

BC/18867
IB/80028



PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA POR
***Xanthomonas campestris* pv.**
***glycines*:**
DETECÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
POTENCIAL PARA PROTEÇÃO DE
PLANTAS.

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo (a) candidato a
VALERIA MAIA DE OLIVEIRA
e aprovada pela Comissão Julgadora.

YBmm
22/10/1993

VALERIA MAIA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título
de Mestre em Ciências Biológicas.
Area de concentração: Genética.

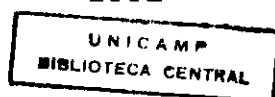
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Yoko Bomura Rosato

T/UNICAMP

OL4
p

CAMPINAS - SP

1992



UNIDADE	IB/71		
N.º CHAMADA	0L4p		
V.	Et.		
TOMBO BC	18.867		
PROC.	261/93		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	G.6 100.000,00		
DATA	05/03/93		
N.º CPD			

CM000378796.

*Dedico este trabalho aos
meus pais, Teresinha e
Walter, a quem devo tudo.*

AGRADECIMENTOS

Aos professores:

Dr. Wanderley Dias da Silveira,

pelo acesso ao seu laboratório e pela disposição e paciência para leitura e discussão deste trabalho.

Dr. Itamar Soares,

pela leitura e avaliação deste trabalho.

Dr. Paulo Arruda,

pelo acesso a equipamentos e reagentes de seu laboratório.

Ao Laboratório de Microscopia Eletrônica,

pelo auxílio técnico e acesso a equipamentos.

Ao Laboratório de Microbiologia,

em especial à Estela, Mingo e Silvia Gatti, pelo apoio técnico, sugestões e disponibilidade de reagentes e equipamentos.

À Rosângela,

pela ajuda prestada na confecção das fotos.

*Ao pessoal da Biologia Molecular de Plantas, Adílson,
Silvia, Isa, Germano, Fernando e Andrés,*

*pela convivência, troca de idéias e ``favores
prestados``.*

Aos técnicos Sandra e Wilson,

cujo auxílio no laboratório foi inestimável.

*As secretárias do CEMEG, Sandrinha, Berê e Tânia,
cuja eficiência e disposição permitiram muitas
vezes o andamento burocrático deste trabalho*

*As secretárias da Genética, Silvia e Teresa,
pela colaboração em todas as etapas burocráticas
durante o curso de pós-graduação.*

*As bibliotecárias Zilda e Norma,
pela boa-vontade constante no atendimento da
biblioteca do IB.*

*A CAPES e ao meu pai,
pelo apoio financeiro.*

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A minha orientadora e amiga, Prof^a. Dr^a. Yoko Bomura Rosato,

pelo carinho, amizade, preocupação, incentivo e confiança recebidos durante todo o desenvolvimento do trabalho e convivência no laboratório.

Ao Prof. Dr. Tomomasa Yano,

pela orientação e colaboração na realização de parte deste trabalho, e pela disponibilidade na leitura e discussão do mesmo.

A moçada do laboratório, Andréa, Rejane, Susinha, Ed, Angela e Lerinha,

pela amizade e colaboração no dia-a-dia, e pelas discussões a respeito do trabalho.

Ao casal Cleide e André,

pela convivência, amizade e livre acesso ao microcomputador.

A Rogéria,

pela amizade de tantos anos, apoio e inenarrável contribuição na análise estatística dos resultados e discussão produtiva dos mesmos.

`A Fabi,

*pela amizade sincera, apoio em todas as horas e
boa-vontade na colaboração técnica em várias
etapas do trabalho.*

`A Sil,

*amiga, companheira e ``conselheira``, pelo
carinho, paciência, compreensão e incentivo, sem
os quais eu jamais teria cumprido minhas metas.*

`A Dona Luzia,

*pelo calor e carinho com que sempre me acolheu em
sua casa.*

Ao Gonçalo,

*meu dançarino favorito, pelo companheirismo e
carinho sincero.*

`A Rê,

*cuja amizade, apoio e auxílio prático e teórico
foram essenciais `a conclusão do trabalho.*

`A Ly,

*minha ``alma gêmea``, por estar ao meu lado a cada
instante.*

A Yamara,

*minha amiga eterna, pelo incentivo e confiança
recebidos.*

Ao Paulo,

*pelo amor, estímulo e paciência durante 3 longos
anos, e por se mostrar sempre presente, apesar da
distância.*

Aos meus pais,

*por sempre confiarem em mim e me apoiarem em todas
as fases da minha vida, sob todos os aspectos.*

INDICE DE CONTEUDO

Página

INTRODUÇÃO.....	01
-----------------	----

Capítulo 1: DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

1.1 REVISAO BIBLIOGRAFICA

1.1.1 Histórico e definição.....	04
1.1.2 Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas.....	07
1.1.3 Bacteriocinas de bactérias Gram-negativas.....	16
1.1.4 Composição química.....	22
1.1.5 Modo de ação.....	25
1.1.6 Determinantes genéticos.....	28
1.1.7 Fatores que afetam a produção.....	32
1.1.8 Papel ecológico.....	35

1.2 MATERIAIS E METODOS

1.2.1 Linhagens bacterianas utilizadas.....	38
1.2.2 Meios de cultura.....	42
1.2.3 Verificação de linhagens produtoras de bacteriocina.....	44
1.2.4 Caracterização da linhagem produtora	
1.2.4.1 Influência do meio de cultura e tempo de incubação na produção de bacteriocina...	45
1.2.4.2 Espectro de ação inibitória.....	45
1.2.4.3 Secreção no meio de cultura.....	46

1.2.4.4	Curva de crescimento e titulação da produção.....	46
1.2.4.5	Perfil plasmidial.....	48
1.2.5	Purificação parcial da bacteriocina	
1.2.5.1	Filtração em membrana.....	49
1.2.5.2	Fracionamento com sulfato de amônia...	49
1.2.5.3	Cromatografia em coluna.....	50
1.2.6	Caracterização da bacteriocina	
1.2.6.1	Teste para atividade fágica.....	51
1.2.6.2	Sensibilidade enzimática.....	51
1.2.6.3	Termosensibilidade.....	52
1.2.6.4	Capacidade antigênica.....	53
1.2.6.5	Efeito na célula sensível	
	a) Atividade bactericida.....	54
	b) Visualização ao ME.....	54
1.2.7	Conjugação.....	55
1.2.8	Mutagênese da linhagem produtora	
1.2.8.1	Transposon.....	56
1.2.8.2	Tratamento com NTG.....	57
1.3	RESULTADOS	
1.3.1	Identificação de linhagens produtoras.....	59
1.3.2	Caracterização da linhagem produtora	
1.3.2.1	Influência do meio de cultura e tempo de incubação na produção de bacteriocina...	61
1.3.2.2	Espectro de ação biológica.....	62
1.3.2.3	Secreção no meio de cultura.....	65

1.3.2.4	Curva de crescimento e titulação da produção.....	65
1.3.2.5	Perfil plasmidial.....	67
1.3.3	Purificação parcial da bacteriocina.....	69
1.3.4	Caracterização da bacteriocina	
1.3.4.1	Atividade fágica.....	73
1.3.4.2	Sensibilidade enzimática.....	73
1.3.4.3	Termosensibilidade.....	75
1.3.4.4	Capacidade antigênica.....	75
1.3.4.5	Efeito na célula sensível.....	75
1.3.5	Conjugação.....	79
1.3.6	Mutagênese da linhagem produtora	
1.3.6.1	Transposon.....	79
1.3.6.2	Tratamento com NTG.....	80

1.4 DISCUSSAO

1.4.1	Detecção e caracterização da linhagem produtora de bacteriocina.....	81
1.4.2	Caracterização parcial da bacteriocina.....	85
1.4.3	Genética da produção da bacteriocina.....	90

Capítulo 2: AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LINHAGEM

BACTERIOCINOGENICA PARA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE

2.1 REVISAO BIBLIOGRAFICA

2.1.1 Introdução ao controle biológico.....	95
2.1.2 As bacteriocinas e o controle biológico.....	98
2.1.3 Dificuldades relacionadas ao controle biológico.....	101
2.1.4 O agente de controle ideal.....	104

2.2 MATERIAIS E METODOS

2.2.1 Linhagens bacterianas utilizadas.....	108
2.2.2 Meios de cultura.....	109
2.2.3 Competição <i>in vitro</i> entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível.....	110
2.2.4 Inibição <i>in vitro</i> da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora.....	112
2.2.5 Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bac ⁺	
2.2.5.1 Teste em sementes.....	113
2.2.5.2 Teste em "seedlings"	116
2.2.5.3 Teste em hipocótilos.....	118
2.2.5.4 Análise estatística.....	119

2.3 RESULTADOS

2.3.1	Competição <i>in vitro</i> entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível.....	121
2.3.2	Inibição <i>in vitro</i> da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora.....	130
2.3.3	Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bac ⁺	
2.3.3.1	Teste em sementes.....	138
2.3.3.2	Teste em "seedlings".....	148
2.3.3.3	Teste em hipocótilos.....	157

2.4 DISCUSSAO

2.4.1	Competição <i>in vitro</i> entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível.....	166
2.4.2	Inibição <i>in vitro</i> da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora.....	168
2.4.3	Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bac ⁺	
2.4.3.1	Teste em sementes.....	170
2.4.3.2	Teste em "seedlings"	174
2.4.3.3	Teste em hipocótilos.....	176

Capítulo 3: CONCLUSOES

3.1	DETECÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINA.....	170
3.2	CARACTERIZAÇÃO DA LINHAGEM PRODUTORA.....	179

3.3 CARACTERIZAÇÃO PARCIAL DA BACTERIOCINA.....	180
3.4 GENÉTICA DA PRODUÇÃO DA BACTERIOCINA.....	180
3.5 AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LINHAGEM BAC+ PARA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE.....	180

Capítulo 4: APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

4.1 APLICAÇÕES

4.1.1 Controle biológico de fitopatógenos.....	182
4.1.2 Estudos de tipagem e epidemiologia.....	182
4.1.3 Agentes anti-cáries.....	184
4.1.4 Bioconservantes alimentares.....	185
4.1.5 Marcadores genéticos.....	186
4.1.6 Sondas para detecção de genes <i>bac+</i>	187

4.2 PERSPECTIVAS

4.2.1 Perfil plasmidial da linhagem produtora.....	189
4.2.2 Purificação da bacteriocina.....	190
4.2.3 Genética da produção da bacteriocina.....	192
4.2.4 Potencial para proteção de plantas.....	194

RESUMO.....	196
-------------	-----

ABSTRACT.....	198
---------------	-----

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	200
---------------------------------	-----

INTRODUÇÃO

A bactéria *Xanthomonas campestris* é uma das cinco espécies do gênero *Xanthomonas*, o qual consiste, na sua maioria, de linhagens fitopatogênicas, aeróbicas, móveis, Gram-negativas e pigmentadas (Daniels, 1989). É o agente causador de doenças em diversos vegetais como: podridão negra em crucíferas, queima comum do feijão, mancha foliar do algodão, queima foliar bacteriana do arroz, mancha bacteriana do tomate e pimentão, queima bacteriana de cereais, cancro cítrico, entre outras (Agrios, 1988).

Uma vez que os patógenos bacterianos se propagam bem em climas quentes e úmidos, é de grande importância para a agricultura dos trópicos o desenvolvimento de sistemas de controle que evitem ou reduzam as perdas econômicas com as colheitas. A preocupação dos investigadores em erradicar ou controlar as doenças de origem bacteriana os tem conduzido a pesquisar a presença de agentes que possuam algum tipo de ação antibacteriana específica. O estudo da bacteriocinogenia - ou a capacidade de produzir toxinas bacterianas ou bacteriocinas - tem demonstrado que estas possuem ação inibitória ou são letais para microrganismos relacionados (Tagg *et al.*, 1976).

As bacteriocinas formam um grupo bastante heterogêneo quanto a sua composição química e modo de ação. Possuem geralmente um componente proteico e ação bactericida, com especificidade biológica restrita, característica básica usada para diferenciar bacteriocinas de outros antibióticos. Podem afetar a síntese proteica, a estabilidade do DNA, o fluxo de energia e a integridade da membrana plasmática (Vidaver, 1983). A produção de bacteriocinas é, na maioria das vezes, controlada por plasmídios. Entretanto, existem casos em que são os genes cromossomais que determinam sua produção (Tagg *et al.*, 1976; Vidaver, 1983).

Poucas bacteriocinas de bactérias fitopatogênicas têm sido estudadas, tampouco caracterizadas. Dentre os gêneros para os quais se tem registro de produção de bacteriocinas estão *Corynebacterium*, *Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, e *Agrobacterium*, sendo que apenas para os dois últimos o modo de ação destas substâncias foi elucidado.

A aplicação prática de linhagens bacteriocinogênicas como agentes de controle de fitopatógenos é ainda bastante incipiente, tendo apenas como exemplo bem sucedido, já usado na agricultura comercial, o controle da galha de diversas plantas pela linhagem K-84 de *Agrobacterium radiobacter*, vendida comercialmente (Schroth & Hancock, 1981).

Este trabalho teve como objetivos selecionar linhagens de *Xanthomonas campestris* produtoras de bacteriocinas, caracteriza-las biologicamente e avaliar o potencial destas linhagens para protecao de plantas de tomate em ensaios *in vivo*.

Capítulo 1

DETECÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA PRODUÇÃO DE BACTERIOCINAS

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Histórico e definição

O estudo de bacteriocinas data da década de 20, quando Gratia observou a inibição do crescimento de *Escherichia coli* ϕ pela linhagem de *E. coli* V. Observações semelhantes foram realizadas com outras linhagens de *E. coli*, e a substância inibitória foi denominada *colicina* (Gratia, 1925; Gratia & Fredericq, 1946).

O antagonismo entre linhagens bacterianas foi verificado e estudado para diversos outros gêneros e espécies de bactérias e, em 1953, Jacob *et al.* propuseram o termo bacteriocina para definir substâncias proteicas do tipo colicina, caracterizadas por biossíntese letal, atividade intraespecífica, e adsorção a receptores específicos (Tagg *et al.*, 1976). Desde então, a detecção e

caracterização de uma ampla variedade de inibidores têm demonstrado que relativamente poucas substâncias, especialmente aquelas produzidas por bactérias Gram-positivas (Tagg et al., 1976), assim como o composto específico não proteico agrocina 84, produzida por *Agrobacterium radiobacter* linhagem 84 (Kerr, 1980), se adequam ao molde clássico proposto para as colicinas. Tais produtos bacterianos inibitórios incluem antibióticos "clássicos" de baixo peso molecular, enzimas, bacteriófagos defectivos, bacteriocinas, assim como produtos metabólicos, incluindo peróxido de hidrogênio (Daeschel, 1989), amônia (Rogul & Carr, 1972), e ácidos láctico, fórmico e acético (Hentges, 1967). Ainda, a geral falta de caracterização química faz com que haja sobreposição das divisões dentro deste espectro de substâncias, tornando difícil a distinção daquelas que podem realmente ser chamadas de bacteriocinas. Atualmente não há, portanto, uma definição precisa e aceita universalmente para as bacteriocinas, o que, segundo alguns autores, seria ilusório (Tagg et al., 1976; Vidaver, 1983). Alguns investigadores preferem designar substâncias incompletamente caracterizadas como compostos "semelhantes" a bacteriocinas (Ivanovics, 1962; Gross & Vidaver, 1978; Kurita et al., 1988), reservando o termo bacteriocina para ser aplicado a substâncias que preencham pelo menos dois critérios: (1) presença de uma porção proteica biologicamente ativa; e (2) modo de ação bactericida (Tagg et al., 1976). Por outro lado, cerca de 100 bacteriocinas já

caracterizadas, que divergem bastante quimicamente, têm como propriedade primária a especificidade biológica restrita (Vidaver, 1983).

A produção de bacteriocinas já foi observada para mais de 30 gêneros de bactérias, incluindo muitos patógenos de plantas (Vidaver, 1976), e um sistema uniforme para nomenclatura das bacteriocinas não existe (Vidaver, 1983). Os nomes geralmente derivam do gênero ou espécie produtora (Bradley, 1967), usando-se a raiz do nome do gênero ou espécie seguido do sufixo "cina" e ainda a designação da linhagem, quando houver. Dessa forma, siringacina 4-A designa a bacteriocina produzida pela linhagem 4-A de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*.

Dentro de uma espécie, linhagens originadas de diferentes locais e ambientes podem, coletivamente, produzir de poucas a muitas bacteriocinas. Por exemplo, muitos patovares de *Pseudomonas syringae* produzem diferentes substâncias inibitórias, embora linhagem ou espécie-específicas (Vidaver *et al.*, 1972; Vidaver & Buckner, 1978). Ainda, linhagens individuais podem produzir várias bacteriocinas diferentes (Fett *et al.*, 1987; Gross & Vidaver, 1979).

1.1.2 Bacteriocinas de bactérias Gram-positivas

As espécies de *Corynebacterium* compreendem o maior grupo de fitopatógenos Gram-positivos. Cada espécie é geralmente hospedeira-específica e a maioria causa doenças de sintomatologia distinta. Nelson e Semeniuk (1964) descreveram a produção de bacteriocina por *C. insidiosum* e *C. michiganense* e a sensibilidade de cada uma dessas espécies com relação à bacteriocina da outra, sendo um número limitado de outras espécies insensíveis. Tal antagonismo interespecífico é comum para bacteriocinas produzidas por gêneros Gram-positivos (Tagg *et al.*, 1976). O primeiro registro de tipagem por bacteriocinas de espécies de *Corynebacterium* fitopatogênicas foi feito por Echandi (1976), que diferenciou 96% das linhagens de *C. michiganense* utilizadas com base na sensibilidade a bacteriocinas. Bacteriocinas de espécies de *Corynebacterium* fitopatogênicas também foram caracterizadas por Gross e Vidaver (1979), e um esquema de tipagem para diferenciar linhagens e espécies, baseado nos padrões de produção e sensibilidade a estas substâncias, foi proposto. Corinebactérias patogênicas para animais também produzem, comumente, bacteriocinas (Tagg *et al.*, 1976). Por exemplo, Gibson e Colman (1973) desenvolveram um esquema de tipagem para *C. diphtheriae*, no qual 94% de todas as linhagens produziram bacteriocina.

A produção de bacteriocinas pelo gênero *Clostridium* tem sido registrada tanto para espécies patogênicas como para não patogênicas, sendo que aquelas melhor caracterizadas são as bacteriocinas de *C. botulinum* e *C. perfringens* (Tagg et al., 1976). Garnier e Cole (1986) estudaram a produção da bacteriocina N5 de *Clostridium perfringens* BP6K-N5 através do isolamento e clonagem de genes plasmidiais responsáveis por sua produção. Os autores visaram o desenvolvimento de um sistema de vetor para facilitar estudos genéticos posteriores com espécies de *Clostridium*, uma vez que este gênero está bem pouco caracterizado a nível genético. Recentemente, dois tipos de bacteriocinas foram caracterizados em *Clostridium perfringens*. Aparentemente, essas duas bacteriocinas, SN-a e SN-b, desenvolveram-se a partir da mesma origem, pois apresentam propriedades comuns, sendo que a atividade de SN-a parece ser gradualmente substituída pela de SN-b durante o crescimento da bactéria (Higa et al., 1991).

Linhagens de muitas espécies de *Bacillus* têm se mostrado produtoras de substâncias antibióticas. A mais extensivamente estudada e melhor caracterizada das bacteriocinas das espécies de *Bacillus* são aquelas produzidas por *B. megaterium*, as megacinas. Várias publicações tratando da caracterização de megacinas já foram sumarizadas em revisões (Ivanovics, 1962; Reeves, 1965; Tagg et al., 1976). A megacina parece ter muitas das

características que a enquadram no conceito "clássico" de bacteriocinas, incluindo a produção por biossíntese letal, restrito espectro de atividade e composição proteica. Especificamente, *Bacillus megaterium* produz uma variedade de megacinas pertencentes a três grupos principais, A, B e C. A classificação de megacinas nestes grupos tem sido baseada na inducibilidade, modo de ação e espectro de atividade (Holland & Roberts, 1964). A produção de uma nova bacteriocina, megacina BII, foi detectada recentemente em linhagens mesofílicas de *B. megaterium* e associada ao plasmídeo pSE203 presente nestas linhagens (Stahl, 1989). Este plasmídeo foi mapeado com endonucleases e nenhuma similaridade com plasmídios da megacina A foi evidenciada. Ainda, megacina BII exibiu espectro de atividade mais amplo que outras megacinas anteriormente estudadas, inibindo algumas linhagens de *E. coli* e *B. stearothermophilus*. De particular interesse para patologistas de invertebrados é a bacteriocina produzida por *Bacillus thuringiensis*. Favret e Yousten (1989) demonstraram atividade antibacteriana de *Bacillus thuringiensis* subsp. *thuringiensis* (HD-2) contra cerca de 86% das linhagens de *B. thuringiensis* testadas e contra algumas outras espécies Gram-positivas, mas não contra Gram-negativas.

Um estudo interessante foi desenvolvido por Gilmore et al. (1990) sobre o mecanismo de liberação da hemolisina/bacteriocina (uma citolisina) de *Enterococcus*

faecalis, que encontrou analogia com o sistema estabelecido para o transporte da alfa-hemolisina de *E. coli*.

As espécies de *Propionibacterium* lácticas são usadas na fermentação de laticínios como culturas "iniciadoras", produzindo a aparência e aroma característicos dos queijos tipo Suíço. *Microgard*, um produto do leite desnatado tipo A pasteurizado, fermentado por *Propionibacterium shermanii*, tem efeitos antagonísticos contra bactérias Gram-negativas e algumas leveduras e bolores, mas não contra bactérias Gram-positivas. Este produto foi aprovado pela FDA (Food & Drug Administration) e está sendo usado como preservativo em requeijão (Daeschel, 1989). Lyon e Glatz (1991) isolaram uma substância inibitória produzida pela linhagem P127 de *Propionibacterium thoenii*, designada propionicina PLG-1, de natureza proteica e com atividade bactericida contra um amplo espectro de microrganismos, como bactérias Gram-negativas, fungos e leveduras.

As bactérias do ácido láctico, que compreendem os gêneros *Lactobacillus*, *Pediococcus*, *Lactococcus* (*Streptococcus* do grupo N) e *Leuconostoc*, não são apenas responsáveis por atributos únicos de certos alimentos, não obtidos através de outros métodos de processamento, mas estão também envolvidos na preservação destes pela produção de ácidos mediante a fermentação de carboidratos. Entretanto, tem sido verificado que as bactérias lácticas são

capazes de produzir outros inibidores além de ácidos orgânicos, antagonísticos para outros microrganismos e produzidos em quantidades menores. Estas substâncias incluem: peróxido de hidrogênio, diacetil, bacteriocinas e produtos de reações secundárias (Daeschel, 1989). A bacteriocinogenia dentro deste grupo de bactérias tem sido objeto de muita pesquisa recentemente, uma vez que a habilidade destas bacteriocinas de inibir muitos patógenos bacterianos presentes nos alimentos as torna atraentes como potenciais agentes de preservação alimentar.

