⁻ (ítem 3.2).

De cada linhagem que apresentava população mista, colônias P⁻ foram isoladas pela técnica do plaqueamento por replicação (LEDERBERG & LEDERBERG, 1952), seguida pelo teste da hidrólise de gelatina. Para tal propósito, foi empregado, em algumas oportunidades, o meio ML, que permite observação direta da hidrólise da gelatina. Eventualmente, um número variável de colônias P⁻ de cada linhagem era testado em meio IAL, para descartar possíveis contaminantes.

5. OCORRÊNCIA DE COLÔNIAS P⁻ EM OUTRAS BACTERIAS PROTEOLITICAS

Procedeu-se ao exame de 14 linhagens de Pseudomonas aeruginosa, 7 de Bacillus subtilis, 3 de Bacillus megaterium, 5 de Bacillus cereus, e 7 de Staphylococcus aureus, utilizando a mesma técnica empregada no ítem anterior.

6. PRODUÇÃO DE SULFETO DE HIDROGÊNIO POR COLÔNIAS DE *Proteus mirabilis*

O objetivo principal deste ítem e do seguinte é de investigar a ocorrência de instabilidade paralela entre a população de protease e a de outros caracteres bioquímicos. Alguns detalhes devem ser observados em relação à técnica empregada na detecção de colônias produtoras de H₂S. O meio deve ser de preparo recente, conforme já especificado no ítem 2, distribuído em placas num volume aproximado de 30 ml (placas quase cheias de meio) e mantido em estufa a 37°C para tornar-se relativamente seco. Outro aspecto a ser observado é quanto ao número de colônias desenvolvidas por placa. Não mais de 50 colônias por placa, bem distribuídas, a fim de evitar falsas reações negativas.

7. SÍNTSE DE UREASE POR COLÔNIAS DE *Proteus mirabilis*

A cultura a ser investigada é rejuvenescida por cultivo em NB por 18 horas a 37°C e, a seguir, diluída convenientemente para fornecer 50-70 colônias, quando semeada em meio NA. Após incubação a 37°C por 18-24 horas, transferem-se as colônias desenvolvidas, através da técnica do plaqueamento por réplica de LEDERBERG & LEDERBERG (1952), para o meio MU e aguarda-se o crescimento das colônias em estufa a 37°C, o que ocorre em 6-8 horas. A seguir, cobre-se a superfície do meio de cada placa com papel de filtro que tenha sido previamente embebido com solução de uréia a 40% e secado em estufa a 37°C. A leitura é feita em seguida, pela viragem do indicador, revelada pelo aparecimento da cor vermelha, impressa no papel de filtro.

8. OCORRÊNCIA DE CÉLULAS P⁻ EM COLÔNIAS P⁺ DE *Proteus mirabilis* RECENTEMENTE ISOLADAS

Para se verificar esse fato foram escolhidas duas linhagens (N-17 e N-17-1) que normalmente apresentam alta frequência de células P⁻, e outras duas constituídas quase que exclusivamente por células P⁺ (N-17-12). De cada linhagem, 10 colônias P⁺ foram semeadas individualmente em tubos contendo 5 ml de NB, e incubadas por 12-

18 horas a 37°C. Após isso, procedeu-se às diluições e inoculos em placas contendo meio NG, permitindo crescimento a 37°C por 18-20 horas. A contagem diferencial de células P⁺ e P⁻ foi feita com o auxílio do teste revelador que utiliza solução saturada de sulfato de amônio.

9. INFLUÊNCIA DA PERMANÊNCIA PROLONGADA DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* EM MEIO NUTRITIVO LÍQUIDO, NA OCORRÊNCIA DE CÉLULAS P⁻

Tubos dotados de tampa de rosquear, contendo 5,0 ml de meio nutritivo líquido (NB), foram semeados com linhagens de *P. mirabilis* e as frequências de colônias P⁻ foram determinadas. A seguir, esses tubos de cultura foram mantidos em temperatura de 37°C por 21 dias. Semanalmente determinou-se a frequência de células P⁻ pela técnica da precipitação da gelatina pela solução saturada de sulfato de amônio.

10. INFLUÊNCIA DA ESTOCAGEM PROLONGADA DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* EM MEIO NUTRITIVO SÓLIDO INCLINADO NA OCORRÊNCIA DE CÉLULAS P⁻

Linhagens de *P. mirabilis* foram estocadas em tubos com tampas de rosquear contendo ágar nutritivo inclinado (NA), em temperatura do ambiente do laboratório.

e ao abrigo da luz solar direta. A frequência de colônias P⁻ foi determinada no tempo zero, isto é, no momento do inóculo inicial e em quatro oportunidades, durante a permanência da cultura em estoque, pela técnica da precipitação de proteína pela solução saturada de sulfato de amônio.

11. OCORRÊNCIA DE CÉLULAS P⁻ EM COLÔNIAS P⁺ DE AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis* ESTÁVEIS E INSTÁVEIS MANTIDAS EM ESTOQUE POR TEMPO PROLONGADO

Foram utilizadas linhagens que se comportaram aparentemente como estáveis, isto é, apresentando muito pouca ou nenhuma célula P⁻ em sua população (veja na Tabela 3 as amostras L-22 e L-70) e linhagens que apresentaram um número grande de células P⁻, portanto consideradas instáveis em relação ao caráter P⁺ (L-79 e N-17). Dez ou mais colônias P⁺ de cada linhagem acima referida, foram inoculadas em frascos do tipo penicilina, contendo NA, pela técnica da picada, e incubadas a 37°C por uma noite. Essas culturas foram então mantidas em temperatura ambiente por 6 a 12 meses, quando foram testadas para a presença de células P⁻, conforme descrito no ítem 4.

12. EFEITO DE SUBCULTIVOS REPETIDOS EM MEIO NUTRITIVO
LÍQUIDO, NA OCORRÊNCIA DE COLÔNIAS P⁻ EM LINHA-
GENS DE *Proteus mirabilis*

Tubos contendo 2,0 ml de caldo nutritivo (NB) serviram para os cultivos sucessivos das diversas linhagens. Após a incubação das culturas por uma noite a 37°C foi determinado o número de colônias P⁻ (tempo zero). Diariamente foram realizados subcultivos, através da transferência do conteúdo da cultura, transportada através de uma alça de platina para o meio nutritivo novo. Esta cultura era novamente incubada a 37°C por mais 24 horas, mano bra esta que se repetiu por 150 dias consecutivos. As contagens das colônias produtoras ou não de protease, foram feitas com auxílio da técnica da precipitação da gelatina pela solução saturada de sulfato de amônio.

13. EFEITO DA GELATINA NO MEIO DE CULTURA, NA OCORRÊNCIA
DE CÉLULAS P⁻ EM AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis*

Diferentes amostras de P.mirabilis foram transferidas do estoque para 2,0 ml de caldo nutritivo (NB) e para 2,0 ml de caldo nutritivo adicionado de gelatina (Difco) na concentração de 0,5% e incubadas a 37°C por uma noite. Determinou-se o número de células P⁻ em cada amostra nos diferentes meios de cultura (tempo zero) e,

então, diariamente, foram realizados subcultivos, conforme descrito no item anterior. Isso se repetiu por 50 dias consecutivos. As contagens das colônias produtoras ou não de protease foram feitas através da técnica de precipitação da proteína do meio nutritivo (NG), pela ação da solução saturada de sulfato de amônio.

14. CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE *Proteus mirabilis* P^+ e P^- EM CALDO NUTRITIVO (NB)

Culturas das diversas linhagens, desenvolvidas em NB glicosado (0,2%) até atingir a metade da fase logarítmica, foram inoculadas em 50 ml de NB glicosado contidos em frascos de Moore (MOORE, 1965) para conferir D.O. _{540nm} (Coleman Jr. mod. 6A 20) correspondente a aproximadamente $5,0 \times 10^5$ células por ml. Após a retirada de aliquotas para a determinação da viabilidade no tempo zero hora, incubaram-se os dois sistemas a 37°C com 160 agitações reciprocas (New Brunswick) e amostras foram retiradas a cada duas horas, durante 10 horas de crescimento. Cada amostra foi diluída segundo a densidade do cultivo daquele momento, semeada em placas contendo meio NG, seguindo-se incubação a 37°C por 18-24 horas e subsequente contagem diferencial de células P^+ e P^- pelo método da precipitação de proteínas do meio de cultura pela solução saturada de sulfato de amônio.

O tempo de geração foi calculado segundo WINKLER, RUGER & WACKERNAGEL (1976), considerando B a população total, b o número de bactérias com que se iniciou o crescimento (presente no inóculo) e n o número de gerações (o crescimento bacteriano é função exponencial de 2). Aplicando logarítmos, teremos $\log B = \log b + n \log 2$. Para determinar o número de gerações deste inóculo (b) resolve-se a equação para n:

$$n = \frac{\log B - \log b}{\log 2}.$$

O tempo de geração G numa cultura em fase logarítmica de crescimento é assim determinada: $G = \frac{t}{n}$ onde t é o tempo de incubação e n o número de gerações.

15. CURVA DE CRESCIMENTO DE CÉLULAS DE *Proteus mirabilis* P^+ e P^- EM CALDO NUTRITIVO ADICIONADO DE GELATINA (NBG)

O procedimento foi semelhante ao descrito no ítem anterior, exceto que o caldo nutritivo (NB) foi substituído por NBG glicosado (gelatina, 0,5% e glicose 0,2%).

16. INFLUÊNCIA DE CÉLULAS P⁺ E P⁻ DE *Proteus mirabilis*
NA SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS

Linhagens P⁺ e P⁻, derivadas de P. mirabilis L-68 m, foram cultivadas em NA inclinado por 15 horas a 37°C. Esse crescimento bacteriano foi suspenso em solução salina tamponada, pH 7,4, lavado, ressuspenso no mesmo tampão e mantido no refrigerador, enquanto se procedia a determinação do número de células viáveis dos vários inóculos a serem utilizados. No dia seguinte, após a inoculação, determinou-se mais uma vez a contagem de células viáveis da suspensão, a fim de se observar qualquer alteração na viabilidade das células.

Para cada dose foram utilizados 20 camundongos, de peso variável entre 18 e 22 g, os quais foram inoculados com 0,2 ml da suspensão, por via intraperitoneal.

Os camundongos foram mantidos em caixas apropriadas e separadas e observados durante 14 dias, anotando-se diariamente o número de mortes.

Como controle, foram injetados lotes de animais com solução salina tamponada e lotes com suspensão bacteriana morta pelo calor (banho a 100°C por 2 horas).

17. DETERMINAÇÃO DA DL₅₀

A dose letal 50% foi calculada segundo Reed & Muench (MUSHEL & TREFFERS, 1956).

18. INFLUÊNCIA DE PLASMÍDEO R, DE RESISTÊNCIA MÚLTIPLA TRANSFERÍVEL, NA EXCREÇÃO DE PROTEASE EM AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis*

Foi verificada a atividade proteolítica de linhagem portadora de plasmídeo R (L- 68-79) e excretora de protease, assim como de linhagem não-portadora de fator R, igualmente proteolítica. Ambas as linhagens derivaram da mesma amostra, L-68 m. Utilizou-se, como controle, outra linhagem derivada também de L-68 m, mas que não mais possuia a capacidade de excretar a enzima (L-68-81). A determinação da atividade proteolítica foi feita de acordo com a técnica de CHARNEY & TOMARELLI (1947), descrita no ítem 3.4.

19. SENSIBILIDADE AO DESOXICOLATO DE SÓDIO (DS) DE LINHA GEM PROTEOLÍTICA DE *Proteus mirabilis* ABRIGANDO PLAS MÍDEO R

As várias amostras foram primeiramente cultivadas em NB por uma noite a 37°C, e, depois, semeadas em MM líquido para dar aproximadamente 10⁵ células por

ml. Após serem submetidas à incubação a 37°C com 160 agitações reciprocantes por minuto, por 24-30 horas, as culturas foram diluídas convenientemente em tampão DM e aliquotas de 0,1 ml foram espalhadas em placas contendo MM sólido, adicionado com diferentes concentrações de DS. Após incubação por aproximadamente 72 horas a 37°C, procedeu-se à contagem de colônias, a fim de se conhecer o número de sobreviventes por ml em cada concentração da droga.

20. TESTE DE REVERSÃO DE LINHAGENS P⁻

No decorrer dos trabalhos, colônias P⁻ foram isoladas da população de células P⁺ de várias linhagens de P. mirabilis e estocadas em NA pelo sistema de picada. Para se investigar a reversibilidade dessas linhagens, partiu-se primeiramente de colônias P⁻ isoladas em placas contendo NA. A seguir, de cada colônia P⁻ foi feita uma cultura em NB, inoculando-se, para tal, um pequeno número de células (aproximadamente 10 células por ml). Após incubação a 37°C por uma noite, cada cultura foi diluída convenientemente e aliquotas de 0,1 ml foram espalhadas na superfície de placas contendo meio NG. Após incubação a 37°C por 12-18 horas, foi feito o teste revelador com sulfato de amônio saturado e o número de colônias e o seu tipo de comportamento em relação à hidrólise da gelatina foram registrados.

21. TESTE DE REVERSIBILIDADE DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* P⁻, UTILIZANDO O AGENTE MUTAGÊNICO NITROSOGUANIDINA(NTG)

Linhagens de P. mirabilis cultivadas isoladamente em 2,0 ml de NB, por uma noite a 37°C, foram rejuvenescidas através de diluição 1/100 em 70,0 ml de NB e incubadas a 37°C com 160 agitações reciprocas por minuto, até atingir aproximadamente 10^9 células por ml.

Essas culturas foram então centrifugadas a 4000 g e suspensas em meio volume de tampão tris-maléico (ADELBERG, MANDEL & CHEN, 1965). Dessas suspensões foram retiradas amostras de 5 ml e distribuídas em tubos contendo iguais volumes de NTG (100 µg/ml), e esses sistemas foram incubados em banho a 37°C, por tempo variável até 50 minutos.

Uma outra alternativa desta técnica foi também usada, na qual tampão acetato 0,1 M, pH 5,0, substituiu a solução salina (INOUYE, 1969), conservando-se contudo a mesma concentração de NTG acima mencionada.

Após o tratamento pelo NTG, a sua remoção foi feita através de duas lavagens com solução salina e, em cada tubo, foi restaurado o volume inicial com NB, incubando-se a seguir a 37°C, com agitação de duas horas. De

cada tubo correspondente a um tempo de ação de droga retiraram-se aliquotas que, após diluição conveniente, foram semeadas em placas contendo meio NG. Também retiraram-se 5 amostras de cada tubo, que foram semeadas em estrias contendo aproximadamente um centésimo do número de células de cada tubo. Ambos os tipos de semeadura foram submetidas ao cultivo por 24 horas a 37°C. O teste de diferenciação entre colônias P⁺ e P⁻ foi feito através da ação da solução saturada de sulfato de amônio sobre a superfície do meio contendo o crescimento bacteriano.

22. TESTE DE REVERSIBILIDADE DE LINHAGENS DE *Proteus m-* *rabilis* P⁻ PELA AÇÃO DA LUZ ULTRAVIOLETA

Foi utilizada uma lâmpada U.V. germicida Westinghouse de 15 watts, que emite radiação predominantemente a 2.537 Å. O débito da irradiação (taxa de dose) ao nível da cultura foi de 10 ergs/mm²-s, medido com um dosímetro de Latarjet (LATARJET, MORENNE & BERGER, 1953). As linhagens P⁻ a serem estudadas foram crescidas até aproximadamente $5,0 \times 10^8$ células/ml em meio NB a 37°C, com agitação reciprocaante (160 p/min). A seguir, foram centrifugadas a 4000g por 10 minutos e ressuspensas em sulfato de magnésio 0,1M na metade do volume inicial. A irradiação foi feita sobre 10 ml da suspensão contida em placa de Petri aberta, com

agitação continua, a uma dose 500 ergs/mm², onde se esperava, segundo curva previamente determinada, sobrevida de 0,01%. A seguir, foram diluídas ao décimo, em meio NB e incubadas com agitação reciprocante por duas horas a 37°C, ao abrigo da luz.

De cada cultura retiraram-se aliquotas que, após diluições convenientes, foram semeadas em placas contendo meio NG. Também retiraram-se 5 amostras de cada cultura irradiada, que foram semeadas em estrias, em meio NG. Ambos os tipos de semeaduras foram submetidas ao cultivo por 24 horas a 37°C. O teste de diferenciação entre colônias P⁺ e P⁻ foi feito através da ação da solução saturada de sulfato de amônio sobre a superfície do meio contendo o cultivo bacteriano.

23. TESTE DE REVERSIBILIDADE DE CÉLULAS P⁻ DE *Proteus mirabilis* "in vivo"

O procedimento referente ao cultivo da linhagem P⁻ (L-68-2-NA-P⁻) e inoculação em camundongo é encontrado no ítem 16. Com a morte do animal, em decorrência da infecção, obtiveram-se culturas a partir do exsudato peritoneal e de material retirado de fígado, baço e rins. Estes materiais eram semeados em placas contendo MT e incubada

dos por 24 horas a 37°C. O crescimento resultante era submetido ao teste de resistência ao ácido nalidíxico (25 µg/ml) e à prova da hidrólise da gelatina, em meio NG, utilizando-se para tal o sistema de réplicas (LEDERBERG & LEDERBERG, 1952).

24. TRATAMENTO PELO BROMETO DE ETÍDEO (EB) DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* INSTÁVEIS E ESTÁVEIS QUANTO À EXCREÇÃO DE PROTEASE

A técnica utilizada foi baseada nos trabalhos de TOMCHICK & MANDEL (1964) e BOUANCHAUD, SCAVIZZI & CHABBERT (1969).

A partir de uma solução-estoque de EB em caldo nutritivo, pH 7,2 ($1,26 \times 10^{-2} M$), foram preparadas duas séries de tubos (13x130 mm) dotados com tampa de rosquear e contendo volume final de 1,0 ml. A diferença de concentração de um tubo para outro foi de 100 µg e as concentrações variaram de $1,26 \times 10^{-3} M$ a $3,78 \times 10^{-3} M$.

Cada tubo recebeu inóculo correspondente a 10^4 células de cultura crescida por 16-18 horas a 37°C, após o que, a série de tubos em duplicata foi incubada a 37°C por 24-30 horas.

Aliquotas representativas de cada concentração foram convenientemente diluídas em solução salina 0,15M,

semeadas e espalhadas em placas contendo meio NG. Após incubação por 12-18 horas procedeu-se à contagem diferencial de colônias P⁺ e P⁻ com auxílio do teste da precipitação da gelatina do meio de cultura com solução de sulfato de amônio saturada. Foram ensaiadas as linhagens instáveis N-17 e N-4 e as estáveis, N-17-11 e N-17-12.

Cerca de 50 colônias P⁻ resultantes do tratamento com a referida droga foram cultivadas em NB por 24 horas a 37°C e reexaminadas, para confirmação do fenótipo, antes de serem estocadas.

24.1 Determinação da atividade do EB sobre o crescimento bacteriano de amostras instáveis e estáveis

A concentração mínima inibitória de EB foi determinada sobre diluições em série do corante em NA e expressada em molaridade (TOMCHICK & MANDEL, 1964).

25. EFEITO DO DODECIL-SULFATO DE SÓDIO (SDS) SOBRE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* INSTÁVEIS E ESTÁVEIS QUANTO À EXCREÇÃO DE PROTEASE

Numa série de tubos em duplicata (13x 130 mm) contendo 1,0 ml de meio NB, pH 7,6, e SDS em concentrações decrescentes, a partir de 75 mg/ml, foram semeados 0,1 ml (10^5 a 10^6 células) de cultura crescida por 12-16 horas a 37°C, após o que, foram incubadas a 37°C por 24 e 48 horas.

Aliquotas representativas de cada concentração foram diluídas adequadamente e semeadas em placas contendo meio NG. Após incubação por 24 horas, procedeu-se à contagem diferencial de colônias P⁺ e P⁻ com auxílio da técnica reveladora que utiliza solução saturada de sulfato de amônio.

Foram utilizadas para o experimento, como representante da linhagem instável, a L-68 e, da estável, a L-68-1-P⁺.

Após o tratamento com a droga, aproximadamente 50 colônias P⁻ foram cultivadas em NB e reexaminadas em meio NG, para confirmação do fenótipo.

26. EFEITO DO DODECIL-SULFATO DE SÓDIO (SDS) NA CONVERSÃO
DE CÉLULAS P⁺ E P⁻ EM *Proteus mirabilis*

O inóculo constou de adição de $6,0 \times 10^8$ células por ml da linhagem de Proteus mirabilis L-68 m, que apresentava cerca de 10^7 células P⁻ por ml, e da adição de $4,0 \times 10^7$ células por ml da linhagem L-68-2-NA-P⁻ em NB adicionado de SDS (0,4%), pH 7,6. Essa mistura de células foi incubada a 37°C com 130 agitações reciprocares por minuto. A cada 3 horas foram retiradas amostras que, após serem diluídas adequadamente, foram semeadas em placas contendo meio com gelatina (NG), e essas placas foram incubadas a 37°C por 18-24 horas. Após esse período de crescimento em estufa, as placas que apresentavam crescimento de colônias bem individualizadas eram "carimbadas" em outro meio NG contendo ácido nalidíxico, na concentração de 25 µg/ml. Após incubação a 37°C por 16-18 horas e revelação das placas matrizes, pela solução saturada de sulfato de amônio, as populações resistentes e sensíveis de células P⁻ (placas mestras e carimbadas em meio contendo a droga) eram registradas.

27. EFEITO DO DODECIL-SULFATO DE SÓDIO (SDS) SOBRE O CRES-CIMENTO DIFERENCIAL DE CÉLULAS P⁺ E P⁻ DE *Proteus mi-rabilis*

A. Curva de crescimento de células P⁺ resistentes ao ácido nalidíxico (L-68-1-NA-P⁺) e de células P⁻ resistentes à rifampicina (L-68-2-R-P⁻).

O inóculo constou de 10^6 células P⁺ e $3,0 \times 10^6$ células P⁻, ambas procedentes de diferentes culturas desenvolvidas em NB por 12 horas a 37°C. A cada duas horas eram retiradas aliquotas que, após serem diluídas, eram semeadas por espalhamento em placas contendo NG adicionado de 100 µg/ml de rifampicina e em placas contendo o mesmo meio adicionado de ácido nalidíxico (25 µg/ml) e incubadas a 37°C por 18-24 horas. A contagem diferencial foi feita também pelo método da precipitação da gelatina do meio de cultura, pela solução saturada de sulfato de amônio.

B. Efeito do SDS sobre células P⁺ e P⁻.

Aproximadamente 10^7 células da linhagem L-68-2-R-P⁻ mais $5,0 \times 10^8$ células da linhagem L-68-1-NA-P⁺, procedentes de culturas desenvolvidas em NB por 12 horas a 37°C, foram incubadas em cada ml de NB adicionado de SDS (0,4%), pH 7,6. Essa mistura de células em NB-SDS foi incubada a 37°C com 130 agitações reciprocares por minuto. A retirada e análise das amostras seguiu a mesma conduta descrita em A.

28. AÇÃO DA RIFAMPICINA NO APARECIMENTO DE CÉLULAS P⁻ EM LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* INSTÁVEIS E ESTÁVEIS QUANTO À EXCREÇÃO DE PROTEASE

Duas séries de 10 tubos contendo cada um 1,0 ml de NB, foram adicionadas de rifampicina (50 e 5 µg/ml) no primeiro tubo de cada série e submetidas a diluições sucessivas e múltiplas de dois. Cada série teve um de seus tubos isento da droga a fim de servir como controle. Inoculou-se ainda, em cada tubo, aproximadamente 10^5 células provenientes de cultura recente (12 horas a 37°C). Assim feito, os tubos foram incubados a 37°C por 24 horas sem agitação. O conteúdo de cada tubo, correspondente a diferentes concentrações da droga e controle sem a droga, foram semeados em placas contendo NG e incubadas por uma noite a 37°C. A diferenciação entre células P⁺ e P⁻ foi feita com o auxílio da solução saturada de sulfato de amônio.

29. TRATAMENTO DE LINHAGENS ESTÁVEIS E INSTÁVEIS QUANTO À EXCREÇÃO DA PROTEASE DE *Proteus mirabilis* PELA MITOMICINA C (MC)

Culturas de linhagens estáveis e instáveis, desenvolvidas por uma noite a 37°C, foram diluídas 100 vezes em meio LB (30 ml) e submetidas a agitação (160 por minuto) até atingir $1,2 \times 10^8$ células por ml (aproximadamente 5 horas). O inóculo foi preparado diluindo essa cultura, de

modo a conter cerca de 10^3 células em 0,1 ml. Esse inóculo foi adicionado em tubos contendo MC nas concentrações compreendidas entre 0,5 a 2,0 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Esse sistema foi então incubado por 48 horas e submetido a contagem diferencial de células P^+ e P^- pela técnica do sulfato de amônio.

30. AÇÃO DA ACRIFLAVINA (AF) NO APARECIMENTO DE CÉLULAS P^- EM LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* ESTÁVEIS E INSTÁVEIS QUANTO À EXCREÇÃO DE PROTEASE

Tubos contendo concentrações decrescentes de AF a partir de 5 até 0,039 mg/ml em NB (volume final 1,0 ml) foram inoculados com aproximadamente 10^7 células de cultura desenvolvida por uma noite a 37°C. Após incubação por 24-48 horas a 37°C e sem agitação, aliquotas de cada tubo foram examinadas para viabilidade e diferenciação de células P^+ e P^- que foi feita em meio NG pela técnica da solução de sulfato de amônio saturada.

31. TRATAMENTO PELO CLORIDRATO DE GUANIDINA (GuHCl) DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis* ESTÁVEIS E INSTÁVEIS EM RELAÇÃO À EXCREÇÃO DE PROTEASE

Diferentes concentrações de GuHCl em NB (volume final 1,0 ml) foram inoculadas com aproximadamente 10^7 células de cultura desenvolvida por uma noite a 37°C.

Após incubação por 24-48 horas a 37°C, sem agitação, alíquotas de cada tubo foram examinadas para viabilidade e diferenciação de células P⁺ e P⁻.

32. TRATAMENTO PELA ELEVAÇÃO DA TEMPERATURA DE CULTIVO DE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis*

Culturas desenvolvidas por uma noite a 37°C serviram de inóculo para 30 ml de NB (10^6 células por ml). Cada amostra foi incubada em diferentes temperaturas (37, 40, 42 e 44°C) em banho dotado de agitação reciprocante (100 por minuto, por 24 horas). Aliquotas foram retiradas, diluídas e semeadas por espalhamento em placas contendo NG e incubadas por 18-24 horas a 37°C. O teste diferencial entre células P⁺ e P⁻ foi feito com o emprego da solução saturada de sulfato de amônio.

33. MÉTODO DO AUXONOGRAAMA

A técnica foi baseada em PONTECORVO (1949). Balões (125 ml) contendo 60 ml de MM sólido, fundido pelo calor e mantido em banho a 45°C, recebeu 1 ml da suspensão bacteriana (10^8 células) previamente lavada duas vezes em tam-pão DM. Após misturar bem o conteúdo do balão, o meio foi distribuído em 4 placas que, após a solidificação do mesmo, permaneceram abertas em posição invertida por 30 minutos em

estufa a 37°C a fim de terem as superfícies secas. Cada placa recebeu, por sobreposição, 5,0 ml de solução de ágar (2%) previamente fundida por aquecimento, arrefecida a 45°C e submetida de maneira semelhante à secagem em estufa. Os compostos a serem testados foram aplicados na superfície dos meios sob forma de cristais, em pequenas quantidades, bem espaçados uns dos outros (não mais do que 5 compostos por placa) e devidamente identificados. Resultados foram registrados após 24-48 horas de incubação a 37°C.

34. INDUÇÃO DE PROFAGOS

No decorrer dos experimentos de indução de células lisogênicas para liberação de profagos, vários métodos foram utilizados:

34.1 Permanência de cultivos por período de tempo prolongado (COETZEE & SACKS, 1959).

Tubos dotados com tampas de rosquear contendo 10 ml de meio NB foram inoculados com diversas culturas do estoque e incubados a 37°C por 10 dias.

34.2 Cultivo sob alta temperatura

Foram utilizados frascos de Erlenmeyer (250 ml) contendo 20 ml de meio NB que receberam 0,2ml de inóculo de culturas com crescimento recente (aproximadamente

5 horas a 37°C com agitação) os quais foram, a seguir, incubados a 44°C com agitação por 8 a 12 horas.

34.3 Ação da luz ultravioleta

Foi utilizada uma lâmpada germicida (Westinghouse, 15 watts) que emite radiação predominantemente a 2537 Å, a uma distância de 35 cm da cultura. A taxa de dose ou débito da irradiação, ao nível da cultura, foi de 10 ergs/mm²-s. Após o crescimento bacteriano atingir aproximadamente $5,0 \times 10^8$ células/ml, em 20 ml de meio LB a 37°C com agitação, as culturas foram centrifugadas a 4000 g por 10 minutos e ressuspensas em solução de sulfato de magnésio 0,1M na metade do volume inicial. A irradiação foi feita em placas de Petri, com agitação contínua e uma dose de 350 ergs/mm². Após isso, foram diluídas 1:10 em meio LB e incubadas com agitação por 2 horas a 37°C, ao abrigo da luz.

Um outro método (VIEU & DUCREST, 1961) também foi usado, constando da irradiação sob as mesmas condições de dose, de 10 ml de cultura contendo aproximadamente $5,0 \times 10^8$ cels/ml. Essa cultura, após ser irradiada, foi submetida a crescimento com agitação a 37°C, durante 2 horas.

34.4 Ação da mitomicina C

O tratamento das células bacterianas pela MC foi baseado em LACEY (1971). Culturas crescidas em meio NB a 37°C, com aproximadamente $1-2,0 \times 10^8$ células / ml foram diluídas 1:100 em 20 ml de NB contidos em frascos de Erlenmeyer (250 ml) e incubadas a 37°C com agitação por 5 horas. MC foi então adicionada para dar uma concentração final de 5 mg/ml. Após 10 minutos a 37°C, as culturas foram centrifugadas, os sobrenadantes desprezados e os sedimentos ressuspensos em NB e incubados por 2 horas a 37°C, para eventual demonstração de lise. Em casos negativos, após essa incubação, as culturas permaneciam por uma noite sob temperatura do laboratório (20-25°C).

Após a conclusão de cada um desses itens (34.1 - 34.4), cada cultivo foi centrifugado a 4000 g por 10 minutos e o sobrenadante submetido à filtração em membrana "Millipore" de acetato de celulose (0,22 µm) recebendo a seguir 0,1 ml do volume de clorofórmio. Esses filtrados foram ensaiados para a presença de vírus e as u.f.p. foram determinadas em cada cultivo (ítem 36).

35. DETERMINAÇÃO DA PRESENÇA DE VIRUS NOS FILTRADOS

Placas contendo aproximadamente 30ml do meio LB sólido (previamente mantidas por 24 horas em estufa

a 37°C para secagem relativa do meio) foram "inundadas" por 2 ml de cultura em LB da bactéria a ser testada como indicadora (sensível ao vírus). Após remoção do excesso de cultura e subsequente secagem, as placas foram abertas na estufa a 37°C, por 60 minutos, e nelas foram distribuídas gotas dos filtrados a serem testados. Esses filtrados tiveram o clorofórmio previamente eliminado por agitação do filtrado em banho a 37°C.

36. TITULAÇÃO DOS VÍRUS

A determinação das u.f.p. dos diversos fagos foi baseada na técnica de GRATIA (1936). Um décimo de mililitro do filtrado convenientemente diluído em LB era adicionado em tubos do tipo hemólise contendo 0,3 ml da suspensão da bactéria indicadora, desenvolvida por uma noite em LB, com aeração, e 2,5 ml de MTA. Algumas vezes a bactéria indicadora foi obtida por suspensão da cultura desenvolvida por uma noite em NA, conseguida por lavagem da superfície do ágar com 5ml de LB (ADAMS, 1959). Outras vezes, ainda, a bactéria indicadora era fornecida conforme descrito no próximo ítem.

37. PREPARAÇÃO DA BACTÉRIA INDICADORA

Cultivo em aeração no meio LB (10^9 bactérias por ml) era centrifugado e suspenso em solução esterilizada de sulfato de magnésio 0,01M. Após aeração por uma hora, a 37°C , essa suspensão era guardada no refrigerador (4°C), podendo ser usada após vários dias (4-5 após a preparação).