Dentro do gênero *Lactobacillus*, Barefoot e Klaenhammer (1983) observaram que 63% das linhagens de *L. acidophilus* examinadas produziam bacteriocinas. O agente inibitório, designado lactacina B, foi isolado da linhagem N2 de *L. acidophilus* e caracterizado. Muriana e Klaenhammer (1987) forneceram evidência direta para o envolvimento de determinantes plasmidiais na produção e imunidade à lactacina F, produzida por *L. acidophilus* 88. Esta bacteriocina foi posteriormente isolada de *L. acidophilus* 11088, purificada e caracterizada, sendo sua sequência de aminoácidos parcialmente identificada (Muriana & Klaenhammer, 1991). Através da utilização de uma sonda deduzida a partir da região N-terminal da sequência de aminoácidos da lactacina F, o gene estrutural para sua produção foi clonado e a região contendo o gene sequenciada (Muriana & Klaenhammer, 1991a). Upreti e Hindsill (1975)

confirmaram a produção de uma bacteriocina, designada lactocina 27, por *L. helveticus* LP27, com espectro de ação restrito, inibindo linhagens de *L. acidophilus* e *L. helveticus*, e de natureza proteica. Ainda dentro da espécie de *L. helveticus*, Joerger e Klaenhammer (1986) purificaram e caracterizaram helveticina J, produzida pela linhagem 481, fornecendo evidências para a localização cromossômica dos genes para produção e imunidade. Linhagens de *L. plantarum* foram testadas para a produção de bacteriocina e uma substância inibitória, plantacina B, foi detectada na linhagem NCD01193 e exibiu atividade contra outras linhagens de *L. plantarum*, *L. mesenteroides* 8015 e *P. damnosus* 1832 (West & Warner, 1988). Outra bacteriocina detectada e caracterizada no gênero *Lactobacillus* é a lactocina S, produzida por *L. sake* linhagem L45, cuja produção foi associada ao plasmídio pCIM1 e sua sequência de aminoácidos determinada (Mortvedt & Nes, 1990; Mortvedt *et al.*, 1991).

O gênero *Pediococcus* tem importância comercial na fermentação de vegetais e carnes, e tem sido assunto de muitos estudos recentes com relação a sua capacidade de produzir bacteriocinas. Fleming *et al.* (1975) compararam propriedades inibitórias de culturas de *Pediococcus*, de várias fontes, contra bactérias do ácido lático associadas com a fermentação de pepinos em conserva e contra outras bactérias e leveduras. Os autores observaram um retardamento da produção de ácido por *L. plantarum* WSO, quando esta

linhagem era inoculada em meio contendo suco de pepino juntamente com *P. cerevisiae* FBB-61. Mais tarde, a produção de bacteriocina por *Pediococcus pentosaceus*, pediocina A, foi associada com DNA plasmidial (Daeschel & Klaenhammer, 1985). Recentemente, a relação entre produção de bacteriocina e DNA plasmidial em *Pediococcus acidilactici* PAC1 (pediocina PA-1) e *P. acidilactici* H (pediocina Ach), foi registrada por Gonzalez e Kunka (1987) e Ray *et al.* (1989), respectivamente. Spelhaug e Harlander (1989) avaliaram a habilidade de linhagens de *Pediococcus pentosaceus* e *Lactococcus lactis* de inibir numerosos patógenos presentes em alimentos.

Estudos com o gênero *Lactococcus* (ou grupo N do gênero *Streptococcus*) têm demonstrado basicamente a produção de duas substâncias, diplococcina e nisina. Esta última tem amplo espectro de atividade e tem sido usada em fermentações lácticas e como conservante alimentar. Estudos extensivos têm fornecido dados básicos sobre sua síntese, estrutura química e modo de ação (Daeschel, 1989). Recentemente, Buckman *et al.* (1988) analisaram a estrutura, expressão e evolução do gene que codifica o precursor da nisina, a partir da clonagem do DNA de *Streptococcus lactis* ATCC 11454. A produção da bacteriocina de *Streptococcus lactis* subsp. *cremoris* 346, denominada diplococcina, foi verificada e caracterizada por Davey e Richardson (1981), e demonstrou-se, posteriormente, que é especificada por um plasmídio

conjugativo de 54 megadaltons (Davey, 1984). Scherwitz-Harmon e McKay (1987) usaram técnicas de clonagem para localizar segmentos do DNA do plasmídeo pNP2 que incluíam os genes para produção de bacteriocina. Em *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4, dois fragmentos do plasmídeo p9B4-6 clonados se mostraram responsáveis pela produção e imunidade às bacteriocinas desta linhagem (Belkum *et al.*, 1989). Essas duas regiões foram, a seguir, sequenciadas e evidenciaram que os "open reading frames" (ou pontos iniciais do quadro de leitura) encontrados nestes fragmentos estavam envolvidos na produção e imunidade à bacteriocina, e eram transcritos como um só operon (Belkum *et al.*, 1991).

Outro grupo do gênero *Streptococcus* bastante investigado com relação à bacteriocinogenia, é o grupo dos estreptococos orais, principalmente a espécie *Streptococcus mutans*, principal agente etiológico responsável pelas cáries dentais que afetam o homem. Bacteriocinas produzidas por *S. mutans* são de considerável interesse, uma vez que estes inibidores podem eliminar linhagens de *S. mutans* da placa dental, sem afetar outras bactérias da microflora oral normal, o que poderia ocorrer com a aplicação de antibióticos. Parrot *et al.* (1990) demonstraram que bacteriocinas produzidas por *S. mutans* são ativas contra outras linhagens da mesma espécie ou contra outras bactérias Gram-positivas orais, mas não exibem atividade inibitória para a maioria das bactérias Gram-negativas, e sugeriram o

envolvimento do DNA cromossômico na produção das mutacinas estudadas. Ikeda *et al.* (1985) registraram uma redução significativa de cáries em animais de laboratório alimentados com dieta suplementada com bacteriocina de *S. mutans* C3603. O papel das mutacinas na determinação da ecologia da placa dental *in vivo* também foi discutido por Hamada *et al.* (1986). Antagonismo *in vitro* por estreptococos orais, registrado por Tzannetis *et al.* (1991), foi constatado para cerca de vinte linhagens de estafilococos isolados das cavidades oral e nasal de homens sadios, sugerindo importante papel protetor para os primeiros, inibindo ou restringindo a colonização da boca por *Staphylococcus aureus* nasais. Kurita e Hirasawa (1988) caracterizaram substâncias antibacterianas produzidas pela linhagem 32K de *S. mutans* como sendo lipídicas, designando-as mutalipocinas. Entretanto, a caracterização genética da produção de mutacinas tem sido pouco documentada. Através da utilização do transposon Tn916, o gene associado com a produção de mutacina II em *S. mutans* UA96 foi inativado e isolado por Caufield *et al.* (1990).

1.1.3 Bacteriocinas de bacterias Gram-negativas

As colicinas foram as primeiras bacteriocinas a serem detectadas e estudadas em detalhe, e são hoje o grupo mais extensivamente investigado. São produzidas por diferentes espécies da família *Enterobacteriaceae*, divididas em grupos com base no seu receptor alvo na célula sensível e geralmente codificadas por genes plasmidiais. Os modos de ação e sistemas de imunidade destas bacteriocinas foram determinados ao nível molecular, e uma grande quantidade de informação está disponível com relação a sua arquitetura funcional (Ivanovics, 1962; Reeves, 1965; Konisky, 1982). Dentre estas estão as colicinas A, E1, E2, E3, Ia, Ib, K, L, M, cloacina DF13 e pesticina A1122 (Konisky, 1982). Ohsumi e Imahori (1974) investigaram o mecanismo de ação da colicina E3 num sistema *in vitro*, e sugeriram o envolvimento de um fator que aumenta a inativação de ribossomos por E3. Um mecanismo de regulação temporal da expressão do operon que inclui o gene para colicina E1 (*cea*) e o gene *kil*, cujo produto lisa as células de *E. coli*, foi proposto através de estudos com genes fundidos *cea-lac Z* (Salles *et al.*, 1987). A colicina E8-J e sua proteína de imunidade foram caracterizadas com relação a suas atividades e genes estruturais, sendo que as análises de sequência nucleotídica do operon da colicina E8 mostraram que esta é altamente homóloga a E2 (Toba *et al.*, 1988). Outro estudo que trata da regulação de operon de colicina foi realizado por Ghera *et*

al. (1988), que forneceram evidência genética para a existência de um repressor que modula a expressão de colicina D no plasmídeo ColD-CA23. Verschoor *et al.* (1989) investigaram a expressão e liberação da proteína de imunidade à cloacina DF13, através da clonagem do gene para esta proteína sob o controle de um promotor forte e induzível. Dentro desta família, antagonismo do tipo bacteriocina foi também registrado entre isolados clínicos de *Yersinia enterocolitica* por Cafferkey *et al.* (1989), com o intuito de identificar potenciais linhagens produtoras e indicadoras para um possível sistema de tipagem de linhagens desta espécie. James (1988), visando também o uso em esquemas de tipagem com fins epidemiológicos, identificou uma nova klebicina produzida por *Klebsiella pneumoniae*, klebicina B, e clonou o gene responsável por sua produção.

O gênero *Rhizobium* tem sido também bastante investigado quanto à bacteriocinogenia. A ocorrência de bacteriocinas neste gênero foi pela primeira vez registrada por Roslycky (1967) para as espécies *R. meliloti*, *R. trifolii*, *R. phaseoli*, *R. leguminosarum*, *R. japonicum* e *R. lupini*. Schwinghamer *et al.* (1973) forneceram informação sobre a natureza física e química da bacteriocina 37, produzida por uma linhagem de *R. trifolii*, que se assemelha a fagos. Mais tarde, algumas características de bacteriocinas "menores" de *R. trifolii* foram examinadas, que tornaram evidente a ocorrência de pelo menos dois tipos

de bacteriocinas, ou substâncias semelhantes, dentro desta espécie (Schwinghamer, 1975). Características semelhantes foram observadas para bacteriocinas dializáveis de *R. japonicum* (Gross & Vidaver, 1978). Já Hirsch (1979) classificou as bacteriocinas produzidas por 97 isolados de *R. leguminosarum* em "pequenas" e "médias" e associou a produção destas a plasmídios distintos e incompatíveis.

O grupo das bactérias Gram-negativas inclui os gêneros fitopatogênicos de maior expressão que são: *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* e *Xanthomonas*. Poucas bacteriocinas produzidas por estes gêneros têm sido descobertas e caracterizadas.

Dentro do gênero *Agrobacterium*, a produção de bacteriocinas foi verificada para as espécies de *A. tumefaciens* (Stonier, 1960; Moore, 1979; Hendson *et al.*, 1983) e *A. radiobacter* linhagem 84 (Kerr & Htay, 1974). A bacteriocina produzida por esta última, denominada agrocina 84, tem sido objeto de extensa investigação nos últimos vinte anos, sendo sua natureza química e modo de ação elucidados (Roberts *et al.*, 1977), e sua elevada eficácia no controle biológico da galha comprovada por vários pesquisadores em diversos países (Moore, 1977; Ellis *et al.*, 1979; Moore & Warren, 1979; Kerr, 1980). Ellis *et al.* (1979) demonstraram que a produção de agrocina 84 era codificada por um plasmídio, mais tarde denominado pAgK84, transferível

por mobilização para outras linhagens de *Agrobacterium*. Slota e Farrand (1982) isolaram este plasmídeo e construíram seu mapa de restrição, visando posterior melhoramento do sistema de controle baseado na produção de agrocina 84 através de manipulação genética. Outros estudos sobre a base genética da produção e imunidade à agrocina 84 se seguiram no mesmo intuito (Farrand *et al.*, 1985; Ryder *et al.*, 1987), sendo, inclusive, a transferência, estabilidade e expressão de pAgK84 em *R.meliloti* investigada (Hendson & Thomson, 1986). Engler *et al.* (1975) verificaram que a característica de sensibilidade à agrocina 84 era determinada pela presença dos plasmídios Ti nas linhagens de *A. tumefaciens*.

No gênero *Erwinia*, linhagens produtoras de bacteriocinas foram observadas para as espécies de *E. carotovora*, *E. chrysanthemi*, *E. herbicola*, *E. salicis*, *E. uredovora*, *E. quercina*, dentre outras (Vidaver, 1976; Biagi, 1982). Echandi e Moyer (1979) analisaram a produção, propriedades e morfologia de bacteriocinas de *E. chrysanthemi*, sendo as 18 linhagens estudadas divididas em cinco grupos com base na sensibilidade a bacteriocinas de três linhagens produtoras distintas. Resultados obtidos por Itoh *et al.* (1981), implicam a carotovoricina Er, produzida por *E. carotovora* linhagem Er, como ativadora da fosfolipase A nas células sensíveis. Por outro lado, Expert e Toussaint (1985) sugerem um possível efeito pleiotrópico sobre a patogenicidade em linhagens mutantes de *E. chrysanthemi*

resistentes a bacteriocina, supondo a existência de um sítio comum na membrana das células sensíveis ao qual pudessem se ligar diferentes bacteriocinas, assim como uma proteína envolvida na fitopatogenicidade e que, no caso, seria regulada por ferro.

Dentre as pseudomonas fitopatogênicas, Vidaver *et al.* (1972) analisaram a produção de bacteriocinas por *P. syringae*, *P. glycinea* e *P. phaseolicola*, e propuseram um esquema de tipagem que permitiu diferenciar as duas últimas espécies de *P. syringae*. Este esquema foi melhorado mais tarde por Vidaver e Buckner (1978), que apresentaram evidências para novos grupos de bacteriocinas. A produção de bacteriocina no tecido da planta pela linhagem PSW-1 de *P. syringae* foi verificada por Smidt e Vidaver (1982), que discutem as interações entre duas linhagens desta espécie que infectam feijão. Cuppels *et al.* (1978) isolaram e caracterizaram uma bacteriocina produzida pela linhagem B1 de *P. solanacearum* K60, sugerindo sua utilidade em esquemas de tipagem para linhagens desta espécie e como potencial agente de controle biológico. A capacidade bacteriocinogênica dentro deste gênero foi demonstrada também para a espécie *P. fluorescens* linhagem BC8 (Gallardo *et al.*, 1989), capaz de inibir *in vitro* a linhagem 3T de *P. solanacearum*.

Dentre as pseudomonas patogênicas para animais, a maioria dos estudos tem sido desenvolvida com piocinas de *P. aeruginosa*. Shinomiya e Ina (1989), através da comparação genética entre o bacteriófago PS17 e a piocina R2 de *P. aeruginosa* PAO, concluem que os genes da bainha de PS17 devem ser homólogos aos genes para piocina tipo R. Piocinas do tipo S, proteínas menores que aquelas do tipo R semelhantes a bacteriófagos e mais relacionadas a colicinas (Uratani & Hoshino, 1984), têm sido investigadas por vários pesquisadores. Watanabe e Saito (1980) analisaram a toxicidade de piocina S2 para células de mamíferos normais e tumorais e a presença de sítios de ligação para esta bacteriocina na membrana celular. Ainda, Seo e Galloway (1990) purificaram o complexo da piocina S2 da linhagem PAO1 de *P. aeruginosa*, e determinaram a atividade de DNase da proteína S2.

Poucos estudos têm sido relatados tratando da produção de bacteriocinas pelo gênero *Xanthomonas*. Yano (1976) verificou a produção de bacteriocinas para vários patovares de *X. campestris*, e fatores que podem afetar a produção destas substâncias foram investigados por Biagi (1982) para várias espécies de *Xanthomonas*. Fett *et al.* (1987) detectaram e caracterizaram bacteriocinas produzidas por 16 linhagens de *X. campestris* pv. *glycines*, que se mostraram inibitórias também para *X. campestris* pv. *phaseoli* e *X. campestris* pv. *vesicatoria*. Atividade inibitória de

linhagens de *X. campestris* pv. *citri* foi verificada principalmente contra linhagens dos patovares *manihotis* e *passiflorae* (Rosato & Daniels, comunicação pessoal). A bacteriocina de uma das linhagens, Ci2223, foi analisada e denominada citricina, sendo os genes para sua produção associados a um plasmídeo transferível para o pv. *campestris* em alta frequência. Mais recentemente, um estudo da diversidade de 26 linhagens de *X. campestris* pv. *oryzae* quanto a DNA plasmidial, genômico e produção de bacteriocinas, levou Xu e Gonzalez (1991) a identificarem cinco subgrupos para estas linhagens.

1.1.4 Composição química

A diversidade quanto à composição química das bacteriocinas confirma a heterogeneidade deste grupo de substâncias. Dentre as bacteriocinas de natureza proteica estão as megacinas (Ivanovics, 1962; Stahl, 1989), turicina (Favret & Yousten, 1988), pediocinas PA-1 (Gonzalez & Kunka, 1987) e Ach (Ray *et al.*, 1989), nisina (Buckman *et al.*, 1988), diplococcina (Davey & Richardson, 1981), bacteriocinas de *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* 9B4 (Belkum *et al.*, 1989), de *Propionibacterium thoenii* (Lyon & Glatz, 1991), de espécies de *Corynebacterium* (Gross & Vidaver, 1978), mutacina II (Caufield *et al.*, 1990), colicinas E1 e D (Salles *et al.*, 1987; Ghersa *et al.*, 1988, respectivamente), bacteriocinas de *Xanthomonas campestris*

(Fett *et al.*, 1987), piocinas (Cuppels *et al.*, 1978; Watanabe & Saito, 1980). As bacteriocinas proteicas podem ocorrer sob a forma de grandes agregados moleculares, como aqueles observados para helveticina J (Joerger & Klaenhammer, 1986), lactocina S (Mortvedt *et al.*, 1991), lactacina F (Muriana & Klaenhammer, 1991), lactacina B (Barefoot & Klaenhammer, 1983), ou ainda, complexadas a outras proteínas, como a klebicina B (James, 1988), piocina S2 (Seo & Galloway, 1990), as colicinas E8 (Toba *et al.*, 1988), E2 e E3 e cloacina DF13 (Konisky, 1982), que são secretadas associadas a suas proteínas de imunidade, ou a hemolisina/bacteriocina de *Enterococcus faecalis* (Gilmore *et al.*, 1990), que consiste de duas proteínas, o precursor lítico inativo e um componente ativador. As bacteriocinas podem ainda ser encontradas como proteínas complexadas a carboidratos, lipídios e/ou DNA. Como exemplos podemos citar a plantacina B (West & Warner, 1988), lactocina 27 (Upreti & Hinsdill, 1974), bacteriocinas produzidas por *Rhizobium trifolii* (Schwinghamer, 1975), e também por *Streptococcus mutans* (Parrot *et al.*, 1989). Substâncias inibitórias bastante divergentes quanto à composição química são a agrocina 84 (Roberts *et al.*, 1977), que é um análogo estrutural do nucleotídeo adenina, e as mutalipocinas, de natureza lipídica, observadas por Kurita e Hirasawa (1988) para *Streptococcus mutans* linhagem 32K.

Devido a relação sorológica ocasional entre bacteriocinas e bacteriófagos, muitos investigadores acreditam que estas substâncias podem ter evoluído a partir destes vírus (Konisky, 1982; Shinomiya & Ina, 1989). Estudos desenvolvidos com microscopia eletrônica têm demonstrado que muitas bacteriocinas são semelhantes a componentes virais ou bacteriófagos inteiros. Esta semelhança foi observada para bacteriocinas de *Rhizobium trifolii* (Schwinghamer *et al.*, 1973), carotovoricina Er (Itoh *et al.*, 1978), bacteriocinas das linhagens Ech25 e Ech23 de *E. chrysanthemi* (Echandi & Moyer, 1979), siringacina W-1 (Smidt & Vidaver, 1982), fluocina BC8 (Bustamante *et al.*, 1989) e piocinas tipo R de *Pseudomonas aeruginosa* (Shinomiya & Ina, 1989). Uma classificação de Bradley (1967) divide as bacteriocinas em dois grandes grupos, baseada na diversidade destas substâncias. No primeiro grupo colocou as bacteriocinas de baixo peso molecular, e, no segundo grupo, incluiu aquelas de alto peso molecular semelhantes a bacteriófagos. Apesar dessas semelhanças morfológicas observadas ao microscópio eletrônico, e outras como estabilidade e especificidade, bacteriocinas e bacteriófagos são considerados entidades distintas, uma vez que os últimos são capazes de se auto-replicar em organismos susceptíveis e as bacteriocinas não (Bradley, 1967; Tagg *et al.*, 1976).

O tamanho das bacteriocinas varia muito também, com pesos moleculares de cerca de 1kDa (agrocina) a 200kDa para

as de baixo peso molecular, até aquelas de dimensões semelhantes às de um bacteriófago.

1.1.5 Modo de ação

Uma hipótese amplamente aceita sobre o modo de ação das bacteriocinas sugere que a interação de uma bacteriocina com a célula sensível ocorre em dois estágios (Mayr-Harting *et al.*, 1972; Tagg *et al.*, 1976). O primeiro estágio corresponde à adsorção física rápida, normalmente irreversível, a receptores específicos na superfície celular da bactéria sensível. Este é seguido pelo desenvolvimento de alterações patológicas irreversíveis que levam, geralmente, à morte celular. Enquanto o primeiro estágio ocorre em células em descanso ou mesmo mortas, o segundo é dependente de energia.

Embora em muitos casos a adsorção de bacteriocinas seja altamente específica a bactérias sensíveis (Ivanovics, 1962; Mayr-Harting *et al.*, 1972; Tagg *et al.*, 1976), resultados obtidos por vários investigadores sugerem fortemente que uma adsorção não-específica a bactérias resistentes (ação não-letal) possa ocorrer (Hamada *et al.*, 1986; Upreti & Hinsdill, 1974; Gonzalez & Kunka, 1987; Barefoot & Klaenhammer, 1983). Esta ligação não-letal pode refletir que a especificidade da ação das bacteriocinas não é inteiramente dependente da presença de receptores

particulares nas células sensíveis, ou ainda, podem refletir uma alta atividade de superfície de algumas bacteriocinas capazes de adsorver não especificamente a várias bactérias (Tagg *et al.*, 1976).

Sob um ponto de vista geral, os receptores podem fornecer um meio através do qual as bacteriocinas superam a barreira da membrana externa, alcançando seus alvos celulares e acarretando a morte da célula. Os alvos bioquímicos primários de várias bacteriocinas têm sido identificados e são bastante divergentes. A colicina E3 e a cloacina DF13 são enzimas com atividade de RNase, danificando o RNA 16S da subunidade ribossomal 30S. A ação *in vivo* destas bacteriocinas envolve certamente a penetração de toda ou parte da molécula através das membranas bacterianas, permitindo assim a interação direta da toxina com os ribossomos (Ohsumi & Imahori, 1974; Konisky, 1982). As colicinas E2 e E8 exibem atividade de endonuclease não específica sobre o DNA (Konisky, 1982; Toba *et al.*, 1988, respectivamente). As colicinas A, E1, Ia, Ib e K formam canais na membrana citoplasmática da célula sensível permeáveis a íons, causando a perda de potássio e magnésio celulares e a consequente morte da célula. A colicina M leva à inibição da síntese de mureína e hidrólise desta, causando lise celular, o que sugere que o seu alvo devem ser as enzimas envolvidas na formação das peptidoglicanas, localizadas na superfície externa da

membrana interna (Konisky, 1982). A estafilococcina 1580 age primariamente na membrana citoplasmática, provocando uma despolarização que culmina numa rápida inibição da síntese macromolecular e transporte ativo, e na depleção do ATP celular. A butiricina e a piocina R1, semelhante a fagos, atuam inibindo a síntese de DNA, RNA e proteína, reduzem os níveis de ATP e induzem um efluxo de potássio celular, sendo a membrana citoplasmática o provável alvo primário destas bacteriocinas (Konisky, 1982). As piocinas S2 e AP41 exercem atividade de endonuclease sobre o DNA (Seo & Galloway, 1990; Konisky, 1982). As megacinas A, assim como a turicina (Favret & Yousten, 1989), têm atividade de fosfolipase, atuando na membrana citoplasmática sem provocar a lise celular, aumentando a permeabilidade e causando a aparência de células "fantasmas" (Ivanovics, 1962; Ozaki *et al.*, 1966; Konisky, 1982). Já as megacinas B têm atividade de natureza desconhecida, embora as megacinas BI e BII pareçam atuar como proteínas de membrana (Rilfors *et al.*, 1978), e as megacinas C exercem sua ação ativando a DNase em células sensíveis (Holland, 1965). A lactocina 27 atua primariamente inibindo a síntese proteica (Upreti & Hinsdill, 1974), e a mutacina MT3791 inibe a síntese de DNA, RNA e proteína simultaneamente (Hamada *et al.*, 1986). A carotovoricina Er causa ativação da fosfolipase A, existente na forma latente nas células normais, provocando a degradação dos fosfolípidios da membrana e a lise da bactéria sensível (Itoh *et al.*, 1981). A agrocina 84 age especificamente

inibindo a síntese de DNA (Das *et al.*, 1978), o que também foi sugerido para uma agrocina produzida pela linhagem D286 de *A. tumefaciens* (Hendson *et al.*, 1983).

1.1.6 Determinantes genéticos

Geralmente o DNA plasmidial está implicado na produção de bacteriocinas. Entretanto, os plasmídios bacteriocinogênicos podem determinar não apenas a composição química das bacteriocinas, mas também a regulação de sua biossíntese, sua liberação da célula, e imunidade da bactéria produtora, assim como, em alguns casos, a sua própria transferência para outras linhagens por conjugação (Tagg *et al.*, 1976). Dentre os plasmídios envolvidos na produção de bacteriocinas, os fatores colicinogênicos são os melhor estudados, sendo os genes para produção e imunidade à bacteriocina de muitos já sequenciados e os mecanismos de regulação da expressão gênica elucidados. Ghera *et al.* (1988) analisaram a organização transcricional dos genes colicinogênicos no plasmídio Col D-CA23, e encontraram que a expressão destes era modulada por um repressor codificado pelo mesmo transcrito. A relação entre os sistemas de regulação SOS e a indução dos genes para a colicina E1 foi esclarecida por Salles *et al.* (1987), através de fusões do gene da colicina E1 e o gene *lac-Z* para quantificação da síntese de colicina, que verificaram que apenas a indução persistente da resposta SOS levaria à expressão dos genes

colicinogênicos letais para as células produtoras. Toba *et al.* (1988) investigaram os genes para colicina E8 a nível molecular, sequenciando parte do seu operon e constatando a homologia deste com o operon da colicina E2. A organização estrutural, expressão fenotípica e sequenciamento têm sido também amplamente registrados para genes bacteriocinogênicos plasmidiais de bactérias do ácido láctico (Harmon & McKay, 1987; Belkum *et al.*, 1989; Belkum *et al.*, 1991; Muriana & Klaenhammer, 1991). O envolvimento de plasmídios na produção de bacteriocinas foi ainda verificado para diplococcina (Davey, 1984), lactacina F (Muriana & Klaenhammer, 1987), lactocina S (Mortvedt & Nes, 1990), pediocinas A (Daeschel & Klaenhammer, 1985), PA-1 (Gonzalez & Kunka, 1987), AcH (Ray *et al.*, 1989), klebicina B (James, 1988), bacteriocina BCN5 de *Clostridium perfringens* (Garnier & Cole, 1986), megacina BII (Stahl, 1989), turicina (Favret & Yousten, 1989), agrocina 84 (Ellis *et al.*, 1979), agrocina D286 (Hendson *et al.*, 1983), bacteriocinas de *Rhizobium leguminosarum* (Hirsch, 1979), citricina (Rosato & Daniels, comunicação pessoal). Entretanto, em algumas bactérias são os genes cromossomais que codificam para a produção de bacteriocinas, como observado para a fluocina BC8 de *Pseudomonas fluorescens* (Bustamante *et al.*, 1989), piocinas R1, R2 e S2 (Konisky, 1982; Shinomiya & Ina, 1989; Seo & Galloway, 1990; respectivamente), mutacinas (Parrot *et al.*, 1990; Caufield *et al.*, 1990), helveticina J (Joerger & Klaenhammer, 1986),

bacteriocinas de *X. c. pv. glycines* (Fett *et al.*, 1987) e de *X. c. pv. oryzae* (Xu & Gonzalez, 1991).

Uma propriedade necessária para assegurar a sobrevivência dos organismos produtores de bacteriocina é a presença de imunidade específica à bacteriocina homóloga. Imunidade à bacteriocina é diferente de resistência à bacteriocina, sendo que a última é determinada pela perda do receptor específico para uma bacteriocina particular, e a imunidade resulta da síntese de uma substância capaz de reprimir a atividade da bacteriocina homóloga (Tagg *et al.*, 1976). Os mecanismos de imunidade de algumas bacteriocinas já estão determinados a nível molecular, como para as colicinas E2 e E3 e para a cloacina DF13 (Konisky, 1982). Estas bacteriocinas interagem, durante a síntese, com suas proteínas de imunidade formando complexos inativos. Assim, o organismo produtor é protegido da ação da bacteriocina endógena e mantém a capacidade de síntese contínua até a liberação do complexo no meio. A imunidade da bacteriocina exógena, sugerem alguns pesquisadores, resultaria da neutralização de tal bacteriocina por proteína de imunidade intracelular livre. Verschoor *et al.* (1989) verificaram que o mecanismo de transporte da proteína de imunidade à cloacina DF13 é dependente de uma proteína de liberação de bacteriocina (BRP) e identificaram a região C-terminal da proteína de imunidade como sendo fundamental na sua função protetora. Estudos de caracterização da colicina E8-J e sua

proteína de imunidade, revelaram que EB consiste também de um complexo de duas proteínas, sendo que uma delas exibe atividade de DNase inibida pela outra proteína. Geralmente os genes que codificam para imunidade estão contidos no mesmo plasmídeo portador do gene estrutural da bacteriocina (Ryder *et al.*, 1987; Ray *et al.*, 1989; Mortvedt & Nes, 1990). Podem ainda estar organizados estruturalmente próximos aos genes para produção de bacteriocina e para lise da célula, mas serem transcritos como operons distintos (Ghera *et al.*, 1988; James, 1988), ou também, podem estar contidos no mesmo operon que contém o gene para bacteriocina, e serem transcritos a partir do mesmo promotor (Belkum *et al.*, 1991).

A sensibilidade à bacteriocina, geralmente decorrente da presença de receptores na superfície da célula sensível, é codificada por genes cromossômicos (Mayr-Harting *et al.*, 1972; Tagg *et al.*, 1976). No caso da agrocina 84, a sensibilidade é conferida pela presença do plasmídeo Ti na linhagem sensível (Engler *et al.*, 1975). Evidências fornecidas recentemente sugerem que a sensibilidade à agrocina 84 deve estar relacionada à habilidade de linhagens sensíveis de catabolizar uma classe de opinas chamadas agrocinopinas, e que estas seriam os substratos legítimos para o sistema de transporte codificado pelo locus agrocinopina-agrocina 84 no plasmídeo Ti (Hayman & Farrand, 1988). A resistência a bacteriocinas pode resultar da perda

dos receptores específicos, ou, no caso da agrocina 84, do plasmídeo Ti. Outros mecanismos de resistência, ou insensibilidade, são discutidos por Sahl *et al.* (1987) para a estafilococcina peptídica Pep 5, como: (1) a produção de uma protease por *Bacillus subtilis* W23 que cliva a Pep5 em fragmentos com atividade bactericida bastante reduzida; (2) a inabilidade de Pep5 de alcançar o seu alvo celular no caso de bactérias Gram-negativas, uma vez que a substância não é capaz de penetrar através da membrana externa, e (3) potencial de membrana muito baixo através da membrana citoplasmática de células eucarióticas, o que não permitiria a formação de canais transmembranais por Pep5. Estes mecanismos de insensibilidade seriam, provavelmente, consequências de sistemas não relacionados primariamente com bacteriocinogenia.

1.1.7 Fatores que afetam a produção

A produção de bacteriocinas é fortemente afetada pelas condições de incubação dos organismos produtores, sendo que as condições ótimas de produção para cada caso devem ser determinadas empiricamente (Mayr-Harting *et al.*, 1972; Tagg *et al.*, 1976; Vidaver, 1983).

Em vários casos, a produção significativa de bacteriocinas só foi detectada em meio sólido (Echandi, 1976; Tagg *et al.*, 1976; Gross & Vidaver, 1978; Stahl,

1989), sendo que alguns pesquisadores obtiveram maiores títulos da substância aumentando-se a concentração do ágar, ou seja, a viscosidade do meio, ou a profundidade do ágar na placa teste (Vidaver *et al.*, 1972; Echandi & Moyer, 1979).

Componentes particulares do meio podem também influenciar a produção de bacteriocinas. Schwinghamer (1975) verificou uma maior produção de bacteriocinas de *R. trifolii* quando extrato de levedura era adicionado ao meio. Este mesmo efeito foi observado por Rogers (1972) para linhagens de *S. mutans*. A influência da composição do meio na produção de bacteriocinas também foi constatada por outros investigadores (Gross & Vidaver, 1978; 1979; Favret & Yousten, 1989; Biswas *et al.*, 1991).

Outras variáveis que interferem com os níveis de produção de bacteriocinas são a temperatura de incubação (Vidaver *et al.*, 1972; Echandi, 1976; Cuppels *et al.*, 1978; Gross & Vidaver, 1978; 1979; Echandi & Moyer, 1979; Fett *et al.*, 1987; Stahl, 1989; Cafferkey *et al.*, 1989; Biswas *et al.*, 1991), pH (Davey & Richardson 1981; Muriana & Klaenhammer, 1987; Biswas *et al.*, 1991), fase de crescimento (Schwinghamer, 1975; Davey & Richardson, 1981; Kurita & Hirasawa, 1988; Favret & Yousten, 1989; Mortvedt & Nes, 1990; Mortvedt *et al.*, 1991; Higa *et al.*, 1991; Biswas *et al.*, 1991) e quantidade de inóculo (Vidaver *et al.*, 1972; Echandi, 1976; Biswas *et al.*, 1991).

A produção de algumas bacteriocinas pode ser aumentada através da utilização de agentes de indução, sendo os tratamentos com luz ultravioleta ou mitomicina C os métodos mais empregados (Mayr-Harting *et al.*, 1972; Tagg *et al.*, 1976). Cuppels *et al.* (1978) obtiveram maior título da bacteriocina produzida por *Pseudomonas solanacearum* K60 após uma curta exposição à luz ultravioleta, mas não com o emprego de agentes químicos como mitomicina C, cloranfenicol ou trimetoprim. Já ambos os tratamentos com luz UV e mitomicina C de duas linhagens de *Erwinia chrysanthemi* aumentaram a produção de bacteriocinas (Echandi & Moyer, 1979). Entretanto, em alguns casos, tais agentes parecem não ter efeito indutor (Vidaver *et al.*, 1972; Schwinghamer, 1975; Echandi, 1976; Gross & Vidaver, 1978; Davey & Richardson, 1981; Fett *et al.*, 1987; Higa *et al.*, 1991). Zink *et al.* (1985) realizaram um estudo molecular a respeito da indução de pectina liase e carotovoricina em *E. carotovora* subsp. *carotovora*, utilizando-se luz UV, mitomicina C e ácido nalidíxico. Através de experimentos de clonagem e mutagênese, os autores demonstraram que um produto funcional do gene *rec A* de *E. carotovora* subsp. *carotovora* era requerido na indução de pectina liase e carotovoricina neste organismo. Constataram também a conservação do gene *rec A* entre as enterobactérias, com experimentos de complementação em *E. coli*, e sugeriram a hipótese de que a pectina liase e a carotovoricina fossem

reguladas pelo produto do gene *rec A* de maneira similar a indução das funções SOS em *E. coli*. A regulação da síntese de bacteriocina através de um promotor SOS, ou seja, que responde a danos causados no DNA, já foi confirmada para as colicinas (Ebina *et al.*, 1982).

1.1.8 Papel ecológico

Através das observações de interações *in vitro*, parece razoável assumir que as bacteriocinas desempenham importante papel na regulação da dinâmica de populações em vários ecossistemas bacterianos, embora isto tenha raramente sido demonstrado de maneira evidente. Uma possível base para este papel regulador é a ocorrência universal destas substâncias e a sobrevivência a pressões evolutivas de maneira consistente, sugerindo que devam preencher alguma função vital (Tagg *et al.*, 1976). Indubitavelmente, muitas bactérias são capazes de deslocar ou suprimir o crescimento de outras residentes na mesma microbiota, seja por antibiose ou competição.

Evidências de supressão do crescimento mediada por substâncias inibitórias foram fornecidas por Fleming *et al.* (1975), que registraram inibição do crescimento da linhagem WSO de *Lactobacillus plantarum* durante os dois primeiros dias de incubação em sucos de pepino, e o consequente retardamento na produção de ácido, quando esta era inoculada

juntamente com uma linhagem de *Pediococcus cerevisiae* com atividade inibitória em placa. Isolados não inibitórios de *Pediococcus* não tiveram efeito apreciável no crescimento e produção de ácido por *L. plantarum* WSO. Em experimentos realizados por Smidt e Vidaver (1982), uma linhagem bacteriocinogênica de *P. syringae* pv. *syringae* efetivamente suprimiu uma linhagem patogênica sensível à bacteriocina em tecidos de feijão em determinadas concentrações celulares. Não ocorreu supressão do crescimento quando um mutante das linhagens sensíveis resistente à bacteriocina foi utilizado. Entretanto, pode ser que a produção de bacteriocina nos tecidos da planta seja necessária mas não suficiente, por si só, para controlar o patógeno. Por exemplo, a transferência do plasmídeo que determina a produção de agrocina 84 em *A. radiobacter* para uma linhagem não bacteriocinogênica foi insuficiente para efetuar um controle da galha equivalente àquele obtido com a linhagem 84, sugerindo que um fator adicional era necessário (Ellis et al., 1979). Outros exemplos são os estudos com as bacteriocinas produzidas por *S. mutans*, que podem, potencialmente, determinar a ecologia da placa dental, eliminando linhagens de *S. mutans*, agentes cariogênicos, sem afetar consideravelmente outras bactérias da microflora normal. Ikeda et al. (1985) observaram uma taxa de redução significativa na incidência de cáries em ratos e homem através da utilização de uma bacteriocina purificada de *S. mutans* C3603. O antagonismo verificado *in vitro* entre linhagens de estreptococos orais

bacteriocinogênicos e linhagens de estafilococos de origem nasal e oral de humanos sadios, levou Tzannetis *et al.* (1991) a concluir que os estreptococos orais, via suas bacteriocinas, podem desempenhar um papel protetor, restringindo o estabelecimento massivo e a colonização da boca por *Staphylococcus aureus* de origem nasal. Uma vantagem seletiva via biossíntese letal de bacteriocina foi sugerida para a colicina E1, cujo mecanismo se baseia no controle temporal da indução da colicina através de um promotor SOS, que permite que apenas uma pequena parte da população de células, portadoras de altas taxas de danos no DNA e que não sobreviveriam de qualquer forma, sejam induzidas (Salles *et al.*, 1987). Esta taxa de produção num ambiente natural já seria suficiente para assegurar vantagem seletiva sobre a população sensível.

O interesse na aplicação de microrganismos como instrumentos profiláticos e terapêuticos tem sido recentemente retomado, após o advento da era do antibiótico, uma vez que esta pode ser uma estratégia ecologicamente mais válida para controle de patógenos do que o uso dos antibióticos, os quais apresentam efeitos destrutivos mais amplos sobre a microbiota residente (Tagg *et al.*, 1976).

1.2 MATERIAIS E METODOS

1.2.1 Linhagens bacterianas utilizadas

Tabela 1 - Relação das linhagens bacterianas e plasmídios utilizados , suas características e referências.

<i>Linhagens</i>	<i>Características ou hospedeiro</i>	<i>Fonte ou referencia</i>
<i>X. campestris</i>		
<i>pv. campestris</i>		
Sm referência	NRRL-B 1459 Sm	Lanza e Rosato (1986)
Cm referência	NRRL-B 1459 Cm	"
420	NRRL-B 1459 Sm::Tn5	Lanza e Rosato (1991)
247	<i>Brassica oleracea</i> (couve)	Rodrigues Neto; I.B.; Campinas; SP
<i>pv. vesicatoria</i>		
310, 332, 401,	<i>Capsicum annuum</i> (pimentão)	"
411, 415, 460	"	"
462, 466, 467	"	"
317	<i>Nicotiana tabacum</i> (tabaco)	"
408, 420, 463,	<i>Lycopersicon esculentum</i> (tomate)	"
479, 484, 418	"	"
456, 457, 459	<i>Lycopersicon esculentum</i> , como provável hospedeiro	"

<i>Linhagens</i>	<i>Características ou hospedeiro</i>	<i>Fonte ou referência</i>
(contin.)		
<i>pv. glycines</i>		
333, 327	<i>Glycine max</i> (soja)	Rodrigues Neto; I. B.; Campinas; SP.
<i>pv. melonis</i>		
68	desconhecido	"
<i>pv. passiflorae</i>		
148	<i>Passiflora</i> sp. (maracujá)	"
<i>pv. citri</i>		
221, 256	<i>Citrus reticulata</i> (laranja pera)	"
<i>pv. cucurbitae</i>		
319	desconhecido	"
<i>pv. pelargonii</i>		
266	<i>Geranium pratense</i> (gerânio)	"
<i>pv. cassavae</i>		
270, 272	<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)	"
<i>pv. manihotis</i>		
321	desconhecido	"
289	<i>Manihot esculenta</i>	"
<i>pv. phaseoli</i>		
559	desconhecido	"
558	<i>Phaseolus vulgaris</i> (feijão)	"
<i>pv. carotae</i>		
366, 367	<i>Daucus carotae</i> (cenoura)	"

<i>Linhagens</i>	<i>Características ou hospedeiro</i>	<i>Fonte ou referência</i>
(contin.)		
<i>pv. cerealis</i>		
548	<i>Trifolium aestivum</i> (trevo)	Rodrigues; Neto I.B.; Campinas; SP.
<i>pv. malvacearum</i>		
559	<i>Gossypium hirsutum</i> (algodão)	"
<i>pv. cordiae</i>		
510, 511	<i>Cordia goeldiana</i> (freijó)	"
<i>pv. ricini</i>		
313	<i>Ricinus communis</i> (mamona)	"
<i>pv. viegasii</i>		
575, 576	<i>Pachystachys lutea</i> (camarão)	"
<i>pv. fragariae</i>		
89, 90	<i>Fragaria hib.</i> (morango)	"
<i>pv. undulosa</i>		
578	<i>Trifolium aestivum</i>	"
579	<i>Trifolium turgidum</i>	"
<i>E. coli</i>		
HB101	<i>recA13, rpsL20(5sr), proA2, ara-14, lacY1</i>	Boyer e Roulland- Dussoix (1969)
ED8767	<i>recA, met</i>	Murray et al. (1977)
WR 6016	F'ts 114 lac::Tn5	Sansonetti et al. (1982)

<i>Linhagens</i>	<i>Características ou hospedeiro</i>	<i>Fonte referência</i>	<i>ou</i>
(contin.)			
<i>E. coli</i>			
JM101	supE ^{hi} (lac-proAB)F'	Messing (1979)	
<i>Pseudomonas elodea</i>		ATCC 31461	
<i>R. leguminosarum</i> subsp.			
<i>phaseoli</i> CIAT899	sensível a acidez, Al e Mn	Graham et al. (1982)	
<i>B. subtilis</i> SB202		Iizuka, T.; Sapporo, Japão.	
<i>B. thuringiensis</i> var.			
<i>kurstaki</i> HD-1, HD-73		"	
<hr/> plasmídios <hr/>			
pMR5	TnA (Ap ^r)	Robinson et al. (1979)	
pRK2013	Tn10(Tc ^r), replicon ColE1	Lemos, V.F.; UNESP; Jaboticabal, SP.	
ColE1	Tn3 (Ap ^r)	Coelho, A.; URFJ; RJ	
pRK2013	Tra ⁺ Mob ⁺ Ka ^r , "helper", replicon ColE1	Figurski e Helinski (1979)	
pRK2073	Tra ⁺ Mob ⁺ Sp ^r , "helper", replicon ColE1	Leong et al. (1982)	

1.2.2 Meios de cultura

MEIO COMPLETO NYG

Peptona	5,0g	
Extrato de levedura	3,0g	
Glicerol	20,0ml	
Agua destilada	qsp.....	1000ml	pH 7,2

MEIO COMPLETO YM

Extrato de malte	3,0g	
Extrato de levedura	3,0g	
Peptona	3,0g	
Sacarose	10,0g	
Agua destilada	qsp.	1000ml	pH 7,2

MEIO COMPLETO 523

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

MEIO COMPLETO LB (Luria Bertani)

Triptona	10,0g	
Extrato de levedura	5,0g	
NaCl	5,0g	
Agua destilada	qsp.....	1000ml	pH 7,2

MEIO PARA DETECÇÃO DE ATIVIDADE DE DNase

Triptona	20,0g	
NaCl	5,0g	
Bacto DNA	2,0g	
Agua destilada	qsp.	1000ml	pH 6,0

MEIO PARA DETECÇÃO DE NATUREZA LIPIDICA

Peptona	10,0g	
NaCl	5,0g	
CaCl ₂ . 2H ₂ O	0,1g	
Agua destilada	qsp.	1000ml	
Adicionar Tween 20 esterilizado a 1%.			