38. PREPARAÇÃO DE ESTOQUES DE VÍRUS

A fim de se obter lisados com altos títulos, a obtenção de estoques foi baseada em métodos que utilizam placas de lises confluentes (HERSHEY et al, 1943); SWANSTROM & ADAMS, 1951), empregando-se a camada de MTA. Assim, após a confluência das placas de lise no ágar semi-sólido, a este era adicionado 5 ml de LB e removido com auxílio de uma espátula ou lâmina de vidro para um tubo de centrífuga (50 ml) contendo 20 ml de LB. Após boa agitação por 30 minutos, o ágar e os restos celulares das bactérias foram sedimentados por centrifugação a 4000 g por 10 minutos.

39. ISOLAMENTO DE VÍRUS TEMPERADOS

Os vírus foram obtidos por indução de 60 amostras de Proteus mirabilis da série L (Tabela 28),

após tratamento pelos métodos referidos nos ítems 34.1-34.4 o lisado de cada bactéria, assim obtido, foi posto em contato com as mesmas 60 amostras, de acordo com o descrito no ítem 35.

40. TIPOS DE VÍRUS

Uma série de 9 filtrados continham vírus que formaram placas de lise em 6 amostras bacterianas. Os fagos foram denominados tomando-se o número de linhagem induzida que liberou o vírus, no numerador, e o número da linhagem indicadora ou sensível, no denominador (COETZEE & SACKS, 1960^a). A linhagem L-81 foi indicadora para os vírus 25 e 27 e 113; a L-82 foi indicadora para os vírus 30 e 33; as linhagens L-65, L-73, L-80, L-81, L-99, L-100, L-104, L-124, L-126 e L-127 foram sensíveis aos vírus 68 e 92; a amostra L-88 revelou-se sensível ao vírus 101; as linhagens L-65, L-73, L-80, L-81, L-109 e L-127 foram sensíveis ao fago 114.

Aparentemente, os fagos 25/81, 27/81 e 113/81 são idênticos, o mesmo acontecendo com 30/82 e 33/82 e com as séries 78 e 92 acima referidas. Os vírus 25/81 e 30/82 e 33/82 e as séries 68 e 114 foram obtidos por indução por cultivo prolongado (10 dias) em NB; os vírus 27/81 e 113/81, através da luz ultravioleta; a série 92, pela ação de mitomicina C; e o vírus 101/88, pela ação do calor.

Esses fagos produzem halos de lise turvos e falham em lisar cultura dessas células em caldo nutritivo, não tornando-o límpido.

41. INDUÇÃO DE PROFAGOS DE CÉLULAS P⁻ DE AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis*

Variantes P⁺ e P⁻ das amostras L-68 m, L-114 e L-101 foram submetidas à indução de profagos, conforme descrito no ítem 34. As séries de vírus 68 P⁺ e P⁻ e 114P⁺ e P⁻ foram conseguidas por indução pelo cultivo prolongado, enquanto que a série 101 P⁺ e P⁻ foi induzida pela ação da mitomicina C.

42. VERIFICAÇÃO DE PSEUDOLISOGENIA (ESTADO DE PORTADOR)

Um décimo de mililitro de uma diluição ao centésimo de cada cultura, desenvolvida por 10-12 horas em LB, foi adicionada em 3 ml de MTA, previamente fundido, arrefecido e mantido a 45°C, sobre placas contendo 30 ml de LB sólido. Após incubação por uma noite a 37°C, pesquisou-se a presença de placas de lise.

43. INVESTIGAÇÃO DA OCORRÊNCIA DE CONVERSÃO LISOGÊNICA NA DETERMINAÇÃO DOS FENÓTIPOS P^+ E P^- EM AMOSTRAS DE *Proteus mirabilis*

Foram utilizadas as linhagens instáveis em relação à excreção da protease, não-lisogênicas e sensíveis a um dos fagos isolados (Tabela 28). Assim, as células P^+ e P^- da linhagem L-81 foram lisogenizadas com os fagos 25, 68, 113 e 114; as células P^+ e P^- das linhagens L-127, L-99, L-100, L-104 e L-124 foram lisogenizadas pelo fago 68. A lisogenização dessas linhagens foi conseguida, analisando placas de lise causadas por esses vírus, através da técnica da adição de gotas dos vírus sobre um "tapete" de células preparado recentemente, na superfície de meio sólido LB contido em placas (ítem 35). Após incubação por 8-10 horas (37°C) as placas foram deixadas fora da estufa por 24-48 horas. Analisando as placas de lise, foram isoladas colônias que se mostraram imunes e lisogênicas (liberação de profagos) para o seu respectivo vírus. Essas colônias foram então reavaliadas em relação ao seu padrão de comportamento quanto à excreção da protease, ao serem cultivadas em NG, e reveladas pela técnica da solução de sulfato de amônio.

44. TRANSDUÇÃO DO CARÁTER PROTEASE ENTRE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis*

Os vírus temperados e bactérias sensíveis utilizados constam na Tabela 28. Os lisados apresentaram títulos da ordem de 10^{10} e foram propagados nos organismos P^+ , pelo menos 3 vezes antes da realização dos experimentos.

A célula receptora P^- foi removida do crescimento a $37^\circ C$, por uma noite, em meio NA através de lavagem da superfície do meio com NB. Uma suspensão contendo aproximadamente $2,5 \times 10^9$ células por ml foi então feita ($D.O_{540} = 0,50$).

Três tubos, cada um contendo 0,5 ml da cultura P^- foram centrifugados e os sobrenadantes descartados. Um mililitro do lisado do fago propagado na amostra doadora P^+ (5×10^9 células p/ml) foi então misturado com o depósito de um dos tubos. Um mililitro do fago propagado em células P^- foi misturado no segundo tubo e 1 ml de NB foi adicionado ao depósito do terceiro tubo. Um quarto tubo, contendo somente suspensão do fago derivado da lise de células P^+ , serviu como controle de esterilidade bacteriana. Em todos os tubos foi adicionado 0,01 ml de cloreto de cálcio (0,01M). Após 45 minutos de incubação a $37^\circ C$ adicionou-se em todos os tubos 0,03 ml de citrato de sódio (0,3M).

Aliquotas de 0,01 ml foram esgotadas em meio NG contido em placas. Após incubação por 24 horas, determinou-se a presença de transdutantes P^+ , através do teste do sulfato de amônio. O número de células existentes no tubo de adsorção foi determinado em placas de NA. A multiplicidade de infecção (m.o.i.) foi calculada pela razão entre o título dos fagos multiplicado pelo volume, e o número de células. A taxa de adsorção do fago à bactéria foi determinada pela remoção de amostras da mistura, no início e no final do período de adsorção e adicionadas em NB contendo 0,1 do volume de clorofórmio e, a seguir, tituladas, utilizando-se a bactéria indicadora.

Uma alternativa dessa técnica foi a introdução de modificações sugeridas por COETZEE, SMIT & PROZESKY (1966) e COETZEE (1974). Cultura da bactéria receptora desenvolvida por uma noite a 37°C foi diluída 1:5 em 2 ml de NB e incubada por 90 minutos. Uma diluição da suspensão do fago em solução salina 0,15 M (0,1 ml) foi adicionada na cultura e a mistura incubada por 10 minutos a 37°C . As misturas de adsorção foram então adicionadas de 8 ml de solução salina e filtradas em membranas "Millipore" (COETZEE & SACKS, 1960_a). Essas membranas contendo as células eram então colocadas diretamente no meio de cultura (NG). No caso da transferência da informação genética da protease,

para se contornar possível demora fenotípica, de maneira semelhante, como ocorre com a estreptomicina, as membranas foram deixadas 4 horas incubadas em NG e, após a remoção e suspensão das bactérias em NB, foram elas incubadas em NG e reveladas da maneira usual, pela solução de sulfato de amônio.

45. DETERMINAÇÃO DOS NÍVEIS DE RESISTÊNCIA A ANTIMICROBIANOS

Os níveis de resistência foram determinados pela técnica da diluição em placa, que consiste em semear as amostras a serem testadas, em placas contendo o meio de cultura com diferentes concentrações das drogas em questão (TRABULSI & ZULIANI, 1969). No preparo das placas usou-se o meio Müller e Hinton (MH) para todas as drogas.

Determinou-se a resistência a estreptomicina, canamicina, tetraciclina, cloranfenicol, ampicilina e bicloreto de mercúrio. As soluções-estoque de cada droga foram preparadas na concentração de 10 mg/ml e os solventes utilizados para as diferentes drogas foram: água destilada, para estreptomicina, canamicina e bicloreto de mercúrio; álcool metílico e água destilada, para tetraciclina e cloranfenicol.

As placas foram preparadas no dia do uso, adicionando-se volumes e diluições adequadas das drogas no meio de cultivo contido em tubos (20 ml) ou em frascos de erlenmeyers (100 ml) previamente fundido e arrefecido a 45^oC, a fim de se obter as concentrações finais de 1, 5, 10, 20, 50, 100, 200, 500 e 1000 µg da droga/ml de meio de cultura.

Após solidificação do meio, o excesso de umidade da superfície era eliminado expondo-se as placas abertas por uma hora em ambiente asséptico (câmara de fluxo luminal) ou semi-abertas, em estufa a 37^oC, por aproximadamente 1 hora.

As culturas foram feitas em 2 ml de NB, incubadas a 37^oC por 18-20 horas, diluídas 1:1000 no mesmo meio e a inoculação foi realizada com o auxílio de alças (multi-alça composta de 16 alças de níquel-cromo, com aproximadamente 1,8 mm de diâmetro), em placas, cada uma contendo uma droga diferente, e em uma sem a droga, como controle da viabilidade da cultura. Assim, em cada placa foram semeadas 16 amostras.

Após incubação de 24 horas, a 37^oC, as placas foram observadas e os resultados anotados. Foi considerada como concentração inibitória a menor concentração da droga que impediu o crescimento de cada amostra e, a imediata

mente inferior, como o nível de resistência. O critério adotado de resistência de uma dada amostra, em relação à determinada concentração de droga, foi o de considerar o crescimento bacteriano igual ou superior a 50% em relação ao crescimento na placa de viabilidade, calculado visualmente.

46. PESQUISA DE PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

Para se verificar a produção de bacteriocinas nas linhagens doadoras e receptoras, procedeu-se de acordo com a técnica preconizada por FRÉDÉRICQ (1948), modificada por COSTA (1973). Assim, as amostras em estudo eram transferidas do meio no qual estavam estocadas para o meio NA, por meio de uma alça cheia, com cerca de 2 mm de diâmetro, e semeadas em forma de círculo com aproximadamente 0,5 cm de diâmetro, em número de quatro amostras por placa.

Após 48 horas de incubação a 37°C, as placas eram invertidas e 1 ml de clorofórmio era colocado na tampa de cada uma delas; depois de 15 minutos, eram entreabertas durante 30 minutos, a fim de permitir evaporação do clorofórmio. A linhagem a ser testada quanto a sua sensibilidade às bacteriocinas, foi incubada por 24 horas a 37°C e diluídas ao décimo, usando o mesmo meio e 1 ml da diluição assim obtida foi adicionada a 4 ml de ágar nutritivo semi-sólido. A seguir, essa mistura era distribuída sobre

a superfície do meio contido na placa, de modo a se obter uma película homogênea. Após 12 a 24 horas de incubação a 37°C, era feita a leitura através do halo de inibição.

47. TRANSFERÊNCIA DE MARCAS GENÉTICAS

Foi utilizada uma placa seletora para cada marcador de resistência cuja transferência estava sendo pesquisada, de modo que, se a amostra apresentasse resistência a 6 drogas, 6 placas seletoras eram preparadas. Cada placa, além da concentração adequada da droga pesquisada, continha também estreptomicina (100 mg/ml) ou rifampicina (100 mg/ml) que correspondiam ao marcador de resistência. Para a transferência de marcadores de algumas linhagens que apresentavam níveis de resistência altos à estreptomicina, concentrações mais elevadas dessa droga foram empregadas nas placas seletoras (800 µg/ml).

Quando a transferência de resistência a drogas era constatada sempre se procedeu à purificação e estocagem de um número representativo de transconjugantes.

A frequência de transferência foi calculada em relação ao número de doadores, isto é, como transferência por célula doadora, no momento de misturar as culturas (DATTA et al, 1971).

48. OBTENÇÃO DE LINHAGENS RECEPTORAS DERIVADAS DO *Proteus mirabilis* N-17 Gm

Esta linhagem é instável em relação à excreção de protease e sensível aos antibióticos ensaiados, estreptomicina, canamicina, cloranfenicol, tetraciclina e ampicilina, sendo resistente somente à Su (2000 µg/ml) e ao bicloreto de mercúrio (1 µg/ml). A partir de uma sua derivada P⁻ (N-17 G P⁻) que há 5 anos tem sido submetida a testes de reversão para P⁺, sem demonstrar esse fenômeno, obtiveram-se mutações para estreptomicina e rifampicina que foram selecionadas espontaneamente, através de "plaqueamento"⁹ de aproximadamente 10 células por placa contendo NA adicionado do agente antibiótico. As colônias selecionadas sofreram três passos sucessivos de purificação, pela utilização da técnica do esgotamento de alça no mesmo meio seletivo.

Dessa forma, foram conseguidas as linhagens N-17 G P⁻ Rif^R e N-17 P⁻ Rif^R Str^R.

Da mesma maneira, outras linhagens foram obtidas, envolvendo resistência a outros antibióticos.

49. TÉCNICAS DE CONJUGAÇÃO

Uma variedade de táticas de conjugação foi ensaiada para transferência de marcadores genéticos de resistência transferível a drogas entre linhagens de Proteus mirabilis e entre E. coli e P. mirabilis.

49.1 Conjugação em meio líquido (SMITH, 1959)

Foram utilizados cultivos de 18-20 horas a 37°C. A mistura de conjugação constituiu-se de 0,1 ml da doadora com 1,0 ml da receptora e 4,9 de NB aquecido (37°C), seguida de incubação por 6 horas a 37°C. Quando bactérias autotróficas estavam envolvidas no processo de conjugação, adicionaram-se 20 ml de tampão DM e submeteu-se em seguida à centrifugação para eliminação do sobrenadante, com subsequente ressuspensão do sedimento em 6 ml de tampão DM. Aliquotas (0,1 ml) dessa suspensão não-diluídas e diluídas ao décimo em tampão DM, foram inoculadas em placas seletoras contendo meio MH ou MM adicionado de drogas.

49.2 Conjugação, utilizando filtro Millipore, modificada de LAI, PANOPoulos & SHAFFER (1977)

Culturas doadora e receptora foram desenvolvidas por 16-18 horas em meio TSB, a 37°C, foram misturadas (1:2 v/v) e 3 ml dessa mistura foi passada através de uma membrana filtrante Millipore 0,22 µm (GSWPO 2500-25 cm Ø) e

então colocada sobre a superfície de meio MH disposto numa placa, por 5 horas a 37°C. O filtro foi retirado e lavado com 2-4 ml de tampão DM e, a ressuspensão nesse mesmo tampão, se prestou para a retirada de alíquotas (0,1ml) diluídas ou não, para serem inoculadas em placas seletoras contendo meio MH ou MM adicionado de drogas.

49.3 Conjugação em meio sólido

Amostras doadora e receptora foram cultivadas, separadamente, em 2 ml de NB por 24 horas a 37°C. Dois tubos contendo cinco mililitros de TSB foram inoculados com essas culturas, na proporção de 1:1000 (v/v), e novamente incubados a 37°C por 12-16 horas. Após esse tempo inoculou-se 0,1 ml de cultura doadora em meio MH contido em placa, em camada alta (30 ml de meio), até a completa secagem da gota (mais ou menos 30 minutos, em placa aberta na câmara de fluxo laminar "Veco"). Um décimo de mililitro da cultura receptora foi colocado sobre o inóculo da doadora e igual procedimento foi dado até a sua secagem. A placa assim inoculada foi incubada em estufa a 37°C por 5 horas.

A remoção do cultivo da mistura de conjugação foi feita pela adição de 3 ml de TSB, onde se pro-

cedeu, primeiramente, à suspensão das células com o auxílio de uma pipeta. Esta suspensão foi submetida a agitação (agitador do tipo "Vortex") por aproximadamente 30-40 segundos. Aliquotas de 0,1 ml, diluídas ou não, foram semeadas em placas seletoras contendo meio MH adicionado de drogas.

50. EXPERIMENTOS DE TRANSFERÊNCIA DA INFORMAÇÃO GENÉTICA RESPONSÁVEL PELA SÍNTESE DE PROTEASE, ATRAVÉS DE CONJUGAÇÃO BACTERIANA

Uma série de linhagens doadoras, todas P. mirabilis, foram postas em contato com um número de linhagens de P. mirabilis e E. coli, a fim de se encontrar alguma evidência de transferência da informação da protease.

Utilizou-se, além das técnicas acima referidas, outra que utiliza a linhagem receptora em feno-cópia, o que se conseguiu através de crescimento prolongado com aeração (160 r.p.m.) a 37°C. A mistura de conjugação era constituída de 0,4 ml da receptora mais 1,2 ml da doadora em crescimento exponencial. Essa mistura era incubada em erlenmeyer de 250 ml e permanecia em banho a 37°C por 24 horas, sob lenta agitação (30 r.p.m.). Essa mistura de conjugação, após as primeiras 12 horas de incubação, recebia 0,8 ml de meio TSB.

51. EXPERIMENTOS DE CONJUGAÇÃO ENVOLVENDO A TRANSFERÊNCIA DE PLASMÍDEOS R ENTRE LINHAGENS DE *Proteus mirabilis*

Foi utilizada como doadora a linhagem L-68-79 (Sm, Km, Ap, Hg) e a L 68-73 (Cm, Tc) derivada de *P. mirabilis* L-68 m, e, como receptoras, as linhagens N-17 G P⁻Rif^R e N-17 G P⁻Rif^RStr^R.

Após a conjugação realizada pelos três processos descritos no item 49, aliquotas (0,1 ml) da mistura de conjugação não-diluída e diluída ao décimo, foram espalhadas na superfície de placas seletoras contendo drogas nas concentrações de 10 µg/ml, para o bicloreto de mercúrio (Hg); 20 µg/ml, para estreptomicina (S) e ampicilina (A); 40 µg/ml para canamicina (K), cloranfenicol (C) e tetraciclina (T). Em todas essas placas seletoras estava também presente a rifampicina (Rif) (50 µg/ml).

Na preparação dos controles, as culturas doadora e receptora foram semeadas em placas contendo meio MH adicionado de rifampicina; em placas contendo meio MH, adicionada, cada uma delas, das outras drogas, nas mesmas concentrações das placas seletoras; em placas contendo meio MH mais rifampicina e, cada uma delas, adicionada das outras drogas, na mesma concentração das placas seletoras; e em placas contendo meio MH isento de drogas.

Após permanência das placas seletoras se meadas com a mistura de conjugação, na estufa por 24-36 horas, cerca de 150 colônias eram retiradas com o auxílio de palitos (cotransferência) esterilizados, diluídas em pequenos volumes de tampão DM contido em placas escavadas e, a seguir, inoculadas com o mesmo palito em placas de Petri contendo meio MH adicionado com as drogas acima referidas e em placas contendo meio NG, para o teste da protease.

Após confirmação e purificação das colônias transconjugantes, procedeu-se à estocagem de um número delas.

52. TRANSFERÊNCIA DO PLASMÍDEO RP4 DA LINHAGEM DE *E. coli*

J 53 PARA *Proteus mirabilis*

A linhagem receptora foi inicialmente a N-17 G P⁻ Rif^RStr^R.

Após a conjugação em meio sólido suplementado com 20 µg/ml de prolina e metionina e 10 µg/ml de tiamina, alíquotas (0,1 ml) da mistura de conjugação, não-diluída e diluída ao décimo e ao centésimo, foram espalhadas em placas seletoras contendo TS, KS e AS (tetraciclina, estreptomicina, canamicina mais estreptomicina e ampicilina mais estreptomicina), nas concentrações de 10 µg/ml de tetraciclina, 25 µg/ml de canamicina, 20 µg/ml de ampicilina e 800 µg/

ml de estreptomicina. Para o cálculo da frequência de transconjugantes, utilizaram-se as placas seletoras KS e TS. Todas as colônias dela resultantes foram testadas em K, T, A, S e Rif. Algumas colônias foram testadas no meio IAL.

Conjugação também foi realizada, utilizando-se como linhagem receptora P. mirabilis N-17 Gm, que apresenta população mista, constituída por células P⁺ e P⁻, e não apresenta nehhum dos marcadores de resistência acima mencionadas.

Após conjugação, utilizando procedimento igual ao experimento anterior, a mistura de conjugação (3ml) foi lavada por 3 vezes com tampão DM e ressuspensa no mesmo volume. Aliquotas (0,1ml) não-diluídas e diluídas ao décimo e ao centésimo foram espalhadas em placas seletoras contendo MM adicionado de K, T; MM adicionado de T; e MM adicionado de A. Para o cálculo da frequência de recombinantes utilizaram-se as placas seletoras MM + K e MM + T. Foram retestadas 42 colônias para resistência a K, T, A, sensibilidade à S, excreção da protease em NG e para confirmação da espécie em IAL. Algumas linhagens foram estocadas e logo submetidas à eletroforese do DNA, para a confirmação da presença do plasmídeo RP4.

53. MOBILIZAÇÃO DA INFORMAÇÃO GENÉTICA DA PROTEASE PELO
PLASMÍDEO RP4

A linhagem doadora N-17 G-22 P⁺ (KTA), obtida por conjugação de E.coli J 53 com N-17 Gm, foi conjugada com a linhagem N-17 G P⁻Rif^RStr^R, pelo processo do meio sólido, utilizando-se placas seletoras constituídas de KS e TS. Colônias desenvolvidas nestes meios foram "carrimadas" em placas contendo NG adicionado de estreptomicina (800 µg/ml) em NG mais rifampicina(100 µg/ml) e em placas contendo NG mais ambos os antibióticos. De posse de placas assim constituídas, que não sofreram ação reveladora da hidrólise da protease, pela solução de sulfato de amônio, iniciou-se o processo de purificação, confirmação e estoque de colônias que apresentavam indicativo de trans-conjugantes, utilizando-se meios contendo cada uma das drogas (K,T,A, S,Rif) e teste da protease.

54. ELETROFORESE EM GEL DE AGAROSE VERTICAL, PELA TÉCNICA DA COLÔNIA ÚNICA (SANTOS, 1978)

As células foram crescidas em 2 ml de TSB, a partir do estoque em NA, por incubação com agitação reciprocante (160 por minuto) por 8 horas. Cada linhagem foi semeada pela técnica do esgotamento de alça, em placas contendo MM adicionado de um dos antibióticos correspondentes aos seus marcadores de resistência canamicina (25 µg/

ml), tetraciclina (10 µg/ml) ou ampicilina (20 µg/ml) e incubadas por 24-48 horas a 37°C.

A placa de agarose a 1% foi preparada com tampão TEB (tris OH, 89 mM; Na₂EDTA, 2,5 mM; H₃BO₃, 89 mM; pH 8,2).

Colônias isoladas foram colhidas, utilizando, como espátula, a extremidade achatada e maior de um palito de dentes e foram dissolvidas nas canaletas da placa de agarose, onde previamente havia sido colocado 25 µl de uma solução de lisozima (tris HCl 0,25 M, pH 8,5); . ficoll (P.M. 400.000) 20%; azul de bromofenol 0,05%; RNase dissolvida em tampão TEB, tomando-se o cuidado de se evitar a formação de grumos, o que dificultaria a ação da lisozima. Após esta fase, foi depositado nas canaletas 30 µl de uma solução contendo SDS, 0,2%; ficoll, 10%, dissolvidos em tampão TEB. Em seguida, as duas soluções foram misturadas e 100 µl de uma solução de SDS, 0,2%; ficoll, 5% foi colocada nas canaletas e seladas com agarose 0,8% fundida pelo calor.

Colocou-se, então, tampão TEB nas cubas e procedeu-se a corrida de 45 minutos com 2 mAmp. Fimando esse período, a amperagem foi aumentada para 45 mAmp por aproximadamente 2 horas (até o corante alcançar a extre

midade inferior da placa de eletroforese).

Após a retirada da placa de agarose, ela foi imergida numa solução de TEB contendo 0,5 µg/ml de EB, por um período de 10 minutos.

As bandas de DNA foram visualizadas com auxílio de um transiluminador de U.V., que emite radiação predominantemente a 2537 \AA (Ultraviolet Products Inc.) e fotografadas com filme Kodak Tri-X, 35 mm.

RESULTADOS

Ao se examinar indivíduos provenientes de 177 amostras de Proteus mirabilis, isoladas de material clínico humano de diferentes fontes, observa-se que algumas dessas populações são heterogêneas em relação à excreção de protease (Tabela 3).

Embora nem sempre o número de células investigadas tenha sido suficientemente grande, convencionou-se denominar de população estável aquela onde não apareceram células P⁻. Somente depois é que em algumas linhagens foram melhor estudadas e definitivamente consideradas como estáveis e, então, incluídas em alguns experimentos que seguem.

Essa instabilidade em tão elevado grau parece não ocorrer em algumas outras bactérias também dotadas de atividade proteolítica, tais como Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, B. cereus, B. megaterium e Staphylococcus aureus (Tabela 4).

Duas outras propriedades bioquímicas, produção de sulfeto de hidrogênio e urease, foram ensaiadas para verificação da ocorrência de instabilidade em linhagens instáveis e estáveis de P. mirabilis, conforme mostram

as Tabelas 5 e 6. As linhagens N-17, L-79, L-84, L-88 e L-124 são instáveis em relação à excreção de protease. O que se pode concluir é que as informações genéticas envolvidas nestes dois processos bioquímicos parecem ser estáveis.

A Tabela 7 mostra o quanto heterogeneas em relação à excreção de protease, podem ser as colônias P^+ obtidas de linhagens instáveis (N-17, N-17-1).

Essa instabilidade pode ser bem evidenciada pela influência da estocagem prolongada de linhagens instáveis (N-17-9-13 e N-17-C) em ágar nutritivo inclinado (Figura 3), o que explica a grande conversão de amostras de P. mirabilis instáveis em protease-negativas.

A estocagem prolongada de colônias P^+ , isoladas de culturas instáveis e estáveis, em relação à excreção da protease, em ágar semi-sólido (método da pica-dá), mostra que a maioria das células P^+ apresenta o traço da instabilidade (Tabela 8). No entanto, algumas dessas colônias P^+ parecem comportar-se de maneira muito estável. A colônia número 12 da amostra N-17 (N-17-12), depois de permanecer um ano estocada, continua estável. Estudos ulteriores realizados neste últimos cinco anos comprovam esse fato.

A instabilidade em relação à informação da protease pôde ainda ser constatada pelo cultivo de linhagens instáveis (N-17, N-2, S-3, S-4) em caldo nutritivo (NB) por 21 dias (Figura 4) ou através de subcultivos sucessivos (diários) das linhagens (N-17 e N-17-1), (Figura 5). As linhagens N-17-11 e N-17-12 mantiveram-se absolutamente estáveis.

Há uma fundamental diferença quando se submetem linhagens instáveis à subcultivos sucessivos (diários), em caldo nutritivo (NB) e caldo nutritivo adicionado de 0,5% de gelatina (NBG). A instabilidade se mostra muito acentuada em NB, mas não em NBG (Figura 6A e 6B), apesar de que não se nota diferença de comportamento entre o crescimento de células P⁺ e P⁻, em NB e NBG (Figura 7A e 7B). Os tempos de geração de ambas as linhagens foram muito semelhantes em cada sistema de cultivo.

Células P⁻, originárias de P. mirabilis, não voltam espontaneamente à condição P⁺ (Tabela 9). Esse fato pode ser constatado, mesmo sob a ação de conhecidos mutágenos como o NTG (Tabela 10) e luz U.V. (Tabela 11), após inoculação em camundongos (Tabela 12).

A frequência espontânea de células P⁻ pode ser grandemente aumentada pela ação de agentes curagênicos, tais como o EB (Tabela 13). As células estáveis

(N-17-11 e N-17-12) não parecem sofrer uma eficiente ação curagênica desse corante (Tabela 14).

Também o SDS mostra uma ação efetiva no aparecimento de células P^- de amostras instáveis (L-68 m), mas não de células conhecidas por sua estabilidade (L-68-1- P^+), conforme pode ser constatado na Tabela 15.

Na Figura 8, onde ocorre crescimento de linhagem L-68 m (população mista P^+ e P^-) e de sua derivada P^- (L-68- P^- Nal^R), em presença de SDS, verifica-se um crescimento satisfatório das células P^- , em detrimento das células P^+ . Mas não ficou claro, nesse experimento, se as células P^+ são mais sensíveis ao SDS do que as P^- ou, se elas são convertidas em células P^- .

Parece ocorrer um crescimento seletivo diferencial a favor das células P^- . Tal droga favorece competitivamente o crescimento de células P^- (Figura 9B). As duas linhagens P^+ e P^- utilizadas na curva de crescimento, em presença de SDS, apesar de serem mutantes resistentes a diferentes drogas, não mostra diferença de crescimento quando crescem em NB sem o SDS (Figura 9A).

A acriflavina atua eficientemente na conversão de células P^+ a P^- quando amostras instáveis são utilizadas. Embora as células estáveis não apresentem me-

nor sensibilidade à sua ação, não se observa a referida conversão (Tabela 16). O mesmo acontece com o uso da mitomicina C (Tabela 17). Já com a rifampicina, apesar de mostrar um aparente efeito conversor de células P^+ em P^- , quando atua sobre células instáveis, o mesmo não acontece em relação às células estáveis que, além do mais, são muito mais sensíveis à ação do antibiótico. Isso faz crer tratar-se de efeito seletivo, onde células P^- tiram vantagem sobre as P^+ , como no caso do SDS (Tabela 18).

Tanto o cloridrato de guanidina (Tabela 19), como temperaturas superiores à fisiológica (Tabela 20), não parecem apresentar qualquer efeito no aparecimento de células P^- e na viabilidade de células instáveis em relação ao caráter protease.

Dados sobre a influência de células P^+ de P. mirabilis na sobrevivência de camundongos podem ser encontrados nas Tabelas 21 e 22. Parece que as células P^- são menos virulentas quando comparadas com as P^+ (Tabelas 23 e 24).

A Tabela 25 mostra que plasmídeos R devem exercer alguma influência na excreção de protease em hospedeiros de P. mirabilis; a evidência de que a linhagem L-68-79- P^+ -R contém plasmídeos R, é a transferibilidade desses determinantes para as linhagens N-17 G^- Rif^R e

N-17 G P⁻ Rif^R Str^R (Tabela 26).

As linhagens L-68-79-P⁺ R e L-68-79A-P⁻ R que contêm determinantes genéticos extracromossômicos responsáveis pela resistência bacteriana a drogas transferível, apresentam maior sensibilidade ao desoxicolato de sódio, quando comparadas com outras linhagens P⁺ e P⁻ que não abrigam plasmídeos R (Figura 10).

A linhagem L-68-73 (P⁺) não foi capaz de transferir seus marcadores de resistência ao cloranfenicol e à tetraciclina (Tabela 27) para as mesmas linhagens receptoras utilizadas nos experimentos acima referidos (Tabela 26).

As amostras de vírus temperados, utilizados neste trabalho, foram obtidas por indução de agentes químicos e físicos e podem ser encontradas na Tabela 28.

Tanto células P⁺ como P⁻, desenvolvem, sob indução, lise com subsequente liberação de fagos temperados. Isso afasta a possibilidade de que genes responsáveis pela síntese ou excreção da protease, sejam carregados por fagos (Tabela 29).

Além do mais, lisogenização parece não alterar as características fenotípicas de células P⁺ e P⁻ em diversas amostras de Proteus mirabilis (Tabela 30).

A possibilidade de pseudolisogenia (esta do portador) foi aparentemente afastada, quando não se detectou a formação de placas de lise espontâneas, em 60 linhagens de P. mirabilis (Tabela 31).

A transdução do caráter protease foi conseguida em algumas linhagens de Proteus mirabilis, com o auxílio de vírus temperados (Tabela 32).

O plasmídeo RP4 da linhagem E.coli J 53 foi transferido eficientemente para linhagens de Proteus mirabilis (Tabela 33 e Figura 11).

A linhagem N-17 G P⁻ Rif^R Str^R recebeu, por conjugação com a linhagem N-17 G-22 P⁺ (RP4), o caráter protease. Essa mobilização do caráter protease através do plasmídeo RP4 consta da Tabela 34.

TABELA 3

Ocorrência de colônias P⁻ em amostras de Proteus mirabilis
procedentes de material clínico

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P ⁻
L-1	1454	655	2
L-2	1494	485	6
L-3	1504	904	19
L-4	1505	761	5
L-5	1506	700	0
L-6	1507	1641	17
L-7	1525	1187	2
L-8	1562	634	4
L-9	1563	567	5
L-10	1569	945	5
L-11	1607	787	0
L-12	1629	978	0
L-13	1661	807	1
L-14	7	807	17
L-15	11	1160	0
L-16	112	1513	15
L-17	1558	588	0
L-18	1558	910	1
L-19	1630	842	0
L-20	1676	463	0
L-21	1677	701	1
L-22	1687	1968	0
L-23	1693	888	3
L-24	1697	907	0
L-25	1717	1514	0

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P
L-26	1723	584	2
L-27	1739	2474	0
L-28	1740	502	1
L-29	1742	593	0
L-30	1796	1136	0
L-31	1811	929	9
L-32	1825	1162	1
L-33	1829	1202	0
L-34	1841	781	0
L-35	1844	502	0
L-36	1862	1304	2
L-37	1847	735	0
L-38	1880	509	0
L-39	1880A	1069	1
L-40	1912	602	0
L-41	1913	901	1
L-42	11C-913	769	0
L-43	1976	1067	0
L-44	1949	313	66*
L-45	2012	428	54*
L-46	2014	447	14
L-47	-	331	2
L-48	-	131	1
L-64	3583	279	13
L-65	3570	532	10*
L-66	3575	904	183*
L-67	3616	504	104*
L-68	3617	437	59*

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P
L-69	3621	579	47
L-70	3624	894	1
L-73	3639	674	15
L-74	3647	494	124*
L-75	3663	492	132*
L-77	3673	249	36*
L-79	3694	1143	415*
L-80	3699	320	44*
L-81	3700	230	25
L-82	3713	123	18
L-83	3721	152	15
L-84	3730	214	26
L-85	3732	505	25
L-86	3766	263	7
L-87	3780	663	54*
L-88	3790	970	120*
L-89	3804	340	67
L-90	3805	382	3
L-91	3829	1510	0
L-92	3843	309	7
L-93	3845	325	24
L-94	3848	254	0
L-97	3866	395	36
L-98	3871	218	14
L-99	3872	208	0
L-100	3872A	650	1*
L-101	3880	1103	99
L-102	3880A	896	78*
L-103	3889	1120	10

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P
L-104	3892	193	4
L-105	3892A	871	10
L-106	3892B	985	35
L-107	3892C	735	34
L-108	3892D	409	7
L-109	3901	144	15
L-110	3901A	158	8
L-111	3901B	222	7
L-112	3901C	362	3
L-113	3905	551	5.
L-114	3910	349	4
L-115	3910A	292	5
L-116	3910B	480	6
L-117	3914	317	29
L-118	11-P	609	37
L-119	11-PA	368	24
L-120	15-P	3636	1949*
L-122	25-P	400	11
L-123	25-PA	873	13
L-124	30-P	1137	17
L-125	30-PA	288	1
L-126	79-P	363	2
L-127	89-P	348	0
L-128	90-P	175	5
L-129	106-P	620	124*
L-130	106-PA	630	61
L-131	127-P	354	0
L-132	127-PA	370	18

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P
L-133	180-P	488	9
L-134	180-PA	353	11
L-135	182-P	318	12
L-136	182-PA	490	67*
L-137	189-P	2613	511*
L-138	189-PA	413	16
L-139	189-PB	520	6
L-140	194-P	543	9
L-141	197-P	522	9
L-142	197-PA	112	4
L-143	197-PB	431	22*
L-144	197-PC	347	82*
L-145	197PD	308	9
L-146	198-P	396	26
L-147	198-PA	377	69
L-148	198-PB	398	63
L-149	198-PC	348	7
L-150	206-P	481	9
L-151	206-PA	510	14
L-152	211-P	701	269*
L-153	211-PA	578	23*
L-154	211-PB	1977	65*
L-155	211-PC	643	55*
L-156	221-P	876	100*
L-157	221-PA	650	106*
L-158	221-PB	1316	451*
L-159	221-PC	1887	841*
L-160	221-PD	659	89*
L-161	226-P	617	92*

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P
L-162	226-PA	374	22
L-163	226-PB	461	65*
N-2	-	679	36
N-3	-	843	56
N-4	-	283	24
N-5	-	510	59*
N-6	-	551	446*
N-7	-	443	14*
N-8	-	518	21*
N-9	-	387	22*
N-10	-	255	134*
N-11	-	1096	510*
N-12	-	707	203*
N-13	-	483	114*
N-14	-	291	52*
N-15	-	601	15*
N-16	-	186	6*
N-17	-	2098	369*
Bm-1	32	1000	40*
Bm-2	63	3040	60*
Bm-3	105	600	3*
Bm-4	133	980	0*
Bm-5	143	770	1
Bm-6	160	1400	4
Bm-7	189	1800	0*
Bm-8	225	2200	0*
Bm-9	310	2300	6
Bm-10	312	1700	50

Continua

Continuação da Tabela 3

Linhagens (a)	Nº de origem	Col. testadas	Col. P ⁻
AT-26	2396KS2	400	2
AT-27	AN22	800	800*
AT-28	2380 sl	3300	180*
AT-29	2386 sl	3100	70
AT-30	AN20	2000	0*
AT-31	22175M	3040	3
AT-32	21435	7000	0*
AT-33	2392 KS 2	800	0
AT-35	2197-1	1950	5*
AT-38	Pr 23 (Kauffmann)	3500	3500*

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. As culturas L-1 a 43, resultaram do reisolamento de uma única colônia, decorrente da purificação prévia das referidas culturas. As demais linhagens da série L foram usadas conforme recebidas (mantidas em culturas estocadas), e o controle de pureza foi feito somente após o experimento. As linhagens da série N acham-se estocadas no laboratório há 7 anos.

* Linhagens que tiveram suas colônias P⁺ e P⁻ reclassificadas.



TABELA 4

Ocorrência de colônias P⁻ em outras bactérias proteolíticas

Linhagens (a)	Origem	Col. testadas	Col. P ⁻
<u>Pseudomonas aeruginosa</u>			
	1	576	0
	31	837	0
	33	393	0
	42	707	0
	51	855	0
	52	800	0
	56	637	0
	1851	844	0
	1864	633	0
	1877	1310	0
	1946	914	0
	1957	718	0
	1967	933	0
	2014	642	0
<u>Bacillus subtilis</u>			
	18	437	0
	19	857	0
	26	933	0
	27	645	0
	F ₁	936	0
	F ₁	744	0
	W23	822	0
<u>Bacillus megaterium</u>			
	F	821	0
	F ₁	937	0
	F ₂	810	0

Continua

Continuação da Tabela 4

Linhagens ^(a)	Origem	Col. testadas	Col.P
<u>Bacillus cereus</u>			
	F ₉₁	808	0
	1	1800	0
	2	2100	0
	3	700	0
	4	400	0
<u>Staphylococcus aureus</u>			
	3A 6	3000	0
	3A 10	1970	0
	3A 45	882	0
	13136	4000	0
	196 E	2110	0
	PC 1	1890	0
	4	2700	0

(a) Bactérias relacionadas na Tabela 2.

TABELA 5

Produção de sulfeto de hidrogênio por colônias de
Proteus mirabilis

Linhagens ^(a)	Col. testadas	Col. H ₂ S (-) ^(b)
N-17	1994	0
L-70	1440	0
L-79	2070	0
L-84	1423	0
L-88	965	0
L-91	1280	0
L-124	1745	0
L-125	1726	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. As linhagens N-17, L-79, L-84, L-88 e L-124 são instáveis em relação à excreção de protease (Tabela 3).

(b) A técnica utilizada na detecção de colônias produtoras de H₂S consta de MATERIAL E MÉTODOS, item 6.

TABELA 6

Síntese de urease por colônias de Proteus mirabilis

Linhagens ^(a)	Col. testadas	Col.urease (-) ^(b)
N-17	2070	0
L-70	1700	0
L-79	4597	0
L-84	2070	0
L-88	4318	0
L-91	415	0
L-124	374	0
L-125	236	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. As linhagens N-17, L-79, L-84 e L-124 são instáveis em relação à síntese de protease (Tabela 3).

(b) A técnica de detecção de colônias produtoras de urease consta em MATERIAL E MÉTODOS, ítem 7.

TABELA 7

Ocorrência de células P⁻ em colônias P⁺ de Proteus
mirabilis recentemente isoladas

Linhagens ^(a)	Col.nº	Col. testadas ^(b)	Col. P ⁻
N-17	1	142	0
	2	145	1
	3	145	2
	4	95	0
	5	122	0
	6	158	0
	7	148	0
	8	253	140
	9	151	1
	10	166	0
N-17-1	1	304	2
	2	303	0
	3	712	2
	4	868	0
	5	824	0
	6	963	0
	7	798	0
	8	413	12
	9	166	0
	10	500	0

Continua

Continuação da Tabela 7

Linhagens ^(a)	Col.Nº	Col. testadas ^(b)	Col. P-
N-17-11	1	159	0
	2	259	0
	3	185	0
	4	223	1
	5	170	0
	6	131	0
	7	192	0
	8	173	0
	9	179	0
	10	209	0
N-17-12	1	738	0
	2	910	0
	3	321	0
	4	701	0
	5	820	0
	6	333	0
	7	475	0
	8	638	0
	9	400	0
	10	930	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. As linhagens N-17 e N-17-1 são instáveis em relação à síntese de protease.

(b) De acordo com MATERIAL E MÉTODOS, item 3.2.

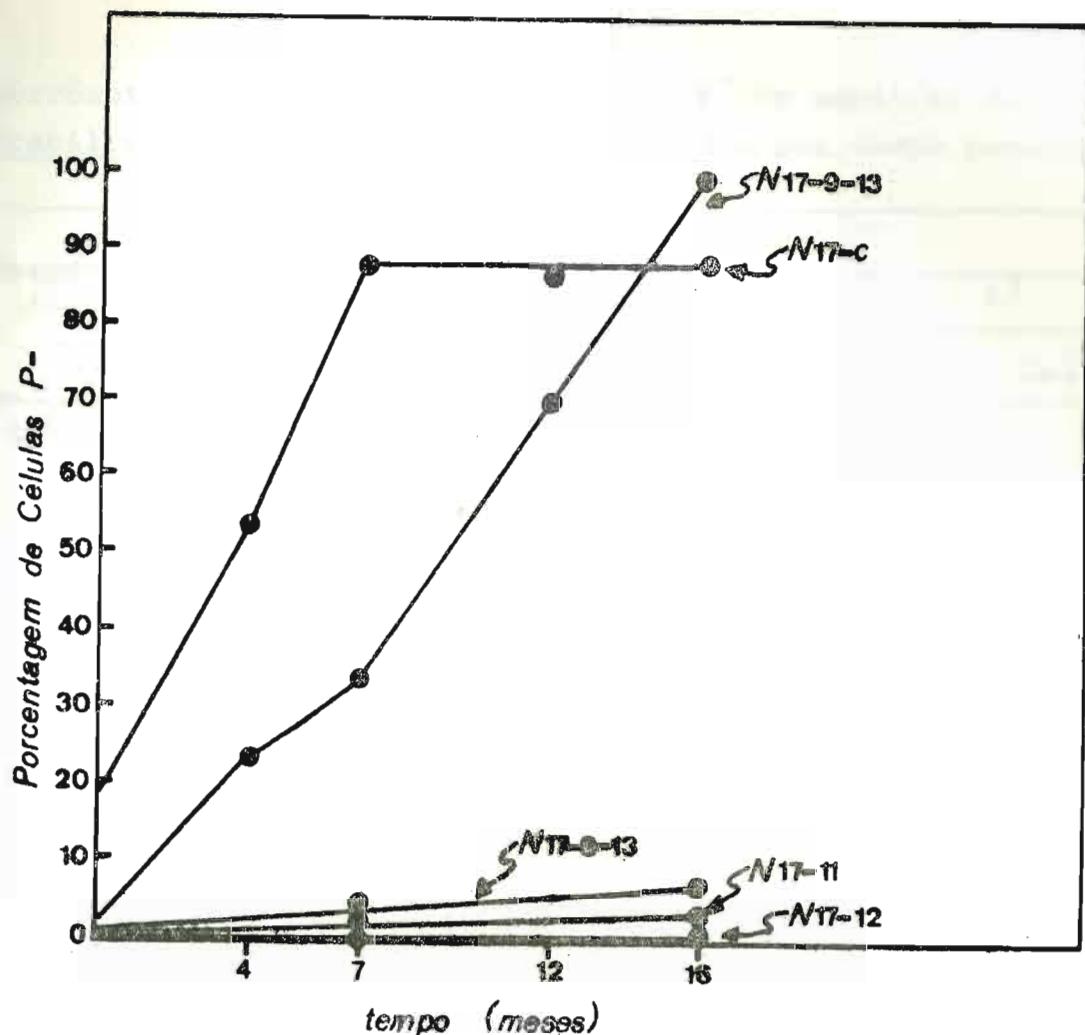


FIGURA 3. Influência da estocagem prolongada, de culturas instáveis em meio nutritivo sólido inclinado, na ocorrência de células P-. Linhagens de *P. mirabilis* foram estocadas em NA inclinado, em temperatura ambiente do laboratório, ao abrigo da luz. As frequências de células P- nas populações foram determinadas no tempo zero, isto é, no momento do inóculo inicial e durante a permanência da cultura em estoque. As linhagens N-17-9-13 e N-17-C são instáveis e as N-17-8-13, N-17-11 e N-17-12 são estáveis em relação ao caráter protease. A determinação do número de células P⁺e P- foi realizada pela técnica de precipitação da gelatina pelo sulfato de amônio, segundo MATERIAL E MÉTODOS, itens 3.2 e 4).

TABELA 8

Ocorrência de célula P⁻ em colônias P⁺ de amostras de Proteus mirabilis estáveis e instáveis, estocadas por tempo prolongado.

Linhagens (a)	Culturas nº	Tempo de estoque (meses) (b)			
		6		12	
		Col.test.	Col.P ⁻	Col.test.	Col. P ⁻
L-22	1	854	2	794	0
	2	1040	7	888	1
	3	775	0	481	1
	4	617	0	838	0
	5	770	8	649	0
	6	743	0	801	2
	7	1024	12	631	2
	8	577	0	680	0
	9	572	0	200	0
	10	1146	26	520	5
L-70	1	659	0	245	0
	2	463	0	319	0
	3	366	0	304	0
	4	318	11	82	5
	5	355	0	350	0
	6	349	0	480	0
	7	246	0	225	0
	8	416	0	610	0
	9	444	0	337	0
	10	458	0	376	0

Continua

Continuação da Tabela 8

Linhagens (a)	Culturas nº	Tempo de estoque (meses)		(b)	
		6		12	
		Col.test.	Col. P ⁻	Col.test.	Col.P ⁻
L-79	1	524	12	687	9
	2	823	501	452	339
	3	877	877	1251	1521
	4	814	0	515	1
	5	1387	3	1100	6
	6	877	0	378	0
	7	558	252	421	314
	8	658	0	774	0
	9	974	0	465	0
	10	385	33	875	43
N-17	1	1312	2	920	6
	5	314	4	420	6
	9	498	5	411	9
	10	768	199	800	300
	11	456	14	717	9
	12	402	0	1646	0
	14	984	414	1791	310
	17	426	54	450	60
	19	582	0	637	0
	21	457	38	719	50
	24	1223	1154	1049	1007

(a) Linhagens referidas na Tabela 1.

(b) As linhagens foram estocadas em agar semi-sólido, contido em frascos do tipo penicilina, fechados com tampa de borracha, e inoculadas pela técnica da picada. As 10 culturas representativas de colônias P⁻, isoladas das linhagens L-22, L-70 e L-79, permaneceram estocadas em agar nutritivo semi-sólido, em temperatura ambiente por 6 e 12 meses, à partir do momento que chegaram ao laboratório. Já no caso da linhagem N-17, a sua chegada ao laboratório foi há 7 anos atrás. As linhagens L-22 e L-70 são estáveis e as L-79 e N-17 são instáveis em relação ao caráter protease.

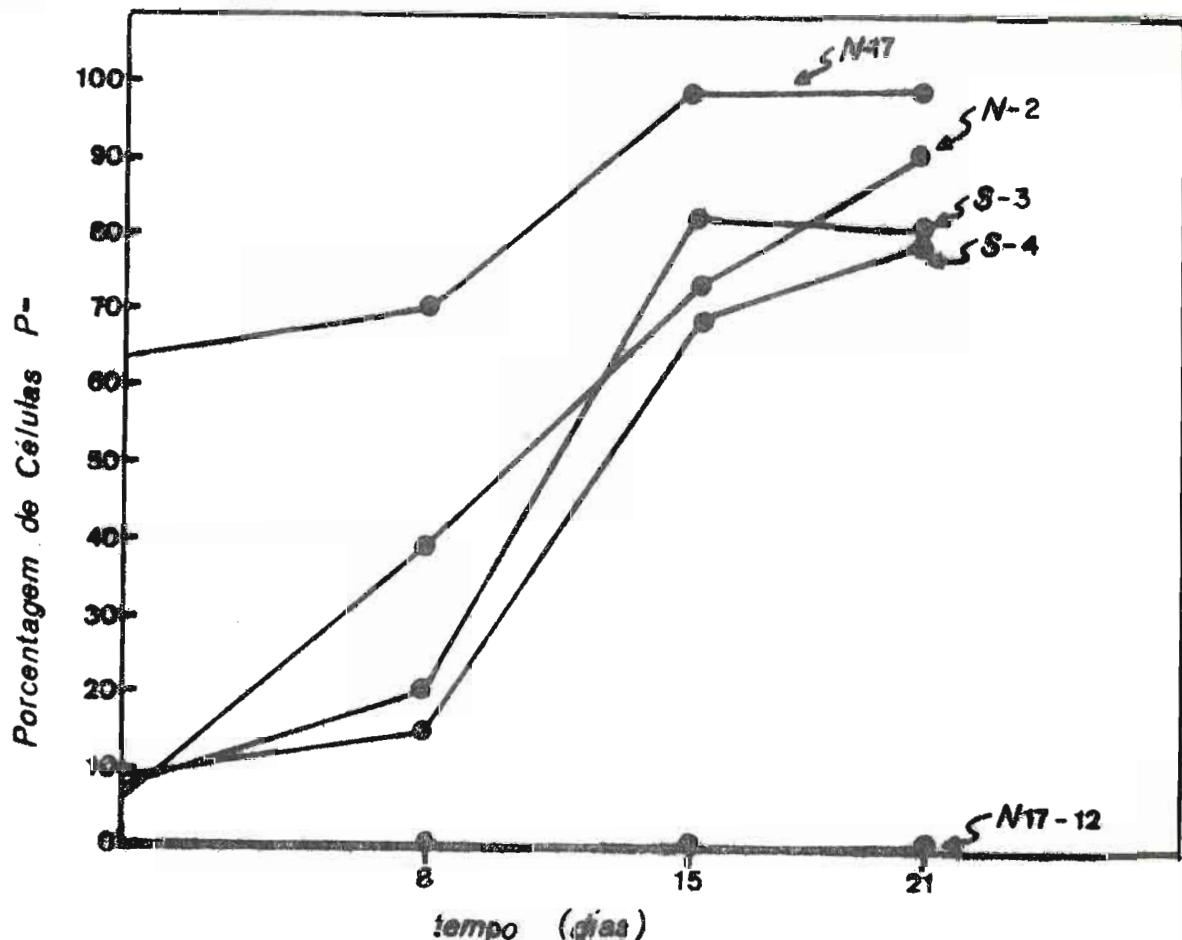


FIGURA 4. Influência da permanência prolongada de culturas em meio nutritivo líquido, na ocorrência de células P⁻, em linhagens de *Proteus mirabilis*. Tubos com tampas de rosquear, contendo 5,0 ml de NB foram semeados com várias linhagens de *P. mirabilis* e a frequência de células P⁻ foi determinada. A seguir, esses tubos de cultura foram mantidos em temperatura constante de 37°C por 21 dias e suas populações P⁺ e P⁻ analisadas pelo método já descrito no item 4 de MATERIAIS E MÉTODOS, em intervalos de aproximadamente uma semana. As linhagens N-17, N-2, S-3 e S-4 são instáveis e a N-17-12 estável, em relação ao caráter protease.

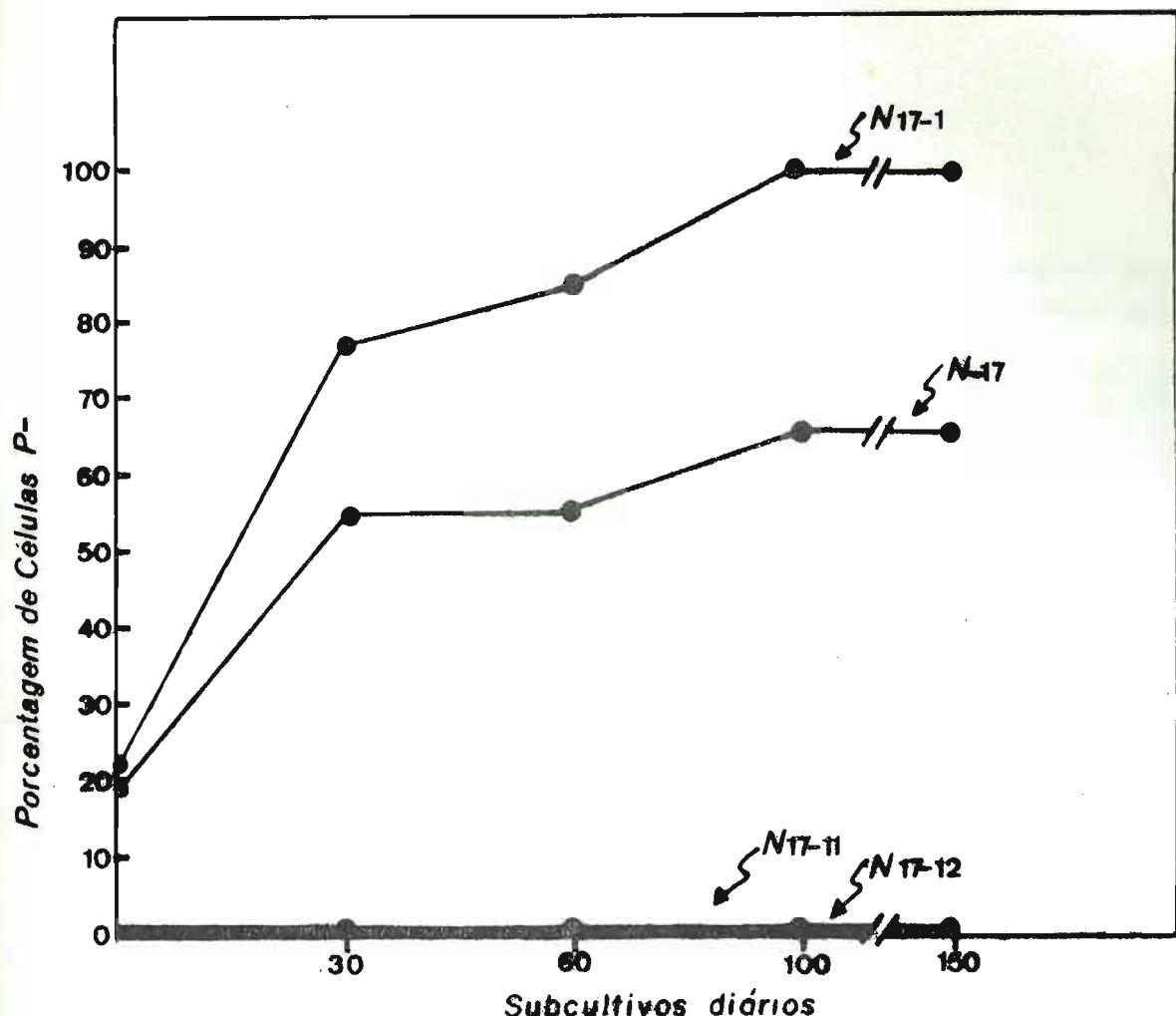


FIGURA 5. Efeito de subcultivos repetidos em meio nutritivo líquido na ocorrência de colônias P^- em linhagens de *Proteus mirabilis*. Tubos contendo 2 ml de NB, serviram para subculturas sucessivas das linhagens. Após a inoculação inicial dessas culturas, foi determinado o número de células P^- (tempo zero). Diariamente foram realizados subcultivos, transferindo-se uma alçada de cultura para meio nutritivo novo e incubado a 37°C. A contagem de células produtoras de protease foram feitas periodicamente, como indicado na figura. As linhagens N-17-1 e N-17 são instáveis e as N-17-11 e N-17-12 são estáveis, em relação ao caráter protease. As contagens de células P^+ e P^- foram feitas pelo processo da precipitação da gelatina, conforme MATERIAL E MÉTODOS, itens 3.2 e 4.

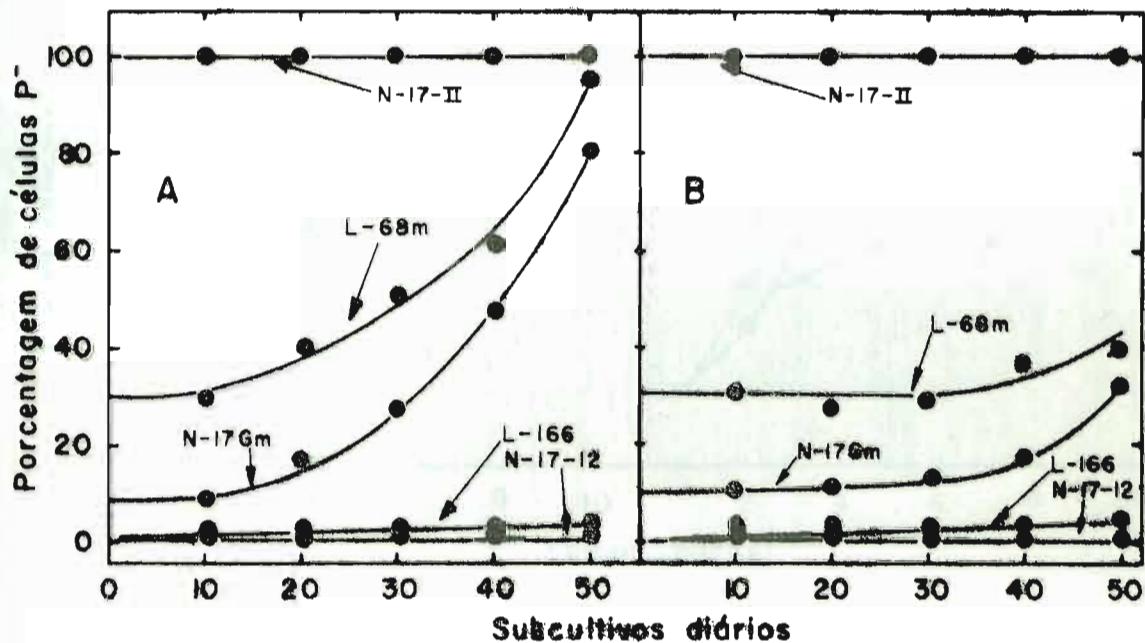


FIGURA 6. Efeito da gelatina, no meio de cultura, na ocorrência de células P- em amostras de *Proteus mirabilis*. Diferentes linhagens foram subcultivadas por repiques sucessivos a cada 24 horas, em caldo nutriente (NB) e em caldo nutriente adicionado de gelatina 0,05% (NBG). A cada 10 dias aliquotas de cada linhagem crescida nos diferentes meios, eram diluidas e incubadas em placas contendo agar nutritivo, adicionado de gelatina (NG), para após cada 24 horas de incubação (37°C), efetuar-se a contagem diferencial de células P⁺ e P⁻, pelo teste do sulfato de amônio (MATERIAL E MÉTODOS, ítems 3.2 e 4). Foram analisadas as linhagens instáveis, L-68 m, N-17 Gm, as linhagens N-17-II, N-17-12 e L-166 que representam populações P⁻ e P⁺ irreversíveis, respectivamente. A curva A representa a frequência de células P⁻ em meio sem gelatina e a curva B, em meio adicionado de gelatina.

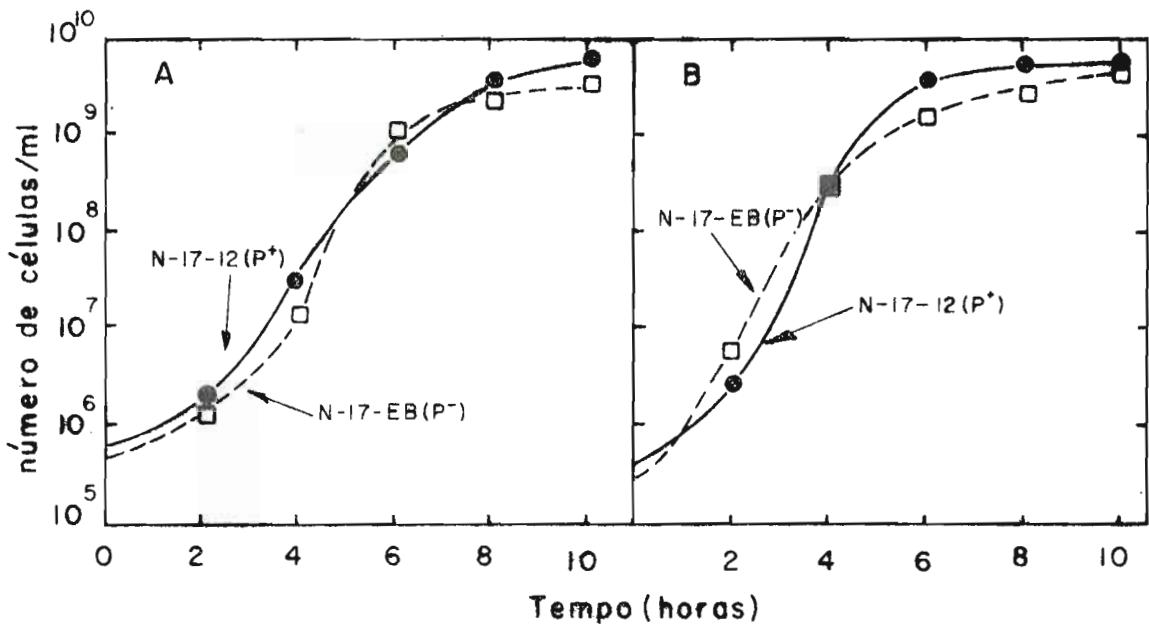


FIGURA 7. Curva de crescimento de células de *Proteus mirabilis* P⁺ e P⁻ em caldo nutritivo glicosado (FIG. 7A) e em caldo nutritivo glicosado adicionado de gelatina (0,5%), representado na figura B. As linhagens P⁺ (N-17-12) e P⁻ (N-17-EB) constituem diferentes clones de uma mesma população (N-17 Gm) e seus caracteres ligados à protease são conhecidamente estáveis. Os tempos de geração de ambas as linhagens foram muito próximos, em cada sistema de cultivo. (MATERIAL E MÉTODOS, itens 14 e 15).

TABELA 9

Teste de reversão espontânea de linhagens P⁻ originárias de
Proteus mirabilis

Linhagens ^(a)	Tubo nº	Col. testadas ^(b)	Col. P ⁺
N-17-II	1	1700	0
	2	800	0
	3	3375	0
	4	2475	0
	5	4633	0
	6	631	0
	7	602	0
	8	1410	0
	9	1825	0
	10	3314	0
N-17-II	1	2610	0
	2	433	0
	3	875	0
	4	4400	0
	5	885	0
	6	805	0
	7	3444	0
	8	603	0
	9	812	0
	10	1250	0

Continua

Continuação da Tabela 9

Linhagens ^(a)	Tubo nº	Col. testadas ^(b)	Col. P ⁺
N-17-VII	1	2875	0
	2	715	0
	3	4480	0
	4	550	0
	5	750	0
	6	818	0
	7	3608	0
	8	495	0
	9	219	0
	10	5420	0
N-17-VIII	1	2833	0
	2	393	0
	3	623	0
	4	715	0
	5	3808	0
	6	1735	0
	7	2818	0
	8	349	0
	9	5501	0
	10	622	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1.

(b) O crescimento confluente resultante da semeadura em meio NG, de 5 estrias representativas do conteúdo de cada tubo e que continha inicialmente, cerca de um centésimo do número de células ali presentes por mililitro, também não mostrou conter nenhum indivíduo P⁺.