Para a obtenção de meio sólido, o ágar foi adicionado a 1,5%, e para o meio semi-sólido, a 0,75%.

Os antibióticos foram utilizados em meio sólido, quando necessário, nas seguintes concentrações: canamicina 25ug/ml, cloranfenicol 50ug/ml, espectinomicina 100ug/ml,

estreptomicina 100ug/ml. Quando utilizados em meio líquido, os antibióticos tiveram suas concentrações reduzidas à metade.

1.2.3 Verificação de linhagens produtoras de bacteriocina

Dezenove linhagens de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (tabela 1) e a linhagem 333 de *Xanthomonas campestris* pv. *glycines* (inicialmente tida como sendo também do pv. *vesicatoria*), foram testadas entre si para a produção de bacteriocina utilizando-se a técnica empregada por Vidaver *et al.* (1972). O tempo de incubação para o ensaio das linhagens produtoras foi padronizado em 24 horas, em meio NYG sólido a 28°C. As linhagens a serem testadas como indicadoras foram crescidas durante a noite, em meio NYG líquido, a 28°C sob agitação constante. Aquela que evidenciou maior halo de inibição foi utilizada nos experimentos posteriores. A medida do halo de inibição é dada pela distância da margem da colônia produtora à margem externa do halo, onde se inicia o crescimento da linhagem sensível.

1.2.4 Caracterização da linhagem produtora

1.2.4.1 Influência do meio de cultura e tempo de incubação na produção de bacteriocina

A linhagem produtora foi inoculada em três diferentes meios de cultura, NYG, YM e 523, e cultivada em diferentes tempos de incubação, 24, 48 e 72 horas, com o intuito de se avaliar a influência destas variáveis na produção da bacteriocina. A temperatura de incubação permaneceu constante, 28°C, e os halos de inibição foram visualizados através da técnica utilizada por Vidaver *et al.* (1972).

1.2.4.2 Espectro de ação inibitória

A linhagem bacteriocinogênica identificada foi testada contra outros patovares de *X. campestris*, assim como contra outras espécies e gêneros (tabela 1), a fim de se determinar o espectro de inibição de sua bacteriocina. A metodologia foi seguida como descrito no item 1.2.3.

1.2.4.3 Secreção no meio de cultura

A detecção da atividade de bacteriocina no meio de cultura foi realizada centrifugando-se 1,5ml de cultura líquida da linhagem produtora, cultivada durante a noite a 28°C sob agitação constante, a 12.000g por 2 minutos. Uma alíquota de 10ul foi depositada sobre placas contendo meio NYG sólido e esperou-se secar por cerca de 30 minutos. A linhagem indicadora crescida por 24 horas foi então adicionada a 5ml de meio semi-sólido fundido, o qual foi despejado sobre as placas, como descrito por Vidaver *et al.* (1972), sendo a leitura dos resultados feita após 24 horas.

1.2.4.4 Curva de crescimento e titulação da produção

Para este experimento utilizou-se um mutante espontâneo da linhagem produtora, resistente a estreptomicina, obtido neste trabalho. A linhagem produtora foi cultivada em meio NYG líquido acrescido do antibiótico, a 28°C sob constante agitação.

A partir de um pré-inóculo de 5ml de meio, cultivado 24 horas, foi feito um inóculo a 10% em 40ml de meio NYG líquido contidos em erlenmeyers de 125ml para uma DO (densidade ótica)soo inicial de 0,1. Essa cultura foi cultivada por 36 horas, nas condições descritas acima, e

durante este tempo foram retiradas aliquotas de 2ml, com repetição, em intervalos de 3 horas nas primeiras 12 horas e 6 horas nas 24 horas restantes. A leitura da densidade ótica destas aliquotas foi realizada em um comprimento de onda de 600nm. As aliquotas coletadas foram também plaqueadas em diluições apropriadas em meio NYG sólido contendo 5m e incubadas a 28°C para posterior contagem do número de células viáveis.

Para a titulação da produção de bacteriocina, seguiu-se o mesmo procedimento descrito acima, mas utilizaram-se os meios NYG e YM para o cultivo da linhagem produtora. Foram coletadas aliquotas de 4 ml para leitura do pH, sendo uma pequena fração utilizada para a centrifugação e posterior diluição do sobrenadante em série de 1/2. As várias diluições de cada coleta foram testadas contra a linhagem sensível como consta no item 1.2.4.4. A atividade da bacteriocina foi expressa em UA (unidades arbitrárias)/ml, como sendo a recíproca da mais alta diluição para a qual se detectou atividade contra a linhagem indicadora.

1.2.4.5 Perfil plasmidial

A purificação de DNA plasmidial da linhagem produtora foi realizada mediante a lise alcalina de Birnboim e Doly (1979), com algumas modificações descritas por Maniatis *et al.* (1982). Para caracterização do padrão de restrição, os plasmídios da linhagem bacteriocinogênica foram digeridos com as enzimas de restrição EcoRI, BamHI, HindIII, Sall e Sau3A. As digestões foram realizadas a 37°C durante 3 horas de acordo com Maniatis *et al.* (1989) ou conforme instruções do fabricante. O DNA plasmidial intacto e digerido, ressuspendido em TE e adicionado de tampão de amostra, foi submetido a uma eletroforese em gel de agarose 0.7% e tampão TEB, a uma voltagem de cerca de 5V/cm de gel, e corado em solução contendo brometo de etídio para posterior visualização das bandas plasmidiais em transiluminador de luz ultra-violeta. A metodologia descrita acima, assim como as soluções utilizadas, seguiram instruções segundo Maniatis *et al.* (1989). O tamanho dos fragmentos do(s) plasmídio(s) presente(s) na linhagem produtora digerido(s) com BamHI foi estimado através de um programa de microcomputador para cálculo de peso molecular (PM) de DNA desenvolvido por Leite, A. (comunicação pessoal).

1.2.5 Purificação parcial da bacteriocina

A linhagem bacteriocinogênica foi inoculada em 250ml de meio NYG líquido e cultivada durante a noite a 28°C. A cultura foi, a seguir, centrifugada a 5.600g por 10 minutos a 4°C, e o sobrenadante transferido para um erlenmeyer para proceder à purificação.

1.2.5.1 Filtração em membrana

Uma fração do sobrenadante foi submetida à filtração em membrana AMICON PM10 com peso molecular de exclusão de 10.000 daltons (D), como uma prévia estimativa do tamanho da bacteriocina.

1.2.5.2 Fracionamento com sulfato de amônia

O sobrenadante foi fracionado através da precipitação com sulfato de amônia primeiramente nas saturações de 0 a 25%, 25 a 50% e 50 a 80%. As frações foram centrifugadas por 10 minutos a 15.300g a 4°C, ressuspensas em PBS (tampão fosfato 50mM/NaCl 150mM) pH 7,4 e dialisadas, também a 4 °C, em sacos de diálise com peso molecular de exclusão de 12.000D contra o mesmo tampão. A preparação dos sacos de diálise seguiu a metodologia descrita por Maniatis *et al.* (1989). A atividade biológica das frações nas

diluições de 1/1, 1/5 e 1/10, foi testada contra a linhagem sensível como descrito no item 1.2.4.4.

1.2.5.3 Cromatografia em coluna

Após a precipitação, centrifugação e diálise, o sobrenadante concentrado em 5ml de PBS foi submetido à cromatografia de exclusão em Sepharose 4B, equilibrada com tampão PBS pH 7,4. Este mesmo tampão foi utilizado na eluição. A absorbância das frações foi lida em espectrofotômetro Beckman Modelo DU-65 no comprimento de onda de 280nm. A atividade inibitória das frações foi testada e aquelas que exibiram atividade biológica foram então reunidas e precipitadas com 50 a 80% de saturação do sulfato de amônia e, após centrifugação e diálise, o material obtido foi recromatografado em Sepharose 4B. Novamente, aquelas frações com atividade biológica foram reunidas, dialisadas contra PBS e concentradas com polietilenoglicol (PEG). O volume final foi filtrado em membrana millipore com poros de 0,22µm de diâmetro a fim de se esterilizar a amostra para testes posteriores. O material assim obtido foi considerado como bacteriocina parcialmente purificada.

1.2.6 Caracterização da bacteriocina

1.2.6.1 Teste para atividade fágica

A possível capacidade de reprodução da substância investigada foi testada com o intuito de se descartar, ou não, a possibilidade desta ser um bacteriófago. Uma pequena fração de meio semi-sólido foi retirada com uma micropipeta do halo de inibição na placa contendo a linhagem produtora e a sobre-camada da linhagem sensível. Esta fração de ágar foi colocada em 2ml de meio 523 líquido, ao qual adicionaram-se 200ul de clorofórmio. A mistura foi agitada intensamente em agitador automático e deixada decantar por 5 a 10 minutos para a separação entre o clorofórmio e o meio de cultura. Cerca de 0,5ml do meio foi adicionado a 5ml de meio 523 semi-sólido fundido contendo 0,1ml de uma cultura da linhagem sensível, cultivada durante a noite, e despejado sobre uma placa com meio 523 sólido. Os resultados foram lidos 24 horas depois.

1.2.6.2 Sensibilidade enzimática

Os ensaios para se analisar a sensibilidade da bacteriocina a enzimas foram realizados com amostras de bacteriocina "bruta", ou seja, o sobrenadante da cultura da linhagem produtora, e de bacteriocina parcialmente purificada. Aliquotas de 100ul de ambas as amostras foram

submetidas a tratamento com as enzimas protease (300ug/ml), tripsina (300ug/ml), RNase (1.000ug/ml), e DNase (150ug/ml), a 37°C por 90 minutos e então testadas em placa contra a linhagem sensível como consta no item 1.2.4.4. Foram realizados testes controle a fim de se confirmar a atividade das enzimas. A atividade da protease e da tripsina foi testada em meio contendo leite mólico a 1%. A atividade das enzimas DNase e RNase foi verificada em meio adicionado de Bacto DNA (Difco 3231) e RNA de levedura (Jeffries et al., 1957), respectivamente, sendo que os halos de degradação foram evidenciados através da revelação com HCl 1N. As placas foram incubadas a 37°C durante a noite e os resultados analisados. Tratamentos das amostras de bacteriocina com as enzimas foram também realizados com incubação de 16 horas a 37°C.

1.2.6.3 Termosensibilidade

Os ensaios com temperatura foram levados a cabo apenas com amostras de bacteriocina "bruta". As temperaturas de incubação foram de 37°C (60 minutos), 42°C (60 minutos), 65°C (15 e 30 minutos), 80°C (30 minutos) e 100°C (15 minutos). Aliquotas de 100ul da bacteriocina "bruta" foram incubadas em banho-maria nas temperaturas e tempos especificados acima. A atividade inibitória das

amostras após os tratamentos foi testada como descrito no item 1.2.4.4. e os resultados analisados 24 horas depois.

1.2.6.4 Capacidade antigênica

A capacidade da bacteriocina de induzir a formação de anticorpos foi verificada mediante a inoculação de dois coelhos jovens com aliquotas de bacteriocina parcialmente purificada. Os coelhos foram inicialmente inoculados com adjuvante Freund completo nos gânglios poplíteos das patas traseiras. Após 3 semanas, foram novamente inoculados com adjuvante Freund incompleto. Um mês depois realizou-se a sangria de prova para se verificar o título do antissoro. Este foi titulado através da reação de neutralização da atividade bacteriocinogênica do sobrenadante da cultura produtora, "bruto" e parcialmente purificado. O antissoro foi diluído em PBS pH 7,4 em série de 1/2 e 10ul de cada diluição foram incubados com o mesmo volume da amostra de bacteriocina por 1 hora a 37°C. A seguir, a mistura foi testada para atividade biológica contra a linhagem sensível de maneira descrita no item 1.2.4.4. O antissoro foi titulado também através do teste de dupla difusão em ágar (Ouchterlony, 1950), no qual a reação antígeno-anticorpo evidencia uma linha de precipitação no ágar. Posteriormente, outra imunização foi realizada através da inoculação sub-cutânea em vários pontos do dorso do

animal, sem a utilização de adjuvante. Seis dias depois, o antissoro foi titulado de maneira análoga à descrita acima.

1.2.6.5 Efeito na célula sensível

1.2.6.5.a) Atividade bactericida - a partir de um pré-inóculo da linhagem sensível cultivado durante a noite, 4ml de meio NYG e 2ml de meio NYG acrescido de 2ml de sobrenadante da cultura produtora, centrifugado e filtrado em filtros millipore, foram inoculados para uma concentração final de 10^8 céls./ml. Logo após o inóculo, as amostras foram diluídas e plaqueadas em meio NYG sólido, e então incubadas por 90 minutos a 28°C sob agitação, quando foram novamente diluídas e plaqueadas. Após 48 horas de incubação das placas em estufa a 28°C , procedeu-se à contagem do número de células viáveis nos tempos zero e 90 minutos.

1.2.6.5.b) Visualização ao M.E. - a linhagem sensível foi cultivada durante a noite a 28°C com agitação, diluída para as concentrações finais de 10^8 , 10^9 e 10^{10} céls./ml e adicionadas de sobrenadante esterilizado da cultura produtora na proporção de 1:1. Foram utilizados controles para cada diluição, ou seja, sem a adição de bacteriocina "bruta". As amostras foram então incubadas, nas mesmas condições de temperatura e agitação, sendo as alíquotas retiradas após 30, 90 e 180 minutos, depositadas

sobre telas de cobre previamente cobertas com filme parlódio e coradas com PTA (ácido fosfotúngstico) a 1% pH 7,0 por 1 minuto. Depois de secas, as telas foram examinadas ao microscópio eletrônico de transmissão Zeiss Modelo EM-9, sob aumentos de 9.460x e 27.777x. As fotomicrografias eletrônicas foram feitas em filme Kodalite (Kodak) e ampliadas em papel fotográfico Kodak F3.

1.2.7 Conjugação

Foram realizadas conjugações, segundo o método de Turner *et al.* (1984), com algumas modificações, entre a linhagem produtora de bacteriocina e cada uma das três receptoras de *X. campestris* pv. *campestris*: Sm referência, Cm referência e 420 contendo o transposon Tn5 no genoma (Sm^r e Km^r), linhagens estas desprovidas de plasmídio (tabela 1). As conjugações foram realizadas com e sem o plasmídio "helper" pRK2073, utilizado para a mobilização do(s) plasmídio(s) da linhagem produtora de bacteriocina. As linhagens doadora e receptora foram cultivadas durante a noite a 28°C com agitação e amostras de 0,5ml de cada uma das culturas foram misturadas, centrifugadas a 12.000g por 1 minuto e depositadas sobre filtros de papel celofane esterilizados com cerca de 2cm de diâmetro na superfície de uma placa contendo meio NYG sólido. Após incubação de 24 horas, os filtros foram lavados em 3ml de salina 0,9%, sendo

as diluições realizadas a partir deste volume e plaqueadas em meio NYG sólido contendo os antibióticos apropriados. A seleção foi feita apenas contra a linhagem receptora parental, uma vez que não se conhecem marcadores para o(s) plasmídio(s) da linhagem selvagem produtora de bacteriocina. As colônias isoladas obtidas do plaqueamento em meios seletivos foram transferidas para placas mestras e testadas para a produção de bacteriocina em meio NYG sem antibiótico, como descrito no item 1.2.3.

1.2.8 Mutagênese da linhagem produtora

1.2.8.1 *Transposon*

Com a finalidade de se marcar o gene responsável pela produção de bacteriocina, para posterior localização deste gene e futuros experimentos de clonagem e complementação, foram realizadas conjugações entre a linhagem produtora e diferentes linhagens de *E. coli* (tabela 1) portadoras de transposon: WR6016 F⁺TS114lac::Tn5; DS250 (ColE1::Tn3); C600 (pRK2013::Tn10) e HB101 (pMR5::TnA). Os cruzamentos foram efetuados com dois diferentes mutantes espontâneos da linhagem produtora, resistentes a Sm e Sp, segundo o método de Turner et al. (1984) modificado. As culturas receptora e doadora, cultivadas em meio de cultura líquido NYG e LB respectivamente, foram centrifugadas por 2

minutos em um único tubo de microcentrífuga em duas proporções diferentes para cada cruzamento (1:1 e 2:1, receptora:doadora). Para o cruzamento da linhagem bacteriocinogênica com a linhagem portadora do transposon Tn3, utilizou-se o plasmídeo pRK2013 para mobilização do plasmídeo ColE1, uma vez que este não é conjugativo. As células das linhagens doadora e receptora foram lavadas em salina 0,9% e suspensas em cerca de 60ul desta. Este volume foi então depositado sobre filtros millipore esterilizados em placas contendo meio NYG sólido sem antibiótico. Estas foram incubadas durante a noite em estufa a 28°C. Os filtros foram lavados em salina 0,9%, como consta no item 1.2.7. Procedeu-se então à diluição das células em suspensão de cada cruzamento e plaqueamento em meio NYG sólido contendo os antibióticos necessários para a contra-seleção dos parentais.

1.2.8.2 Tratamento com NTG

A linhagem produtora foi tratada com o mutagênico químico N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (NTG) com o intuito de se obter um mutante *bac*⁻ (deficiente para a produção de bacteriocina), segundo a metodologia descrita por Adelberg *et al.* (1965) modificada. O tampão tris-maleico (TM) pH 7,2, foi adaptado para o tratamento de *Xanthomonas*, tendo na sua composição o meio mínimo MP1 (Sow & Demain, 1979) sem sais fosfato. A linhagem produtora Sm^r foi

cultivada durante a noite a 28°C com agitação constante e então distribuída para tratamento em diferentes tempos com NTG. Aliquotas de 1ml da cultura foram centrifugadas, lavadas em tampão TM uma vez e suspensas em 1ml deste mesmo tampão. A este volume, foram adicionados 5ml do tampão TM e NTG para uma concentração final de 100ug/ml. As células foram, a seguir, tratadas com o mutagênico à temperatura ambiente e sob agitação suave nos tempos: 0, 15, 30 e 45 minutos. Em seguida, 1ml do tampão contendo as células tratadas foi centrifugado, sendo o sobrenadante descartado. As células foram então lavadas uma vez em salina 0,9%, suspensas nesta, diluídas e plaqueadas em meio NYG sólido contendo Sm. Este procedimento foi repetido inúmeras vezes, sendo que todas as colônias isoladas obtidas dos plaqueamentos foram transferidas para placas mestras contendo meio NYG sólido e Sm, e posteriormente testadas para atividade inibitória contra a linhagem sensível em placas de NYG sólido sem antibiótico.

1.3 RESULTADOS

1.3.1 Identificação de linhagens produtoras de bacteriocina

Apenas a linhagem de *X. campestris* pv. *glycines* utilizada, 333, mostrou ser produtora frente às indicadoras testadas. Dentre as 20 linhagens testadas, 10 mostraram-se sensíveis à bacteriocina da linhagem 333 (tabela 2), sendo 8 delas isoladas de pimentão. As outras 10 linhagens que não exibiram sensibilidade à linhagem bacteriocinogênica foram: 310, 333, 408, 418, 420, 457, 460, 463, 466 e 479.

A linhagem 411 foi escolhida como indicadora a ser utilizada nos testes posteriores por ser mais sensível (figura 1).

Tabela 2 - Linhagens sensíveis à linhagem bacteriocinogênica 333 e tamanho dos halos de inibição (cm).

<i>Linhagem</i>	<i>Linhagens sensíveis</i>									
<i>produt.</i>	317	332	401	411	415	456	459	462	467	484
333	0.1	0.3	0.4	0.5	0.3	0.2	0.1	0.4	0.2	0.15



Figura 1 - Halo de inibição evidenciando a produção de bacteriocina pela linhagem 333 frente à indicadora 411.

1.3.2 Caracterização da linhagem produtora

1.3.2.1 Influência do meio de cultura e tempo de incubação na produção de bacteriocina

A tabela 3 mostra as medidas do halo de inibição da linhagem sensível 411, variando-se o tempo de incubação da linhagem produtora e o meio de cultivo desta.

Tabela 3 - Produção de bacteriocina pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* em diferentes tempos de incubação e meios de cultura. A medida do tamanho do halo é dada em cm como a média entre 6 valores

<i>Tempo (hs)</i>	24	48	72
<i>Meios de cultura</i>			
NYG	0,56	0,58	0,81
YM	0,48	0,36	0,73
523	0,40	0,36	0,46

A tabela 3 mostra que os halos de inibição apresentaram-se maiores no meio NYG. Cabe descrever que os halos formados ao redor da colônia produtora crescida nos

meios YM e 523 não apresentavam limite bem definido e eram opacos, ou seja, houve um ligeiro crescimento da linhagem sensível 411 dentro da zona de inibição (dados não mostrados). Tempos de incubação maiores que 24 horas não alteraram muito a produção da bacteriocina em meio sólido, o que foi evidenciado por aumentos muito pequenos nos tamanhos dos halos (tabela 3). Ainda, a visualização destes era dificultada nos meios YM e 523 com 48 e 72 horas de incubação, uma vez que o crescimento da linhagem sensível na zona de inibição era mais intenso e os limites ainda menos definidos. Até mesmo no meio NYG, após 72 horas de incubação, o limite do halo de inibição tornou-se mal definido. O meio NYG e o tempo de incubação de 24 horas foram então as condições utilizadas nos ensaios posteriores, por propiciarem melhor visualização dos resultados obtidos.

1.3.2.2 Espectro de ação biológica

A tabela 4 mostra a sensibilidade de vários patovares de *X. campestris* e de outras espécies, como *P. elodea*, *E. coli*, *B. thuringiensis*, *B. subtilis* e *R. leguminosarum*, à linhagem bacteriocinogênica 333.

Tabela 4- Sensibilidade de outros patovares de *X. campestris* e de outras espécies bacterianas à linhagem 333 produtora de bacteriocina.

<i>Indicadoras</i>	<i>Sensibilidade</i> à 333
<i>X. campestris</i> pv.	
<i>melonis</i> 68	-
<i>passiflorae</i> 148	+/-
<i>citri</i> 221	+
256	+/-
<i>curcubitae</i> 319	-
<i>pelargonii</i> 266	-
<i>cassavae</i> 270	-
272	+/-
<i>manihotis</i> 321	-
<i>glycines</i> 327	-
<i>phaseoli</i> 558	+/-
557	-
<i>carotae</i> 366	-
367	+/-
<i>cerealis</i> 548	+/-
<i>malvacearum</i> 559	+
<i>cordiae</i> 510	-
511	-
<i>viegasii</i> 575	-
576	+/-

<i>Indicadoras</i>	<i>Sensibilidade</i>	
	<i>A 333</i>	(cont.)
<i>fragariae</i> 89	+	
90	-	
<i>ricini</i> 313	-	
<i>undulosa</i> 578	-	
579	-	
<i>campestris</i> 472	+	
247	+	
<i>Pseudomonas elodea</i>	-	
<i>Escherichia coli</i> HB101	-	
JM101	-	
ED8767	-	
<i>B. thuringiensis</i> HD-1	-	
HD-73	-	
<i>B. subtilis</i> SB202	-	
<i>R. leguminosarum</i> CIAT899	+	

(-) insensível; (+/-) halo reduzido, <1mm; (+) sensível, com halo >1mm.