TABELA 10

Teste de reversibilidade de linhagens de Proteus mirabilis P,
utilizando o agente mutagênico nitrosoguanidina (NTG)

Linhagens (a)	Tempo (b) (min)	Céls.viáveis (p/ml)	Col.testadas (c)	Col.P ⁺
L-68-2-R-P ⁻	0	$3,0 \times 10^9$	12.325	0
	20	$1,5 \times 10^8$	13.720	0
	25	$2,9 \times 10^7$	12.470	0
	30	$1,2 \times 10^7$	14.214	0
	35	$9,0 \times 10^6$	13.141	0
	40	$9,0 \times 10^6$	13.780	0
	45	$5,5 \times 10^6$	12.070	0
	50	$1,3 \times 10^6$	12.908	0
N-17-I	0	$5,5 \times 10^8$	12.491	0
	20	$7,0 \times 10^7$	13.014	0
	25	$5,0 \times 10^7$	11.327	0
	30	$1,0 \times 10^7$	14.144	0
	35	$9,0 \times 10^6$	13.332	0
	40	$5,0 \times 10^6$	12.202	0
	45	$1,0 \times 10^6$	13.974	0
	50	$1,0 \times 10^6$	12.733	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. (b) A concentração de final de NTG foi de 100 µg/ml, em solução de tris maleico. Não houve diferença nos resultados quando a solução salina usada como diluente do NTG foi substituída por tampão acetato de sódio 0,1M, pH 5,0. (c) O crescimento confluente resultante da semeadura em meio NG, de 5 estrias representativas de cada tempo de ação da droga, e que continham inicialmente cerca de um centésimo do número de células ali presentes por mililitro, também não mostrou conter nenhum indivíduo P⁺.

TABELA 11

Teste de reversibilidade de linhagens de Proteus mirabilis
 P^- , pela ação da luz ultravioleta (a)

Linhagens ^(b)	Exp. nº	Col. testadas ^(c)	Col. P^+
L-68-2-R- P^-	1	14.071	0
	2	11.457	0
N-17-I	1	12.874	0
	2	13.110	0
N-17-II	1	12.120	0
	2	1.780	0
N-17-VII	1	13.273	0
	2	11.017	0

(a) As células foram irradiadas com uma dose de 500 ergs/ mm^2 ;

(b) Linhagens referidas na Tabela 1;

(c) O crescimento confluente resultante da semeadura em meio NG de 5 estrias representativas de cada linhagem irradiada, não mostrou conter nenhum indivíduo P^+ .

TABELA 12

Teste de reversibilidade de células P⁻ de
Proteus mirabilis in vivo

Exp. Nº	Céls P ⁻ inocu- ladas/animal (b)	Animais ino- culados (c)	Animais exa- minados (d)	Céls.P ⁻ testadas (e)	Céls P ⁺
1	1,0x10 ⁹	60	36	3,0x10 ⁴	0
2	7,5x10 ⁸	60	27	2,5x10 ⁴	0
3	5,0x10 ⁸	60	13	1,8x10 ⁴	0
4	2,5x10 ⁸	60	2	8,7x10 ²	0
Total	2,5x10 ⁹	240	78	7,3x10 ⁴	0

(a) Linhagem utilizada: L-68-2-NA-P⁻ (Tabela 1).

(b) Três repetições de cada experimento.

(c) Camundongos pesando entre 18 e 22 g.

(d) Material proveniente de exsudato peritoneal, fígado, baço e rins.

(e) Células cultivadas inicialmente em meio adicionado de tripofano e citrato de ferro amoniacial (MT) e depois replicadas em NG e NG adicionado com ácido nalidíxico (25µg/ml).

TABELA 13

Tratamento pelo brometo de etídeo de linhagens de Proteus mirabilis instáveis quanto à excreção da protease

Linhagens (a)	Exp. nº	Conc. EB (M)	Col.viáveis p/ml	Col.testadas	Col.P ⁻ (b)
N-17	1	$3,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,27 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^7$	482	446
		$3,02 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^7$	325	325
		$2,77 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^7$	510	403
		0	$2,5 \times 10^{10}$	680	191
	2	$3,02 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$2,77 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^7$	355	326
		$2,52 \times 10^{-3}$	$2,1 \times 10^7$	700	620
		0	$3,1 \times 10^9$	510	130
	3	$2,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$2,26 \times 10^{-3}$	$2,6 \times 10^6$	1047	620
		$1,76 \times 10^{-3}$	$2,2 \times 10^7$	773	773
		$1,26 \times 10^{-3}$	$1,7 \times 10^7$	773	640
		0	$3,0 \times 10^9$	805	300
N-4	1	$3,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,27 \times 10^{-3}$	$1,6 \times 10^7$	1894	1894
		$2,77 \times 10^{-3}$	$2,8 \times 10^7$	1033	1033
		$2,26 \times 10^{-3}$	$3,6 \times 10^7$	1711	1711
		0	$1,8 \times 10^9$	1400	100
	2	$3,60 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,52 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^6$	1671	1600
		$3,27 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^7$	2033	1580
		$2,77 \times 10^{-3}$	$4,0 \times 10^7$	3100	1330
		$2,26 \times 10^{-3}$	$2,9 \times 10^7$	1800	620
		0	$2,1 \times 10^9$	1800	120

(a) Linhagens referidas na Tabela 1; (b) Cerca de 50 colônias P⁻, resultantes do tratamento pela droga, foram cultivadas em caldo nutritivo e reexaminadas para confirmação dos fenótipos antes de serem estocadas.

TABELA 14

Tratamento pelo brometo de etídeo de linhagens de Proteus mirabilis estáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Exp. nº	Conc. EB (M)	de Col.viáveis p/ml	Col.testadas	Col.P
N-17-11	1	$3,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,27 \times 10^{-3}$	$1,8 \times 10^6$	1337	65
		$2,27 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^7$	2020	120
		$2,26 \times 10^{-3}$	$3,1 \times 10^7$	1994	30
		0	$3,0 \times 10^9$	2000	0
	2	$3,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,27 \times 10^{-3}$	$6,0 \times 10^6$	890	12
		$2,27 \times 10^{-3}$	$5,0 \times 10^7$	1700	0
		$2,26 \times 10^{-3}$	$4,8 \times 10^7$	1010	8
		0	$2,3 \times 10^9$	980	0
N-17-12	1	$3,60 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,52 \times 10^{-3}$	$1,0 \times 10^5$	1182	12
		$3,27 \times 10^{-3}$	$1,5 \times 10^6$	1720	6
		$2,27 \times 10^{-3}$	$1,9 \times 10^7$	1300	3
		$2,26 \times 10^{-3}$	$2,7 \times 10^7$	990	0
		0	$1,9 \times 10^9$	2010	0
	2	$3,52 \times 10^{-3}$	0	0	0
		$3,27 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^6$	1090	0
		$2,27 \times 10^{-3}$	$7,0 \times 10^7$	3008	0
		$2,26 \times 10^{-3}$	$8,0 \times 10^7$	1710	0
		0	$4,3 \times 10^9$	1720	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1.

TABELA 15

Efeito do dodecil-sulfato de sódio (SDS), sobre linhagens de Proteus mirabilis, instáveis e estáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Tempo (h)	Conc. SDS (mg/ml)	Céls viáveis p/ml	Col. test.	Col.P (b)
L-68 m	24	0	$4,0 \times 10^9$	881	49
		0,58	$1,1 \times 10^9$	707	57
		1,17	$1,8 \times 10^8$	990	64
		2,34	$4,2 \times 10^7$	708	68
		4,68	$9,4 \times 10^6$	960	600
	48	0	$4,8 \times 10^9$	591	61
		0,58	$1,5 \times 10^9$	93	75
		1,17	$3,1 \times 10^8$	727	80
		2,34	$1,7 \times 10^7$	590	369
		4,68	$2,7 \times 10^5$	780	750
L-68-1-P ⁺	24	0	$2,7 \times 10^9$	564	2
		0,58	$3,0 \times 10^8$	701	5
		1,17	$8,1 \times 10^7$	907	1
		2,34	$2,8 \times 10^6$	861	0
		4,68	$1,7 \times 10^4$	498	0
	48	0	$4,8 \times 10^9$	668	0
		0,58	$8,7 \times 10^7$	262	2
		1,17	$2,6 \times 10^5$	771	1
		2,34	$2,4 \times 10^4$	305	0
		4,68	$1,9 \times 10^2$	471	1

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 m é instável em relação à excreção de protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é estável em relação a esse caráter. (b) Cerca de 50 colônias P⁻, obtidas dos tubos correspondentes à concentração 4,68mg/ml, foram cultivadas e testadas repetidas vezes, para a comprovação dessa característica.

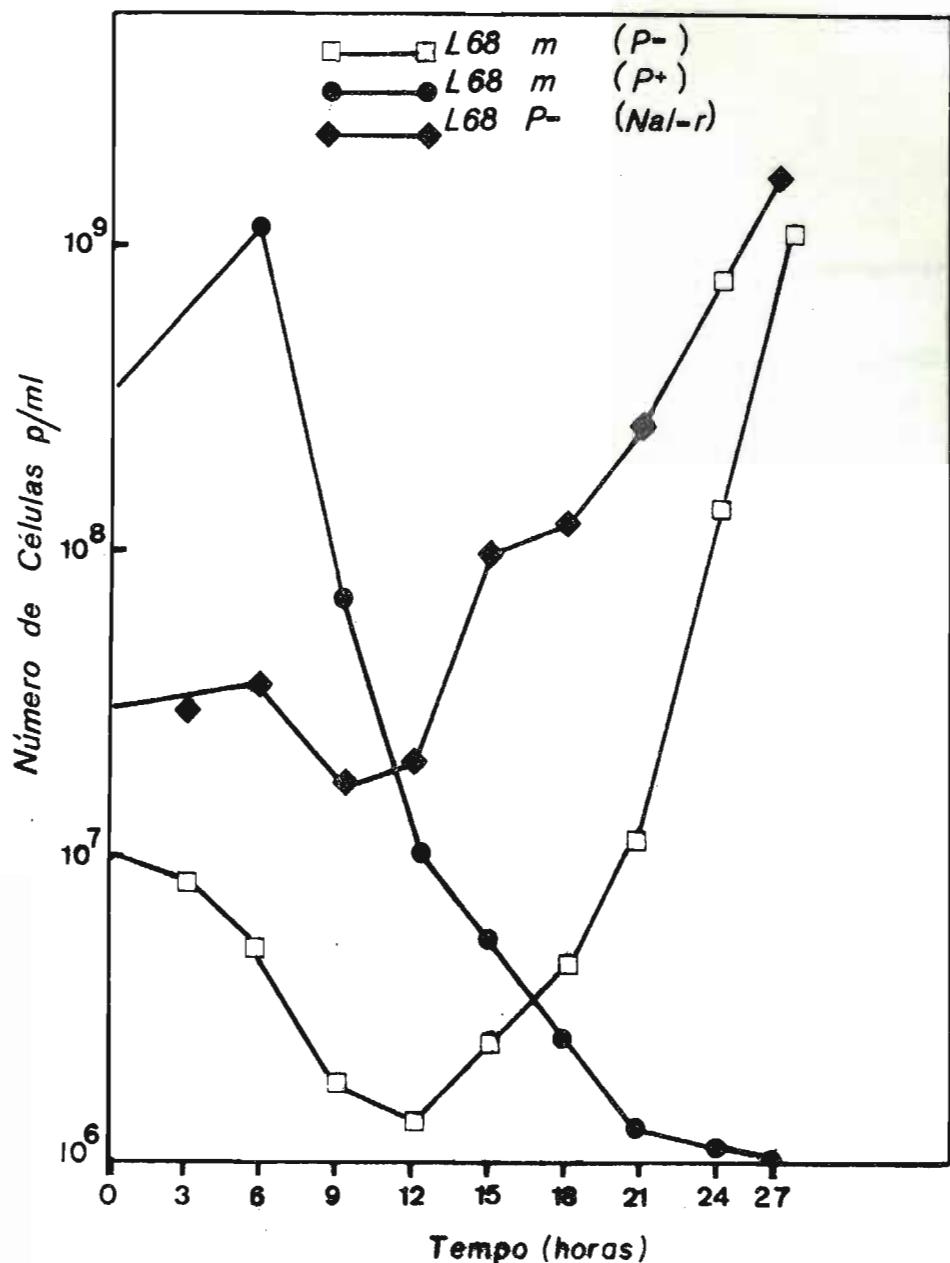


FIGURA 8. Efeito do dodecil sulfato de sódio (SDS) na conversão de células P^+ em P^- de *Proteus mirabilis* (L-68 m). Células de *P. mirabilis* L-68 m (população mista, P^+ e P^-) e células da linhagem L-68-2-NA-P $^-$ foram cultivadas em NB, pH 7,6, adicionado de SDS (4%) por 27 horas a 37°C. Após cada tempo de cultivo, indicado na figura, as células foram identificadas pelo comportamento, em relação à excreção da protease e resistência ao ácido nalidíxico. (MATERIAL E MÉTODOS, ítem 26).

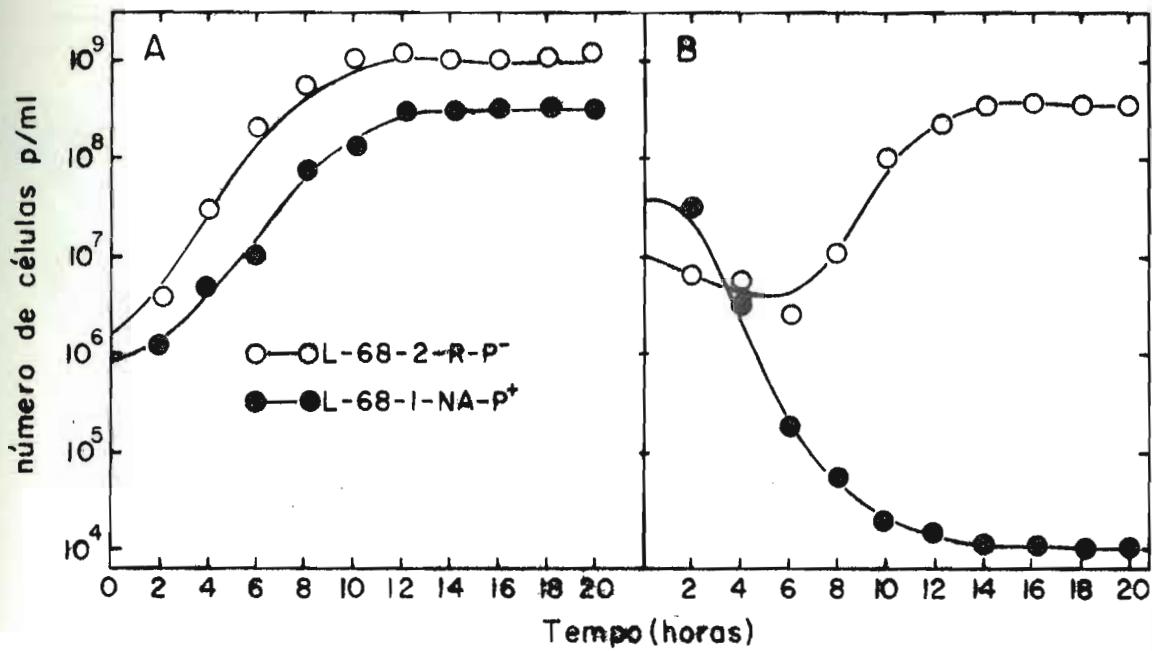


FIGURA 9. Curva de crescimento de células P^+ e P^- de *P. mirabilis* em NB com e sem SDS. As linhagens L-68-2-R-P- e L-68-1-NA-P+ foram cultivadas em NB (Fig. A) e em NB adicionado de SDS (4%), (Fig. B). Essas linhagens constituem diferentes clones de uma mesma população (L-68 m) e diferem quanto à excreção de protease. (MATERIAL E MÉTODOS, ítem 27).

TABELA 16

Ação da acriflavina (AF) no aparecimento de células P⁻, em linhagens de Proteus mirabilis estáveis e instáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Conc. (mg/ml)	Céls.viáveis (p/ml)	Col.testadas	Col.P ⁻
L-68 m	0	2,0x10 ⁹	880	60
	0,019	3,7x10 ⁷	925	88
	0,039	1,8x10 ⁶	678	100
	0,078	3,3x10 ⁴	715	418
	0,156	1,2x10 ³	148	80
	0,312	2,4x10 ³	234	232
L-68-1-P ⁺	0	3,0x10 ⁹	1100	6
	0,019	3,1x10 ⁹	1870	4
	0,039	2,7x10 ⁸	890	0
	0,078	1,8x10 ⁶	2010	1
	0,156	1,4x10 ⁴	780	0
	0,312	2,7x10 ³	520	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 m é instável em relação à excreção da protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é relativamente estável. Colônias P⁻ obtidas pela ação da AF, foram submetidas a transferência e pela técnica do carimbo de LEDERBERG & LEDERBERG (1952), em meio NG sem a droga e a seguir retestadas para o referido caráter.

TABELA 17

Efeito da mitomicina C (MC) no aparecimento de células P⁻, em linhagens de Proteus mirabilis instáveis e estáveis quanto à excreção de protease

Linhagens ^(a)	Conc. (mg/ml)	Céls.viáveis (p/ml)	Col. testadas	Col. P ⁻
L-68 m	0	$1,7 \times 10^9$	480	31
	0,5	$1,0 \times 10^9$	714	77
	1,0	$1,7 \times 10^7$	670	105
	1,5	$5,1 \times 10^5$	1850	1850
	2,0	$3,1 \times 10^2$	135	135
L-68-1-P ⁺	0	$4,0 \times 10^9$	780	3
	0,5	$1,0 \times 10^9$	765	0
	1,0	$2,3 \times 10^7$	1036	8
	1,5	$2,8 \times 10^5$	900	2
	2,0	$6,2 \times 10^3$	180	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. A linha em L-68 m é instável em relação à excreção de protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é relativamente estável para esse caráter.

TABELA 18

Ação da rifampicina (Rif) no aparecimento de células P⁻, em linhagens de Proteus mirabilis instáveis e estáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Exp. nº	Conc. (mg/ml)	Col.viáveis (p/ml)	Col.testadas	Col.P ⁻
L-68 m	1	0	$1,9 \times 10^9$	788	280
		0,31	$1,1 \times 10^9$	453	195
		0,62	$1,4 \times 10^9$	331	258
		1,24	$1,7 \times 10^9$	893	890
L-68 m	2	0	$2,8 \times 10^9$	210	80
		0,78	$1,4 \times 10^9$	440	328
		1,56	$1,7 \times 10^9$	472	432
		3,12	$4,6 \times 10^8$	1700	1700
L-68-1-P ⁺	1	0	$4,0 \times 10^9$	750	4
		0,15	$3,4 \times 10^9$	450	2
		0,31	$1,7 \times 10^6$	490	0
		0,62	$2,0 \times 10^3$	156	0
		1,24	$1,7 \times 10^2$	304	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 m é instável em relação à excreção de protease e a L-68-1-P é relativamente estável. Colônias P⁻ obtidas pela ação da Rif, foram submetidas à transferência pela técnica do carimbo de LEDERBERG & LEDERBERG (1952) em meio NG sem a droga, e a seguir retestadas para o referido caráter.

TABELA 19

Tratamento pelo cloridrato de guanidina (GuHCl) de linhagens de Proteus mirabilis instáveis e estáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Conc. (mg/ml) GuHCl	Céls. viáveis (p/ml)	Col. testadas	Col. P-
L-68 m	0	$2,3 \times 10^9$	480	41
	15	$2,0 \times 10^9$	700	36
	20	$1,1 \times 10^9$	790	52
	25	$6,0 \times 10^8$	1040	93
	30	$4,0 \times 10^8$	1075	39
	35	$1,0 \times 10^8$	810	17
	40	$3,0 \times 10^7$	911	41
	45	$9,0 \times 10^6$	1141	39
	50	$2,0 \times 10^5$	707	47
L-68-1-P ⁺	0	$1,7 \times 10^9$	781	3
	15	$1,7 \times 10^9$	700	6
	20	$4,0 \times 10^8$	1020	0
	25	$5,0 \times 10^7$	1060	0
	30	$1,0 \times 10^7$	380	1
	35	$6,0 \times 10^6$	1220	4
	40	$1,8 \times 10^6$	991	0
	45	$7,0 \times 10^5$	603	3
	50	$1,0 \times 10^4$	488	0

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. A linhagem L-68 m é instável em relação à excreção de protease. A linhagem L-68-1-P⁺ é relativamente estável a esse caráter.

TABELA 20

Tratamento pela elevação da temperatura de cultivo, de linhagens de Proteus mirabilis instáveis quanto à excreção de protease

Linhagens (a)	Exp. nº	Temperatura de cultivo (°C)							
		37		40		42		44	
		Col. test.	P-	Col. test.	P-	Col. test.	P-	Col. test.	P-
L-68 m	1	4580	1370	12000	1920	3251	590	8200	1950
	2	6000	1880	4120	910	1311	300	4700	960
	3	4370	1248	1752	370	6020	1640	1110	380
N-17 Gm	1	5800	1471	3121	400	7100	1500	2100	490
	2	4400	890	1113	290	4920	860	1880	450
	3	11180	2600	6800	1700	7100	1780	6000	1040

(a) Linhagens referidas na Tabela 1. As linhagens L-68 m e N-17 Gm são instáveis em relação à excreção da protease.

TABELA 21
 Influência de células P⁺ de Proteus mirabilis^(a) na
 sobrevivência de camundongos^(b)

Nº de céls P ⁺ inocula- das em 0,2 ml	Exp. nº	Dias de observação/animais mortos													Nº de animais inocula- dos (c)	Nº de animais mortos
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
$1,0 \times 10^9$	1	20	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	20
	2	14	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	15
	3	14	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	14
	total	48	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	49
$7,5 \times 10^8$	1	18	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	20	19
	2	12	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	20	13
	3	15	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	16
	total	45	0	1	0	0	0	2	0	0	0	0	0	0	60	48
$5,0 \times 10^8$	1	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	16
	2	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	20	9
	3	11	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	11
	total	35	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	60	36
$2,5 \times 10^8$	1	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	3
	2	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	2
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	total	5	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	5
controle (salina tamponada) (d)	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	total	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
controle (céls mor- tas/calor)																
$1,0 \times 10^9$	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	20	2
$7,5 \times 10^8$	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	20	2

(a) Linhagem utilizada: L-68-1-NA-P⁺; (b) Inoculação pela via intraperitoneal; (c) o peso dos animais variou de 18 a 22 gramas; (d) solução salina tamponada, segundo MATERIAL E MÉTODOS (ítem 2.2).

TABELA 22

Determinação da DL_{50} utilizando dados da Tabela 21, pelo método de acumulação de resultados de Reed & Muench (MUSHEL & TREFFERS, 1938)

Dose $\times 10^8$	Nº de animais inoculados	Nº de animais mortos	Nº de animais sobreviventes	Acumulados			Total de mortos	% de morta- lidade
				mortos	sobrevi- entes	Total de animais		
2,5	60	5	55	5	55	55	102	107 4,67
5,0	60	36	24	41	24	41	47	88 46,59
7,5	60	48	12	89	12	89	23	112 79,46
10,0	60	49	11	138	11	138	11	149 92,61

$$DL_{50} = 5,26 \times 10^8 \text{ células por ml.}$$

TABELA 23
 Influência de células P⁻ de Proteus mirabilis^(a) na
 sobrevivência de camundongos^(b)

Nº de céls P ⁻ inocula- das em 0,2 ml	Exp. nº		Dias de observação/animais mortos												Nº de animais inocula- dos (c)	Nº de animais mortos	
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13		
$1,0 \times 10^9$	1		18	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	18
	2		7	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	20	10
	3		8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	8
	total		33	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	60	36
$7,5 \times 10^8$	1		12	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	20	16
	2		3	1	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	1	20	7
	3		4	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	4
	total		19	2	1	2	0	1	0	1	0	0	0	0	1	60	27
$5,0 \times 10^8$	1		9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	9
	2		1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	1
	3		3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	3
	total		13	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	13
$2,5 \times 10^8$	1		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	2
	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	total		2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	2
controle (salina tamponada)	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	2		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	3		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
	total		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	60	0
controle (céls mor- tas/calor)	1		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	20	0
$1,0 \times 10^9$																	

(a) Linhagem utilizada: L-68-2-NA-P⁻; (b) Inoculação pela via intraperitoneal; (c) o peso dos animais variou de 18 a 22 g; (d) solução salina tamponada, segundo MATERIAL E MÉTODOS (ítem 2.2).

TABELA 24

Determinação da DL₅₀ utilizando dados da Tabela 23, pelo método de acumulação de resultados de Reed & Muench (MUSHEL & TREFFERS, 1938)

Dose $\times 10^8$	Nº de animais inoculados	Nº de animais mortos	Nº de animais sobreviventes	Acumulados		Total de mortais	% de mortalidade
				mortos	sobrevidentes		
2,5	60	2	58	2	162	164	1,22
5,0	60	13	47	15	104	119	12,60
7,5	60	27	33	42	57	99	42,42
10,0	60	36	24	78	24	102	76,47

$$DL_{50} = 8,05 \times 10^8 \text{ células por ml.}$$

TABELA 25

Influência de plasmídeos R, de resistência múltipla transferível, na excreção de protease em hospedeiros de Proteus mirabilis

Linhagens ^(a)	Exp. Nº	Atividade proteolítica exocelular (UP/ml/mg de proteína) ^(b)
L-68-73-P ⁺	1	3,9
	2	3,9
	3	3,9
L-68-79-P ⁺ (R)	1	2,1
	2	2,1
	3	2,2
L-68-81-P ⁻	1	0
	2	0
	3	0

- (a) A linhagem L-68-79-P⁺ (R) possue os marcadores plasmidiais (Sm, Km, Ap, Hg) e a transferibilidade dessas marcas de resistência pode ser constatada na Tabela 26. As características mais relevantes dessas linhagens acham-se na Tabela 1. O significado das marcas de resistência encontra-se em "Abreviaturas e Símbolos".
- (b) Atividade proteolítica foi determinada pelo método de CHARNEY & TOMARELLI (1947); UP: unidade de protease que foi definida como sendo a quantidade de enzima necessária para digerir 500 µg/ml do substrato azocazeina, a 38°C em 30 minutos. (MATERIAL E MÉTODOS, ítem 3.4).

TABELA 26

Transferência da informação genética, por conjugação^(a),
do plasmídeo R da linhagem L-68-79-P⁺-R^(b) para Proteus
mirabilis

Linhagens recep- toras ^(b)	Exp. Nº	Frequência de transferência (c)	Modelos transferidos
N-17 G P ⁻ Rif ^R	1	1,2x10 ⁻⁵ 2,0x10 ⁻⁵ 5,1x10 ⁻⁵ 3,5x10 ⁻⁶ 2,1x10 ⁻⁶ 1,8x10 ⁻⁶	Sm Sm Km Sm Hg Sm Km Ap Sm Km Ap Hg Sm Km Hg
N-17 G P ⁻ Rif ^R	2	2,8x10 ⁻⁵ 3,1x10 ⁻⁵ 1,7x10 ⁻⁴ 4,2x10 ⁻⁶ 1,7x10 ⁻⁵ 1,0x10 ⁻⁶	Sm Sm Km Sm Hg Sm Km Ap Sm Km Ap Hg Sm Km Hg
N-17 G P ⁻ Rif ^R Str ^R	3	1,0x10 ⁻⁵ 1,9x10 ⁻⁵ 2,5x10 ⁻⁵ 1,0x10 ⁻⁵ 2,1x10 ⁻⁶ 3,5x10 ⁻⁶	Sm Sm Km Sm Hg Sm Km Ap Sm Km Ap Hg Sm Km Hg

(a) Método de conjugação em meio sólido; (b) linhagem derivada de amostra L-68 m contendo plasmídeo R (Sm, Km, Ap, Hg); (c) as frequências de transferência foram calculadas por células doado ra.

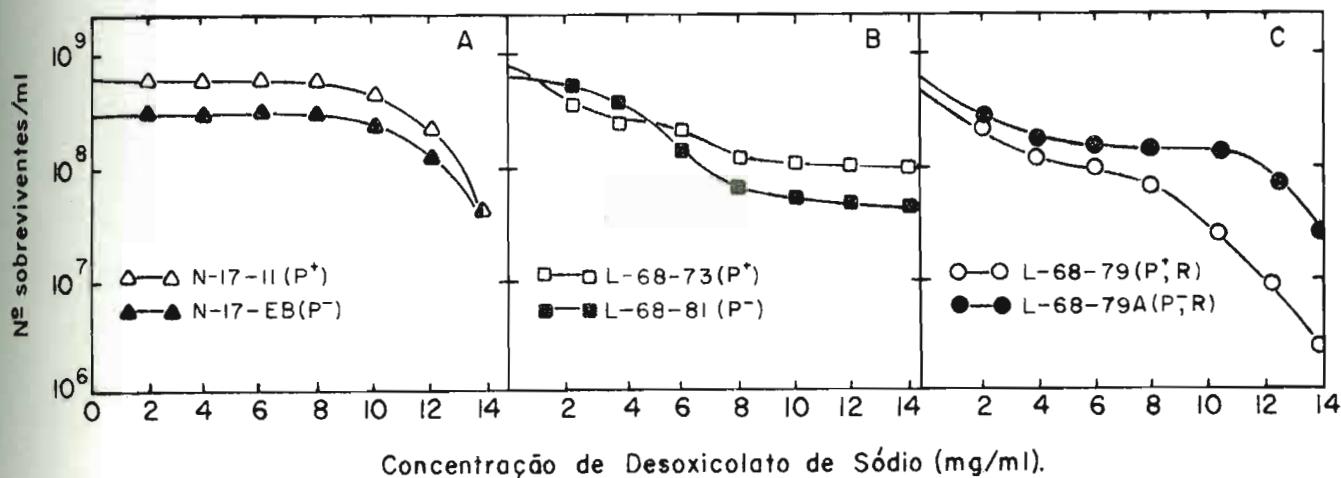


FIGURA 10. Sensibilidade ao desoxicólico de sódio (DS) de linhagens de *Proteus mirabilis* abrigando plasmídeo R. Linhagens proteolíticas e não proteolíticas, abrigando ou não plasmídeos R foram testadas quanto as suas sensibilidades ao DS. As linhagens constam na Tabela 1. As linhagens da Fig. A tiveram origem comum (N-17) e diferem apenas na capacidade de excretar a enzima proteolítica. As linhagens das Figs. B e C também tiveram origem numa mesma população (L-68 m) e diferem entre si na capacidade de excretar a enzima e hospedar plasmídeos R. A linhagem L-68-79 (P⁺, R), excreta a metade do teor de protease, quando comparada com a L-68-73 (P⁺) (Tabela 25). A linhagem L-68-73 (P⁺), não foi capaz de transferir seus marcadores de resistência ao cloranfenicol e tetraciclina para outras linhagens de *P. mirabilis* (Tabela 27).

TABELA 27

Experimentos de transferência da informação genética, por conjugação, de plasmídeos R de linhagem L 68-73 (P^+)^(b) para Proteus mirabilis

Linhagem receptora	Exp.Nº	Frequência de transferência
N-17 G P ⁻ Rif ^R	1	$<10^{-8}$
	2	$<10^{-9}$
N-17 G P ⁻ Rif ^R Str ^R	1	$<10^{-8}$
	2	$<10^{-9}$

(a) Método de conjugação em meio sólido.

(b) Linhagem derivada da amostra L-68 m. A frequência de transferência foi calculada por célula doadora.

TABELA 28

Amostras de vírus obtidos por indução de amostras lisogênicas

Linhagens sensíveis (a)	Linhagens induzidas (b)								
	25	27	30	33	68	92	101	113	114
65					x	x		x	
73					x	x		x	
80					x	x		x	
81	x	x			x	x	x	x	
82			x	x					
88							x		
99					x	x			
100					x	x			
104					x	x			
107									
109								x	
113									
124					x	x			
125									
126					x	x			
127					x	x		x	

(a) 60 amostras da série L (Tabela 1) sofreram indução por cultivo por tempo prolongado, ação da luz ultra violeta, mitomicina C ou temperatura elevada e cada um dos sobrenadantes foi testado diante das mesmas 60 amostras da série L;

(b) Tipos de vírus; 25/81; 27/81; 30/82; 33/82; 101/88; 113/81; 114/65; 114/65; 114/73; 114/80; 114/81; 114/109; 114/27; os vírus 68 e 92 têm como hospedeiros as amostras 65; 73; 80; 81; 99; 100; 104; 124; 126; 127. Aparentemente os vírus 25, 27 e 113; 30 e 33; 68 e 92 são iguais entre si.

TABELA 29

Indução de profagos de células P⁺ e P⁻ de amostras de
Proteus mirabilis (a)

Linhagens induzidas (b)	Linhagens sensíveis (c)
L-68-1-P ⁺	65 73 80 81 99 100 104 124 126 127
L-68-2-P ⁻	65 73 80 81 99 100 104 124 126 127
L-114-P ⁺	65 73 80 81 109 127
L-114-P ⁻	65 73 80 81 109 127
L-101-P ⁺	88
L-101-P ⁻	88

(a) Agentes indutores da eliminação de profagos: cultivo por tempo prolongado; temperatura elevada; luz ultravioleta; mitomicina C.