Os resultados observados na tabela 4 evidenciam um espectro de ação biológica restrito para a bacteriocina da linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines*, sendo apenas alguns outros patovares de *X. campestris* e a linhagem de *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* sensíveis à ação inibitória.

1.3.2.3 Secreção no meio de cultura

A formação de halo de inibição da linhagem 411 sensível frente ao sobrenadante da cultura da linhagem produtora 333, sugeriu a presença da bacteriocina no sobrenadante e, portanto, a secreção do produto no meio de cultura. Quando o sobrenadante foi testado contra 18 outros patovares de *X. campestris* (listados na tabela 4), este mostrou atividade apenas contra 4 patovares (dados não mostrados).

1.3.2.4 Curva de crescimento e titulação da produção

A figura 2 ilustra a produção de bacteriocina durante o crescimento em meio líquido NYG. O gráfico mostra que a atividade da bacteriocina presente no sobrenadante da cultura produtora acompanha inicialmente o crescimento da bactéria, mas atinge o seu máximo, ou seja, 3.200UA/ml, quando a densidade ótica da cultura está na fase descendente da curva.

Não foram observadas diferenças quanto à atividade da bacteriocina quando a linhagem foi crescida em meio líquido YM (dados não mostrados). O pH da cultura variou de cerca de 7,0 para o tempo zero de crescimento, até 7,83 (YM) e 8,62 (NYG) para o tempo 30 horas, mostrando a estabilidade da bacteriocina em pH alcalino.

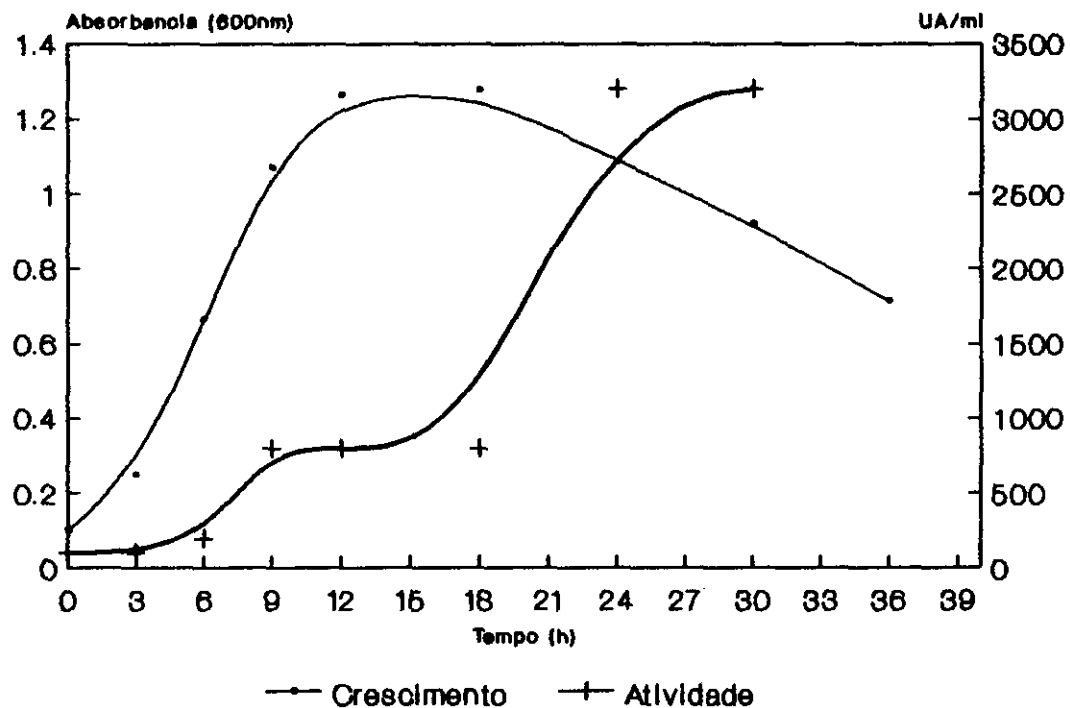


Figura 2 -Crescimento da bactéria e produção de bacteriocina pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* em meio NYG líquido. A: *absorbância*; UA: *unidades arbitrárias*.

1.3.2.5 Perfil plasmidial

A figura 3 ilustra o perfil plasmidial da linhagem 333 (canaleta 7), evidenciando a presença de 4 plasmídios nesta. A banda mais superior corresponde, provavelmente, a material degradado durante a purificação plasmidial. O peso molecular total dos plasmídios da linhagem 333 foi estimado em cerca de 24,62kb (kilobase) através da soma dos pesos moleculares dos fragmentos resultantes da digestão destes plasmídios com a enzima de restrição BamHI, calculados por comparação com a migração dos fragmentos do DNA do fago lambda digerido com HindIII. Entretanto, os dois plasmídios menores, de pesos moleculares de 1,752 e 1,165kb, também estimados por comparação com o padrão, parecem não apresentar sítios de restrição para nenhuma das enzimas utilizadas (2 a 5), com digestão parcial apenas com Sau3A (6).

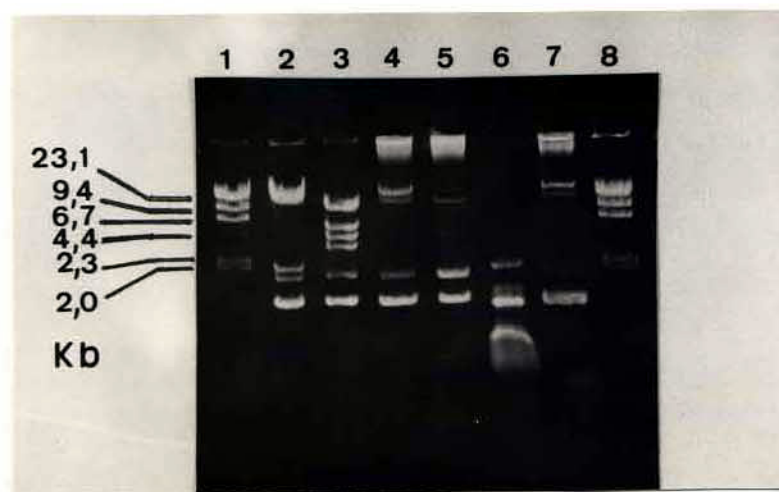


Figura 3 - Perfil de plasmídios da linhagem 333 e padrão de restrição. 1 e 8: DNA do fago λ digerido com HindIII, padrão de PM; 2 a 7: DNA plasmidial da linhagem 333 digerido com EcoRI, BamHI, HindIII, SalI, Sau3A, e intacto, respectivamente.

1.3.3 Purificação parcial da bacteriocina

A purificação e caracterização da bacteriocina foram efetuados com o sobrenadante do meio de cultura. Um dos primeiros passos foi a estimativa preliminar do peso molecular (PM), feita através da filtração em membrana AMICON PM10 e de membranas de diálise com peso molecular de exclusão ("cut off") de 12.000D. No primeiro caso, foi observado que a bacteriocina era retida na membrana, desde que não foi detectada atividade inibitória no filtrado, indicando um PM maior que 10.000D. No segundo caso, observou-se que a atividade inibitória era mantida no volume dializado, permitindo estimar o PM como superior a 12.000D.

O fracionamento preliminar do sobrenadante com sulfato de amônia indicou a saturação de 50 a 80% como a mais apropriada para precipitar o sobrenadante, pois a fração precipitada com esta saturação do sal exibiu maior atividade inibitória contra a linhagem sensível 411.

O gráfico construído a partir da absorbância a 280nm das frações resultantes da cromatografia em coluna de Sepharose 4B, evidenciou baixa concentração de proteínas, mesmo nos picos de absorbância entre as frações de número 41 até 92 (figura 4). A atividade biológica foi então testada para as frações, sendo que aquelas de número 60 até 100 exibiram atividade inibitória contra a linhagem sensível 411

(figura 4). A recromatografia em Sepharose 4B, evidenciou um único pico de absorvância ao redor da fração de número 80 e atividade para as frações de número 69, quando a A ainda era zero, até a de número 84, quando a A era 0,146 (figura 5).

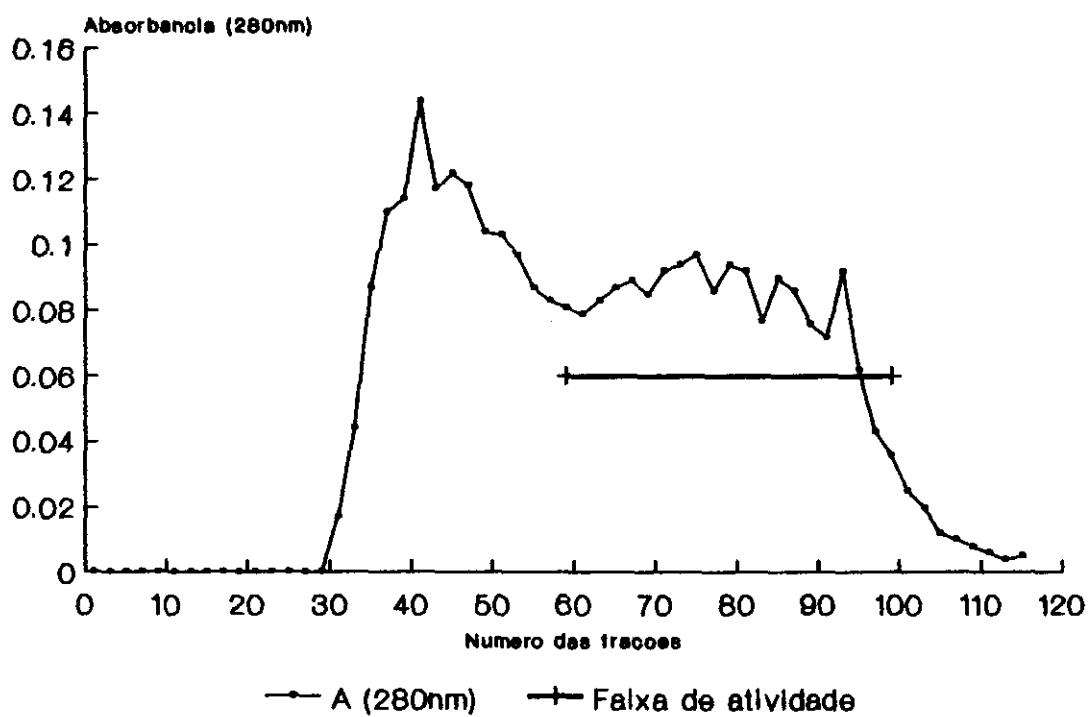


Figura 4 - Absorbância (280nm) e atividade de bacteriocina das frações resultantes da cromatografia em coluna de Sepharose 4B.

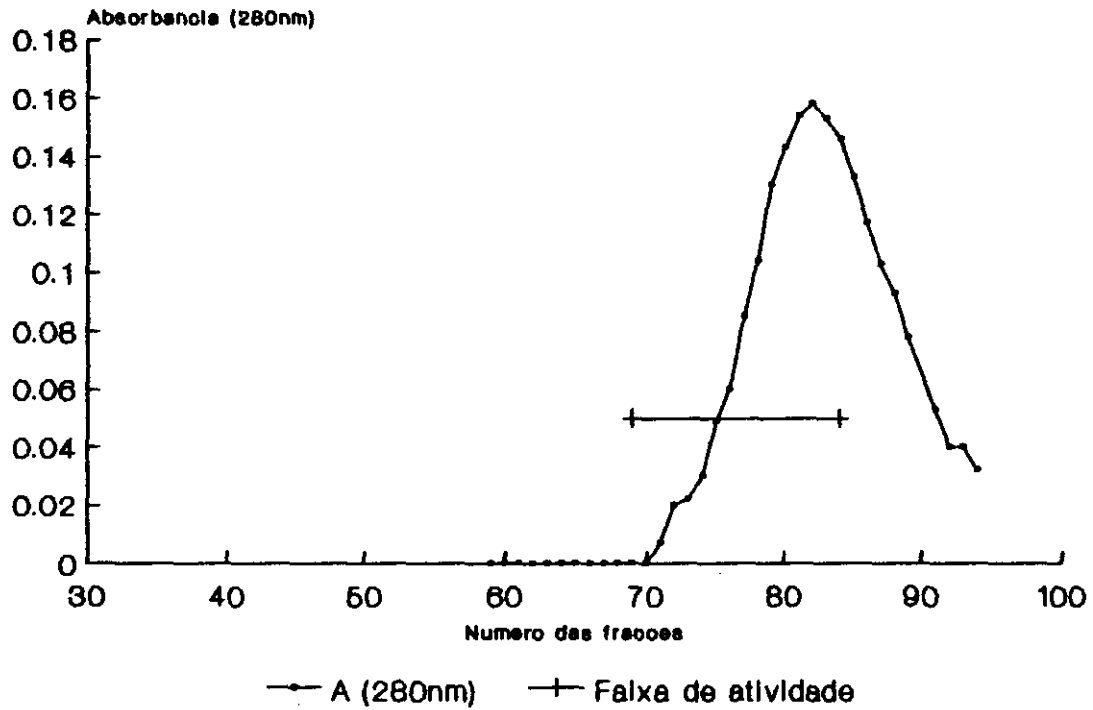


Figura 5 - Absorbância (280nm) e atividade de bacteriocina das frações resultantes da recromatografia em coluna de Sepharose 4B.

1.3.4 Caracterização da bacteriocina

1.3.4.1 Atividade fágica

Desde que fagos podem produzir placas de lise e formar zonas de inibição semelhantes àsquelas produzidas por bacteriocinas, foi realizado um teste a fim de se averiguar a atividade fágica. O que se verificou foi a não formação de placas de lise na camada de células sensíveis, indicando que a bacteriocina da linhagem 333 não é capaz de se reproduzir nas células sensíveis.

1.3.4.2 Sensibilidade enzimática

A tabela 5 mostra os resultados obtidos com os tratamentos das amostras de bacteriocina "bruta" e parcialmente purificada, utilizando as enzimas protease, tripsina, RNase e DNase com tempos de incubação de 90 minutos e 16 horas.

Tabela 5 - Atividade das amostras de bacteriocina após os tratamentos com as enzimas protease, tripsina, RNase e DNase com 90 minutos e 16 horas de incubação a 37°C.

<i>Tratamentos</i>	<i>Protease</i>		<i>Tripsina</i>		<i>RNase</i>		<i>DNase</i>	
	90min	16hs	90min	16hs	90min	16hs	90min	16hs
<i>"bruta"</i>	+	-	+	+	+	+	+	+
<i>parcialmente purificada</i>	+	-	+	+	+	+	+	+/-

Os tratamentos com as enzimas realizados com 90 minutos de incubação não eliminaram a atividade biológica das amostras de bacteriocina "bruta" ou parcialmente purificada (tabela 5), que apresentaram halos de inibição similares aos das amostras não tratadas. Entretanto, os tratamentos com protease cuja incubação foi de 16 horas eliminaram a atividade biológica tanto da amostra de bacteriocina "bruta" como da parcialmente purificada. Ainda, a amostra de bacteriocina purificada quando tratada com DNase por 16 horas, teve sua atividade biológica reduzida.

1.3.4.3 Termosensibilidade

Os tratamentos nas temperaturas de 37°C e 42°C não tiveram qualquer efeito sobre a atividade biológica da bacteriocina. Entretanto, a incubação das amostras de bacteriocina "bruta" a 65°C (30 min.), 80°C (30 min.) e 100°C (15 min.), eliminaram a atividade inibitória desta sobre a linhagem sensível 411.

1.3.4.4 Capacidade antigênica

Ambos os testes de titulação do antissoro preparado de coelho, contra a bacteriocina da linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines*, o teste de dupla difusão em ágar e o teste de neutralização da atividade bacteriocinogênica, exibiram o título de 1:1, tanto na reação com o antígeno parcialmente purificado como com o não purificado. A imunização através de inoculação sub-cutânea não resultou no aumento do título.

1.3.4.5 Efeito na célula sensível

Como foi descrito em Materiais e Métodos (item 1.2.6.6), o experimento com 90 minutos de incubação da linhagem 411 com a bacteriocina, evidenciou um efeito

bactericida desta sobre a célula sensível, uma vez que 76% das células falharam em formar colônias, quando comparadas com o tratamento controle sem bacteriocina.

Ainda, o halo de inibição translúcido visualizado em meio NYG sólido confirma a ação bactericida da bacteriocina sobre a linhagem 411.

As células tratadas e não tratadas da linhagem 411 foram examinadas ao ME para se verificar possíveis alterações citológicas causadas pela bacteriocina da linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines*. Após 90 minutos de tratamento com a bacteriocina, as células sensíveis pareciam estar mais agrupadas quando comparadas com as células dos tratamentos controle, com uma grande quantidade de depósito acumulado ao redor das células e grumos escuros no seu interior (figuras 6 e 7). Entretanto não se observou lise das células sensíveis, mesmo após 180 minutos de incubação.

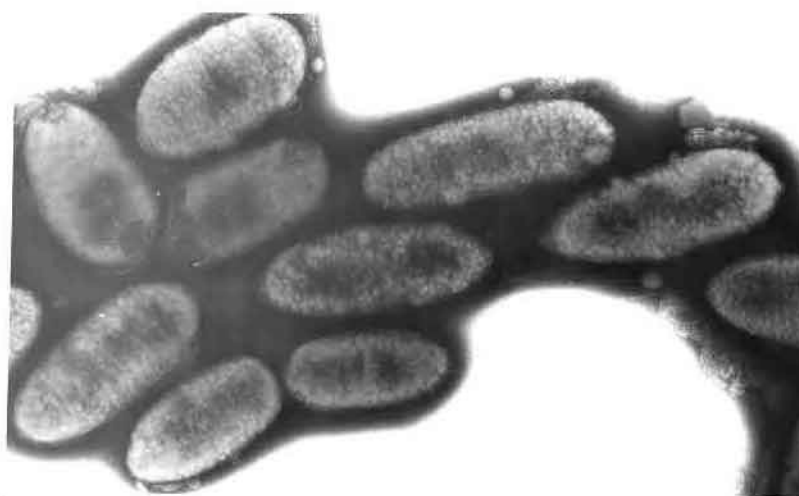
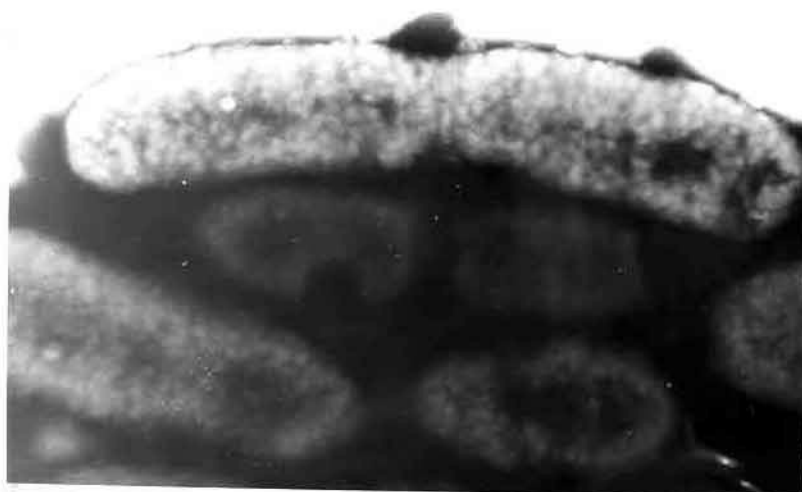
A**B**

Figura 6 - Micrografias eletrônicas de células sensíveis tratadas com a bacteriocina "bruta". A e B: células tratadas após 90 min (aumentos 43.516x e 125.997x, respectivamente).

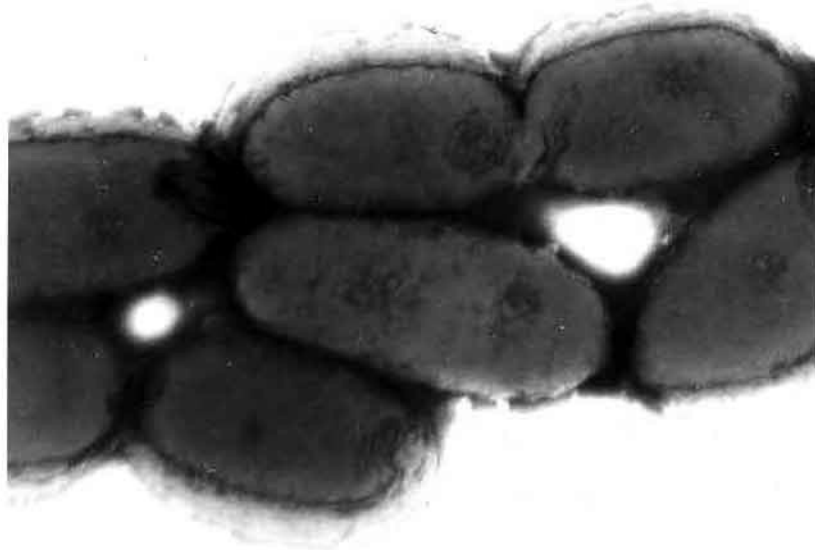
A**B**

Figura 7 - Micrografias eletrônicas de células sensíveis não tratadas. **A:** células não tratadas após 90 min. (aumento 41.624x). **B:** células não tratadas após 180 min. (aumento 122.219x).

1.3.5 Conjugação

Foram isoladas 580 colônias dos cruzamentos da linhagem 333 com a receptora Sm referência, 2.170 dos cruzamentos com a linhagem Cm referência e 800 colônias do cruzamento com a linhagem 420 (Km^r/Sm^r), as quais foram testadas para a produção de bacteriocina. Não foi detectado sequer um transconjugante positivo para o caráter bacteriocinogênico em qualquer dos cruzamentos. A utilização do plasmídeo pRK2073 para mobilização dos plasmídios nativos da linhagem 333 não alterou os resultados.

1.3.6 Mutagênese da linhagem produtora

1.3.6.1 *Transposon*

A conjugação da linhagem produtora com a linhagem de *E. coli* portadora do transposon Tn5 foi realizada entre 8 a 10 vezes, em experimentos independentes, sendo que o crescimento nas placas de seleção consistia de colônias muito pequenas visualizadas após 4 dias de incubação, e que não se desenvolviam quando transferidas para placas mestras contendo os antibióticos Sm e Km, ou Sp e Km, dependendo da linhagem 333 mutante utilizada. Também não se obtiveram transconjugantes mediante as conjugações

realizadas com as outras 3 linhagens de *E. coli* portadoras dos transposons TnA, Tn3 e Tn10.

1.3.6.2 Tratamento com NTG

Um total de 4.000 colônias foi isolado dos tratamentos com o mutagênico químico NTG, as quais, após transferência para placas mestras, foram testadas quanto à capacidade de produzir bacteriocina. Nenhum mutante *bac⁻* foi detectado.