(b-c) Linhagens da série L relacionadas na Tabela 1.

TABELA 30

Investigação da ocorrência de conversão lisogênica na determinação dos fenótipos P⁺ e P⁻ em amostras de Proteus mirabilis

Linhagens ^(a)	Vírus ^(b)				Teste da protease ^(c)	
	25	68	113	114	L-81	(25) P ⁺
L-81 P ⁺	L-81	(25)			L-81	(25) P ⁺
	L-81	(68)			L-81	(68) P ⁺
	L-81	(113)			L-81	(113) P ⁺
	L-81	(114)			L-81	(114) P ⁺
L-81 P ⁻	L-81	(25)			L-81	(25) P ⁻
	L-81	(68)			L-81	(68) P ⁻
	L-81	(113)			L-81	(113) P ⁻
	L-81	(114)			L-81	(114) P ⁻
L-90 P ⁺	L-90	(68)			L-90	(68) P ⁺
L-90 P ⁻	L-90	(68)			L-90	(68) P ⁻
L-100 P ⁺	L-100	(68)			L-100	(68) P ⁺
L-100 P ⁻	L-100	(68)			L-100	(68) P ⁻
L-104 P ⁺	L-104	(68)			L-104	(68) P ⁺
L-104 P ⁻	L-104	(68)			L-104	(68) P ⁻
L-124 P ⁺	L-124	(68)			L-124	(68) P ⁺
L-124 P ⁻	L-124	(68)			L-124	(68) P ⁻
L-127 P ⁺	L-127	(68)			L-127	(68) P ⁺
L-127 P ⁻	L-127	(68)			L-127	(68) P ⁻

(a) Linhagens referidas na Tabela 1.

(b) Vírus relacionados na Tabela 28. O número entre parênteses corresponde ao vírus para o qual a linhagem é lisogênica.

(c) Método da precipitação pelo sulfato de amônio (MATERIAL E MÉTODOS, ítem 3.2).

TABELA 31

Teste de detecção de pseudolisogenia (estado de portador) em linhagens de Proteus mirabilis, estáveis e instáveis em relação à excreção de protease

Nº de linhagens testadas (a)	Número de placas examinadas (b)	u.f.p. espontâneas (c)
60	600	0

- (a) Linhagens da série L que também serviram para liberar profagos pela ação de indutores físicos e químicos que constam da Tabela 28.
- (b) Placas examinadas, significam placas contendo meio LB sólido, pela técnica descrita no ítem 42 de MATERIAL E MÉTODOS.
- (c) Unidades formadoras de placas de lise.

TABELA 32

Experimentos de transdução do caráter protease em Proteus mirabilis

Fago ^(a)	Linhagens receptoras ^(b)	Exp. ^(c) nº	Frequência de transdução/ n.p.f. adsorvidas ^(d)
25/81 P ⁺	L-81-P ⁻	1	$1,4 \times 10^{-9}$
		2	$3,2 \times 10^{-9}$
30/82 P ⁺	L-82-P ⁻	1	-
		2	-
68/73 P ⁺	L-73-P ⁻	1	$1,8 \times 10^{-9}$
		2	$1,8 \times 10^{-9}$
101/88 P ⁺	L-88-P ⁻	1	-
		2	-
113/109 P ⁺	L-109-P ⁻	1	$< 10^{-9}$
		2	$< 10^{-9}$

(a) Relacionados na Tabela 28;

(b) Relacionadas na Tabela 1; os experimentos de números 1 foram realizados pela técnica de COETZEE & SACKS(1960^b) e os de números 2 pela técnica de COETZEE (1974);

(d) 95% das partículas de fago adsorveram-se na bactéria receptora. A multiplicidade de infecção (m.o.i.) nos experimentos números 1, foi 1,0 e nos números 2, foi 0,5.

TABELA 33

Transferência, por conjugação, do plasmídeo RP4 de E.coli J 53 para Proteus mirabilis^(a)

Linhagens receptoras ^(b)	Exp. Nº	Droga usada para seleção	Frequência de transferência
N-17 G P ⁻ Rif ^R Str ^R	1	Km	$1,0 \times 10^{-4}$
	2	Tc	$4,5 \times 10^{-5}$
N-17 Gm	1	Km	$1,0 \times 10^{-4}$
	2	Tc	$3,5 \times 10^{-4}$
	3	Tc	$5,3 \times 10^{-4}$

(a) Método de conjugação em meio sólido. A frequência de transferência foi calculada considerando o número de células receptoras contendo RP4, dividida pelo número de células doadoras presentes no início da transferência.

(b) Linhagens referidas na Tabela 1.

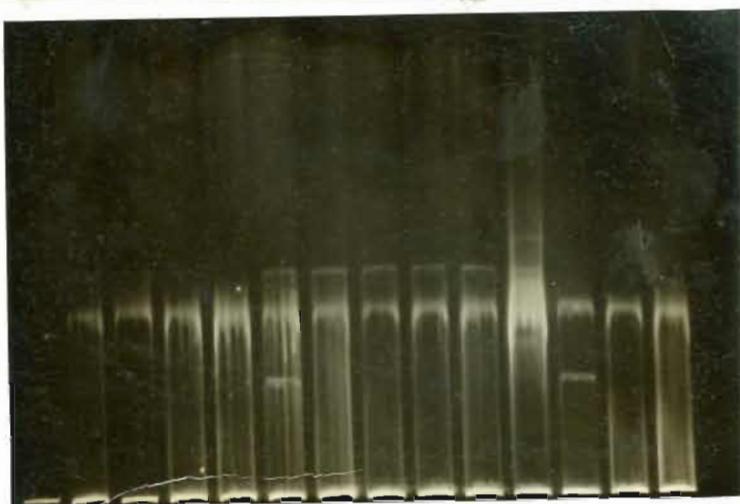


FIGURA 11. Eletroforese em gel de agarose de transconjugantes de *Proteus mirabilis* que receberam o plasmídeo RP4 de *E. coli*. Eletroforese em gel de agarose vertical foi realizada, conforme MATERIAL E MÉTODOS, ítem 54. As corridas eletroforeticas correspondentes a 14 linhagens bacterianas estão numeradas: 1) N-17 Gm (população mista P⁺ e P⁻); 2) N-17 G P⁻Rif^RStr^R; 3) *E. coli* J 53 (RP4); 4 a 9) N-17 G P⁺ (RP4); 10) N-17 G-10 P⁻ (Sm, Km, Hg) Rif^R; 11) N-17 G-134-P⁻ (Sm, Hg) Rif^R; 12) N-17 G-7-P⁻ (RP4) Rif^RStr^R; 13) L-68-73 P⁺ (Cm, Tc); 14) L-68-79 P⁺ (Sm, Km, Ap, Hg). As linhagens de *P. mirabilis* numeradas de 4 a 9 e 12 são transconjugantes que receberam o plasmídeo RP4 de *E. coli*. As linhagens de 4 a 9 são P⁺ e a 12 é P⁻. Nota-se dissociação do plasmídeo RP4 em 4 bandas na linhagem nº 4, em 3 bandas na nº 9 e em 2 bandas na nº 12. As linhagens de número 5 a 8 mostraram só uma banda que é comum a todos os demais citados. As linhagens 1, 2 e 3 servem como controle, já que N-17 Gm e N-17 G P⁻ Rif^RStr^R constituem parentais que foram conjugadas com *E. coli* J 53 (RP4).

TABELA 34

Mobilização do caráter protease pelo plasmídeo RP4 da linhagem
 N-17G-22 P⁺ (KTA) (a)

Linhagem receptora	Exp. Nº	Droga usada para seleção	Frequência de transferência da resistência (b)	Frequência de transferência de protease (b)
N-17 G P ⁻ Rif ^R Str ^R	1	Km	$2,2 \times 10^{-4}$	$3,7 \times 10^{-5}$
N-17 G P ⁻ Rif ^R Str ^R	2	Tc	$3,2 \times 10^{-4}$	$4,1 \times 10^{-5}$

(a) Método de conjugação em meio sólido.

(b) A frequência de transferência foi calculada por célula doadora.

DISCUSSÃO

Observando a incidência de indivíduos P⁻ em 177 amostras de P. mirabilis isoladas de material clínico humano de diferentes hospitais, constata-se a presença de populações que são heterogêneas em relação à excreção da protease. Algumas amostras apresentam nenhum ou poucos indivíduos P⁻ (estáveis); em compensação, algumas populações são constituídas por um número muito grande de indivíduos que não excretam a enzima (instáveis).

Apesar destas amostras instáveis apresentarem alta incidência de indivíduos P⁻, esse fato não impede que essas linhagens, como um todo, dêm reação positiva para o teste de liquefação da gelatina, tal como utilizado em laboratórios de microbiologia, ainda que lentamente. Essa eventual lentidão, ou mesmo, o raro evento negativo da prova de gelatinase, devam ter sido uma das razões pelas quais o fenômeno da instabilidade tenha cruzado o caminho de microbiologistas por quase 100 anos, sem ser devidamente notado. Um outro fato, seria o desconhecimento da importante correlação entre a instabilidade e a herança extracromossômica, somente valorizada de algum tempo para cá.

Esse fenômeno parece não ocorrer em algumas outras bactérias proteolíticas, tais como Pseudomo-

nas aeruginosa, Bacillus subtilis, B. megaterium, B. cereus e Staphylococcus aureus (Tabela 4). Também duas outras características bioquímicas do P. mirabilis, produção de sulfeto de hidrogênio e síntese de urease, mostraram-se estáveis (Tabelas 5 e 6), mesmo quando algumas linhagens instáveis à protease foram testadas.

A informação genética responsável pela produção de H_2S em E. coli é plasmídica (LAUTROP, ØRSKOV & GAARSLEV, 1971; LAYNE *et al.*, 1971; STOLERU *et al.*, 1972). Estes autores encontraram segregação espontânea de células H_2S -negativas em várias linhagens de E. coli.

COOK (1976) observou instabilidade espontânea e induzida pelas ações de drogas curagênicas, na informação da síntese da urease em Streptococcus faecium e considerou esses dados como evidência de herança plasmidiana.

Apesar da rara ocorrência de P. mirabilis urease e H_2S -negativas, referidas por RICHARD (1972-1973), tudo leva a crer que essas informações genéticas são estáveis.

A instabilidade do caráter protease fica mais evidente quando se investiga a presença de células P- em colônias P⁺ de amostras instáveis e estáveis de P. mirabilis. Numa das colônias P⁺ da linhagem instável N-17, se

mostrou que mais da metade de seus indivíduos perderam a propriedade de excretar a enzima proteolítica (Tabela 7).

A estocagem, em meio NA semi-sólido (técnica da picada), de linhagens derivadas de amostras instáveis de P. mirabilis, por vários meses, levou a um aumento considerável do número de indivíduos P⁻, mostrando, com isso, uma possível participação do ambiente nessa conversão. Segregação de variantes negativas de uma dada característica genética pela estocagem prolongada pode constituir-se em valioso fator a favor da herança plasmidiana (LAUTROP, ØRSKOV & GAARSLEV, 1971; STOLERU et al., 1972). No entanto, essa instabilidade decorrente de estoçagem prolongada não ocorre em linhagens derivadas de amostras estáveis.

Quando a determinação do número de células P⁺ e P⁻ foi realizada, não em amostras, como um todo, enviadas pelos laboratórios clínicos de origem, e sim em culturas que tiveram suas origens recentes, por ulteriores purificações em nosso laboratório, à partir de uma única colônia P⁺, observou-se uma incidência maior de indivíduos estáveis. Esse fato alertou para a possibilidade de que nem todas células P⁺ seriam potencialmente instáveis.

Realmente, quando se estocaram por tempo prolongado, cerca de 10 colônias P⁺ de várias amostras que se mostraram estáveis e instáveis (Tabela 8), pôde-se veri-

ficar que algumas amostras de P. mirabilis apresentavam a condição de produzir protease como um caráter estável (L-22 e L-70), onde todos os indivíduos ou a sua grande maioria sintetizam a enzima, ao passo que outras amostras o fazem de maneira instável (L-79 e N-17), ou seja, muitos indivíduos dessa população deixam de excretar essa enzima. Vale a pena, contudo, constar que, mesmo nestas linhagens instáveis, verificou-se a presença de algumas colônias que se mostram irreductíveis, mantendo característica de estabilidade.

Analisando-se indivíduos P^+ de uma maneira instável, nota-se a existência de um grau variável de instabilidade entre essas colônias P^+ analisadas, onde algumas colônias P^+ apresentam-se altamente instáveis produzindo muitos indivíduos P^- , outras atingem valores intermediários de instabilidade, e outras se mantêm muito estáveis. Analisando agora indivíduos P^+ originários de amostra estável, nota-se que o grau de instabilidade entre essas colônias P^+ é bem menor.

Por outro lado, algumas amostras de P. mirabilis são tão instáveis em relação ao caráter protease que, quando se pretende mantê-las com a presença de indivíduos P^+ , por vários anos no laboratório, necessita-se de periódicas seleções a favor de colônias P^+ . Sucede, contudo, que essa prática pode levar algumas culturas assim cons-

tituidas a se tornarem absolutamente estáveis. Um bom exemplo é o que aconteceu com a linhagem N-17-12, derivada de uma colônia P^+ da amostra instável N-17 e que tem-se mostrado estável em estoque, há aproximadamente 5 anos.

A perda do caráter protease ocorre, também, pela permanência prolongada de culturas instáveis em caldo nutritivo (Figura 4). A impressão que isso poderia dar é que, condições disgenésicas geradas no caldo nutritivo favoreceriam o aparecimento de células P^- , em detrimento de células P^+ . Acontece, no entanto, que esse mesmo fenômeno ocorre também como consequência de sucessivos subcultivos diários (Figura 5), com poucas possibilidades de envelhecimento da cultura.

Acresce, a tudo isso, o fato de que deve participar algum fator de pressão seletiva ambiental, a favor do crescimento diferencial das células P^- de linhagens instáveis, quando subcultivadas em NB, na ausência de gelatina, conforme se pode deduzir da Figura 6 (A e B), embora, aparentemente, isso não aconteça num prazo curto de tempo que decorre durante a realização de curvas de crescimento de linhagens P^+ e P^- em NB e NB mais gelatina (Figura 7A e B).

Uma outra característica das células P^- é a sua não-reversibilidade ao estado original P^+ , tanto espontaneamente (Tabela 9), como pela ação de conhecidos mutá-

genos, como nitrosoguanidina, luz ultravioleta e também ino-
culação em camundongos (Tabelas 10-12).

A conversão de células P^+ em P^- de linhagens instáveis de Proteus mirabilis é grandemente aumentada pela ação de conhecidos agentes curagênicos. Já, no caso de linhagens estáveis, essa conversão é muito menor ou mesmo não acontece.

O brometo de etídio (EB) é um poderoso agente de cura (BOUANCHAUD, SCAVIZZI & CHABBERT, 1969), sempre presente ao lado dos corantes de acridina e dodecil-sulfato de sódio, quando se pretende "eliminar" plasmídeos ou caracterizar elementos extracromossômicos. Sua ação sobre os ácidos nucléicos e polimerases do DNA e RNA (WARING, 1966), sua ação intercalante entre pares de bases (LEPECQ & PAOLETTI, 1967) e os seus efeitos bioquímicos sobre bactérias (TOM-CHICK & MANDEL, 1964) colocam-no como agente preferencial no estudo de plasmídeos.

O processo de cura pelo EB em amostras P. mirabilis instáveis foi muito eficiente, atingindo algumas vezes 100%. Esse efeito só foi conseguido numa estreita faixa de concentração, onde a variação foi de $1,26 \times 10^{-2}$ a $3,78 \times 10^{-3} M$, o que corresponde a uma concentração alta, quando se sabe que, entre as enterobactérias, concentrações de $6,0 \times 10^{-5}$ a $2,5 \times 10^{-3} M$, para o mesmo número de células usadas

nesto trabalho, são suficientes BOUANCHAUD SCAVIZZI & CHABBERT, 1969).

Aparentemente ocorreu um processo de cura, já que a concentração mínima inibitória do EB foi a mesma para amostras instáveis e estáveis.

O SDS mostra uma ação eficiente na conversão de células P⁺ em P⁻. Alguns fatos devem contudo ser discutidos. Primeiramente, essa conversão não ocorre quando essa droga atua sobre populações constituídas quase exclusivamente por células P⁺ estáveis. A seguir, existem evidências de que essas células P⁺ ou tem seu crescimento inibido seletivamente pelo SDS ou são convertidas em células P⁻ (Figura 8). Essas possibilidades não podem ser evidenciadas nessa figura, embora ela mostre claramente que as células P⁻ (Nal^R) crescem satisfatoriamente. Já a Figura 9B mostra claramente que a linhagem L-68-1-NA-P⁺, que é estável, é muito sensível ao efeito inibidor do SDS, quando comparada com a L-68-2-R-P⁻, embora ambas apresentem crescimentos relativamente comparáveis em NB sem a droga (Figura 9A), apesar de carregarem marcadores para resistência a drogas diferentes (Rif e Nal). Aparentemente, fica esclarecida a possibilidade de sua conversão em células P⁻, conforme poder-se-ia ter suspeitado na Figura 8. Assim, tudo leva a crer que o SDS favorece o crescimento diferencial de

células P⁻, já existentes, em detrimento da inibição de células P⁺. Esse fato não invalida, contudo, a possibilidade de células P⁻ representarem, eventualmente, indivíduos que, por outras razões, perderam a informação genética codificada por um dado plasmídeo.

Esse dados poderiam encontrar apoio nos achados de SALISBURY, HEDGES & DATTA (1972) que verificaram que o SDS seleciona organismos livres de plasmídeos, em linhagens de E. coli carregando F ou R 100 drd 1, crescidas em presença de SDS. Investigando melhor esse fenômeno, puderam constatar que linhagens abrigando plasmídeos R reprimidos não davam origem a organismos livres de plasmídeos, enquanto que linhagens carregando plasmídeos R desreprimidos, sim. Associado com esse efeito do SDS, encontraram que linhagens transportando plasmídeos R desreprimidos eram mais sensíveis à lise pelo SDS do que as mesmas linhagens não portadoras do plasmídeo ou carregando plasmídeos R reprimidos. Propuseram esses autores que organismos livres de plasmídeos eram simplesmente selecionados por sua maior resistência ao SDS.

O cloridrato de guanidina (GUHCl) não mostrou nenhum efeito curagênico sobre linhagens instáveis e estáveis de P. mirabilis (Tabela 19).

A inclusão de SDS e GUHCl entre a relação de agentes curagênicos utilizados neste trabalho não se

deu exclusivamente devido à conhecida ação do SDS sobre algumas bactérias (TOMOEDA *et al.*, 1968; INUZUKA *et al.*, 1969; ADACHI *et al.*, 1972; SONSTEIN & BALDWIN, 1972_{a-b}; WILLIAMS-SMITH & HUGGINS, 1976). Na realidade, foi verificado que tanto SDS (COSTA, 1969; COSTA E BACILA, 1973) como GUHCl (JULIANI, 1972; 1974; JULIANI, COSTA & BACILA, 1973; JULIANI & COSTA, 1975; JULIANI, GAMBARINI & COSTA, 1975) são capazes de induzir mutação extracromossômica em Saccharomyces cerevisiae. O GUHCl, recentemente, também mostrou ação curagênica sobre marcadores de resistência extracromossômicas adrogas, em Staphylococcus aureus (COSTA, 1978). Tomando em consideração que os genomas de mitocôndrias e plasmídeos podem ser considerados plasmídeos (SHERRATT, 1974; NOVICK, 1976), seria de grande interesse saber se esta última droga também teria efeito curagênico sobre o P. mirabilis, o que poderia adicionar alguma contribuição para a eventual relação existente entre a organização do DNA mitocondrial (MAHLER, 1973; BERNARDI *et al.*, 1976; TZAGOLOFF, FOURY & AKAI, 1976; NAGLEY, SRIPRAKASH & LINNANE, 1977) e a de plasmídeos, bem como a possível ligação desse relacionamento com a origem procriótica da mitocôndria (RAFF & MAHLER, 1972; COSTA, 1974; RABINOVITZ *et al.*, 1974).

Os corantes de acridina são muito eficientes na "cura" do fator F (HIROTA, 1960). As acridinas a-

presentam pouco, se algum, efeito na eliminação de plasmídeos R (MITSUHASHI, HARADA & KAMEDA, 1961; WATANABE & OGATA, 1966). A eliminação de plasmídeos F pelas acridinas parece ser devido a uma interferência seletiva na replicação do plasmídeo (HOHN & KORN, 1969; YAMAGATA & UCHIDA, 1969).

Conforme se verifica na Tabela 16, a acriflavina (AF) aumenta o número de células P⁻ de uma população instável, porém não o faz numa população estável, embora as células dessa população P⁺ apresentem o mesmo nível de sensibilidade à droga.

A concentração necessária para esse efeito variou de 78 µg a 312 µg/ml, bem maior do que a encontrada na literatura para outras bactérias gram-negativas (SALISBURY, HEDGES & DATTA, 1972; AFFONSO, 1976).

A rifampicina (Rif), um derivado da rifamicina (MAGGI *et al*, 1966) tem se mostrado eficiente em eliminar plasmídeos (JOHNSTON & RICHMOND, 1970; KRCMÉRY & JANOUSKOVA, 1971; BAZZICALUPO & TOCCHINI-VALENTINI, 1972; RIVA *et al*, 1973).

Tanto em *E. coli* (HARTMANN *et al*, 1967) como em *S. aureus* (WEHRLI *et al*, 1968) a Rif age sobre a transcrição, combinando-se à sub-unidade β da polimerase do RNA.

A Rif, em concentração menor (0,3 a 3,0 mg/ml) do que a usada para a E. coli (5,0 a 7,5 mg/ml) (BAZZICALUPO & TOCCHINI-VALENTINI, 1972) converteu eficientemente células P⁺ em P⁻ de linhagens instáveis, de P. mirabilis.

As células P⁺ estáveis mostraram-se muito sensíveis a essa concentração da droga e não se converteram em P⁻.

A mitomicina C (MC) é conhecida inibidora da síntese de DNA (IYER & SZYBALSKI, 1964; BOYCE & HOWARD-FLANDERS, 1964). Em doses menores (1,0 a 2,0 µg/ml) do que as utilizadas para eliminação dos plasmídeos, salicilato, cânfora e naftaleno em Pseudomonas (CHAKRABARTY, 1972; RHEIWALD, CHAKRABARTY & GUNSLUS, 1973; DUNN & GUNSLUS, 1973), transformou eficientemente células P⁺ em P⁻ de linhagens instáveis de P. mirabilis. As linhagens estáveis P⁺ não foram mais sensíveis do que as instáveis, e não foram convertidas em P⁻.

O crescimento sob temperaturas mais elevadas do que a fisiológica, revela-se algumas vezes como eficiente método de cura (BONDI, KORNBLUM & SAINT PHALLE, 1953; FAIRBROTHER, PARKER & EATON, 1954). Resistências à tetraciclina e penicilina foram curadas sob ação da temperatura (44°C), em estafilococos, e estudos cinéticos demonstraram

que o crescimento bacteriano, nessa temperatura, seleciona segregantes livres de plasmídeo (MAY, HOUGHTON & PERRET, 1964).

A frequência espontânea de células P^- em P. mirabilis, não foi aumentada pela ação da temperatura elevada. Esse método de cura, no entanto, não tem valor absoluto. Alguns plasmídeos não se mostram sensíveis à elevação da temperatura de crescimento, como acontece com o Streptococcus faecium, onde a propriedade ureiolítica, que mostra evidências de ser codificada por plasmídeo, não apresenta efeito significativo (COOK, 1976).

A instabilidade de um caráter que aumenta em decorrência de estocagem prolongada, subcultivos repetidos, e pela ação de drogas curagênicas, aliado à irreversibilidade do caráter perdido, mesmo sob ação de conhecidos mutágenos, leva a pensar em herança controlada por determinantes extracromossômicos.

Mutação de ponto não deve estar envolvida na instabilidade do caráter protease, por razões bastante convicentes ligadas à alta frequência e à irreversibilidade da conversão P^+ em P^- .

Em relação à variação de fase, vale a pena discutir alguns aspectos ligados a esse fenômeno.

Uma linhagem de Salmonella difásica pos-
sui dois genes estruturais não-alélicos para a síntese da
flagelina, o componente protéico dos filamentos flagelares
(H₁ e H₂). Esses dois genes são ativados alternadamente num
clone bacteriano, e essa expressão resulta no fenômeno ca-
racterístico da variação de fase (LEDERBERG & IINO, 1956).

Essa alternação entre as duas fases ocorre numa probabilidade de 10⁻³ por divisão celular (STOCKER, 1949).

Estudos genéticos (PEARCE & STOCKER, 1967; FUJITA, YAMAGUCHI & IINO, 1973) e bioquímicos (SUZUKI & IINO, 1973) mostraram que H₂ constitui um operon que inclui rhl que produz um repressor de transcrição. Quando o operon H₂ está ativo, é produzida a flagelina da fase 2 e, simultaneamente, H₁ é reprimido pelo produto de rhl. Quando o operon H₂ se torna inativo, dá-se o início da síntese do RNA mensageiro da flagelina da fase 1 e, consequentemente, da síntese da flagelina respectiva.

Portanto, a alta frequência da alternação, atribui uma situação oscilante, muito diferente do que ocorre em relação à conversão de células P⁺ em P⁻.

Genes mutadores que levam a um apreciável aumento da taxa de mutação para outros genes já foram demonstrados em várias bactérias, incluindo a E. coli (TREFFERS,

SPINELLI & BELZER, 1954; BRYSON et al., 1955; GOLDSTEIN & SMOOT, 1955; JYSSUM, 1960; GUNDERSEN, JYSSUM & LIE, 1962; GUNDERSEN, 1963; SIEGEL & BRYSON, 1963; MOHN & KAPLAN, 1967; WITKIN, 1967; LIBERFARB & BRYSON, 1970; HILL, 1970), S. typhimurium (DEMERECK et al., 1958; MIYAKE, 1960; DAWSON & SMITH-KEARY, 1963), Neisseria meningitidis (JYSSUM, 1968), B. subtilis (GROSS, KARAMATA & HEMPSTEAD, 1968) e P. mirabilis (BÖHME, 1967).

Vários modos possíveis de ação foram postulados para os genes mutadores. Uma sugestão é que um gene mutador causa um defeito no sistema de reparo (HANAWALT & HAYNES, 1965). A célula mutante exibiria aumento da sensibilidade à luz UV, acompanhada por uma aumentada mutabilidade espontânea (BÖHME, 1967; MOHN & KAPLAN, 1967; JYSSUM, 1968).

No entanto, inúmeros outros modos possíveis de ação foram sugeridos, tais como, insuficiência da síntese de bases nitrogenadas, criando uma condição de mutagenese, da mesma maneira do que a criada pela carência de timina (COUGHLIN & ADELBERG, 1956; WEINBERG & LATHAM, 1956); formação de bases análogas mutagênicas que levam a erros de replicação (KIRCHNER, 1960; KIRCHNER & RUDDEN, 1966); síntese de polimerase do DNA alterada (SPEYER, 1965); defeito no sistema de reconhecimento do erro, associado com re-

plicação do DNA, que permite emparelhamento de bases erradas (COX & YANOFSKY, 1969; COX, 1970); presença Mn²⁺, alterando o ambiente intracelular, com subsequente alteração da especificidade da polimerase do DNA (DEMEREZ, 1951; ORGEL & ORGEL, 1965).

BÖHME (1967) isolou, após tratamento mutagênico pelo EMS, seguido de seleção indireta em MC, mutantes de P. mirabilis que mostravam instabilidade genética. Todas as colônias que falharam em crescer em MC foram purificadas e testadas para sensibilidade à luz ultravioleta. Verificou, num desses mutantes, que a maior sensibilidade a UV estava associada a aumento da instabilidade genética, caracterizada pelo aumento da frequência de mutação para a resistência à estreptomicina, e à oxitetraciclina, e, também, reversão para prototrofia dessa linhagem auxotrófica (thr⁻).

Quando se investigou, neste trabalho, instabilidade para auxotrofia, encontrou-se um número bem maior do que o esperado de linhagens incapazes de crescer em meio mínimo, mas nenhuma relação pode ser feita entre esta instabilidade e a ocorrência de linhagens estáveis e instáveis em relação à síntese de protease. Em razão desse fato, somente numa linhagem foi determinada a necessidade nutricional, que foi metionina-cistina. No entanto, o fato que mais chamou atenção, foi o encontro dessas linhas

gens, sem a necessidade de qualquer tratamento mutagênico prévio.

Deleções podem ocorrer em bactérias e seus fagos (FRANKLIN, 1971). Mais recentemente, deleções espontâneas foram relatadas, em E. coli, para o gene zwf, que codifica a desidrogenase da glicose-6-fosfato (FRAENKEL, & BANERJEE, 1972), para genes de proteínas ribossômicas (ANDRÉSSON, MAGNUSDOTTIR & EGGERTSON, 1976) e, em S. typhimurium, para o gene do clorato (ALPER & AMES, 1975). Contudo, a frequência dessas deleções são muito baixas (10^{-6} a 10^{-9} por célula plaqueada), embora no caso do gene zwf tenha sido de 10^{-4} . Dado essa raridade, o estudo de deleções em bactérias tem sido feito por indução com vários mutágenos (ISHII & KONDO, 1972; YAMAMOTO & ISHII, 1974; ISHII & KONDO, 1975).

A ocorrência de deleção, sendo de frequência bem mais baixa, afasta a possibilidade de ser responsável pela instabilidade do caráter protease, independente de qualquer análise genética.

A ocorrência de segmentos de inserção e inserção de vírus Mu participando como elemento transponível (BUKHARI & LJUNGQUIST, 1978), atribuindo instabilidade diversificada e reversível em relação aos marcadores envol-

vidos, é pouco provável num fenômeno tão generalizado e frequente como o da instabilidade da protease. Quanto aos casos conhecidos de transposição, referem-se a poucos genes envolvidos com resistência a drogas (ampicilina, tetraciclina, estreptomicina, canamicina e trimetoprim) (DATA et al, 1971; RICHMOND & SYKES, 1972; HEDGES & JACOB, 1974) e são igualmente reversíveis.

Historicamente, a primeira suspeita da existência de plasmídeo, surgiu devido à perda do marcador de resistência à penicilina, em Staphylococcus aureus, que aumentava grandemente pela estocagem prolongada da cultura (BARBER, 1949).

Também no estafilococo foi observada a tendência de linhagens penicilino-resistente tornarem-se sensíveis, devido a subcultivos repetidos (BOROWISKI, 1963).

Ainda atualmente, a instabilidade de um dado caráter faz parte do primeiro critério de avaliação da existência de plasmídeo (RICHMOND, 1972). Normalmente se deve quantificar a perda da informação genética, para diferenciar a alta frequência, característica do plasmídeo, daquela das taxas espontâneas de mutação, da maioria dos genes cromossômicos. No caso presente, não foi necessário avaliar esse fato, uma vez que a frequência de células P- costuma ser extremamente alta.

Uma outra propriedade característica dos plasmídeos é que células que os perdem espontaneamente ou que são curadas do plasmídeo não podem tornar a ganhar o caráter determinado por ele. O uso de mutágenos e inoculação em camundongos não foram capazes de reverter o caráter protease perdido. A ação dos mutágenos também serve para demonstrar que ocorreu "eliminação" e não mutação num dado plasmídeo.

O efeito de agentes curagênicos sobre aumento da frequência espontânea de perda de um marcador genético é um outro critério de RICHMOND (1972) e esse efeito foi demonstrado, quer por um processo que aparenta transformar a célula P^+ em P^- (cura), quer selecionando segregantes P^- .

O que se torna difícil interpretar é a incapacidade de cura de células P^+ estáveis, por todos os agentes utilizados neste trabalho. Uma resposta especulativa seria a de considerar a célula P^+ estável como portadora de integração cromossômica, não-curável, do determinante extracromossômico (HIROTA, 1960). Isso explicaria a ocorrência de células P^+ estáveis não somente em linhagens de P. mirabilis estáveis, como também em linhagens instáveis, conforme já discutido anteriormente.