1.4 DISCUSSAO

1.4.1 Detecção e caracterização biológica da linhagem produtora de bacteriocina

A intenção inicial deste trabalho era detectar linhagens produtoras de bacteriocina dentro do patovar *vesicatoria*, considerando sua importância futura na solução dos problemas relacionados a doenças nas plantações comerciais de tomate. Assim, todas as linhagens do pv. *vesicatoria* obtidas do Instituto Biológico foram testadas entre si para a produção de bacteriocinas. Verificou-se, então, que apenas a linhagem 333, tida a princípio como sendo também do pv. *vesicatoria*, produzia bacteriocina capaz de inibir outras linhagens deste patovar. Entretanto, descobriu-se posteriormente que a linhagem 333 pertencia ao pv. *glycines*. Desde que o objetivo inicial do trabalho havia sido alcançado, ou seja, detectar uma ação inibitória contra linhagens do pv. *vesicatoria*, procedeu-se à caracterização da linhagem bacteriocinogênica 333. A produção de bacteriocinas inibitórias contra isolados de um outro patovar não é incomum, e mesmo em *Xanthomonas campestris* há registros similares (Fett *et al.*, 1987).

A linhagem 333 mostrou ser imune à própria bacteriocina. Isto tem sido comumente observado para

bactérias produtoras de bacteriocina, que possuem, juntamente com o gene estrutural para a bacteriocina, o gene que confere imunidade a esta através de um mecanismo específico (Tagg *et al.*, 1976; Konisky, 1982; Ryder *et al.*, 1987; Ghera *et al.*, 1988; James, 1988; Ray *et al.*, 1989; Belkum *et al.*, 1991; Mortvedt & Nes, 1990).

A composição do meio afetou tanto o tamanho (tabela 3) como a transparência das zonas de inibição, indicando o meio NYG como o mais apropriado dentre os testados. Considerando que o glicerol é o único componente do meio NYG que não está presente no meio YM, podemos sugerir que este composto tenha algum efeito positivo na produção de bacteriocina pela linhagem 333, sendo utilizado, direta ou indiretamente, na sua via biossintética, ou, ainda, estabilizando melhor as moléculas de bacteriocina liberadas para o meio. Axelrood *et al.* (1988) também sugeriram o envolvimento do glicerol na biossíntese de um antibiótico por linhagens de *E. carotovora* subsp. *betavasculorum*, quando verificou que a adição de glicerol ao meio sólido aumentava a produção desse antibiótico. Diferenças na produção de bacteriocinas em função do meio de cultura utilizado já foram registradas por vários pesquisadores para diferentes bactérias (Schwingamer, 1975; Gross & Vidaver, 1979; Biagi, 1982; Biswas *et al.*, 1991). Por outro lado, tempos de incubação da linhagem produtora maiores que 24 horas não tiveram efeito acentuado sobre a produção em meio sólido (tabela 3).

A bacteriocina da linhagem 333 exibiu um espectro inibitório restrito (tabela 4). Esta característica é utilizada por muitos investigadores como um dos critérios para classificar substâncias inibitórias como bacteriocinas (Vidaver, 1983). Entretanto, apesar da atividade intraespecífica de bacteriocinas ser uma característica comum para muitas espécies bacterianas, entre as bactérias Gram-positivas o antagonismo é geralmente interespecífico (Reeves, 1965; Fleming *et al.*, 1975; Tagg *et al.*, 1976; Gross & Vidaver, 1978; Parrot *et al.*, 1990; Tzannetis *et al.*, 1991), tendo sido observado também para algumas bactérias Gram-negativas, como *Rhizobium* (Gross & Vidaver, 1978), *Erwinia* (Echandi & Moyer, 1979), *Pseudomonas*, *E. coli*, *Serratia*, entre outras (Reeves, 1965). O mesmo agente poderia atuar nestas bactérias não relacionadas, mas por diferentes mecanismos. Alternativamente, um mesmo componente estrutural poderia ser sensível, ou mais de um agente inibitório poderia estar envolvido.

O sobrenadante da cultura 333 exibiu atividade inibitória contra a linhagem sensível 411. Cerca de 78% dos outros patovares testados não se mostraram sensíveis ao sobrenadante, evidenciando que a inibição verificada para a linhagem 411 era devida à presença da bacteriocina e não de um outro composto inibitório inespecífico que pudesse estar

presente no sobrenadante da cultura produtora, resultante do metabolismo desta.

A presença da bacteriocina no sobrenadante da cultura em fase exponencial tardia, sem a necessidade de indução e lise das células, pode sugerir que esta seja liberada naturalmente no meio através de um mecanismo específico, como ocorre com a cloacina DF13 (De Graaf & Oudega, 1986).

O gráfico da figura 2 mostra que, embora a bacteriocina já esteja sendo produzida na fase inicial do crescimento da bactéria, o nível máximo de atividade detectado no meio de cultura ocorre quando a densidade ótica desta está decrescendo. Isto pode, possivelmente, ser devido ao fato das células estarem em processo de degradação celular e lise, liberando portanto mais bacteriocina no meio de cultura. Alternativamente, estes dados poderiam indicar que a bacteriocina resulta do metabolismo secundário da linhagem 333. Davey e Richardson (1981) encontraram resultados semelhantes para diplococcina, cujo título alcançou seu máximo quando as células entraram na fase estacionária. Estes resultados contrastam com aqueles obtidos, por exemplo, por Favret e Yousten (1989), que verificaram que o título da bacteriocina produzida por *B. thuringiensis* HD-2 em meio líquido começa a decair a partir de 18 horas de incubação, quando a bactéria se encontra ainda na fase de crescimento exponencial tardia. Estes

resultados também foram obtidos por Schwinghamer (1975) para bacteriocinas produzidas por *Rhizobium trifolii*.

1.4.2 Caracterização parcial da bacteriocina

Os passos iniciais do processo de purificação da bacteriocina evidenciaram um PM para esta superior a 12.000D. Por outro lado, a necessidade de elevada concentração de sulfato de amônia para precipitar a bacteriocina sugere um baixo peso molecular para o composto.

A absorbância a 280nm e a atividade de bacteriocina das frações resultantes recromatografia em coluna de Sepharose 4B (figura 5), ilustram uma faixa de atividade para as frações ligeiramente deslocada do pico de absorção a 280nm. Uma observação realizada quanto às amostras de bacteriocina parcialmente purificada, foi a de que estas apresentavam igual atividade, 3.200UA/ml, à do sobrenadante "bruto" da cultura (dados não mostrados). Provavelmente, parte da atividade biológica do sobrenadante estava se perdendo durante as passagens pela coluna de Sepharose, e a utilização de colunas DEAE e/ou Sephadex talvez fosse apropriada, como realizado por outros investigadores para purificação de bacteriocinas (Herschman & Helinski, 1967; Joerger & Klaenhammer, 1986; Higa *et al.*, 1991).

A natureza proteica da bacteriocina da linhagem 333 é sugerida, uma vez que a incubação de amostras "brutas" ou parcialmente purificadas por 16 horas com protease eliminou a atividade biológica destas. Entretanto, a necessidade de um longo tempo de incubação para que a bacteriocina seja degradada ou inativada, pode indicar a sua complexação a alguma outra molécula que dificulta a ação da protease. Esta hipótese é reforçada pela observação de que a faixa de atividade biológica das frações resultantes da cromatografia está um pouco deslocada do pico de absorção a 280nm (figura 5), comprimento de onda absorvido por proteínas. A associação de um componente proteico com outras moléculas como carboidrato, lipídio ou DNA já foi verificada para várias bacteriocinas como a plantacina B (West & Warner, 1988), lactocina 27 (Upreti & Hinsdill, 1975), colicina A (Barry *et al.*, 1965), dentre outras. A redução da atividade biológica da amostra de bacteriocina purificada quando tratada com DNase por 16 horas poderia ser explicada pela presença de proteases contaminantes que, embora em concentrações ínfimas, durante um tempo de incubação prolongado poderiam degradar algumas moléculas de bacteriocina. Entretanto, não se pode descartar definitivamente a possibilidade da inativação parcial com DNase se dever à presença de fragmentos de DNA da bacteriocina digerida ainda com atividade inibitória. A natureza proteica de bacteriocinas de *X. campestris* também foi verificada por Fett *et al.* (1987) para linhagens do pv.

glycines. Estes autores verificaram que uma das bacteriocinas produzidas por duas linhagens de *X. campestris* pv. *glycines* era sensível a DNase. Bacteriocinas produzidas por *Rhizobium trifolii* também foram identificadas como contendo DNA em sua composição (Schwinghamer *et al.*, 1973; Schwinghamer, 1975).

A incubação de amostras de bacteriocina "bruta" em diferentes temperaturas evidenciou que a bacteriocina da linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* é termolábil, desde que os tratamentos a 65°C, 80°C e 100°C eliminaram a atividade inibitória desta sobre a linhagem sensível 411. Fett *et al.* (1987) também detectaram inativação biológica de bacteriocinas produzidas por algumas linhagens de *X. campestris* pv. *glycines* a 75°C por 30 minutos. A eliminação da atividade inibitória de bacteriocinas nesta mesma faixa de temperatura foi verificada também para linhagens de *Pseudomonas* fitopatogênicas (Vidaver *et al.*, 1972), de *R. trifolii* (Schwinghamer *et al.*, 1973; Schwinghamer, 1975), de *P. thoenii* (Lyon & Glatz, 1991) e de *B. megaterium* (Ivanovics, 1962).

Foi observado que a estabilidade de amostras de bacteriocina "bruta" da linhagem 333 a 4°C é de pelo menos 2 meses (dados não mostrados). Esta estabilidade pode ser devida à presença de determinados compostos no meio de cultura que protegem as moléculas de bacteriocina. Davey e

Richardson (1981) encontraram que a diplococcina purificada ou parcialmente purificada de *S. cremoris* era estável a -75°C por até 3 meses, e a 4°C e temperatura ambiente, por uma semana e 4 horas respectivamente. Entretanto, obtiveram proteção total da substância através da adição de meio de cultura completo às amostras puras.

O experimento para atividade fágica sugeriu fortemente que a inibição da linhagem sensível 411 não se deve a bacteriófagos, uma vez que não se detectou atividade de reprodução nas células sensíveis. Schwingamer *et al.* (1972), através de um experimento semelhante, identificaram o agente responsável pela inibição das células sensíveis como bacteriocina baseado primariamente na ausência desta função reprodutiva. Ainda, a diluição de amostras da substância inibitória produzida pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* até a extinção de sua atividade, resultou em zonas de inibição reduzidas mas sem o aparecimento de placas de lise. Esta mesma observação levou os pesquisadores Davey e Richardson (1981) e Favret e Yousten (1989) a excluírem a atividade fágica como sendo o agente responsável pela inibição de células sensíveis de *S. cremoris* e *B. thuringiensis*, respectivamente.

A imunização de coelhos com a bacteriocina parcialmente purificada resultou em títulos baixos do antissoro contra este antígeno (1:1). Isto pode sugerir uma

baixa capacidade da bacteriocina de induzir resposta imune. Além disso, a concentração da bacteriocina nas amostras era bastante baixa, como ilustram os gráficos de absorção a 280nm das frações resultantes da cromatografia em coluna de Sepharose 4B, mesmo após a concentração destas com sulfato de amônia. Já Ivanovics (1962) relata um título crescente do anticorpo para a megacina da linhagem 216 de *B. megaterium* durante o curso da imunização, e uma neutralização da ação bactericida por um soro de título elevado.

A contagem do número de células da linhagem sensível após incubação desta com o sobrenadante esterilizado da cultura produtora de bacteriocina, evidenciou a ação bactericida desta substância sobre a célula sensível. Considerando que estes resultados foram obtidos após 90 minutos de incubação e que não se observou lise celular ao microscópio eletrônico, mesmo após 180 minutos de tratamento das células sensíveis com bacteriocina (figura 6), podemos supor que esta tenha inicialmente um efeito bactericida, tornando a célula sensível inviável. Entretanto, o efeito bacteriolítico a longo prazo da bacteriocina é nítido quando se observa o halo de inibição translúcido da linhagem sensível ao redor da colônia produtora. Ainda, a densidade ótica da cultura da linhagem sensível 411 após 30 horas de crescimento na presença de bacteriocina, é bem inferior àquela encontrada para a cultura desta linhagem crescida na ausência da bacteriocina (resultados ilustrados no capítulo

2). A visualização ao ME de células tratadas com bacteriocina por um tempo maior que 180 minutos, possivelmente evidenciaria a lise destas. Resultados similares foram encontrados para a lactacina B por Barefoot e Klaenhammer (1983), que demonstraram a ação bactericida desta, com redução da viabilidade da população de células sensíveis de 87% em 30 minutos de tratamento, mas sem efeito bacteriolítico, uma vez que as densidades óticas permaneceram estáveis durante o experimento. Também Lyon e Glatz (1991) verificaram o efeito bactericida da propionicina PLG-1 sobre as células sensíveis sem a detecção de lise celular. Favret e Yousten (1989), por outro lado, observaram ao ME a lise das células sensíveis à turicina após 210 minutos de tratamento, sendo precedida por alterações citológicas como a formação de septos e o enrugamento da superfície celular.

1.4.3 Genética da produção da bacteriocina

Infelizmente, não se obteve sequer um transconjugante positivo para a produção de bacteriocina dos cruzamentos realizados entre a linhagem produtora 333 e as linhagens de *X. campestris* pv. *campestris* Cm referência, Sm referência e 420, utilizadas como receptoras em cruzamentos independentes. Nem mesmo a utilização do plasmídeo mobilizador pRK2073 alterou os resultados obtidos. Dessa

forma, não foi possível correlacionar, através dos experimentos de conjugação, qualquer dos 4 plasmídios presentes na linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* (figura 3, canaleta 7) com a capacidade de produzir bacteriocina nesta linhagem. Uma das explicações para os resultados encontrados seria o fato do gene que codifica para a produção de bacteriocina não se encontrar em plasmídio, mas sim no cromossomo da bactéria. A codificação da produção da bacteriocinas por genes cromossomais foi sugerida para linhagens de *X. campestris* pv. *glycines* por Fett *et al.* (1987). Entretanto, para a linhagem 223 de *X. c.* pv. *citri*, são os genes plasmidiais os responsáveis pela produção da bacteriocina (Rosato & Daniels, comunicação pessoal). A presença dos genes para produção de bacteriocina pela linhagem 333 em um plasmídio não conjugativo seria outra possível explicação para os resultados obtidos, ou ainda, a conjugação ocorreria, mas numa frequência não detectada com a amostragem realizada. Sistemas de restrição incompatíveis seria outra possibilidade para a não obtenção de transconjugantes, ou ainda, a própria bacteriocina inibiria o crescimento das células receptoras sensíveis durante o cruzamento. Esta sensibilidade à bacteriocina da linhagem 333 foi verificada posteriormente apenas para a linhagem 420 usada como receptora. Ray *et al.* (1989), ao realizarem cruzamentos entre linhagens produtoras de bacteriocina e sensíveis a esta, utilizaram condições nas quais a produção de bacteriocina era impedida.

A utilização de transposons para a mutagênese da linhagem produtora também não obteve êxito, e, portanto, não foi possível determinar se o gene para a produção de bacteriocina está localizado no cromossomo ou em algum dos plasmídios presentes na linhagem 333.

Foram utilizados os transposons Tn3, Tn10, TnA e Tn5, inseridos respectivamente nos plasmídios ColE1, pRK2013, pMR5 e F[']ts lac. A não obtenção de transconjugantes mediante as conjugações realizadas com as diferentes linhagens de *E. coli* portadoras de transposon, pode indicar que a transposição de qualquer dos transposons não ocorreu em frequência detectável. Ainda, existe a possibilidade de degradação dos vetores pelo sistema de restrição da célula receptora de *Xanthomonas*, a qual teria que ocorrer antes do evento de transposição do transposon para o DNA de *X. campestris* pv. *glycines*; ou mesmo, a existência de um mecanismo de exclusão de superfície, que impediria a entrada de DNA estranho na célula receptora. Turner *et al.* (1984) também não obtiveram transconjugantes Km^r em cruzamentos triparentais entre vetores com Tn5 e *X. campestris* pv. *campestris*, utilizando plasmídios mobilizadores. Resultados similares foram encontrados por De Feyter *et al.* (1990) para *X. campestris* pv. *malvacearum*, utilizando pLAFR3::Tn5 como vetor. A mesma linhagem de *E. coli* contendo o Tn5 utilizada neste estudo foi empregada com êxito por Lanza (1991) para

obtenção de mutantes de viscosidade da goma xantana em *X. campestris* pv. *campestris*, o que indica que o Tn5 é capaz de se transpor em *X. campestris*, e que esta expressa o fenótipo Km^r.

Os tratamentos com o mutagênico químico NTG visaram a obtenção de um mutante *bac*⁻ para sua utilização em experimentos de clonagem e complementação posteriores. Entretanto, nenhum mutante *bac*⁻ foi detectado num total de 4.000 colônias testadas, isoladas de tratamentos independentes. Estes resultados indicam a não ocorrência de mutação do gene *bac* em frequência detectável. Considerando o elevado número de colônias testadas, poderíamos supor que uma mutação no gene que codifica para a produção de bacteriocina, ou nas suas regiões reguladoras, fosse letal para a célula, não sendo possível a detecção do fenótipo *bac*⁻. Uma outra possibilidade a ser considerada seria o fato de pelo menos dois genes estarem envolvidos na síntese de bacteriocina, de maneira que o fenótipo *bac*⁻ resultasse de mutação em mais de um deles, evento que ocorreria numa frequência mais baixa. Poderíamos considerar ainda a possibilidade do gene para produção de bacteriocina estar localizado em um dos plasmídios e este possuir alto número de cópias, o que seria plausível desde que os plasmídios presentes na linhagem 333 são de baixo PM. Assim, mesmo que ocorresse mutação no gene *bac* em uma das cópias de um dos

plasmídios, as outras cópias apresentariam o gene selvagem e codificariam para a produção.

Capítulo 2

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA LINHAGEM BACTERIOCINOGENICA PARA PROTEÇÃO DE PLANTAS DE TOMATE

2.1 REVISAO BIBLIOGRAFICA

2.1.1 Introdução ao controle biológico

Embora o controle biológico de patógenos de plantas ocorra naturalmente, e é a principal razão das doenças não serem geralmente catastróficas, na maioria dos casos não há conhecimento suficiente para explicar como este controle ocorre na natureza, ou como os vários fatores bióticos e abióticos podem ser manipulados para se efetuar o controle econômico de um patógeno (Schroth & Hancock, 1981; Vidaver, 1983).

Uma revisão feita por Moore e Warren (1979) relata estudos que reforçam a idéia da existência de defesas naturais contra os patógenos, como o aumento da incidência

da galha após a fumigação do solo, sugerindo a erradicação dos inimigos naturais de *A. tumefaciens*; também a redução da incidência da galha em plântulas de cereja usando fungos não identificados isolados de raízes de cerejeira; ou a produção *in vitro* de potentes antibióticos contra espécies de *Agrobacterium* por espécies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Trichoderma* e *Bacillus*, isoladas de raízes de plantas.

A imensa dificuldade em isolar, delinear e entender os vários fatores que influenciam as atividades microbianas ao redor dos sistemas radiculares e nas superfícies das plantas, tem impedido o desenvolvimento de práticas de controle biológico com finalidade comercial. Entretanto, esta geral falta de êxito não tem diminuído o interesse dos pesquisadores, que vêem nesta área uma alternativa para o alto custo do desenvolvimento de agentes químicos para o controle de patógenos, e para a falta de resistência de plantações a muitas doenças. Scroth e Hancock (1981) chamam a atenção para a complexidade das interações entre o patógeno e o agente de controle, apontando a influência e regulação do comportamento do patógeno por microrganismos associados e fatores abióticos, como os sais do solo, umidade, gases, temperatura e pH, que variam de local para local. Ainda, o metabolismo da raiz, absorção e exudatos influenciariam todos estes fatores (Moore & Warren 1979).

A bactéria patogênica pode interagir com o agente de controle de diferentes maneiras: parasitismo, no caso de bacteriófagos; antibiose, definida como uma interação entre organismos onde uma substância produzida por um organismo tem um efeito prejudicial sobre o outro, e que incluiria substâncias como bacteriocinas, antibióticos e outros compostos inespecíficos; e competição, interação entre dois organismos na disputa por fatores como espaço, nutrientes, etc. Schroth e Hancock (1981) incluem as bacteriocinas, juntamente com os bacteriófagos, na classe dos parasitas. Entretanto, estes mecanismos podem estar interligados, sendo que as substâncias inibitórias podem determinar qual microrganismo ganha ascendência quando compete com outros por um nicho ecológico específico.

A indução de proteção contra infecção bacteriana em plantas tem sido demonstrada por vários pesquisadores. Lovrekovich e Farkas (1965) protegeram folhas de tabaco da queima através do tratamento destas com *Pseudomonas tabaci* mortas pelo calor. Wrather *et al.* (1973) e McIntyre *et al.* (1973) obtiveram proteção contra a queima de pera e maçã através da utilização de bactérias não patogênicas e sonicados bacterianos, de bactérias virulentas e avirulentas, e sugeriram a indução de resistência na planta, via produção de uma substância inibitória do tipo fitoalexina, como responsável pelos resultados encontrados.

2.1.2 As bacteriocinas e o controle biológico

O controle biológico da galha da coroa causada por *Agrobacterium tumefaciens* é o exemplo que se destaca de um antagonista que controlou efetivamente e economicamente uma importante doença de plantas. Este controle foi inicialmente sugerido por New e Kerr (1972), que obtiveram 100% de controle mergulhando as raízes de plântulas de pêssego em uma suspensão de células de *A. radiobacter* 84, antes de plantá-las em solo infestado com um isolado do patógeno *A. tumefaciens*. Pouco depois, Kerr (1972) tratou sementes de pêssego com a linhagem 84 de *A. radiobacter* antes de plantá-las em solo contendo o patógeno. Três meses mais tarde, 31% das plantas de sementes inoculadas com a linhagem 84 exibiam galhas, comparado com 79% para o tratamento não inoculado. Avaliando os resultados obtidos com inoculações de sementes e/ou raízes com a linhagem 84, Htay e Kerr (1974) sugeriram ambos os métodos de inoculação para obtenção de maior proteção nas plantações comerciais contra a galha da coroa. O controle nestes casos foi obtido através da inoculação prévia com a linhagem não patogênica. Se as plantas fossem inoculadas com o patógeno e o agente de controle simultaneamente, a maioria dos sintomas da doença era prevenida. O controle decrescia quando o patógeno era inoculado primeiro; por exemplo, se a linhagem 84 fosse adicionada às feridas 2 horas após a inoculação com o

patógeno, ocorria formação de galhas nas plântulas de tomate. As galhas aumentavam em tamanho à medida que a aplicação da linhagem 84 era retardada, e as galhas não eram detectadas quando a linhagem 84 era adicionada primeiro (Htay & Kerr, 1974).