A capacidade de integrar no cromossomo pode ser comum a todos os plasmídeos (ROWBURY, 1977). Essa integração ocorre, via recombinação, entre sequências curtas de DNA homólogo do cromossomo da E. coli e F-DNA (DAVIDSON et al., 1974; DEONIER & DAVIDSON, 1976; DEONIER, OH & HU, 1977; ACHTMAN & SKURRAY, 1977). Muitos plasmídeos R são capazes de integrar no cromossomo bacteriano. Isso pode ser demonstrado por mobilização cromossômica e integração supressiva de mutações dna A, ou por ambos (MOODY & RUNGE, 1972; GOEBEL, 1974; SOTOMURA & YOSHIKAWA, 1975; HEDEN & RUTBERG, 1976). Fatores "I-like" podem produzir linhagens Hfr (DATTA & BARTH, 1976), e plasmídeos do grupo P, como o RP4 (OLSEN & SHIPLEY, 1973) e o R 68 (JACOB, CRESSWELL & HEDGES, 1977), podem propiciar mobilização cromossônica.

Perda da informação genética de uma bactéria, tanto por estocagem prolongada, como através de transferências sucessivas em caldo de cultura, pode constituir um indício da participação de um plasmídeo nessa informação. Contudo, estudos realizados com Bacillus megaterium por LWOFF & GUTMAN (1949_{a-b-c}) e LWOFF & GUTMAN (1950_{a-b}) demonstraram que também a perda de profago pode ocorrer após repiques sucessivos. Realmente, após 61 transferências sucessivas, o B. megaterium perde material genético e torna-se não-lisogênico (CLARKE, 1952; CLARKE & COWLES, 1952).

Os dados contidos na Tabela 29 afastam essa possibilidade, já que variantes P⁻, quando induzidos, por qualquer um dos processos empregados, também desenvolvem lise, com subsequente liberação de fagos temperados. Ainda, a indução de 60 amostras de P. mirabilis, onde a maioria é instável, em relação à excreção de protease (Tabelas 3 e 28), apenas poucas linhagens se mostram lisogênicas. Mesmo assim, lisogenização não altera as características fenotípicas de células P⁺ ou P⁻, em diversas amostras de P. mirabilis (Tabela 30).

A possibilidade dos fenotipos P⁺ ou P⁻ resultarem de pseudolisogenia (estado de portador) foi igualmente afastada pelo que se segue. Lisogenia se caracteriza pela integração estável do genoma do fago (profago) com o cromossomo bacteriano (JACOB & WOLLMAN, 1959). Na pseudolisogenia, o profago parece coexistir no estado temperado com o hospedeiro, mas sem a ocorrência de uma união herdável de maneira estável. O profago é transportado pela bactéria como uma unidade semelhante a episomo, o qual não se replica em sequência com o cromossomo da bactéria. Assim, em contraste com a lisogenia verdadeira, o profago só é transmitido para uma minoria da progenia. Contudo, em algumas bactérias da população, o fago desenvolve replicação com lise do hospedeiro e reinfecção de bac-

térias livres de fagos da vizinhança, mantendo assim a presença do fago na cultura, atribuindo muitas vezes modificações fenotípicas no hospedeiro, quer por expressão de seus genes, quer por indução de genes da bactéria (BAESS, 1971; BARKSDALE & ARDEN, 1974).

Linhagens bacterianas exibindo pseudolisogenia (estado portador) são detectadas pela observação de placas de lise, de aparecimento espontâneo, quando cultivadas de maneira difusa em meio sólido. Esta situação não foi observada neste trabalho, quando se investigaram 60 linhagens (as mesmas que servirão para a indução de profagos), afastando, com isso, a responsabilidade da pseudolisogenia nos fenótipos P⁺ e P⁻ (Tabela 31).

Conhece-se um caso bem comprovado de pseudolisogenia em P. mirabilis (COETZEE & HAWTREY, 1962). Trata-se de uma linhagem, P. mirabilis 57, sacarose-positiva, onde o fago temperado 57 foi capaz de superar a imunidade conferida pela lisogenia (mutante vir), liberando uma endolisinina que altera a estrutura de algumas células da população, tornando-as permeáveis à sacarose, já que P. mirabilis é criptico para o metabolismo desse açúcar.

Transdução em P. mirabilis, utilizando marcadores bioquímicos, foi inicialmente tentada sem sucesso, possivelmente devido a utilização de fagos muito vírus

lentos, segundo COETZEE & SACKS (1960_a). Com a descoberta de uma série de vírus temperados em Proteus (COETZEE & SACKS, 1959) esse objetivo foi plenamente alcançado (COETZEE & SACKS, 1960_b).

A utilização de fagos temperados coloca P. mirabilis numa posição similar àquela de Salmonella, onde muitos fagos temperados podem transduzir (EDWARDS, DAVIS & CHERRY, 1955).

Dois dos cinco diferentes fagos temperados foram capazes de transduzir o marcador protease (Tabela 32). Essa transdução ocorreu com muita raridade, quando comparada com frequências obtidas em P. mirabilis (COETZEE & SACKS, 1960_{a-b}; COETZEE, DATTA & APPELBAUM, 1973; COETZEE, 1975_{a-b}; COETZEE & KRIZSANOVICH-WILLIAMS, 1976) cujos rendimentos de transdutantes, por partícula de fago, são da mesma ordem de grandeza dos encontrados no sistema de transdução generalizada, como exemplificado por ZINDER & LEDERBERG (1952), no sistema original de Salmonella typhimurium e fago P22, e, depois, extensiva à E. coli, com a utilização do fago P₁ (LENNOX, 1955; JACOB, 1955).

Um aspecto que deve ser considerado quando se procura caracterizar uma informação genética, como sendo cromossômica ou extracromossômica, é que geralmente um

plasmídeo não apresenta homologia genética com o cromossomo hospedeiro, apesar de que limitadas regiões possam, eventualmente, estar presentes. Esse fato leva à falha do plasmídeo combinar-se livremente com o cromosso e, consequentemente, o cromossomo ser incapaz de protegê-lo da ação da luz ultravioleta (ARBER, 1960; MACCACARO & HAYES, 1961; NOVICK, 1963). Assim, o efeito da irradiação ultravioleta de lisados, sobre a frequência de transdução, pode fornecer algum esclarecimento sobre a natureza da informação genética.

Observa-se normalmente um declínio exponencial no número de transdutantes, em decorrência de dose aumentada de UV, no caso de transdução envolvendo plasmídeos. Contudo, as frequências muito baixas de transdução para o marcador protease, por partícula de fago adsorvida (Tabela 32), não permitiram uma análise desse tipo, sem que ocorresse grande margem de erro.

Proteus mirabilis é capaz de infectar o homem e animais. Contudo, algumas linhagens podem ser consideradas como oportunistas e invasoras em infecções secundárias. Tais linhagens, sob circunstâncias especiais, podem produzir lesões locais severas e mesmo generalizadas e fatais, no homem, apesar de incapazes de produzir doenças epidêmicas (SMITH & MARTIN, 1948; TOPLEY, WILSON &

MILES, 1953; BRYAN & BRYAN, 1956).

Durante a investigação da irreversibilidade de células de P. mirabilis P⁻ em P⁺, observou-se que as células excretoras de protease participam, de algum modo, na diminuição da sobrevivência de camundongos inoculados intraperitonealmente (Tabelas 21-24).

Convém salientar que ambos os tipos de células inoculadas (P⁺ e P⁻) tiveram origem numa mesma linhagem, L-68 m. Também apresentam o mesmo marcador de resistência (Nal^R), isogenia essa que afasta possíveis diferenças de comportamento entre linhagens. Além do mais, AOKI-WATANABE (1973), estudando o crescimento de E. coli sensíveis e resistentes a drogas, verificou que mutações para resistência ao ácido nalidíxico não interferem substancialmente na capacidade de crescimento, quando comparada com a bactéria do tipo selvagem.

Para igual número de animais inoculados, a DL₅₀ para as células P⁺ é 5,26x10⁸ células/ml, sendo que para as células P⁻ essa dose é 8,05x10⁸ células/ml.

Esses dados, aparentemente, ainda não devem ser conclusivos, já que esse efeito pode não ser exclusivo da protease e sim de algum outro fator adicional.

De posse desses dados, poder-se-ia especular em relação aos achados de TOPLEY, WILSON & MILES

(1953) em referência à diferença de virulência do P. mirabilis. Para esses autores, existem cultivos muito virulentos que determinam morte do animal nas primeiras horas e cultivos menos virulentos que, ao serem inoculados, determinam a morte após uma semana ou mais. Seria de se pensar, se esse fato não teria alguma relação com os dados deste trabalho e se os autores acima referidos não teriam utilizado linhagem que, pelo tipo de comportamento de virulência, poderia estar representada por populações puras ou mistas em relação às células P^+ e P^- , ou, até mesmo, constituída exclusivamente por P^- .

De qualquer maneira, a instabilidade da excreção da protease, sob condições laboratoriais, pode indicar uma importante relação ecológica entre Proteus mirabilis e seus hospedeiros, em particular, o homem.

Apesar de que não parece haver relação entre a presença ou ausência de plasmídeos R, com a ocorrência de células P^+ e P^- , procurou-se verificar a existência de alguma modificação ocasionada por esses elementos de resistência múltipla a drogas, na excreção da protease.

Estudos sobre o comportamento de plasmídeo R em várias bactérias hospedeiras têm sido bem documentados nos últimos anos. No entanto, poucas são as informa-

ções relacionadas com o mecanismo, pelo qual plasmídeos R afetam a fisiologia bacteriana. Sabe-se, por exemplo, que eles podem interferir com a capacidade de crescimento, e que a resistência para duas ou três drogas prejudica o crescimento de maneira mais acentuada do que quando está presente apenas um marcador (AOKI-WATANABE, 1973).

Sabe-se que plasmídeos podem alterar o reparo do DNA da célula hospedeira. Linhagens de E. coli e Salmonella typhimurium carregando Col I⁺ b-P9 são menos sensíveis à morte pela UV e à reversão de alguns mutantes auxotróficos, e mais sensíveis à indução do fago λ do que linhagens Col I⁻ (HOWARTH, 1965). A sensibilidade à radiação e à ação de mutágenos químicos (NTG), em Pseudomonas aeruginosa, também pode decorrer de modificações causadas pela presença de plasmídeos (LEHRBACH et al, 1977).

Um dos maiores fatores responsáveis pelo sucesso do sistema Ames para a detecção de mutágenos e carcinógenos (AMES, McCANN & YAMASAKI, 1975; McCANN, SPINGARN & KOBORI, 1975; McCANN & AMES, 1976), foi a introdução de plasmídeo R na linhagem de Salmonella typhimurium, utilizada como testadora. O plasmídeo pKM 101 é um dos vários que podem reduzir a morte pela ação da UV (chamado efeito de proteção) e, ao mesmo tempo, aumentar a mutagênese para

essa irradiação (Mac PHEE, 1973; MATELMANS, BABUDRI & SAMER, 1976; WALKER, 1978). Na linhagem testadora esse plasmídeo faz com que aumente a reversão de mutações de ponto e de mudanças do quadro de leitura ("frameshift mutations"), pela ação de uma variedade de mutágenos e carcinógenos testados.

A presença de plasmídeo Col V, por exemplo, parece estar associado com a patogenicidade de algumas linhagens de E. coli (WILLIAMS-SMITH & HUGGINS, 1976).

O plasmídeo denominado pCU3, confere à sua hospedeira E. coli K-12, maior sensibilidade ao bicloreto de mercúrio e ao bicloreto de cobalto do que as bactérias que não os abriga (WANG et al, 1978).

Alguns plasmídeos R conferem à sua hospedeira E. coli maior sensibilidade à rifampicina, supostamente devido a um aumento na permeabilidade da membrana (ROMERO et al, 1971; RIVA et al, 1972; SCOTTI, SILVESTRI & ROMERO, 1974). Essa foi a mesma explicação para o aumento da sensibilidade de E.coli ao ácido nalidíxico e à acriflavina, causada pelo fator R 100 (YOSHIKAWA, 1971). Em relação à termosensibilidade para a replicação do DNA a 42°C, foi mostrado que o plasmídeo R, Rts I interfere com o crescimento normal do hospedeiro nessa temperatura, devido a modificações que

surgem na membrana (Di JOSEPH, BAYER & KAJI, 1973).

Durante o estudo de várias linhagens de P. mirabilis carregando fatores R, HESSLEWOOD & SMITH (1974) verificaram que o crescimento em forma de bafo, em meio mínimo, podia ser aumentado por alguns plasmídeos R e diminuído por outros. Em adição, esses plasmídeos R afetam o nível de enzima proteolítica e, em alguns casos, tornam a bactéria mais suscetível à ação do desoxicilato de sódio (DS).

Desta feita, o fator R 1818 (também conhecido como R 46), que apresenta marcadores de resistência para estreptomicina, tetraciclina, ampicilina, espectinomicina e sulfonamida, aumenta o bafo e abole a excreção da protease pelo P. mirabilis F 67. O fator R-TEM (ou R 6K), que apresenta genes para resistência à estreptomicina e ampicilina, reduz o bafo e aumenta a excreção da referida enzima.

Contudo, os dados de HESSLEWOOD & SMITH não fazem referência a nenhuma verificação, a fim de constatar se o transconjugante P. mirabilis R-1818 era P⁺ ou P⁻. Parece que não houve essa preocupação, o que é explicável pelo desconhecimento, até então, do fenômeno de heterogeneidade de população, em relação à excreção da protease.

Com isso, pretendeu-se, neste trabalho, verificar também a influência de plasmídeos R da linhagem P⁺

L-68-79-R (Sm, Km, Ap, Hg) sobre a excreção da enzima. Conforme se observa na Tabela 25, a concentração da protease está reduzida pela metade, quando comparada com a linhagem L-68-73-P⁺ (essas duas linhagens derivam da amostra L-68 m).

Esse fato permite fazer alguma analogia com o verificado por SMITH (1969). Duas diferentes linhagens de P. mirabilis contendo plasmídeo R 1818 produziam somente 1/20 da atividade penicilinásica por bactéria. Dois outros fatores R, o 7268 e o TEM, que também especificam penicilinase, foram introduzidos, via E. coli, em linhagens de P. mirabilis, e a atividade da enzima caiu para 1/20 e 1/100, respectivamente, quando comparadas com as da célula doadora. Como todos os organismos das culturas de P. mirabilis exibiram propriedades do plasmídeo R, afastou-se uma eventual instabilidade desses plasmídeos nesse fenômeno. Acredita o autor que haja defeito na expressão fenotípica dessas informações.

Esse fato acabou se tornando peculiar para P. mirabilis, porque não ocorreu quando plasmídeos R da mesma E. coli, especificando penicilinase, foram introduzidos em E. coli, Serratia marcescens, Aerobacter aerogenes, Alkalescens sp. Acrescentando mais um aspecto intrigante, é bom lembrar que, segundo dados de ROWND, NAKAYA & NAKAMURA (1966) e ROWND, KASAMATSU & MICHEL (1971), devem existir 10

ou mais cópias de plasmídeos R por célula de P. mirabilis, razão essa para ter-se encontrado maior nível da enzima.

Onde residiria o defeito da expressão fenotípica responsável pela redução da excreção de protease na linhagem portadora do plasmídeo R? A linhagem L-68-79-P⁺ (portadora do fator R) excretaria menor teor de protease devido alteração de envelope bacteriano?

BRAUN, REHN & WOLFF (1970), estudando a estrutura molecular da parede celular e o número de moléculas de lipoproteínas da membrana de Salmonella, Serratia, Pseudomonas fluorescens e Proteus, crescidos na presença de concentrações sub-inibitórias de ampicilina, sugeriram que o mucopeptídio da parede celular atuaria como barreira natural de penetração, tanto diretamente como indiretamente, em virtude de sua íntima associação com lipoproteínas da membrana. Realmente, BURMAN, NORDSTROM & BLOOM (1972) constataram que a sensibilidade de P. mirabilis ao colato aumentava após o seu crescimento diante de concentrações sub-inibitórias de ampicilina.

O desoxicolato de sódio (DS) é um agente de superfície, cujo modo de ação é geralmente aceito como sendo o de romper interações entre fosfolipídios e outros componentes da membrana e parede celular (ZWAIG & LURIA,

1967). Desse modo, a sensibilidade ao DS é tomada como medida de accessibilidade a esses componentes e da força de suas ligações com a parede e a membrana (HIROTA, MORDOH & JACOB, 1970; ARMITAGE, ROWBURY & SMITH, 1975).

Parece que ficou claro, pela Figura 10, que não há diferença de sensibilidade ao DS entre células P^+ e P^- . Quando células N-17-II (P^+) e N-17-EB (P^-), ambas originárias da linhagem N-17, e as células L-68-73 (P^+) e L-68-81 (P^-), originárias da L-68 m, todas não-portadoras de plasmídeos R, foram submetidas ao DS, mostraram-se pouco sensíveis, quando comparadas com a maior sensibilidade das células L-68-79- P^+ e L-68-79 A- P^- , ambas portadoras de fatores R.

Diante desses fatos, logo se supõe que o fenômeno central responsável por esse comportamento não usual, decorre de alguma alteração no envelope bacteriano, causado pela presença dos plasmídeos R.

Os dados obtidos por HESSLEWOOD & SMITH (1974), agora em relação ao DS, estão sendo comparados com os deste trabalho, na Tabela 35.

Não serão discutidos os dados referentes ao plasmídeo R-1818, que aparece nos dados daqueles autores, porque, como já foi referido, são sugestivos de que

não foi levada em consideração a possibilidade de heterogeneidade da população que deu origem ao transconjugante R-1818, o que explicaria a abolição total da excreção da protease e a não alterabilidade das células diante do DS.

O plasmídeo da linhagem L-68-79-P⁺ apresenta, em comum com o plasmídeo R-TEM, a capacidade de conferir à célula hospedeira maior sensibilidade ao DS. Contudo, os comportamentos diante da capacidade de excretar protease são inversos.

TABELA 35

Comparação de dados referentes à influência de plasmídeos R, de linhagens de P. mirabilis, na excreção de protease e sensibilidade ao desoxicolato de sódio, segundo HESSLOWOOD & SMITH (1974) e este trabalho

Plasmídeos R (a)	Excreção de protease (b)	Sensibilidade ao DS (c)
R-1818	0	não alterada
T-TEM	+ 300 %	aumentada
R-L 68-79 (d)	- 50 %	aumentada

(a) genes transportados pelos plasmídeos R: R-1818 (Sm, Ap, Sp, Tc, Su); R-TEM (Sm, Ap); R-L68-79 (Sm, Km, Ap, Hg);

(b) Atividade proteolítica determinada pelo método de CHARNEY & TOMARELLI (1947) segundo MATERIAL E MÉTODOS (item 3.4);

(c) DS= desoxicolato de sódio (MATERIAL E MÉTODOS, item 19);

(d) plasmídeo R-L 68-79 tem como hospedeira a linhagem L-68-79-P⁺ (dados deste trabalho).

SANTOS (1972) pesquisou a resistência transferível a drogas nas tribos Escherichia, Salmonella, Klebsiella e Proteae. Verificou que apenas 7% das amostras da tribo Proteae transferia resistência, e somente das marcas hetacilina e cloranfenicol.

Os dados deste trabalho, em relação à transferência de marcadores de resistência, são bem diferentes dos de SANTOS (1972). A explicação é aparentemente simples, uma vez que os dados deste trabalho referem-se ao estudo de poucas amostras. Além do mais, é bom lembrar que HEDGES (1975), investigando plasmídeos R de P. mirabilis enviadas de diferentes lugares (Boston, Londres, Vancouver), verificou marcada diferença nos padrões de resistência entre esses três grupos e também entre padrões obtidos por outros autores (TOMASCHOFF, 1969; CHAI & SOO-HOO, 1970; DIKYI, 1971; GRAEVENTIZ & NOURBAKSH, 1972), que indicam, a exemplo do que acontece também com Serratia marcescens (HEDGES, RODRIGUES-LEMOINE & DATTA, 1974), que populações de diferentes hospitais são frequentemente distintas.

A linhagem L-68-79-P⁺ (Sm, Km, Ap, Hg) transferiu seus marcadores para linhagens derivadas da N-17 Gm. Os marcadores Cm e Tc não foram transferidos, mesmo quando se tentou conjugar a linhagem L-68-73-P⁺ (Cm Tc) com receptores derivados da N-17 Gm.

Em relação ao marcador de resistência à tetraciclina, a explicação é fácil, uma vez que, no grupo Proteus, não são encontrados plasmídeos R com resistência à tetraciclina, embora a maioria de linhagens sejam resistentes cromossômicos a esse antibiótico (SMITH & ARMOUR, 1966; CHABBERT, BAUDENS & BOUANCHAUD, 1969; HEDGES, 1975; MITSUHASHI, 1975).

Segundo ainda MITSUHASHI (1975), plasmídeos R de Proteus possuindo marcadores para ampicilina e canamicina são isolados em bem maior frequência do que no grupo Coli-Shigella.

O plasmídeo RP4 carrega genes para canamicina, tetraciclina e ampicilina. Originário da Pseudomonas aeruginosa, é mantido em E. coli J 53 (DATTA et al., 1971). Foi transferido com boa frequência para linhagem N-17 G P⁻ Rif^RStr^R e N-17 Gm.

Alguns transconjugantes de P. mirabilis que receberam o plasmídeo RP4 da E. coli J 53, mostram claramente, na eletroforese, a ocorrência de dissociação desse plasmídeo em várias bandas, enquanto que outros, apenas uma dessas bandas, que é comum aos demais, é registrada na eletroforese.

Aparentemente, o que aconteceu com RP4 é muito semelhante ao que foi descrito com alguns outros

fatores R, que na E. coli existem como moléculas únicas, mas ao serem transferidos para P. mirabilis, dissociam-se em plasmídeos conjugativos (fatores de transferência) e um ou vários plasmídeos não conjugativos, conforme já discutido na Introdução deste trabalho. Aliás, esse fato não se prende somente a este exemplo, já que também transdutores de P. mirabilis não transferem, por conjugação, fatores R e possivelmente, somente determinantes não-conjugativos são transduzidos (ROWND, NAKAYA & NAKAMURA, 1969).

A linhagem M-17 G-22-P⁺ (Km Tc Ap) transferiu a informação genética da protease, ocorrendo assim a mobilização desse marcador pelo plasmídeo RP4.

Foi esse o único meio de se conseguir a transferência do marcador protease, que já havia sido tentado exaustivamente, por conjugação, antes do recurso da mobilização.

Esse processo costuma ser de extrema valia, já que a maioria dos plasmídeos pequenos, que se replicam sob controle relaxado, não contêm DNA suficiente para especificar um operon tra, necessário para a sua transferência (ROWBURY, 1977).

A autotransferibilidade é uma propriedade dos plasmídeos maiores, dotados de replicação estriada, como também de um plasmídeo de tamanho intermediário, o R 6K (KONTOMICHALOU et al, 1970).

Assim, a mobilização é um processo pelo qual um plasmídeo conjugativo propicia a transferência de um DNA, no qual ele não se liga covalentemente, se bem que uma eventual ligação transitória parece não estar totalmente afastada (NOVICK et al., 1976).

Com a mobilização da informação genética da protease e, caso se considere esse caráter um plasmídeo, pode-se, por extensão, considerá-lo um elemento pequeno, dotado de replicação relaxada e não conjugativo.

Existe, contudo, a possibilidade de que o plasmídeo RP4 tenha mobilizado cromossomo de uma linhagem de P. mirabilis para a outra.

No entanto, essa possibilidade não parece tão significante, devido à alta frequência de transferência observada na mobilização.

A explicação da existência de evidências genéticas, porém não físicas, da ocorrência de um plasmídeo, pode ser devido a uma condição inerente à distribuição de indivíduos nas populações de P. mirabilis examinadas. Realmente, basta considerarmos que numa população caracterizada como instável, por exemplo, a L-68 m, devemos encontrar representantes celulares P^- , P^+ estáveis e P^+ instáveis (uma parte da população irá liberar células

P^-). No primeiro tipo referido (P^-), o plasmídeo estaria ausente; no segundo, não haveria segregação (integrado?), e somente no terceiro tipo, P^+ instável, apenas uma parte da população, aquela que realmente é instável (destinada a segregar P^-) é que forneceria DNA extracromossômico, o que provavelmente seria insuficiente para a detecção de banda na eletroforese.

Por outro lado, vale a pena lembrar, que o fator sexo de Pseudomonas (HOLLOWAY, 1969) e o plasmídeo R que confere resistência à carbenicilina (SYKES & RICHMOND, 1970), embora se comportem geneticamente como plasmídeos, não foram ainda relacionados com nenhum dos DNAs extracromossômicos encontrados nesse organismo (FINLEY & PUNCH, 1972).

RESUMO

O estudo de indivíduos isolados revela que algumas culturas de Proteus mirabilis, recentemente obtidas, apresentam a condição de excretar protease como um caráter estável, onde todos os indivíduos, ou sua grande maioria, excretam protease (colônias P⁺). Algumas culturas, no entanto, excretam esta enzima como um caráter instável, ou seja, um número grande de indivíduos destas populações não excreta a enzima (P⁻). Assim pode-se postular a existência de linhagens de P. mirabilis estáveis e instáveis quanto à excreção de protease.

O mesmo não acontece com outras espécies bacterianas que apresentam, igualmente, atividade proteolítica tais como Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, Bacillus megaterium, Bacillus cereus e Staphylococcus aureus.

Tal instabilidade não foi observada em relação a algumas características bioquímicas ligadas ao P. mirabilis, tais como síntese da urease e produção de sulfeto de hidrogênio. Contudo, foi notada instabilidade em relação à auxotrofia, sem, contudo, mostrar qualquer relação com a da excreção da protease.

A ocorrência de células P⁻ em populações instáveis de P. mirabilis pode ser grandemente aumentada pelo cultivo prolongado em meio nutritivo sólido ou líquido e através de subcultivos sucessivos em caldo nutritivo.

Embora células P⁺ e P⁻ apresentam tempos de geração muito próximos quando crescidas durante um período curto em caldo nutritivo e em caldo nutritivo adicionado de gelatina, verifica-se crescimento diferencial favorável às células P⁻, quando subcultivadas repetidamente em caldo nutritivo sem gelatina.

Algumas colônias P⁺, recentemente isoladas de linhagens instáveis, podem apresentar células P⁻ em suas populações.

Colônias P⁺, isoladas de linhagens estáveis, mantidas estocadas por vários meses, podem apresentar certo grau de instabilidade, porém, colônias P⁺, isoladas, nas mesmas condições, de linhagens instáveis, apresentam instabilidade muito maior. Em ambas linhagens, estável e instável, pode-se contudo, localizar indivíduos P⁺ dotados de grande estabilidade.

Células P⁻, que são constituídas por indivíduos que perderam a condição de excretar protease, são incapazes de reverter à condição original, mesmo sob ação

de agentes mutagênicos químicos e físicos, bem como, por inoculação em camundongos.

Alguns agentes curagênicos são capazes de aumentar grandemente a ocorrência de células P⁻ em populações de P. mirabilis instáveis, mas não em populações estáveis.

Camundongos inoculados intraperitoneal mente com células P⁺, apresentam sobrevivência menor, quando comparados com aqueles inoculados com células P⁻. Contudo, uma responsabilidade exclusiva à protease não pode ser ainda atribuída.

A presença de plasmídeo R (Sm, Km, Ap, Hg), comprovada por transferência por conjugação, inibe parcialmente a excreção de protease, das células hospedeiras de P. mirabilis.

Também a presença desse plasmídeo R confere à célula maior sensibilidade ao desoxicolato de sódio.

A participação de vírus, como causador da instabilidade genética da excreção de protease em P. mirabilis |conversão fágica, lisogenia e pseudolisogenia (estádo de portador)| foi afastada.

Também a presença de gene mutador, ocasionando essa instabilidade, ficou excluída.

O caráter protease foi transduzido por vírus temperados, porém em baixa frequência.

Foi conseguida a transferência, por conjugação, do plasmídeo RP4 da linhagem de Escherichia coli J 53 para linhagens de P. mirabilis, conforme evidências genéticas e físicas.

Aparentemente, ocorreu mobilização, pelo plasmídeo RP4, do fator responsável pela excreção da protease, entre linhagens de P. mirabilis.

SUMMARY

The study of isolated individuals show that some newly obtained culture of Proteus mirabilis presents an ability to excrete protease as a stable character, where all individuals or a great majority, excrete proteases (P^+ colonies). However some culture, excrete this enzyme as an unstable character, that is, a great number of individuals of the population does not excrete the enzyme (P^-). So, it is possible to postulate concerning the protease excretion, the existence of stable and unstable strains of P. mirabilis.

The same thing does not happen with other bacteria strains, which, also show proteolytic activity such as Pseudomonas aeruginosa, Bacillus subtilis, B. megatherium, B. cereus and Staphylococcus aureus.

Such instability has not been observed in relation to some biochemical features found in P. mirabilis, such as, urea synthesis and hydrogen sulfide production. However, instability was noted concerning auxotrophy, without any relation to the instability found out for protease excretion.

The occurrence of P^- cells in unstable population of P. mirabilis may be greatly increased by the prolonged cultivation in either nutrient agar or nutrient broth medium and through successive transferring in nutrient broth.

Although P^+ and P^- cells presents generation times quite similar in a short culture period in nutrient broth and in nutrient broth gelatin added, it is seen enhanced differential growth concerning P^- cells, when repeated subculture in nutrient broth without gelatin is performed.

Some P^+ colonies, newly isolated from unstable strain, may have P^- cells in its population.

P^+ colonies, isolated from unstable strain and stored for several months, may show some degree of instability, however P^+ colonies, isolated, in the same conditions from unstable strain, presents greater instability. In both strains stable and unstable, it may, however, be localized P^+ individuals endowed with great stability.

P^- cells, constituted by individuals that lost the condition to excrete protease, are not capable to revert to the original condition, even under the

action of chemical or physical mutagens, as well as by inoculation in mice.

Some curing agents are capable to greatly increase the occurrence of P⁻ cells in unstable P.mirabilis population, but not in stable population.

Mice, intraperitonially inoculated with P⁺ cells, survive less than those innoculated with P⁻ cells. However this can not be accounted exclusively to protease.

The presence of plasmid R (Sm, Km, Ap, Hg) confirmed by transfer by conjugation, partially inhibit the excretion of protease, by the host cells of P.mirabilis.

The presence of this plasmid R, also, confer to the cell greater sensibility to sodium deoxycholate.

It was ruled out the participation of virus as causative of the genetic instability of the protease excretion in P. mirabilis (phage conversion, lysogeny and pseudolysogeny (carrier-state)).

Also the presence of mutator gene as causative of the instability was ruled out.

The protease character was transduced by temperate phage, however, in low frequency.

The transfer by conjugation of the RP4 plasmid from E. coli J 53, to P. mirabilis strains, was obtained as shown by physics and genetics evidences.

Aarently, there was a mobilization by the RP4 plasmid of the character responsible by the protease excretion among P. mirabilis strains.

REFERÉNCIAS BIBLIOGRÁFICAS*

ACHTMAN, M. & SKURRAY, R. - Redefinition of the mating phenomenon. In: Microbial Interaction. London, Chapman & Hall, 1977. 187p.

ADACHI, H.; NAKANO, M.; INUZUKA, M. & TOMOEDA, M. - Specific role of sex pili in the effective eliminatory action of sodium dodecyl sulfate on sex and drug resistance factors in Escherichia coli. J.Bact., 109: 1114-1124, 1972.

ADAMS, M.H. - Methods of study of bacterial viruses. Meth. med.Res. 2: 1-75, 1959.

ADAMS, M.H. & LURIA, S.E. - Transduction by bacteriophage Pl: abnormal phage function of the transducing particles. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 44: 590-594, 1958.

ADELBERG, E.A.; MANDEL, M. & CHEN, G.C.C. - Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitroso-guanadine in Escherichia coli K 12. Biochem.Biophys.Res. Commun., 18: 788-795, 1965.

* 1- Referências bibliográficas em ciências biomédicas - 1971 do Grupo de Bibliotecários Biomédicos da Assoc. Paul. de Bibliotecários. 2- Abreviação dos títulos das revistas segundo World Medical Periodicals, 1961.

AFFONSO, M.H.T. - Natureza genética da fermentação de lactose em amostras de Salmonella typhimurium. Tese de mestre do. Escola Paulista de Medicina. São Paulo, 1976. 38p.

ALPER, M.D. & AMES, B.N. - Positive selection of mutants with deletions of the gal-chl region of Salmonella chromosome as a screening procedure for mutagens that cause deletions. J.Bact., 121: 259-266, 1975.

AMARAL, D.; COSTA, S.O.P.; SCHWAB, A.; OLIVEIRA, E.N S.; BRANCO, C.L.; CURY, A. & TRAVASSOS, L.R. - Experimentos de Microbiologia Geral. Curitiba. Serviços de Recursos Audiovisuais de Curitiba, 1967. 170p.

AMES, B.N.; McCANN, J. & YAMASAKI, E. - Methods for detecting carcinogens and mutagens with the Salmonella/mammalian-microsome mutagenicity. Mutat.Res., 31: 347-364, 1975.