O efeito inibitório da linhagem K-84 contra linhagens patogênicas de *Agrobacterium* foi atribuído à produção da bacteriocina agrocina 84 (Kerr & Htay, 1974; Kerr, 1980). Presumivelmente, apenas aquelas linhagens sensíveis à bacteriocina eram inibidas em campo. Verificou-se, posteriormente, que esta substância é um análogo do nucleotídeo adenina com duas substituições e várias características únicas (Roberts *et al.*, 1977).

A eficácia da linhagem K-84 no controle da galha tem sido confirmada através de experimentos de campo em vários países, como Canadá, França, Grécia, Hungria, Itália, Nova Zelândia, África do Sul e Estados Unidos, sendo já vendida comercialmente nestes três últimos países (Kerr, 1980). Quando os experimentos sob condições de campo utilizaram solos infestados naturalmente, o nível de controle foi 100% ou quase isso (Dhanvantari, 1976; Moore, 1977).

O potencial para proteção de doenças em plantas contra infecções bacterianas através de substâncias inibitórias tem sido avaliado para outras bactérias além da linhagem K-84 de

A. radiobacter. Smidt e Vidaver (1982) demonstraram a produção de siringacina W-1 em tecidos de feijão evidenciando a inibição do crescimento de uma linhagem sensível pela linhagem bacteriocinogênica Ps W-1 de *Pseudomonas syringae*. Entretanto, a concentração da linhagem produtora tinha que ser cerca de 100 vezes maior que a da linhagem sensível. Além disso, os autores recuperaram a atividade de siringacina W-1 dos tecidos infectados da planta, assim como partículas da substância posteriormente visualizadas ao microscópio eletrônico.

Axelrood *et al.* (1988) observaram uma completa correlação entre a produção de antibiótico por *Erwinia carotovora* subsp. *betavasculorum* *in vitro* e a inibição de linhagens competidoras de *E. carotovora* subsp. *carotovora* em tecidos de batata. Os investigadores verificaram que linhagens de *E. carotovora* subsp. *carotovora* resistentes ao antibiótico não eram inibidas na planta ou *in vitro*, e que mutantes isogênicos de *E. carotovora* subsp. *betavasculorum* negativos para a produção do antibiótico não inibiam as linhagens sensíveis nas infecções do tubérculo.

A habilidade da linhagem BC8 de *Pseudomonas fluorescens* de proteger plântulas de batata contra a murcha bacteriana induzida por *P. solanacearum*, foi investigada por Bustamante e Ciampi (1989). Estes obtiveram uma redução de 90% da manifestação da murcha bacteriana e sugeriram a

produção da bacteriocina fluocina BC8 como provável mecanismo responsável pela proteção, já que em estudos *in vitro* foi demonstrado que esta bacteriocina inibe o crescimento de *P. solanacearum* (Bustamante *et al.*, 1989).

2.1.3 Dificuldades relacionadas ao controle biológico

Embora o controle biológico da galha da coroa seja amplamente praticado, têm havido registros de que o controle satisfatório não é sempre obtido (Vidaver, 1976; Moore & Warren, 1979; Kerr, 1980; Schroth & Hancock, 1981). Várias podem ser as razões para o insucesso no controle biológico. Algumas linhagens de *A. tumefaciens* são resistentes a agrocina 84 e não podem ser controladas pela linhagem K-84 em níveis de aplicação padrão, o que explica porque a galha em plantas como parreira, macieira e alguns outros hospedeiros não é passível de controle (Kerr *et al.*, 1990). Alconero (1980) encontrou uma alta proporção de isolados de *Agrobacterium* que induziam tumor em pessegueiros da Carolina do Sul (36%) e Tennessee (24%) resistente à linhagem K-84. Verificou também que era necessária uma proporção de 3:1 ou 10:1 da linhagem K-84 para o patógeno para controle adequado das culturas ligeiramente sensíveis, e que estas representavam cerca de 10% do total de isolados patogênicos encontrados nos estados de Maryland, Carolina do Sul e Tennessee.

Em cultura, os patógenos podem sofrer mutação espontânea para resistência a agrocina 84 (Cooksey & Moore, 1982), mas se isto constitui ou não um fator importante no campo ainda não foi estabelecido.

Um problema mais perigoso é, provavelmente, o aparecimento de linhagens resistentes a agrocina 84 após o uso da linhagem K-84 no campo. Uma situação deste tipo foi descrita na Grécia por Panagopoulos *et al.* (1979). Estes verificaram, em experimentos de campo, o desenvolvimento de muitas galhas em plântulas de pêsego inoculadas com uma mistura de 1:1 da linhagem 84 para o patógeno. Cerca de 16,5% das linhagens isoladas destas galhas eram patogênicas e produziam agrocina 84. Isto é devido à transferência do plasmídeo pAgK84 da linhagem K-84 para *A. tumefaciens*, conferindo ao último a capacidade de sintetizar agrocina 84 (Ellis *et al.*, 1979; Farrand *et al.*, 1985) e a imunidade a esta (Ryder *et al.*, 1987). Na Austrália, não há evidência para queda na eficácia do controle biológico através da utilização da linhagem 84, provavelmente devido ao fato deste controle ser cerca de 100% efetivo. Considerando que a transferência só ocorre na presença de nopalina, mediante a desrepressão dos genes responsáveis pela mobilização do plasmídeo pAgK84, e que esta, por sua vez, está presente apenas no tecido da galha, então numa situação onde

praticamente não há galha, não ocorrerá a transferência do plasmídeo (Kerr, 1980).

Outro fator que pode interferir com o sucesso do controle utilizando a linhagem K-84, é a ocorrência de linhagens patogênicas que produzam outras bacteriocinas, capazes de inibir a linhagem K-84. Isto foi observado por Kerr e Htay (1974) para a linhagem 108 de *A. tumefaciens*, que produziu uma outra bacteriocina ativa contra a linhagem K-84.

Uma outra variável na eficiência do controle biológico é a espécie da planta hospedeira do patógeno. Moore (1977) mostrou que uma mistura de 6 linhagens patogênicas, 2 das quais eram insensíveis à agrocina 84, não era inibida pela linhagem K-84 em plântulas de tomate em uma casa de vegetação, mas era inibida em plântulas de cereja crescidas no campo. Aparentemente, a espécie hospedeira influencia a interação entre a linhagem K-84 e os patógenos (Moore & Warren, 1979).

Resultados obtidos por Ellis *et al.* (1979) mostraram também que a produção de agrocina 84 não é o único requerimento para o controle biológico. Os autores descreveram duas linhagens que produziam agrocina 84, mas que não eram agentes de controle eficazes, e sugeriram o lento crescimento nos caules de tomate inoculados como a

razao para o fracasso destas linhagens em controlar a galha. Posteriormente, Shim *et al.* (1987) reforçaram a observação de que a produção de agrocina 84 por uma linhagem nao a torna, automaticamente, um agente de controle eficaz. Estes pesquisadores compararam a eficiência em controlar a galha da coroa de duas linhagens produtoras de agrocina 84 que diferiam apenas quanto à carga cromossômica, e verificaram que uma das linhagens, derivada da linhagem C58, era muito menos eficiente que a outra, derivada da linhagem K-84. Considerando a capacidade de colonizar as raízes de plântulas de amêndoa destas duas linhagens, os autores atribuíram os resultados obtidos à ineficiência ecológica da primeira, derivada da linhagem C58.

2.1.4 O agente de controle ideal

Uma vez que a transferência do plasmídeo pAgK84 constitui uma séria ameaça ao sucesso do controle biológico da galha da coroa, a manipulação genética deste vetor vem sendo realizada com o intuito de superar este problema. Shim *et al.* (1987) obtiveram um mutante para o locus de transferência deste plasmídeo (Tra⁻) que, num contexto genético adequado, é um eficiente agente de controle biológico. Também, linhagens de *Rhizobium meliloti* já foram testadas para a manutenção e expressão do plasmídeo que codifica para a produção de agrocina 84, transferido através

da utilização do plasmídeo RP4 como mobilizador, visando contornar o problema de transferência do pAgK84 para linhagens de *A. tumefaciens* patogênicas sensíveis à agrocina 84 (Hendson & Thomson, 1986).

Paralelamente, como muitas agrobactérias são resistentes a agrocina 84, seria interessante encontrar novos agentes de biocontrole que pudessem controlar tais linhagens. Hendson *et al.* (1983) identificaram 6 linhagens de *A. tumefaciens* produtoras de agrocina dentre 18 testadas. Os autores discutem o potencial de uma delas, a linhagem D286, para uso no controle biológico da galha apontando suas vantagens sobre a linhagem K-84. Além de ter produção *in vitro* de agrocina comparável a esta última e de ter perdido espontaneamente sua patogenicidade, a linhagem D286 tem taxa de crescimento mais rápida e exibe atividade contra linhagens de *A. tumefaciens* que metabolizam nopalina, octopina e agropina, enquanto que apenas linhagens com plasmídios Ti para nopalina são potencialmente sensíveis à linhagem K-84. Experimentos de campo seriam necessários para se confirmar o potencial da linhagem D286 como agente de biocontrole.

Por outro lado, o grande sucesso da linhagem K-84 de *A. radiobacter* no controle da galha da coroa não deveria fomentar a idéia de que um antagonista ideal existe e que apenas necessita ser encontrado. Schroth e Hancock (1981)

chamam a atenção para o fato de que a galha da coroa é uma doença única na qual o patógeno e o antagonista interagem em um nicho ecológico relativamente isolado, enquanto que o ciclo de vida da maioria dos patógenos de raízes é tal que suas populações são governadas por interações com vários componentes da microbiota temperados pelo ambiente abiótico, e sugerem que o sucesso no controle biológico futuro resultará do uso de antagonistas combinados, que possam inibir efetivamente o organismo alvo durante as diferentes fases do seu ciclo de vida e alterações das condições ambientais. Portanto, na seleção de antagonistas potenciais, a eficácia não deveria ser baseada apenas na habilidade de reduzir os sintomas da doença do patógeno principal, mas também no seu reflexo sobre o crescimento da planta, controlando, possivelmente, doenças menores que podem ser de valor econômico considerável.

Moore e Warren (1979) apontam uma série de atributos que devem ser considerados importantes no controle biológico além da especificidade do antagonista, que não deve ser muito restrita, pois tornaria sua aplicação extremamente limitada. Estes atributos seriam: (1) a persistência do antagonista; (2) segurança, ou seja, a não toxicidade para o consumidor das plantas tratadas; (3) aceitação estética, o que implica em aparência, odor e características de manipulação das plantas agradáveis, ou melhor, não alteradas; (4) fácil produção e estocagem; (5) baixo custo,

sendo economicamente competitivo com bactericidas menos seletivos; (6) fácil aplicação e proteção contra dessecação após a inoculação, o que provavelmente se constituiria em um inconveniente nas condições de campo antes da plantação. Os autores ressaltam ainda a importância da proporção do agente de controle a ser empregada, um dos fatores responsáveis pelo êxito do controle da galha com a linhagem K-84 em muitos casos, e o efeito preventivo deste tipo de controle, o que significa sua ineficiência sobre infecções latentes e a necessidade das práticas sanitárias apropriadas e manejo das plantações.

2.2 MATERIAIS E METODOS

2.2.1 Linhagens bacterianas utilizadas

Tabela 6 - Relação das linhagens bacterianas utilizadas e hospedeiros de onde foram isoladas.

<i>Linhagens *</i>	<i>Hospedeiro</i>
<i>X. campestris</i> pv.	
<i>vesicatoria</i>	
401, 411, 466	<i>Capsicum anuum</i> (pimentão)
479	<i>Lycopersicum esculentum</i> (tomate)
<i>glycines</i>	
333	<i>Glycine max</i> (soja)
<i>manihotis</i>	
289	<i>Manihot esculenta</i> (mandioca)

* Provenientes do Instituto Biológico de Campinas, Seção de Bactérias Fitopatogênicas.

Para determinados experimentos foram utilizadas linhagens com mutação espontânea para resistência a antibióticos, obtidas neste trabalho: 333Sm^r, 333Sp^r, 411Sp^r, 289Sm^r e 479Sm^r.

2.2.2 Meios de cultura

MEIO COMPLETO NYG

Peptona	5,0g	
Extrato de levedura	3,0g	
Glicerol	20,0ml	
Agua destilada	qsp.	1000ml	pH 7,2

Para obtenção de meio sólido, o ágar foi adicionado a 1,5%.

Os antibióticos foram utilizados em meio sólido, quando necessário, nas seguintes concentrações: espectinomicina 100ug/ml e estreptomicina 100ug/ml. Quando utilizados em meio líquido, os antibióticos tiveram suas concentrações reduzidas à metade.

O meio de cultura utilizado para germinação das sementes de tomate cv. Petomech foi o meio MS (Murashige & Skoog, 1962) a 50%, sem a adição de sacarose, inositol e hormônios (ácido indol acético e ácido giberélico). Neste caso, o ágar foi adicionado a 0,75%.

2.2.3 Competição *in vitro* entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível

Para este experimento foram utilizados mutantes espontâneos da linhagem 333 produtora de bacteriocina, resistente a Sm, e da linhagem 411 sensível a esta, resistente a Sp. As linhagens foram cultivadas em meio NYG líquido acrescido do antibiótico apropriado, a 28°C sob constante agitação.

Foi analisado o comportamento destas linhagens cultivadas individualmente e de maneira combinada em duas proporções diferentes, 1:1 e 2:1 (sensível:produtora).

Os pré-inóculos das linhagens, cultivados por 24 horas em 5ml de meio, foram padronizados para uma DO (densidade ótica) igual a 1,0. A partir dos pré-inóculos foram efetuados os inóculos em 40ml de meio NYG líquido contidos em erlenmeyers de 125ml para uma DO inicial de 0,1, nas devidas proporções descritas acima para cada tratamento. As culturas, individuais ou combinadas, foram então incubadas por 36 horas nas condições já descritas, e durante este tempo foram retiradas alíquotas de 2ml, com repetição, em intervalos de 3 horas nas primeiras 12 horas e 6 horas nas 24 horas restantes. A leitura da absorbância (A) destas alíquotas foi realizada em um comprimento de onda de 600nm, contra um branco contendo o mesmo meio utilizado para o

cultivo da linhagem. As alíquotas coletadas foram também plaqueadas em diluições apropriadas em meio NYG sólido contendo Sm ou Sp e incubadas a 28°C para posterior contagem do número de células viáveis.

Ainda, foram realizados experimentos controle de competição entre a linhagem 333 produtora de bacteriocina e a linhagem 479, insensível à bacteriocina em placa, e entre a linhagem 411 sensível e a linhagem 289, que não produz bacteriocina em placa contra a linhagem 411. Os mutantes espontâneos 333Sp^r e 479Sm^r foram utilizados, no primeiro caso, e os mutantes 411Sp^r e 289Sm^r, no segundo caso. O procedimento foi seguido exatamente como descrito acima, à exceção de que as linhagens foram combinadas apenas na proporção de 1:1.

A partir das leituras de A (600nm) e contagem do número de células viáveis resultantes dos plaqueamentos em meios seletivos, foram construídos gráficos para efeito de comparação entre os tratamentos.

2.2.4 Inibição *in vitro* da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora

A curva de crescimento da linhagem 411 foi acompanhada em 5 tratamentos diferentes: em meio NYG líquido apenas, em meio NYG acrescido de água destilada esterilizada, na proporção de 1:1, e em meio NYG acrescido do sobrenadante esterilizado da cultura produtora em 3 diferentes proporções (1:1, 3:1 e 7:1, meio NYG:sobrenadante). O sobrenadante da cultura produtora, após centrifugação, foi esterilizado através de filtração em filtros millipore 0,22um, e teve sua atividade inibitória contra a linhagem 411 confirmada antes de se dar início a este experimento.

A partir do pré-inóculo da linhagem 411, cultivado em 30ml de meio NYG por 24 horas, foram efetuados os inóculos para os 5 tratamentos em um volume total de 40ml contidos em erlenmeyers de 125ml para uma A (600nm) inicial de 0,1. Essas culturas foram incubadas por 30 horas a 28°C com agitação constante, e, durante este tempo, foram retiradas alíquotas de 2ml, com repetição, em intervalos de 3 horas. A leitura da absorbância destas alíquotas foi também realizada a 600nm, como no item anterior, contra um branco contendo o meio NYG. As alíquotas coletadas foram também plaqueadas em diluições apropriadas em meio NYG sólido e incubadas a 28°C para posterior contagem do número de células viáveis.

Também neste caso, foi realizado um experimento controle de inibição utilizando a linhagem 479Sm^r insensível à bacteriocina. O procedimento seguido foi o mesmo descrito acima, à exceção de que o meio NYG acrescido do sobrenadante esterilizado da cultura produtora foi utilizado apenas na proporção de 1:1, e as culturas foram incubadas por 36 horas, sendo as alíquotas para leitura da A e plaqueamento retiradas em intervalos de 3 horas nas primeiras 12 horas e de 6 horas nas 24 horas restantes.

2.2.5 Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bacteriocinogênica

2.2.5.1 Teste em sementes

As sementes utilizadas foram do cultivar Petomech (Petoseed Co., Inc., California, EUA). Estas foram previamente desinfectadas como descrito a seguir:

- lavagem em água esterilizada adicionada de detergente, 1x por 2 a 3 minutos com agitação
- lavagens em frascos com água esterilizada, 8 a 10x por 2 minutos com agitação
- banho em água sanitária a 40%, 10 minutos com agitação
- lavagens em frascos com água esterilizada, 5x por 2 minutos

As sementes foram submetidas a tratamentos com as linhagens 333 produtora de bacteriocina; 411, 401 e 466, isoladas de pimentão mas que desenvolvem sintomas em plântulas ("seedlings") de tomate cv. Petomech; 289, avirulenta para "seedlings" de tomate cv. Petomech e que não inibe as linhagens patogênicas utilizadas *in vitro*; e também com o sobrenadante esterilizado da cultura bacteriocinogênica incubada por cerca de 18 horas. Cabe salientar que as linhagens 401 e 411 eram sensíveis à linhagem 333, enquanto que a linhagem 466 não o era, sendo esta, portanto, utilizada como controle neste caso. Os tratamentos das sementes com estas linhagens, assim como com o sobrenadante, foram realizados isoladamente e de maneira combinada. Esta última consistiu do tratamento das sementes com a linhagem 333 (bacteriocinogênica), ou com a 289 (controle), ou ainda com o sobrenadante, durante 1 hora e, em seguida, com uma das linhagens patogênicas por mais 1 hora, e vice-versa. Portanto, foram realizados 24 tratamentos sumarizados abaixo:

- | | | | |
|--------|-------------|-------------|-------------|
| 1) 333 | 7) 333+401 | 13) 289+401 | 19) Bac+401 |
| 2) 289 | 8) 333+411 | 14) 289+411 | 20) Bac+411 |
| 3) Bac | 9) 333+466 | 15) 289+466 | 21) Bac+466 |
| 4) 401 | 10) 401+333 | 16) 401+289 | 22) 401+Bac |
| 5) 411 | 11) 411+333 | 17) 411+289 | 23) 411+Bac |
| 6) 466 | 12) 466+333 | 18) 466+289 | 24) 466+Bac |

As linhagens foram cultivadas em 40ml de meio NYG líquido durante a noite, a 28°C sob agitação constante. As absorvâncias (600nm) das culturas foram então padronizadas. Trinta sementes de tomate previamente desinfectadas foram mergulhadas na cultura de células, em cada um dos tratamentos especificados acima, contida em placas de Petri durante 1 hora, e a seguir transferidas para papel de filtro esterilizado, onde permaneceram por cerca de 5 minutos, antes de serem colocadas nas fôrmas plásticas contendo o meio de germinação. No caso dos tratamentos combinados, as sementes foram transferidas do papel de filtro para a segunda cultura, tratadas por mais 1 hora, novamente secas e então colocadas nas fôrmas plásticas. As linhagens dos tratamentos combinados foram utilizadas na proporção de 1:1.

Após os tratamentos, as sementes foram depositadas em fôrmas plásticas previamente autoclavadas contendo meio de germinação MS a 50%. A área de germinação para cada semente foi de 1,69cm². Estas fôrmas foram colocadas em caixas plásticas desinfectadas com água sanitária e álcool e então vedadas com MAGIPACK. Cerca de 20ml de água estéril foram depositados no fundo das caixas a fim de se manter a umidade adequada. Estas foram, a seguir, introduzidas em sacos plásticos, uma vez que o MAGIPACK permite a evaporação da água contida nas caixas, tornando o

ambiente ressecado e interferindo com o desenvolvimento dos sintomas.

As caixas contendo as sementes tratadas foram incubadas em câmara de germinação a 28°C com período de 8 horas de escuro, e os resultados analisados de 8 a 10 dias depois.

2.2.5.2 Teste em "seedlings"

Este experimento foi efetuado mediante a inoculação das linhagens bacteriocinogênica e patogênicas, assim como dos controles, em "seedlings" com 3 a 5 dias de desenvolvimento.

Cerca de 20 sementes de tomate cv. Petomech previamente desinfectadas, como descrito anteriormente, foram depositadas em placas de Petri estéreis contendo meio de germinação MS (Murashige & Skoog, 1962) a 50%. Estas placas foram colocadas em caixas plásticas desinfectadas com água sanitária e álcool, vedadas com MAGIPACK e incubadas em câmara de germinação a 25°C, com período de escuro de 8 horas por 3 a 5 dias.

As inoculações foram então realizadas a partir de culturas em placa mediante o ferimento da porção mediana

do hipocótilo, utilizando-se agulhas número 7 acopladas a um cabo para manuseio adequado. As linhagens a serem inoculadas foram repicadas 24 horas antes e incubadas em estufa a 28°C. Os tratamentos foram realizados com as linhagens 333 (bacteriocinogênica e avirulenta para os "seedlings" de tomate); 289 (avirulenta e que não inibe as linhagens patogênicas em placa); e as linhagens 401, 411 e 466 patogênicas, sendo as 2 primeiras sensíveis à bacteriocina da linhagem 333 em placa. Os "seedlings" foram inoculados com estas linhagens isoladamente e de maneira combinada. Nesta última, a linhagem patogênica, 401, 411 ou 466, foi inoculada 24 horas após o inóculo da linhagem bacteriocinogênica 333 ou da linhagem avirulenta controle 289.

As placas contendo os "seedlings" inoculados foram novamente colocadas nas caixas plásticas, sendo que cerca de 20ml de água esterilizada foram depositados no fundo de cada caixa. As caixas, novamente vedadas com MAGIPACK, foram introduzidas em sacos plásticos a fim de se preservar a umidade e incubadas na câmara de germinação a 28°C por mais 5 dias, quando os resultados foram analisados.