ANDERSON, E.S. - Possible importance of transfer factors in bacterial evolution. Nature (Lond.) 209: 637-638, 1966.

ANDERSON, E.S. & LEWIS, M.J. - Characterization of a transfer factor association with drug resistance factor in Salmonella typhimurium. Nature (Lond.) 208: 843-849, 1965.

ANDERSON, N.G. - The evolutionary significance of virus infection. Nature (Lond.) 227: 1346-1347, 1970.

ANDRESSON, O.S.; MAGNUSDOTTIR, R.A. & EGGERTSON, G. - Deletions of ribosomal proteins genes in Escherichia coli.

Merodiploids heterozygous for resistance to streptomycin and spectinomycin. Molec.gen., Genet., 144: 127-130, 1976.

AOKI-WATANABE, D.S. - Contribuição ao estudo do crescimento da Escherichia coli sensível e resistente a drogas por mutação e aquisição de fatores R. Tese de doutoramento. Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas de Botucatu - S.Paulo, 1973. 153 p.

APPELBAUM, P.C.; TRICHARDT, P.F.; KRIZSANOVICK, K. & COETZEE, J.N. - Abortive transduction of motility in Proteus and Providence strains. J.gen.Microbiol., 70: 361-364, 1972.

ARBER, W. - Transduction of chromosomal genes and episomes in Escherichia coli. Virology, 11: 273-288, 1960.

ARMITAGE, J.P.; ROWBURY, R.J. & SMITH, D.G. - Indirect evidence for cell wall and membrane differences between filamentous swarming cells and short non-swarming cells of Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 89: 199-202, 1975.

BAESS, I. - Report on a pseudolysogenic mycobacterium and a review of the literature concerning pseudolysogeny. Act.path.microbiol.scand., 79: 428-434, 1971.

BALASSA, G.; DOD, B. & ZUCCA, J. - Overproduction of sporulation-associated extracellular protease in Bacillus subtilis mutant. In: P. Gerhardt, H.L. Sadoff & R.N. Costilow (eds.). Spores VI. Amer.Soc.Microbiol., Washington, DC., 1975. p. 279-281.

BARBER, M. - The incidence of penicillin-sensitive variant colonies in penicillin-producing strains of Staphylococcus pyogenes. J.gen.Microbiol., 3: 274-277, 1949.

BARKSDALE, L. & ARDEN, S.B. - Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. Ann.Rev. Microbiol., 28: 265-299, 1974.

BARNES, W.M. - Plasmid detection and sizing in single colony lysates. Science, 195: 393-394, 1977.

BARON, L.S.; GEMSKI, P.; JOHNSON, E.M. & WOHLHIETER, J.A. - Intergeneric bacterial matings. Bact.Rev., 32: 362-369, 1968.

BARTH, P.T.; DATTA, N.; HEDGES, R.W. & GRINTER, N.J. - Transposition of a DNA sequence encoding trimethoprim and streptomycin resistances from R4 B3 to other replicons. J.Bact., 125: 800-810, 1976.

BAZARAL, M. & HELINSKI, D.R. - Replication of a bacterial plasmid and an episome in Escherichia coli. Biochemistry, 9: 399-406, 1970.

BAZZICALUPO, P. & TOCCHINI-VALENTINI, P.G. - Curing of an Escherichia coli episome by rifampicin. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 69: 298-300, 1972.

BEARD, J.P. & BISHOP, S. - Role of cell surface in bacterial mating. Requirement for intact mucopeptide in donors for the expression of surface exclusion in R⁺ strain of Escherichia coli. J.Bact., 123: 916-920, 1971.

BERINGER, J.E. - R factor transfer in Rhizobium leguminosarum. J.gen.Microbiol., 84: 188-198, 1974.

BERNARDI, G.; PRUNELL, A.; FONTY, G.; KOPECKA, H. & STRAUSS, F. - The mitochondrial genome of yeast: organization, evolution and the petite mutation. In: Saccone, C. & Kroon, A.M. (eds.) The genetic function of mitochondrial DNA, Amsterdam, North-Holland Publishing Co., 1976. p. 185-198.

BETZ, J.L.; BROWN, P.R.; SMITH, J.M. & CLARKE, P.H. - Evolution in action. Nature (Lond.) 247: 261-264, 1974.

BLACK, W.A. & GIRWOOD, R.W.A. - Carbenicillin resistance in Pseudomonas aeruginosa. Brit.Med.J., 4: 234, 1969.

BLAU, S. & MORDOH, J. - A new element in the control of DNA initiation in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.) 69: 2895-2898, 1972.

BÖHME, H. - "Über den einfluss von mutationen im genom des donorstammes auf die transcdutionen fähigkeit des Proteus-phagen π1. Sonderdruck aus: Struktur und Funktion des genetischen Erwin-Baur-Gedächtnisvorlesungen vol.III, Berlin. Academic. Verlag, 1964. p. 107-111.

BÖHME, H. - Genetics instability of an ultraviolet sensitive mutant of Proteus mirabilis. Biochem.Biophys.Res.Commun., 28: 191-196, 1967.

BONATO, M.C.M. - Comunicação pessoal, 1978.

BONDI, A.; KORNBLUM, J. & SAINT PHALLE, M. - Isolation of penicillin-susceptible mutants from penicilinase-producing strains of Micrococcus pyogenes. Proc.Soc.exp.Biol., 83: 527-541, 1953.

BOROWISKI, J. - Tendance naturelle de staphylocoques pénicillino-résistants donner des mutants sensibles à la pénicilline. Relations de cette propriété avec l'origine de souches et leur sensibilité aux bacteriophages. Ann. Inst.Pasteur, 104: 535-544, 1963.

BOUANCHAUD, D.H.; SCAVIZZI, M.R. & CHABBERT, Y.A. - Elimination by ethidium bromide of antibiotic resistance in Enterobacteria and Staphylococci. J.gen.Microbiol., 54: 417-425, 1969.

BOYCE, R.P. & HOWARD-FLANDERS, P. - Genetic control of DNA breakdown and repair in Escherichia coli K 12 treated with mitomycin C or ultraviolet light. Z. Vererbungslehre, 95: 345-349, 1964.

BRADLEY, D.E. - Adsorption of bacteriophages specific for Pseudomonas aeruginosa R factors RP 1 and R 1822. Biochem. Biophys. Res. Commun., 57: 893-900, 1974.

BRADLEY, D.E. - Adsorption of the R-specific bacteriophage PR 4 to pili determined by a drug resistance plasmid of the W compatibility group. J. gen. Microbiol., 95: 181-185, 1976.

BRAUN, W. - Bacterial genetics. 2.ed. Philadelphia, W.B. Saunders, 1965. 380p.

BRAUN, V.; REHN, K. & WOLFF, H. - Supramolecular structure of the rigid layer of cell wall of Salmonella, Serratia, Proteus and Pseudomonas fluorescens. Number of lipo-protein molecules in a membrane layer. Biochemistry, 9: 5041-5049, 1970.

BRENNER, D.J.; CITARELLA, R.V. & FALKOW, S. - Spisy prirodoved. Fak. Univ. J. E. Purkyne Brno. K43: 255-278, 1968.

BRENNER, D.J. & FALKOW, S. - Molecular relationships among members of the Enterobacteriaceae. Advanc. Genet., 16: 81-118, 1971.

BRYAN, A.H. & BRYAN, C.G. - Bacteriology. 5a.ed. N.York,
Barnes & Noble, Inc., 1956. 422 p.

BRYSON, V.P.; SKAAR, D.; DAVIDSON, H.; HADDEN, J. & BOMPIANI,
G. - Genetic and biochemical studies of bacteria. Ann.
Rept.Biol.Lab.Cold Spring Harbor, 1954-1955. p. 16-22.

BUKHARI, A.I. & LJUNGQUIST, E. - Bacteriophage Mu and trans
position elements. In: D. Schlessinger (ed.), Micro-
biology, Washington, DC, Am.Soc.Microbiol., 1978. p.
52-54.

BURMAN, L.G.; NORDSTROM, K. & BLOOM, G.D. - Murein and the
outer penetration barrier of Escherichia coli K 12,
Proteus mirabilis and Pseudomonas aeruginosa. J.Bact.,
112: 1364-1374, 1972.

CHABBERT, Y.A.; BAUDENS, J.G. & BOUANCHAUD, D.H. - Medical
aspects of transferable drug resistance. In: G.E.W.
Wolstenholme & M. O'Connor (eds.), Bacterial episomes and
plasmids, London, J.& A. Churchill Ltd., 1969. p. 227-
239.

CHAI, K.H. & SOO-HOO, T.S. - The antibiogram and the distribution
of Proteus organisms isolated from urinary tracts.
Med.J.Malaya, 25: 43-45, 1970.

CHAKRABARTY, A.M. - Genetic basis of the biodegradation of
salicylate in Pseudomonas. J.Bact., 112: 815-823, 1972.

CHAKRABARTY, A.M. - Plasmids in Pseudomonas. Ann.Rev.Genet., 10: 7-30, 1976.

CHAKRABARTY, A.M.; CHOU, G. & GUNSALUS, I.C. - Genetic regulation of octane dissimilation plasmid in Pseudomonas (incompatibility). Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 70: 1137-1140, 1973.

CHARNEY, J. & TOMARELLI, R.M. - A colorimetric method for the determination of the proteolytic activity of duodenal juice. J.Biol.Chem., 171: 501-505, 1947.

CLARKE, N.A. - Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of Bacillus megaterium. II. The growth of Bacillus megaterium in synthetic medium. J.Bact., 63: 187-192, 1952.

CLARKE, N.A. & COWLES, P.B. - Studies on the host-virus relationship in a lysogenic strain of Bacillus megaterium. I. The relationship between groth and bacteriophage production in cultures of Bacillus megaterium. J.Bact., 63: 177-186, 1952.

CLOWES, R.C. - Molecular structure of bacterial plasmids. Bacteriol.Rev., 36: 361-405, 1972.

COETZEE, J.N. - Transduction of swarming in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 33: 1-7, 1963.

COETZEE, J.N. - Genetics of the Proteus group. Ann.Rev.
Microbiol., 26: 23-54, 1972.

COETZEE, J.N. - High frequency transduction of kanamycin resistance in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 84: 285-296, 1974.

COETZEE, J.N. - High frequency transduction of resistance to ampicillin and kanamycin in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 87: 173-176, 1975_a.

COETZEE, J.N. - Transduction of Proteus vulgaris strain by a Proteus mirabilis bacteriophage. J.gen.Microbiol., 89: 299-309, 1975_b.

COETZEE, J.N. - Derivation and properties of Proteus mirabilis systems for high frequency transduction of streptomycin-sulphonamide and streptomycin-sulphonamide-kanamycin resistances. J.gen.Microbiol., 96: 95-107, 1976.

COETZEE, J.N. & HAWTREY, A.O. - A change in phenotype associated with the bacteriophage carrier state in a strain of Proteus mirabilis. Nature (Lond.), 194: 1196-1197, 1962.

COETZEE, J.N. & KRIZSANOVICH-WILLIAMS, K. - Transduction of leucine auxotrophs of Proteus mirabilis to prototrophy or antibiotic resistance by P.mirabilis high frequency transduction bacteriophages. J.gen.Microbiol., 92: 369-374, 1976.

- COETZEE, J.N. & SACKS, T.G. - Lysogeny in the genus Proteus.
Nature (Lond.) 184: 1340, 1959.
- COETZEE, J.N. & SACKS, T.G. - Intrastrain tranduction in
Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 23: 209-215, 1960 a.
- COETZEE, J.N. & SACKS, T.G. - Transduction of streptomycin
resistance in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 23:
445-455, 1960 b.
- COETZEE, J.N.; DATTA, N. & HEDGES, R.W. - R factors from
Proteus rettgeri. J.gen.Microbiol., 72: 543-552, 1972.
- COETZEE, J.N.; SMIT, J.A. & PROZESKY, O.W. - Properties of
Providence and Proteus morgani transducing phages. J.
gen.Microbiol., 44: 167-176, 1966.
- COETZEE, J.N.; DATTA, N.; HEDGES, R.W. & APPELBAUM, P. -
Transduction of R factors in Proteus mirabilis and
P.rettgeri. J.gen.Microbiol., 76: 355-368, 1973.
- COHEN, S.N. - Transposable genetic elements and plasmid evolution. Nature (Lond.) 263: 731-738, 1976.
- COHEN, S.N. & MILLER, C.A. - Non-chromosomal antibiotic
resistance in bacteria. III. Isolation of the discrete
transfer unit of the R factor R 1. Proc.nat.Acad.Sci.
(Wash.) 67: 510-516, 1970.
- COHEN, S.N.; SILVER, R.P.; SHARP, P.A. & MCCOUBREY, A.E. -
Studies on the molecular nature of R factors. Ann. N.Y.
Acad.Sci., 182: 172-187, 1971.

COOK, A.R. - The elimination of urease activity in Streptococcus faecium as evidence for plasmid-coded urease. J. gen. Microbiol., 92: 49-58, 1976.

CORDS, B.R.; MCKAY, L.L. & GUERRY, P. - Extrachromosomal elements in group N streptococci. J. Bact., 117: 1149-1152, 1974.

COSTA, M.L.P. - Comunicação pessoal, 1978.

COSTA, S.O.P. - Obtenção de mutantes de Saccharomyces cerevisiae com deficiência respiratória pela ação do dodecil sulfato de sódio. Tese de doutoramento. Univ. de S.Paulo, 1969. 114 p.

COSTA, S.O.P. - Produção de colicinas em Escherichia coli e ação de enzima proteolítica bacteriana sobre colicina. In: Azevedo, J.L. & Costa, S.O.P., (eds.), Exercícios práticos de genética. São Paulo, Companhia Editora Nacional e Editora da Universidade de São Paulo, 1973. p. 186-188.

COSTA, S.O.P. - Origem procariótica da mitocondria. Rev. Microbiol., 5: 85-94, 1974.

COSTA, S.O.P. & BACILA, M. - Induction of respiratory-deficient nonchromosomal "petites" of Saccharomyces cerevisiae by sodium dodecyl sulfate. J. Bact., 115: 461-463, 1973.

COUGHLIN, C.A. & ADELBERG, E.A. - Bacterial mutation induced by thymine starvation. Nature (Lond.) 178: 531-532, 1956.

COURTURIER, M. - The integration and excision of the bacteriophage Mu-1. Cell, 7: 155-163, 1976.

COX, E.C. - Mutator gene action and the replication of bacteriophage DNA. J.molec.Biol., 50: 129-135, 1970.

COX, E.C. - Bacterial mutator genes and the control of spontaneous mutation. Ann.Rev.Genet., 10: 135-156, 1976.

COX, E.C. & YANOFSKY, C. - Mutator gene studies in Escherichia coli. J.Bact., 100: 390-397, 1969.

DATTA, N. & BARTH, P. - Hfr-formation by I pilus-determining plasmids in Escherichia coli. J.Bact., 125: 811-817, 1976.

DATTA, N. & HEDGES, R.W. - Host ranges of R factors. J.gen. Microbiol., 70: 453-460, 1972.

DATTA, N.; HEDGES, R.W.; SHAW, E.J.; SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. - Properties of an R factor from Pseudomonas aeruginosa. J.Bact., 108: 1244-1249, 1971.

DATTA, N. & KONTOMICHALOU, P. - Transmissible R factors controlling penicillinase synthesis. Proc. 9th Int. Cong. Microbiol., 1966. p. 22-23.

DAVIDSON, N.; DEONIER, R.C.; HU, S. & OHTSUBO, E. - The DNA sequence organization of F and F-primes and the sequences involved in Hfr formation. In: D. Schlessinger, (ed.) Microbiology, Washington DC. Am.Soc.Microbiol., 1974. p. 56-65.

DAVIS, B.D. & MINGIOLI, E.S. - Mutants of Escherichia coli requiring methionine or vitamin B 12. J.Bact., 60: 17-28, 1950.

DAWSON, G.W.P. & SMITH-KEARY, P.T. - Episomic control of mutation in Salmonella typhimurium. Heredity, 18: 1-20, 1963.

DEMERECK, M. & HANSEN, J. - Mutagenic action of manganous chloride. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 16: 215-228, 1951.

DEMERECK, M.; ADELBERG, E.A.; CLARK, A.J. & HARTMAN, P.E. - A proposal for uniform nomenclature in bacterial genetics. Genetics, 54: 61-76, 1966.

DEMERECK, M.; LAHR, E.L.; MYAKE, T.; GOLDMAN, L.; BALBINDER, E.; BANIC, S.; HASHIMOTO, K.; GLANVILLE, E.V. & GROSS, J.D. - Mutability factor. Carnegie Inst. Washington Yearb., 57: 397-398, 1958.

DEONIER, R.C. & DAVIDSON, N. - The sequence organization of the integrated F plasmid in two Hfr strains of Escherichia coli. J.molec.Biol., 107: 207-222, 1976.

DEONIER, R.C.; OH, G.R. & HU, M. - Further mapping of IS 2 and IS 3 in the lac-pur E region of the Escherichia coli K-12 genome: Structure of F-prime ORF 203. J.Bact., 129, 1129-1140, 1977.

DI JOSEPH, C.G.; BAYER, M.E. & KAJI, A. - Host cell growth in the presence of thermosensitive drug resistance factor R ts I. J.Bact., 115: 399-410, 1973.

DIKYI, B.N. - Sensitivity of various Proteus species to antibiotics. Antibiotiki, 16: 622-624, 1971.

DOBOZY, A. & HAMMER, H. - Incidence of transmissible drug resistance in Proteus strains. Acta microbiol.Acad.Sci.hung., 15: 181-185, 1968.

DUNN, N.W. & GUNSAULUS, I.C. - Transmissible plasmid coding early enzymes of naphthalene oxidation in Pseudomonas putida. J.Bact., 114: 974-979, 1973.

EDWARDS, P.R.; DAVIS, B.R. & CHERRY, W.B. - Transfer of antigens by phage lysates with particular reference to the l, w antigens of Salmonella. J.Bact., 70: 279-283, 1955.

FAIRBROTHER, R.W.; PARKER, L. & EATON, B.R. - The stability of penicillinase-producing strains of Staphylococcus aureus. J.gen.Microbiol., 10: 309-316, 1954.

FALKOW, S.; HAAPALA, D.K. & SILVER, R.P. - Relationships between extrachromosomal elements. In: G.E.W. Wolstenholme & M.O'Connor, (eds.) Bacterial episomes and plasmids. Ciba Foundation Symposium. London, Churchill, 1969. p. 136-158.

FALKOW, S.; WOHLHIEDER, J.A.; CITARELLA, R.V. & BARON, L.S.-

Transfer of episomic elements to Proteus. I Transfer of F-linked chromosomal determinants. J.Bact., 87: 209-219, 1964a.

FALKOW, S.; WOHLHIEDER, J.A.; CITARELLA, R.V. & BARON, L.S.-

Transfer of episomic elements to Proteus. II Nature of lac⁺ Proteus strains isolated from clinical specimens.

J.Bact., 88: 1598-1601, 1964b.

FALKOW, S.; TOMPKINS, L.S.; SILVER, R.P.; GUERRY, P. & LE BLANC, D.J. - The replication of R-factor DNA in Escherichia coli K-12 following conjugation. Ann.N.Y.Acad.Sci., 182: 153-171, 1971.

FINLEY, R.B. & PUNCH, J.D. - Satellite deoxyribonucleic acid in Pseudomonas aeruginosa. Canad.J.Microbiol., 18: 1003-1006, 1972.

FRAENKEL, D.G. & BANERJEE, S. - Deletion mapping of zwf. The gene for a constitutive glucose-6-phosphate dehydrogenase in Escherichia coli. Genetics, 71: 481-489, 1972.

FRANKLIN, N. - Illegitimate recombination. In: A.D.Hershey (ed.), The Bacteriophage lambda. New York, Cold Spring Harbor Lab., 1971. p. 175-194.

FRAZIER, W.C. - A method for detection of changes in gelatin due to bacteria. J.infect.Dis., 39: 302-309, 1926.

FRED, E.B.; BALDWIN, I.L. & MCCOY, E. - Root nodule bacteria and leguminosis plants. Madison, (Wis.), Univ.Wisconsin Press, 1932. 343p.

FRÉDÉRICQ, P. - Actions antibiotiques reciproques chez les Enterobacteriaceae. Rev.belge Path., 29: (supl.4): 1, 1948.

FRÉDÉRICQ, P. & BETZ-BARAU, M. - Transfert génétique de la propriété colicinogène en rapport avec la polarité F des parents. C.R.Soc.Biol. (Paris), 147: 2043-2045, 1953.

FRÉDÉRICQ, P.; KRCMÉRY, V. & KETTNER, M. - Transferable colicinogenic factors as mobilizing agents for extra-chromosomal streptomycin resistance. Zh.Allg.Mikrobiol., 11: 11-17, 1971.

FUGITA, H.; YAMAGUCHI, S. & IINO, T. - Studies on H-O variants in Salmonella in relation to phase variation. J.gen.Microbiol., 76: 127-134, 1973.

FULLBROOK, P.D.; ELSON, S.W. & SLOCOMBE, L. - R factor mediated β-lactamase in Pseudomonas aeruginosa. Nature (London) 226: 1054-1056, 1970.

GEMSKI, P. Jr.; WOHLHIETER, J.A. & BARON, L.S. - Chromosome transfer between Escherichia coli Hfr strains and Proteus mirabilis. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 58: 1461-1467, 1967.

GINOZA, H.S. & PAINTER, R.B. - Genetic recombination between the resistance transfer factor and the chromosome of Escherichia coli. J.Bact., 87: 1339-1345, 1964.

GOEBEL, W. - Integrative suppression of temperature-sensitive mutants with a lesion in the initiation of DNA replication. Replication of autonomous plasmids in suppressed state. Europ.J.Biochem., 43: 125-130, 1974.

GOEBEL, W. & SCHREMPF, H. - Replication of plasmid DNA in temperature-sensitive DNA replication mutants of Escherichia coli. Biochim.biophys.Acta. (Amst.), 262: 32-41, 1972.

GOLDSTEIN, A. & SMOOT, J.S. - A strain of Escherichia coli with an unusually high rate of auxotrophic mutation. J. Bact., 70: 588-595, 1955.

GRABOW, W.O.K. - Genetic studies of methionine synthesis in Proteus mirabilis. D.S. tesis. University of Pretoria. South Africa, 1970.

GRABOW, W.O.K. - Transductional analysis of cisteine mutants in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 70: 77-85, 1972.

GRAEVENTIZ, A. & NOURBAKHSH, M. - Antimicrobial resistance of the genera Proteus, Providencia & Serratia with special reference to multiple resistance patterns. Med.Microbiol. Immunol., 157: 142-148, 1972.

GRATIA, A. - Numerical relations between lysogenic bacteria and particles of bacteriophage. Ann.Inst.Pasteur, 57: 652-676, 1936.

GREEN, D.M. & COLARUSSO, L.J. - The physical and genetic characterization of a transformable enzyme: Bacillus subtilis α -amilase. Biochim.biophys.Acta, 89: 277-281, 1964.

GRINSTED, J.; SAUNDERS, J.R.; INGRAM, L.C.; SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. - Properties of an R factor which originated in Pseudomonas aeruginosa 1822. J.Bac., 110: 529-537, 1972.

GROSS, J.D.; KARAMATA, D. & HEMPSTEAD, W.G. - Temperature-sensivite mutants of B.subtilis defective in DNA synthesis. Cold Spring Harbor Symp.Quant.Biol., 33: 307-312, 1968.

GUIMARÃES, W.V. - Studies of plasmids in plant pathogenic bacteria. I. Conjugational plasmid transmission and plasmid-promoted chromosome mobilization in Pseudomonas phaseolicola and Erwinia crysanthemi. II. Effect of plasmids on physiology and pathogenicity of Erwinia crysanthemi. Ph.D. Thesis. Univ.California, Berkeley, 1976. 109 p.

GUNDERSEN, W.B. - New type of streptomycin resistance resulting from action of the episome-like mutator factor in Escherichia coli. J.Bact., 86: 510-516, 1963.

GUNDERSEN, W.B.; JYSSUM, K. & LIE, S. - Genetic instability with episome-mediated transfer in Escherichia coli. J. Bact., 83: 616-623, 1962.

GUO, M.M.S. & LIU, P.V. - Serological specificities of ureases of Proteus species. J.gen.Microbiol., 38: 417-422, 1965.

HAAPALA, D.K. & FALKOW, S. - Characterization of R factor DNA in Proteus mirabilis. Bact.Proc., 48, 1969.

HANAWALT, P.C. & HAYNES, R.H. - Repair replication of DNA in bacteria: irrelevance of chemical nature of base defect. Biochem.Biophys.Res.Commun., 19: 462-467, 1965.

HARADA, K.; KAMEDA, M.; SUZUKI, M. & MITSUHASHI, S. - Drug resistance of enteric bacteria. III. Acquisition of transference of nontransmissible R (Tc) factor in cooperation with F factor and formation of FR (Tc). J.Bact., 88: 1257-1265, 1964.

HARADA, K.; KAMEDA, M.; SUZUKI, M. & MITSUHASHI, S. - Drug resistance of enteric bacteria. X. Recombination of defective R (Tc) factor with other episomes. Jap.J. Microbiol., 11: 143-151, 1967.

HARTMANN, G.; HONIKEL, K.A.; KNUSEL, F. & STAHELIN, M. -

The specific inhibition of the DNA directed RNA synthesis by rifampicin. Biochim.biophys.Acta. (Amst.), 145: 843-847, 1967.

HAUSER, G. - Über faulniss-bakterien. Leipzig, Verlag von F.C.W. Vogel, 1885. 107 p.

HEDEN, L.O. & RUTBERG, L. - R factor-mediated polarized chromosomal transfer in Escherichia coli C. J.Bact., 127: 46-50, 1976.

HEDGES, R.W. - R factors from Proteus mirabilis e P. vulgaris. J.gen.Microbiol., 87: 301-311, 1975.

HEDGES, R.W. & JACOB, A.E. - Transposition of ampicillin resistance from RP4 to other replicons. Molec.gen.Genet., 132: 31-40, 1974.

HEDGES, R.W.; RODRIGUES-LEMOINE, V. & DATTA, N. - R factor from Serratia marcescens. J.gen.Microbiol., 86: 88-92, 1974.

HEFFRON, C.; SUBLETT, R.; HEDGES, R.W.; JACOB, A. & FALKOW, S. - Origin of the TEM beta-lactamase gene found on plasmids. J.Bact., 122: 250-256, 1975.

HELINSKI, D.R. - Plasmid determined resistance to antibiotics: molecular properties of R factors. Ann.Rev.Microbiol., 27: 437-469, 1973.

HELINSKI, D.R. - Plasmids. Fed.Proc., 35: 2024-2043, 1976.

HERSHEY, A.D.; KALMANSON, G. & BRONFENBRENNER, J. - Quantitative methods in the study of the phage-antiphage reactions. J.Immunol., 46: 267-279, 1943.

HERSHEY, A.D.; KALMANSON, G.M. & BRONFENBRENNER, J. - Coordinate effects of electrolyte and antibody on the infectivity of bacteriophage. J.Immunol., 48: 221-239, 1944.

HERSHFIELD, V.; BOYER, H.W.; CHOW, L. & HELINSKI, D.B. - Characterization a mini-Col E 1 plasmid. J.Bact., 126: 447-453, 1976.

HERSHFIELD, V.; BOYER, H.W.; YANOFSKY, C.; LOVETT, M. & HELINSKI, D.R. - Plasmid Col E 1 as a molecular vehicle for cloning and amplification of DNA. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.) 71: 3455-3459, 1974.

HESSLEWOOD, S.R. & SMITH, J.T. - Envelope alterations produced by R factors in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 85: 146-152, 1974.

HILL, R.F. - Location of genes controlling excision repair of UV damage and mutator activity in Escherichia coli WP 2. Mutat.Res., 9: 341-344, 1970.

HIROTA, Y. - The effect of acridine dyes on mating type factors in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 46: 57-64, 1960.

- HIROTA, Y.; MORDOH, J. & JACOB, P. - On the progress of cellular division in Escherichia coli. III. Thermosensitive mutants of Escherichia coli altered in process of DNA initiation. J.mol.Biol., 53: 369-387, 1970.
- HOFSTEN, B.V. & TJEDER, C. - An extracellular proteolytic enzyme from a strain of Arthrobacter. I Formation of the enzyme isolation of mutant strains without proteolytic activity. Biochim.biophys.Acta, 110: 576-584, 1965.
- HOHN, B. & KORN, D. - Co-segregation of a sex factor with the Escherichia coli chromosome during curing by acridine orange. J.molec.Biol., 45: 385-395, 1969.
- HOLLOWAY, B.W. - Genetics of Pseudomonas. Bact.Rev., 33: 419-443, 1969.
- HOWARTH, S. - Resistance to the bactericidal effect of ultra violet radiation conferred on enterobacteria by the colicine factor Col I. J.gen.Microbiol., 40: 43-55, 1965.
- HOWE, M.M. & BADE, E.G. - Molecular biology of bacteriophage Mu. Science, 190: 624-632, 1975.
- HU, S.; OHTSUBO, E.; DAVIDSON, N. & SAEDLER, H. - Electron microscope heteroduplex studies of sequence relations among plasmids: Identification and mapping of the insertion sequences IS 1 and IS 2 in F and R plasmids. J. Bact., 122: 764-775, 1975.
- HUTCHISON, W.G. & MEDILL, M.A. - The isolation of Proteus mutants and their use in recombination experiments. Bact.Proc., G-51, 40-41, 1954.

IINO, T. & LEDERBERG, J. - Genetics of Salmonella. In: van Oye E. (ed.) The world problem of Samonellosis. Mono-
graphiae biol., 13: 111-114, 1964.

INOUE, M. - Unlinking of cell division from deoxiribonucleic acid synthesis mutant of Escherichia coli. J.Bact., 99: 842-850, 1969.

INUZUKA, N.; NAKAMURA, S.; INUZUKA, M. & TOMOEDA, M. - Specific action of sodium dodecyl sulfate on the sex factor of Escherichia coli K 12 strains. J.Bact., 100: 827-835, 1969.

ISHII, Y. & KONDO, S. - Spontaneous and radiation-induced deletion mutations in Escherichia coli strains with different repair capacities. Mutat.Res., 16: 13-25, 1972.

ISHII, Y. & KONDO, S. - Comparative analysis of deletion and base-change mutabilities of Escherichia coli B strains differing in DNA repair capacity (wild type, uvr A⁻, pol A⁻, rec A⁻) by various mutagens. Mutat.Res., 27: 27-44, 1975.

ITO, J. & SPIZIZEN, J. - Genetic studies of catabolite repression insensitive sporulation mutants of Bacillus subtilis. In: J.P. Aubert; P. Schaeffer & J. Szulmaster (eds.). Regulation de la sporulation microbienne. Colloq.Int.C.N.R.S., 1973. p. 81-82.

IYER, V.N. & SZYBALSKI, W. - Mitomycin C and porfiromycin: chemical mechanisms of activation and cross-linking of DNA. Science, 145: 55-57, 1964.

JACOB, A.E.; CRESSWELL, J.M. & HEDGES, R.W. - Molecular characterization of the P group plasmid R 68 and variants with enhanced chromosomal mobilizing ability. Fed.Eur. Microbiol.Soc.Lett., 22: 17, 1977.

JACOB, F. - Transduction of lysogeny in Escherichia coli. Virology, 1: 207-220, 1955.

JACOB, F. & WOLLMAN, E.L. - Lysogeny. In: F.N. Burnet & W. M. Stanley. The viruses. 2.ed. N.York.Acad.Press., 1959. p. 319.

JOHNSTON, J.H. & RICHMOND, M.H. - The increased rate of loss of penicillinase of rifampicin. J.gen.Microbiol., 60: 137-139, 1970.

JULIANI, M.H. - Indução de deficiência respiratória do tipo citoplasmática, em Saccharomyces cerevisiae pela ação do cloridrato de guanidina. Tese de mestrado. Univ. de S. Paulo. São Paulo, 1972. 75 p.

JULIANI, M.H. - Características do processo de indução da mutação rho⁻ em Saccharomyces cerevisiae pela ação do cloridrato de guanidina. Tese de doutoramento. Univ. de S. Paulo, 1974. 91 p.

JULIANI, M.H. & COSTA, S.O.P. - Induction of ρ -mutants in Saccharomyces cerevisiae by guanidine hydrochloride. II. Conditions that prevent ρ - induction. Mutat.Res., 29: 335-342, 1975.

JULIANI, M.H.; COSTA, S.O.P. & BACILA, M. - Non-chromosomal respiratory deficient mutants induced by guanidine hydrochloride in Saccharomyces cerevisiae. Biochem.Biophys.Res.Commun., 53: 531-538, 1973.

JULIANI, M.H.; GAMBARINI, A.G. & COSTA, S.O.P. - Induction of ρ -mutants in Saccharomyces cerevisiae. I. Genetic analysis. Mutat.Res., 29: 67-75, 1975.

JYSSUM, K. - Observations on two types of genetic instability in Escherichia coli. Acta.path.microbiol.scand., 48: 113-120, 1960.

JYSSUM, K. - Mutator factor in Neisseria meningitidis associated with increase sensitivity to ultraviolet and defective transformation. J.Bact., 96: 165-172.

KAUFFMANN, F. - Enterobactereaceae. Copenhagen, Ejear Munksgaard, 1951. 320 p.

KAUFFMANN, F. - Zur biochemischen und serologischen gruppen und typen einteilung der Enterobacteriaceae. Zbl.Bakt., I Abt.Ref., 165: 344-354, 1956.

KAUFFMANN, F. - Bacteriology of Enterobacteriaceae. Copenhagen,
Einar Munksgaard, 1966.

KELLY, C.F. & HITE, K.E. - Microbiology. 2a.ed. N.York,
Appleton-Century-Crofts, Inc., 1955. 615 p.

KIRCHNER, C.E.J. - The effects of the mutator gene of molecular
changes and mutation in Salmonella typhimurium. J.molec.
Biol., 2: 231-238, 1960.

KIRCHNER, C.E.J. & RUDDEN, M.J. - Location of a mutator gene
in Salmonella typhimurium by cotransduction. J.Bact.,
92: 1453-1456, 1966.

KONRAD, E.B. - Isolation of an Escherichia coli K-12 dna E
mutation as a mutator. J.Bact., 133: 1197-1202, 1978.

KONTOMICHALOU, P.; MITANI, M. & CLOWES, R.C. - Circular R-
-factor molecules controlling penicillinase synthesis,
replicating in Escherichia coli under either relaxed or
stringent control. J.Bact., 104: 34-44, 1970.

KOPECKO, D.J. & COHEN, S.N. - Site specific rec A - independent recombination between bacterial plasmids, involvement of palindromes at recombinational loci. Proc.nat.
Acad.Sci. (Wash.) 72: 1373-1377, 1975.

KOPECKO, D.J. & PUNCH, J.D. - Regulation of R-factor replication in Proteus mirabilis. Ann.N.Y.Acad.Sci., 182:
207-216, 1971.

KOZAK, W.; RAJCHERT-TRZPIL, M. & DOBRZANSKI, W.L. - The effect of proflavin, ethidium bromide and an elevated temperature on the appearance of nisin-negative clones in nisin-producing strains of Streptococcus lactis.

J.gen.Microbiol., 83: 295-302, 1974.

KRCMÉRY, V. & JANOUSKOVA, J. - Effect of rifampicin on stability and transfer of R-factors. Z.Allg.Mikrobiol., 11: 97-101, 1971.

LACEY, R.W. - Transfer of tetracycline resistance between strains of Staphylococcus aureus in mixed cultures. J.gen.Microbiol., 69: 229-237, 1971.

LACY, G.H. & LEARY, J.V. - Plasmid-mediated gene transfer in Pseudomonas glycinea. Proc.Am.Phytopathol.Soc., 2: 115, 1975 (abst.)

LACY, G.H. & LEARY, J.V. - Selection of efficient chromosomal donors from Pseudomonas glycinea carrying P plasmid R 6886. Proc.Am.Phytopathol.Soc., 3: 223, 1976_a. (abst.)

LACY, G.H. & LEARY, J.V. - Plasmid-mediated transmission of chromosomal genes in Pseudomonas glycinea. Genet.Res.Camb., 27: 363-368, 1976_b.

LAI, M.; PANOPoulos, N.J. & SHAFFER, S. - Transmission of R plasmids among Xanthomonas spp. and other plant pathogenic bacteria. Phytopathology, 67: 1044-1050, 1977.

LATARJET, R.; MORENNE, P. & BERGER, R. - Un appareil simple pour le dosage des rayonnements ultraviolets é mis par les lamps germicides. Ann.Inst.Pasteur, 85: 174-184, 1953.

LAUTROP, H.; ØRSKOV, I. & GAARLEV, K. - Hydrogen sulfide producing of an Escherichia coli. Acta path.microbiol. scand., 79: 641-650, 1971.

LAYNE, P.; HU, A.S.L.; BALOWS, A. & DAVIS, B.R. - Extra-chromosomal nature of hydrogen sulfide production in Escherichia coli. J.Bact., 106: 1024-1030, 1971.

LEDERBERG, J. & IINO, T. - Phase variation in Salmonella. Genetics, 4: 743-757, 1956.

LEDERBERG, J. & LEDERBERG, E.M. - Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J.Bact., 63: 390-406, 1952.

LEDERBERG, S. - Suppression of multiplication of heterologous bacteriophages in lysogenic bacteria. Virology, 3: 496-513, 1957.

LEHRBACH, P.; KUNG, A.H.C.; LEE, B.T.O. & JACOBY, G.A. -

Plasmid modification of radiation and chemical mutagen sensitivity in Pseudomonas aeruginosa. J.gen.Microbiol., 98: 167-176, 1977.

LE MINOR, E. & PIÉCHAUD - Note technique. Une méthode rapide de recherche de la protéolise de la gelatine. Ann.Inst.Pasteur, 105: 792-794, 1963.

LENNOX, E.S. - Transduction of linked genetic characters of the host by bacteriophage P 1. Virology, 1: 190-206, 1955.

LEPECQ, J.B. & PAOLETTI, J.A. - A fluorescent complex between ethidium bromide and nucleic acids. J.molec.Biol., 27: 87-106, 1967.

LIBERFARB, R.M. & BRYSON, V. - Isolation, characterization and genetic analysis of mutator genes in Escherichia coli B and K-12. J.Bact., 104: 363-375, 1970.

LOWBURY, E.J.L.; KIDSON, A.; LILLY, H.A.; AYLIFFE, G.A.J. & JONES, R.J. - Sensitivity of Pseudomonas aeruginosa to antibiotics: emergence of strains highly resistant to carbenicillin. Lancet, II: 448-452, 1969.

LOWRY, O.H.; ROSEBOROUGH, N.J.; FAHR, A.L. & RANDALL, R.J. - Protein measurement with the folin fenol reagent. J.biol.Chem., 193: 265-275, 1951.

LWOFF, A. & GUTMAN, A. - Les problèmes de la production du bactériophage par les souches lysogènes. La lise spontanée du Bacillus megaterium. C.R.Acad.Sci. (Paris), 229: 605-607, 1949_a.

LWOFF, A. GUTMAN, A. - Production discontinue de bactériophages par une souche lysogène de Bacillus megaterium. C.R.Acad.Sci. (Paris), 229: 679-682, 1949_b.

LWOFF, A. & GUTMAN, A. - La perpetuation endomicrobienne du bactériophage chez un Bacillus megaterium lysogène. C.R.Acad.Sci. (Paris), 229: 789-791, 1949_c.

LWOFF, A. & GUTMAN, A. - La libération de bactériophages par la lyse d'une bactérie lysogène. C.R.Acad.Sci. (Paris), 230: 154-156, 1950_a.

LWOFF, A. & GUTMAN, A. - Recherches sur un Bacillus megaterium lysogène. Ann.Inst.Pasteur, 78: 711-739, 1950_b.

MACCACARO, G.A. & HAYES, W. - The genetics of fimbriation in Escherichia coli. Genet.Res., 2: 394-405, 1961.

MAC PHEE, D.G. - Effect of rec mutations on the ultraviolet protecting and mutation-enhancing properties of the plasmid R-Utrecht in Salmonella typhimurium. Mutat.Res., 19: 356-359, 1973.

MAGGI, N.; PASQUALUCCI, R.; BALLOTTA, R. & SENSI, P. - Rifampicin: a new orally active rifamycin. Chemoterapia, 11: 285, 1966.

- MAHLER, H.R. - Genetic autonomy of mitochondrial DNA. In: Hamkalo, B.A. & Papaconstantinou, J. (eds.). Molecular cytogenetics, New York, Plenum Press, 1973. p.181-208.
- MARTIN, R.R.; SOKATCH, J.R. & UNGER, L. - Formation of Escherichia coli Hfr strains by integrative suppression with a Pseudomonas R factor. In: Abstracts of 75th Ann. Mtg. N.York, Am.Soc. for Microbiol., 1975. 336 p.
- MATELMANS, K.E.; BABUDRI, N. & SAMER, L. - Expression of the plasmid pKM 101 determined repair system in rec A and lex-strains of Escherichia coli. Molec.gen.Genet., 145: 303-306, 1976.
- MAY, J.W.; HOUGHTON, R.H. & PERRET, C.J. - The effect of growth at elevated temperatures on some heritable properties of Staphylococcus aureus. J.gen.Microbiol., 37: 157-169, 1964.
- McCANN, J. & AMES, B.N. - Detection of carcinogens as mutagens in Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals: discussion. Proc.nat.Acad.Sci., 73: 950-954, 1976.
- McCANN, J.; SPINGARN, N.E.; KOBORI, J. & AMES, B.N. - Detection of carcinogens as mutagens: bacterial tester strains with R factor plasmids. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 72: 979-983, 1975.

McKAY, L.L.; BALDWIN, K.A. & ZOTTOLA, E.A. - Loss of lactose metabolism in lactic streptococci. Appl.Microbiol., 23: 1090-1096, 1972.

MEYNELL, E. & MEYNELL, G.G. - Phylogenetic relationship of drug-resistance factors and other transmissible bacterial plasmids. Bact.Rev., 32: 55-83, 1968.

MILLER, H.J. - "Experiments in molecular genetics". N.York, Cold Spring Harbor Laboratory, 1972. 466 p.

MITSUHASHI, S. - "Drug action and drug resistance in bacteria". vol. II, Tokio, University Press, 1975. 282 p.

MITSUHASHI, S.; HARADA, K. & KAMEDA, M. - Elimination of transmissible drug resistance by treatment with acriflavin. Nature (Lond.), 139: 947, 1961.

MITSUHASHI, S.; HASHIMOTO, H.; EGAWA, R.; TANAKA, T. & NAGAI, Y. - Drug resistance of enteric bacteria. IX. Distribution of R factors in gram negative bacteria from clinical sources. J.Bact., 23: 1242-1245, 1967.

MIYAKE, T. - Mutator factor in Salmonella typhimurium. Genetics, 45: 11-14, 1960.

MOHN, G. & KAPLAN, R.W. - Belinflussung der spontanen und chemisch induzierten mutabilität bei E.coli durch änderung des genetischen Hintergrundes. Molec.Gen.Genet., 99: 191-202, 1967.

MONNER, D.A.; JOHNSSON, S. & BOWMAN, H.G. - Ampicillin-resistant mutants of Escherichia coli K-12 with lipopolysaccharides alterations affecting mating ability and susceptibility to sex-specific bacteriophages. J.Bact., 107: 420-432, 1971.

MOODY, E.E. & RUNGE, R. - The integration of autonomous transmissible plasmids into the chromossome of Escherichia coli K-12. Genet.Res., 19: 181-186, 1972.

MOORE, W.B. - Separation, characteristics and minimal amino-acid requirements of six variants derived from a strain of Bacillus cereus. J.gen.Microbiol., 40: 329-342, 1965.

MUSHEL, L.D. & TREFFERS, W.B. - Quantitative studies on bactericidal actions of serum and complement. J.Immunol., 76: 1-10, 1956.

NAGLEY, P.; SRIPRAKASH, K.S. & LINNANE, A.W. - Structure, synthesis and genetics of yeast mitochondrial DNA. Advanc.Microbial.Physiolog., 16: 157-277, 1977.

NAIDE, Y.; KAWAMURA, T.; MAKINO, K.; TAMURA, H. & WATANABE, T. - Prevalence of transferable drug resistance in drug resistant bacteria isolated from urinary tract infections in Japan. Jap.J.Microbiol., 11: 87-94, 1967.

NISIOKA, T.; MITANI, M. & CLOWES, R. - Composite circular forms of R factor deoxyribonucleic acid molecules. J. Bact., 97: 376-385, 1969.

NOVICK, R.P. - Analysis by transduction of mutations affecting penicillinase formation in Staphylococcus aureus. J.gen.Microbiol., 33: 121-136, 1963.

NOVICK, R.P. - Extrachromosomal inheritance in bacteria. Bact. Rev., 33: 210-235, 1969.

NOVICK, R.P.R.; CLOWES, R.C.; COHEN, S.N.; CURTISS III, R.; DATTA, N. & FALKOW, S. - Uniform nomenclature for bacterial plasmids. A proposal. Bact. Rev., 40:168-189, 1976.

ODAKURA, Y.; TANAKA, T. & MITSUHASHI, S. - Drug resistance and distribution of R factors among Proteus strains. Jap. J. Microbiol., 15: 367-372, 1971.

OLSEN, R.H. & SHIPLEY, P. - Host range and properties of an R factor from Pseudomonas aeruginosa R factor 1922. J. Bact., 113: 772-780, 1973.

ORGEL, A. & ORGEL, L.E. - Induction of mutations in bacterio phage T 4 with divalent manganese. J. molec.Biol., 14: 453-457, 1965.

PEARCE, U.B. & STOCKER, B.A.D. - Phase variation of flagellar antigens in Salmonella: abortive transduction studies. J. gen.Microbiol., 49: 335-349, 1967.

PESSÔA, G.V.A. & GELLI, D.S. - Meio para a diferenciação da tribo Proteae de outras enterobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32: 95-96, 1972.

PESSÔA, G.V.A. & SILVA, A.M. - Meios de Rugai - lisina e motilidade combinados em um só para a identificação presuntiva de enterobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32: 97-100, 1972.

PITTON, J.S. - Controle génétique de la synthèse des penicillinases chez quelques bacilles Gram-négatifs. Path. et Microbiol. (Basel), 36: 299-300, 1970.

PONTECORVO, G. - Auxonographic techniques in biochemical genetics. J. gen. Microbiol., 3: 122-127, 1949.

POTY, F.; GOZE, A.; GAGNON, P. - Infectious resistance to carbenicillin in Proteus rettgeri: occurrence of two different penicillinases in the same strain. J. Antibiot., 24: 271-272, 1971.

PRIEST, F.G. - Extracellular enzyme synthesis in genus Bacillus. Bact. Rev., 41: 711-808, 1977.

PROZESKY, O.W. - Transductional analysis of arginineless mutants in Proteus mirabilis. J. gen. Microbiol., 54: 127-143, 1968.

PTASHNE, K. & COHEN, S.N. - Occurrence of insertion sequence (IS) regions on plasmids deoxyribonucleic acid as direct and inverted nucleic sequence duplications. J. Bact., 122: 776-781, 1975.

"PUHLER, A.; BURKARDT, H.J. & HEUMANN, W. - Genetics experiments with the Pseudomonas aeruginosa R fator RP4 in Rhizobium lupini. J.gen.Microbiol., 73: xxvi, 1972.

RABINOWITZ, M.; CASEY, J.; GORDON, P.; LOCKER, J.; HSU, H. & GETZ, G.S. - In: KROON, A.M. & SACCOME, C. (eds), Biogenesis of mitochondrial: transcriptional, translational and genetic aspects, N. York, Academic Press, 1974. p.89-105.

RAFF, R.A. & MAHLER, H.R. - The non-symbiotic origin of mitochondria. Science, 177: 575-582, 1972.

REANNEY, D.C. - Viruses and evolution. Int. Rev. Cytol., 37: 21-52, 1974_a.

REANNEY, D.C. - On the origin of prokaryotes. J.theor. Biol., 48: 243-251, 1974_b.

REANNEY, D.C. - Extrachromosomal elements as possible agents of adaptation and development. Bact. Rev., 40: 552-590, 1976.

REANNEY, D.C. & MARSH, S.C. - The ecology of viruses attacking Bacillus stearothermophilus in soil. Soil Biol. Biochem., 5: 399-408, 1973.

REEVE, E.C.R. & BRAITHWAITE, J.A. - F_k-lac, an episome with unusual properties found in a wild strain of a Klebsiella species. Nature (Lond.), 228:162-164, 1970.

RESENBURG, A.J.Van - Infection of spheroplasts with deoxiribonyucleic acid from a Proteus bacteriophage. J.gen. Microbiol., 5: 437-441, 1969.

RESENBURG, A.J.Van - Genetic transformation in Proteus mirabilis. J.gen.Microbiol., 66: 215-129, 1971.

RHEINWALD, J.G.; CHAKRABARTY, A.M. & GUNSALUS, I.C. - A transmissible plasmid controlling camphor degradation in Pseudomonas putida. Proc. nat. Acad. Sci. (Wash.) 70: 885-889, 1973.

RICHARD, R. - "Cours de Microbiologie Systematique". Paris, Inst. Pasteur, 1972-1973, p. 1-11.

RICHMOND, M.H. - The plasmids of Staphylococcus aureus and their relation to other extrachromosomal elements. In: A.H. Rose & J.F. Wilkinson (eds.) - Advances in microbiol physiology, New York, Academic Press, 1968, v.2, p.43-88.

RICHMOND, M.H. - Plasmids and extrachromosomal genetics in Staphylococcus aureus. In: COHEN, J.O. (ed). Staphylococci. N.York, Interscience, 1972. p.159-186.

RICHMOND, M.H. & SYKES, R.B. - The chromosomal integration of a β -lactamase gene derived from the P-type R factor RP 1 in Escherichia coli. Genet. Res., 20: 231-236, 1972.

RIVA, S.; FIETTA, A.M. & SILVESTRI, L.G. - R factor determined changes in permeability of E. coli towards rifampicin and other antibiotics. In: KRCMÉRY, L. & WATANABE, T. (eds.). Bacterial plasmids and antibiotic resistance. Berlin, Springer-Verlag, 1972. p. 343-348.

RIVA, S.F.; FIETTA, A.; BERTI, M.; SILVESTRI, L.G. & ROMERO, O.E. - Relationships between curing of F episome by rifampicin and by acridine orange in Escherichia coli. Antimicrob. Ag. chemother., 5: 456-462, 1973.

ROE, E.; JONES, R.J. & LOWBURY, E.J.L. - Transfer of antibiotic resistance between Pseudomonas aeruginosa, Escherichia coli and other Gram-negative bacilli in burns. Lancet, I: 149-152, 1971.

ROMERO, E.; RIVA, S.; FIETTA, A.M. & SILVESTRI, L.G. - Effects of R-factors on rifampicin resistance in E. coli. Nature (Lond.), 234: 56-58, 1971.

ROWBURY, R.J. - Bacterial plasmids with particular reference to their replication and transfer properties. Prog. Biophys. Molec. Biol., 33: 271-317, 1977.

ROWND, R. - Symposium on infectious multiple drug resistance. S. Falkow, (ed.) Washington, D.C., U.S. Government Printing Office, 1967.

ROWND, R. - Replication of a bacterial episome under relaxed control. J.molec. Biol., 44: 387-402, 1969.

ROWND, R.; KASAMATSU, H. & MICKEL, S. - The molecular nature and replication of drug resistance factors of the Enterobacteriaceae. Ann.N.Y.Acad.Sci., 182: 188-206, 1971.

ROWND, R.; NAKAYA, R. & NAKAMURA, A. - Molecular nature of the drug-resistance factors of the Enterobacteriaceae. J. molec.Biol., 17: 376-388, 1966.

ROWND, R.; PERLMAN, D. & GOTO, N. - Structure and replication of R factor DNA in Proteus mirabilis. In: D.Schlessinger (ed.), Microbiology, Washington, D.C., Am.Soc.Microbiol., 1974. p. 76-94.

ROWND, R.; WATANABE, T.; MICKEL, S.; NAKAYA, R. & GARGAN, B.- Progress in antimicrobial and anticancer chemotherapy. University of Tokyo Press, Japan, 1970. v.2, p.535.

SAEDLER, H. & HEISS, B. - Multiple copies of the insertion-DNA sequences IS 1 and IS 2 in the chromosome of E. coli K 12. Molec.gen.Genet., 122: 267-277, 1973.

SALISBURY, V.; HEDGES, R.W. & DATTA, N. - Two modes of "curing" transmissible bacterial plasmids. J.gen.Microbiol., 70: 443-452, 1972.

SANTOS, D.S. - Resistência transmissível a drogas na família Enterobacteriaceae. Tese de mestrado. Escola Paulista de Medicina. S.Paulo, 1972.

SANTOS, D.S. - Comunicação pessoal, 1978.

SCAIFE, J. - Episomes. Ann.Rev.Microbiol., 21:601-638, 1967.

SCHWESINGER, M.D. - Additive recombination in bacteria. Bact. Rev., 41:872-902, 1977.

SCHWESINGER, M.D. & NOVICK, R.P. - Prophage-dependent plasmid integration in Staphylococcus aureus. J.Bact., 123: 724-738, 1975.

SCOTTI, R.; SILVESTRI, L.G. & ROMERO, E. - Distribution of R factors that increase susceptibility to rifampicin of rif-r mutants in Escherichia coli. Antimicrob.Ag.Chemother., 6: 121-123, 1974.

SHAPIRO, J.A. - DNA insertion elements and the evolution of chromosome primary structure. TIBS, agosto, 1977.

SHERRATT, D.J. - Bacterial plasmids. Cell, 3:189-195, 1974.

SIEGEL, E.C. & BRYSON, V.P. - Selection of resistant strains of Escherichia coli by antibiotics and antibacterial agents: role of normal and mutator strains. Antimicrob. Ag.Chemother., 3:629-634, 1963.

SILVA, M.L.M. - Resistência a drogas mediada por fatores R não autotransferíveis em amostras de Shigella flexneri. Tese de mestrado. Escola Paulista de Medicina. S.Paulo, 1974. 52 p.

SILVER, R.P. & FALKOW, S. - Specific labeling and physical characterization of R factor deoxiribonucleic acid in Escherichia coli. J.Bact., 104: 331-339, 1970a.

SILVER, R.P. & FALKOW, S. - Studies on resistance transfer factor deoxyribonucleic acid in Escherichia coli. J. Bacteriol., 104: 340-344, 1970b.

SMIT, J.A. & COETZEE, J.N. - Serological specificities of phenylalanine deaminases of Proteus-Providence group. Nature (Lond.) 214: 1238-1239, 1967.

SMITH, D.H. & ARMOUR, S.E. - Transferable R factors in enteric bacteria causing infection of the genito urinary tract. Lancet, II: 15-18, 1966.

SMITH, D.T. & MARTIN, D.S. - Zinsser's textbook of bacteriology. 9º Ed., N.York, Appleton-Century-Crofts, Inc., 1948. 992 p.

SMITH, J.T. - R-factor gene expression in gram-negative bacteria. J.gen.Microbiol., 55: 109-120, 1969.

SMITH, N.R.; GORDON, R.E. & CLARK, F.E. - U.S.Dep.Agrc.Mono-graph nº 16, Washington, D.C., 1952.

- SOMPOLINSKY, D.; BEN-YAKOV, M.; ABOUD, M. & BOLDUR, I. - Transferable resistance factors with mutator effect in Salmonella typhi. Mutat. Res., 4: 119-127, 1967.
- SONSTEIN, S.A. & BALDWIN, J.N. - Loss of the penicillinase plasmid after treatment of Staphylococcus aureus with sodium dodecyl sulfate. J. Bact., 109: 262-265, 1972_a.
- SONSTEIN, S.A. & BALDWIN, J.N. - Nature of elimination of penicillinase plasmid from Staphylococcus aureus by surface-active agents. J. Bact., 111:152-155, 1972_b.
- SOTOMURA, M. & YOSHIKAWA, M. - Reinitiation of chromosome replication in the presence of chloramphenicol under an integratively suppressed state by R 6K. J. Bact., 122: 623-628, 1975.
- SPEYER, J.F. - Mutagenic DNA polymerase. Biochem. Biophys. Res. Commun., 21: 6-8, 1965.
- STANISICH, V.A. & HOLLOWAY, B.W - Chromosome transfer in Pseudomonas aeruginosa mediated by R-factors. Genet. Res., 17: 169-172, 1971.
- STARLINGER, P. - DNA rearrangements in prokaryotes. Ann. Rev. Genet., 11:103-126, 1977.
- STARLINGER, P. & SAEDLER, H. - Insertion mutations in microorganisms. Biochemie, 54: 177-185, 1972.

- STARLINGER, P. & SAEDLER, H. - IS-elements in microorganisms.
Curr.Top.Microbiol.Immunol., 75: 111-152, 1976.
- STOCKER, B.A.D. - Measurements of rate of mutation of flagellar antigenic phase in Salmonella typhimurium. J. Hyg., 47: 398-413, 1949.
- STOLERU, G.H.; GERBAUD, G.R.; BOUANCHAUD, D.H. & LE MINOR, L.- Etude d'un plasmid transferable déterminant la production d'H₂S et la résistance à la tetracycline chez "Escherichia coli". Ann.Inst.Pasteur, 123: 743-754, 1972.
- SUZUKI, H. & IINO, T. - In vitro synthesis of phase-specific flagellin of Salmonella. J.molec.Biol., 81: 57-70, 1973.
- SWANSTROM, M. & ADAMS, M.H. - Agar layer method for production of high titer phage stocks. Proc.Soc.exp.Biol., 78: 372-375, 1951.
- SYKES, R.B. & RICHMOND, M.H. - Intergeneric transfer of β-lactamase gene between Ps. aeruginosa and E.coli. Nature (Lond.), 226: 952-954, 1970.
- SZYBALSKI, W. & SZYBALSKI, E.H. - Visualization of the evolution of viral genomes. In: E.Kurstak & Maramosh (eds.)- Viruses, evolution and cancer. New York. Academic Press Inc., 1974. p. 563-568.

TAYLOR, A.I. - Bacteriophage induced mutation in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 50: 1043-1051, 1963.

TERAWAKI, Y.; TAKAYASU, H. & AKIBA, T. - Thermosensitive replication of a kanamycin resistance factor. J. Bact., 94: 687-690, 1967.

TOMASCHOFF, E. - Die okologie und bedeutung der Proteus gruppe. Klin.Wschr., 47: 837-844, 1969.

TOMCHICK, R. & MANDEL, H.G. - Biochemical effects of ethidium bromide in microorganisms. J.gen.Microbiol., 36: 225-236, 1964.

TOMOEDA, M.; INUZUKA, M.; KUBO, N. & NAKAMURA, S. - Effecti-
ve elimination of drug resistance and sex factors in Es-
cherichia coli by sodium dodecyl sulfate. J. Bact., 95:
1078-1089, 1968.

TOPLEY, W.W.C.; WILSON, G.S. & MILES, A.A. - Bacteriologia e
imunidad. Barcelona, Salvat Editores, S.A., 1953. 958 p.

TOWNER, K.J. & VIVIAN, A. - RP 4 mediated conjugation in
Acetinobacter calcoacetieus. J.gen.Microbiol., 93: 355-360, 1976.

TRABULSI, L.R. & ZULIANI, M.E. - Estudos sobre a E. coli O111:B 4. III. - Sensibilidade "in vitro" à sulfadiazina e a seis antibióticos. Rev.Inst.Med.trop., São Paulo, 11: 323-334, 1969

TREFFERS, H.P.; SPINELLI, V. & BELSER, N.O. - A factor (or mutator gene) inducing mutation rates in Escherichia coli. Proc.nat.Acad.Sci. (Wash.), 40:1064-1071, 1954.

TZAGOLOFF, A.; FOURY, F. & AKAI, A. - Resolution of the mitochondrial genome. In: Saccone, C. & Kroon, A.M., (ed.) - The genetic function of mitochondriae DNA. Amsterdam, North-Holland Pub. Co., 1976. p.151-161.

UEHARA, H.; YONEDA, Y.; YAMANE, K. & MARUO, B. - Regulation of neutral protease productivity in Bacillus subtilis: transformation of high protease productivity. J. Bact., 119: 82-91, 1974.

VELTKAMP, E.; BARBENDSEN, W. & NIJKAMP, H.J.J. - Plasmid incompatibility and control of replication copy mutants the R-factor R 1 in Escherichia coli K-12. J. Bact., 124: 641-649, 1974.

VIEU, J.E. & DUCREST, P. - Notions nouvelles sur la lysotypie de Proteus hauseri. Le lysotype I. Zbl. Bakt., I Abt., 182: 44-56, 1961.

WALKER, G. - Isolation and characterization of mutants of the plasmid pKM 101 deficient in their ability to enhance mutagenesis and repair. J. Bact., 133: 1203-1211, 1978.

WANG, P.Y.; RELF, J.; PALCHADHURI, S. & IYER, U.N. - Plasmid conferring increased sensitivity to mercuric chloride and cobalt chloride found in some laboratory strains of Escherichia coli K-12. J.Bact., 133: 1042-1043, 1978.

WARING, M.J. - Cross-linked and intercalation in nucleic acids. Symp. Soc. gen. Microbiol., 16: 235-265, 1966.

WATANABE, T. - Infective heredity of multiple drug resistance in bacteria. Bact.Rev., 27: 87-115, 1963.

WATANABE, T. & OGATA, C. - Episome mediated transfer of drug resistance in Enterobacteriaceae. IX. Recombination of an R factor with F. J.Bact., 91: 43-50, 1966.

WEHRLI, W.; KNUSEL, F.; SCHMID, K. & STAHELIN, M. - Interaction of rifampicin with bacterial RNA polymerase. Proc. nat.Acad.Sci. (Wash.), 61: 667-669, 1968.

WEINBERG, R. & LATHAM, A.B. - Apparent mutagenic effect of thymine deficiency for a thymine-requiring strain of Escherichia coli. J.Bact., 72:570-572, 1956.

WEISBERG, R.A. & ADHYA, S. - Illegitimate recombination in bacteria and bacteriophage. Ann.Rev.Genet., 11:451-473, 1977.

WILLIAMS-SMITH, H. & HUGGINS, M.B. - Further observations on the association of the colicine V plasmid of Escherichia coli with pathogenicity and with survival in the alimentary tract. J.gen.Microbiol., 92: 335-350, 1976.

WINKLER, V.; RÜGEL, W. & WAKERNAGEL, W. - "Bacteria, phage and molecular genetics." N.York, Springer-Verlag, 1976. 240 p.

WITKIN, E.M. - Mutation-proof and mutation-prone modes of survival in derivatives of Escherichia coli B differing in sensitivity to ultraviolet light. Brookhaven Symp. Biol., 20:17-55, 1967.

WOHLHIEDER, J.A.; GEMSKI, P. & BARON, L.S. - Transfer of extensive portions of the Escherichia coli genome to Proteus mirabilis. Bact. Proc., GP. 15, 67, 1969.

WOHLHIEDER, J.A.; FALKOW, S.; CITARELLA, R.V. & BARON, L.S.- Characterization of DNA from Proteus strain harboring an episome. J.molec.Biol., 9: 576-588, 1964.

WONG, C.L. & DUNN, N.W. - Transmissible plasmid coding for the degradation of benzoate and m-toluuate in Pseudomonas arvillae mt-2. Genet. Res., 23: 227-232, 1974.

WORSEY, M.J. & WILLIAMS, P.A. - Metabolism of toluene and xilene by Pseudomonas putida (arvillae) mt-2: evidence for a new function of the TOL plasmid. J.Bact., 124: 7-13, 1975.

YAMAGATA, H. & UCHIDA, H. - Effect of acridine orange on sex factor multiplication in Escherichia coli. J.molec. Biol., 46: 73-84, 1969.

YAMAMOTO, K. & ISHII, Y. - 4-nitroquinoline 1-oxide-induced deletion mutations in Escherichia coli strains with a different DNA repair capacities. Mutat.Res., 22: 81-83, 1974.

YANOFSKY, C.E.; COX, C.; HORN, V. - The unusual mutagenic specificity of an E. coli mutator gene. Proc.nat.Acad.Sci.(Wash.), 55: 274-281, 1966.

YOSHIKAWA, M. - Drug sensitivity and drug resistance associated with the presence of an R-factor. Genet. Res., 17: 1-7, 1971.

ZHDANOV, V.M. & TIKCHONENKO, T.I. - Viruses as a factor of evolution: exchange of genetic information in the biosphere. Adv.Virus.Res., 19: 361-395, 1974.

ZINDER, N.D. & LEDERBERG, J. - Genetic exchange in Salmonella. J. Bact., 64: 679-694, 1952.

ZWAIG, R.N. & LURIA, S.E. - Genetics and physiology of colicin-tolerant mutants of Escherichia coli. J.Bact., 94: 1112-1123, 1967.

*It is characteristic of Science and
Progress that they continually open new fields
to our vision.*

PASTEUR