2.2.5.3 Teste em hipocótilos

Visando a simplificação da metodologia para analisar o efeito da linhagem 333 sobre os sintomas desenvolvidos pelas linhagens patogênicas, foram realizados experimentos inoculando-se a linhagem *bac⁺* e /ou a linhagem patogênica, assim como os controles, em segmentos de hipocótilos de tomate cv. Petomech.

Os "seedlings" foram obtidos de maneira análoga à descrita no item anterior, e, quando estavam com cerca de 5 dias de desenvolvimento, tiveram seus hipocótilos cortados em segmentos de aproximadamente 1cm.

As linhagens a serem inoculadas nos hipocótilos foram cultivadas em 30ml de meio NYG líquido durante a noite, a 28°C e sob agitação constante. As absorbâncias das culturas (600nm) foram, a seguir, padronizadas. Os tratamentos com as linhagens 333; 289; e as patogênicas 401, 411 e 466 foram realizados isoladamente ou de maneira combinada. Neste último, a linhagem 333 ou a 289 foi inoculada simultaneamente com uma das linhagens patogênicas na proporção de 1:1, ou estas foram inoculadas 18 horas após o inóculo da linhagem 333 ou da 289. Quando as linhagens patogênicas foram inoculadas depois, estas foram cultivadas por 16 a 18 horas e tiveram suas absorbâncias novamente padronizadas de acordo com a A da cultura produtora

inoculada previamente. Cerca de 10ul da cultura patogênica foram depositados sobre os hipocótilos já inoculados.

Os hipocótilos tratados foram transferidos para placas de Petri contendo ágar-água a 1,5%. Foram colocados 15 hipocótilos de cada tratamento por placa, com repetição. As placas de Petri foram, a seguir, colocadas na câmara de germinação a 28°C e os resultados analisados 4 e 7 dias depois.

2.2.5.4 Análise Estatística

Os resultados obtidos dos tratamentos com as sementes, "seedlings" e hipocótilos foram analisados estatisticamente. Com a finalidade de normalização, as porcentagens de indivíduos doentes encontrados foram transformadas em valor angular ($=\text{arco seno } \sqrt{p}$), sendo p a proporção de indivíduos doentes.

Para comparação entre os vários tratamentos, utilizou-se análise de variância simples, determinando-se a diferença mínima significativa (DMS) pelo teste de Tukey, a nível de 5% de probabilidade (Pimentel Gomes, 1976).

Os resultados das análises estão indicados nas figuras através de letras minúsculas, sendo que os valores

seguidos pelas mesmas letras não diferem significativamente entre si.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Competição *in vitro* entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível

Este experimento foi realizado com o intuito de se analisar o efeito da linhagem bacteriocinogênica sobre o crescimento da linhagem sensível quando ambas são inoculadas juntas.

A figura 8 ilustra a variação da absorbância (600nm) durante o crescimento das linhagens 333Sm^r produtora de bacteriocina e 411Sp^r sensível, cultivadas isoladamente e combinadas nas proporções 1:1 e 1:2 (produtora:sensível), e a figura 9 mostra a variação no número de células viáveis destas linhagens nas mesmas condições. O gráfico da figura 8 mostra que a absorbância das culturas mistas no tempo 36 horas é bem inferior à A das culturas individuais das linhagens 333 e 411, embora a queda da A com relação à cultura 411 sensível se dê em maior escala do que em relação à cultura 333. A variação do número de células viáveis das culturas em função do tempo de crescimento (figura 9) demonstra que ambas as linhagens tiveram o número de células viáveis reduzido quando cultivadas juntas, sendo que se considerarmos o tempo 36 horas, por exemplo, a redução é mais drástica para a linhagem sensível 411.

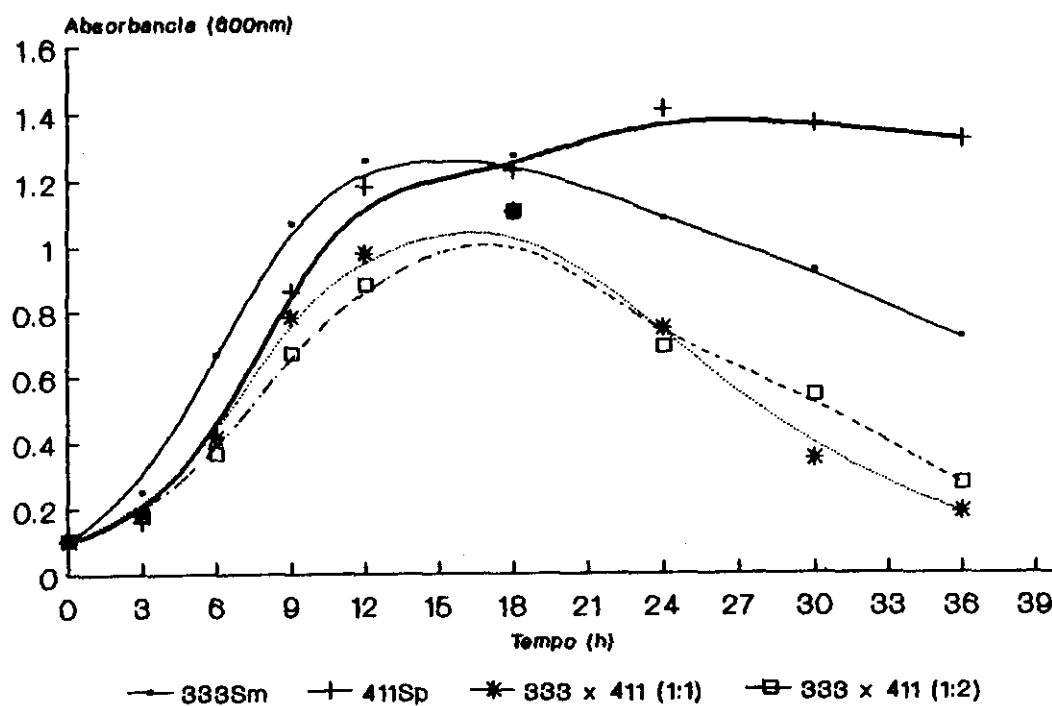


Figura 8 - Variação da absorbância (600nm) durante o crescimento das linhagens 333Sm^r e 411Sp^r, cultivadas isoladamente e combinadas nas proporções 1:1 e 1:2 (produtora:sensível).

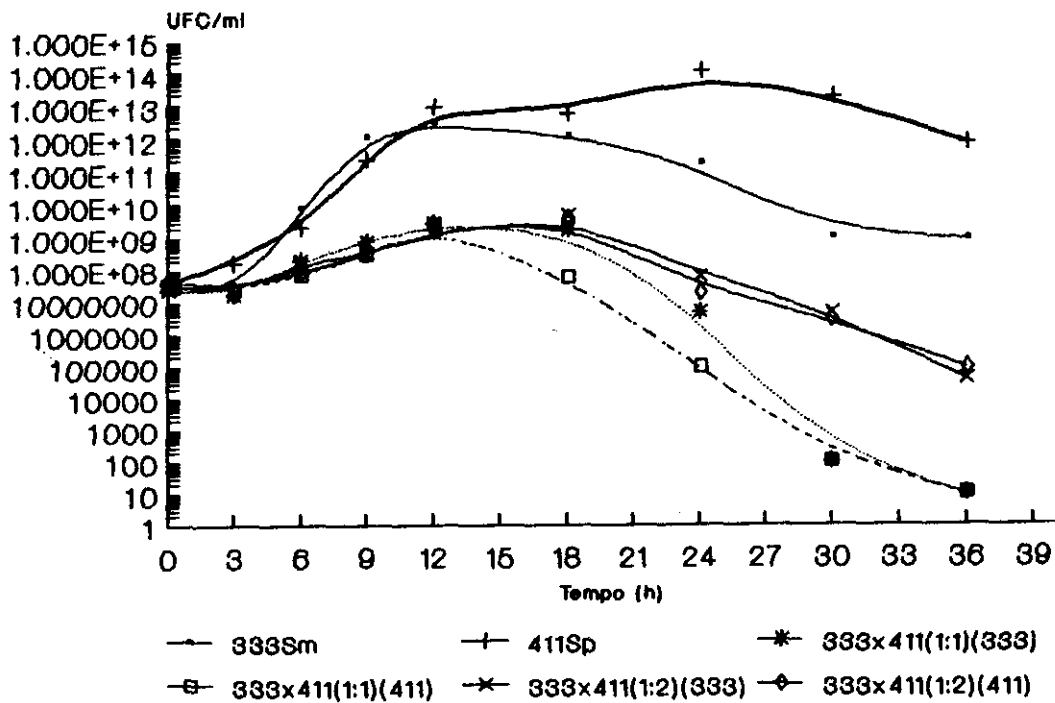


Figura 9 - Variação do número de células viáveis durante o crescimento das linhagens 333Sm^r e 411Sp^r, cultivadas isoladamente e combinadas nas proporções 1:1 e 1:2 (produtora:sensível). No eixo x: 1.0E+x = 10^x.

Foram realizados experimentos controle a fim de se verificar se a redução do número de células viáveis da linhagem 411 se deveu à inibição pela bacteriocina da linhagem 333 ou simplesmente à competição entre as duas linhagens. Para isto a linhagem 479Sm^r, insensível à bacteriocina em placa, foi cultivada isoladamente e em cultura mista com a linhagem 333Sp^r (na proporção 1:1). A variação da A e do número de células viáveis em função do tempo de crescimento é ilustrada nas figuras 10 e 11, respectivamente. A figura 10 mostra que a absorbância final da cultura mista é bem inferior à A da cultura 479Sm^r crescida isoladamente e pouco inferior à da cultura 333Sp^r, ilustrando uma inibição da linhagem 479 quando cultivada juntamente com a linhagem 333, semelhante àquela verificada para a linhagem 411 sensível à bacteriocina. O gráfico da figura 11 confirma essa inibição, evidenciando também a redução do número de células viáveis da própria linhagem bacteriocinogênica 333 em cultura mista. Entretanto, observou-se que a inibição foi mais acentuada para a linhagem 479.

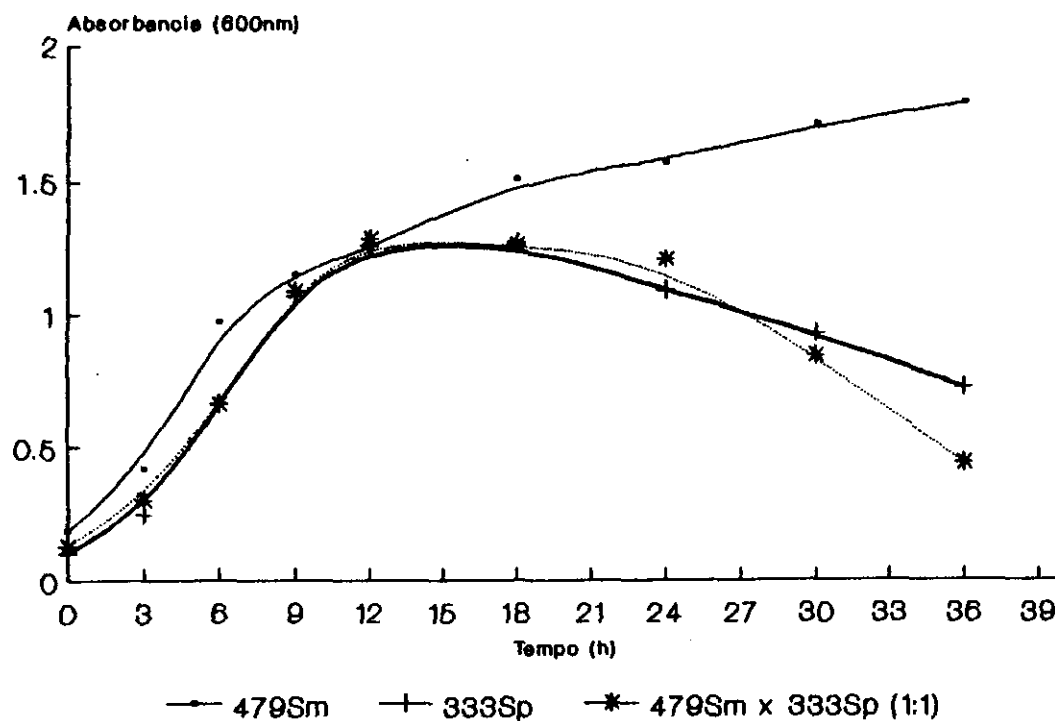


Figura 10 - Variação da absorbância (600nm) durante o crescimento das linhagens 333Sp^r e 479Sm^r, cultivadas isoladamente e combinadas na proporção 1:1 .

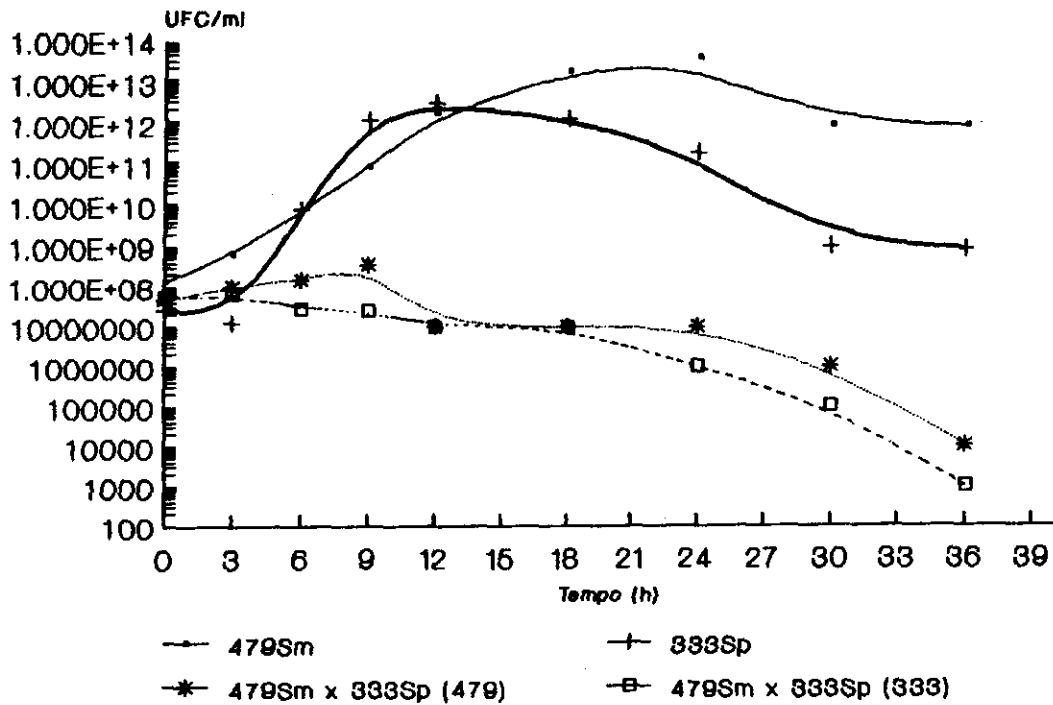


Figura 11 - Variação do número de células viáveis durante o crescimento das linhagens 333Sp^r e 479Sm^r, cultivadas isoladamente e combinadas na proporção 1:1. No eixo x: $1.0E+x = 10^x$.

Ainda como controle, a linhagem 289Sm^r, que não tem atividade inibitória sobre a linhagem 411 em placa, foi cultivada isoladamente e em cultura mista com a linhagem 411Sp^r na proporção 1:1. As figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, a variação da A e do número de células viáveis destas culturas em função do tempo de crescimento. O gráfico da figura 12 mostra que o valor de absorbância final da cultura mista é praticamente o mesmo que aquele observado para a cultura da linhagem 411Sp^r crescida isoladamente, e pouco inferior à A final observada para a cultura 289Sm^r. O número final de células viáveis da linhagem 411 não se alterou muito quando esta foi cultivada juntamente com a linhagem 289Sm^r. Por outro lado, se considerarmos os valores obtidos no tempo 36 horas, a linhagem 289 teve a população de células viáveis bastante reduzida quando em cultura mista.

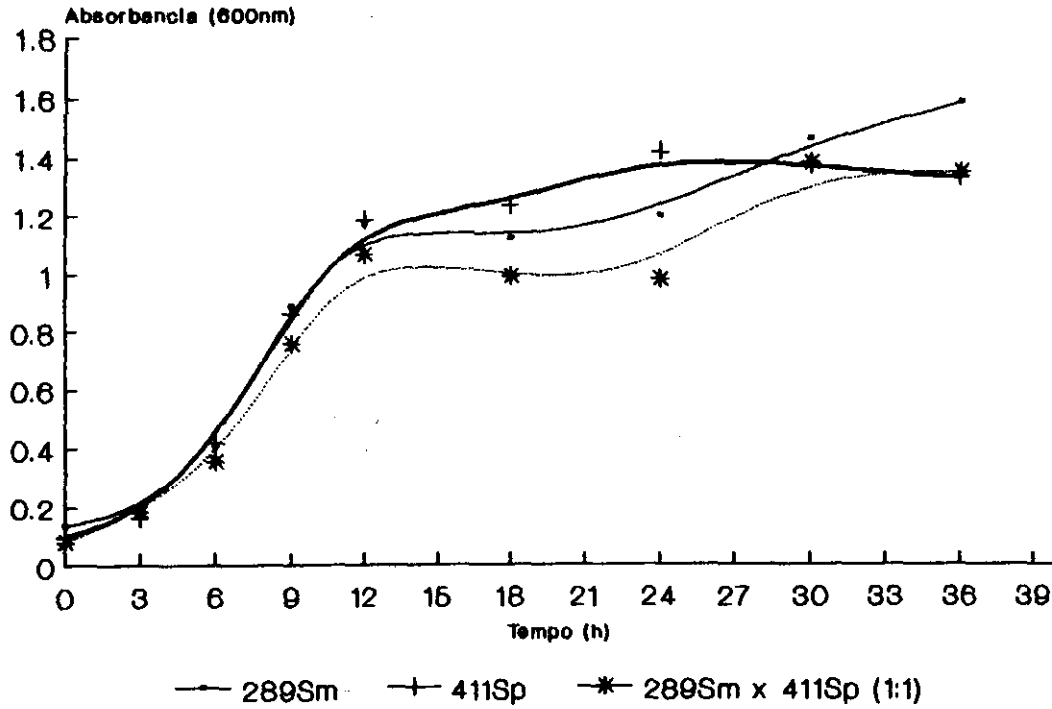


Figura 12 - Variação da absorbância (600nm) durante o crescimento das linhagens 289Sm^r e 411Sp^r, em culturas isolada e mista na proporção 1:1.

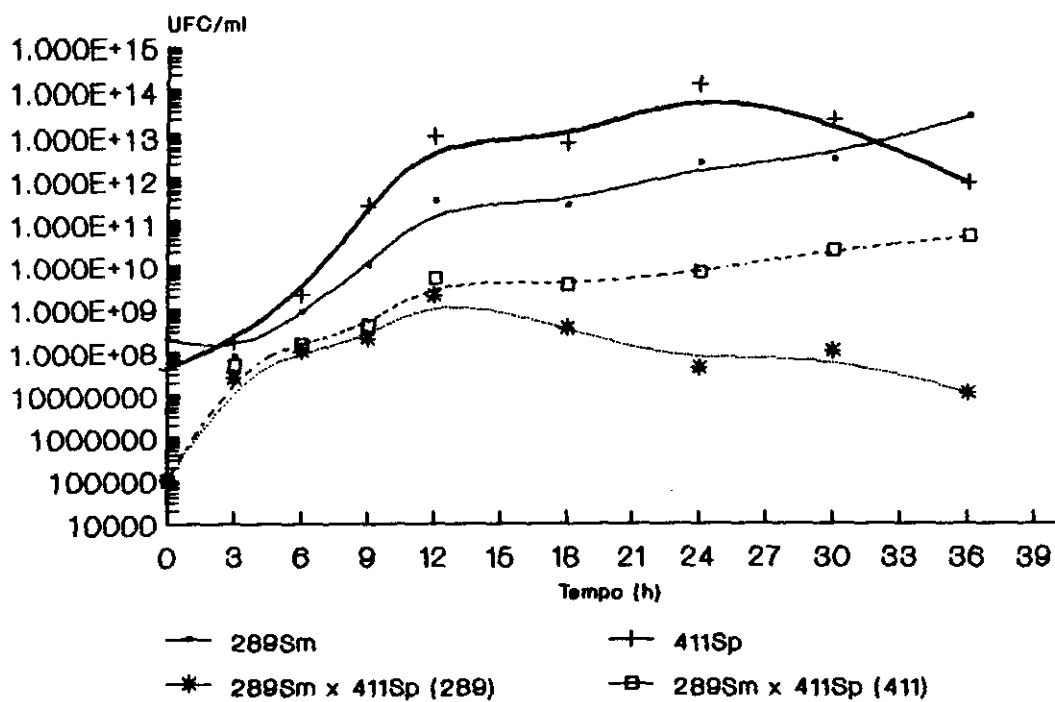


Figura 13 - Variação do número de células viáveis durante o crescimento das linhagens 289Sm^r e 411Sp^r, em culturas isolada e mista na proporção 1:1. No eixo x: $1.0E+x = 10^x$.

2.3.2 Inibição *in vitro* da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora

A linhagem 411 foi cultivada em meio NYG adicionado do sobrenadante esterilizado da cultura produtora em diferentes proporções, com a finalidade de se verificar o efeito do sobrenadante com atividade de bacteriocina sobre o crescimento da linhagem sensível.

A figura 14 mostra a variação da absorbância das culturas da linhagem 411, incubada em meio NYG adicionado do sobrenadante nas proporções 1:1, 3:1 e 7:1 (NYG:sobrenadante), em função do tempo. O que se verificou foi uma relação inversa entre a quantidade de sobrenadante adicionado ao meio NYG e a razão de crescimento da cultura sensível, ou seja, quanto mais sobrenadante se adiciona menor é o crescimento da linhagem sensível. No caso da proporção 1:1, maior proporção de sobrenadante utilizada, a DO da cultura sensível permaneceu constante durante todo o tempo de incubação, isto é, a razão de crescimento foi zero. Além disso, observou-se que até cerca de 9 horas todas as proporções de sobrenadante utilizadas tiveram o mesmo efeito sobre a absorbância das culturas, e a partir daí houve crescimento da linhagem com as proporções 3:1 e 7:1, mas em escalas diferentes. A variação da A em função do tempo de incubação da cultura 411 em meio NYG adicionado de água esterilizada, na proporção 1:1, é semelhante àquela

verificada para a cultura sensível crescida em meio NYG apenas, havendo uma ligeira redução na A final de 1,414 para 1,195.

O gráfico da figura 15, que mostra a variação do número de células da cultura sensível durante a incubação em meio NYG acrescido do sobrenadante nas proporções 1:1, 3:1 e 7:1, confirma os resultados visualizados na figura 14, ou seja, a razão de crescimento da linhagem sensível diminui à medida que se adiciona mais sobrenadante estéril da linhagem bacteriocinogênica ao meio NYG.

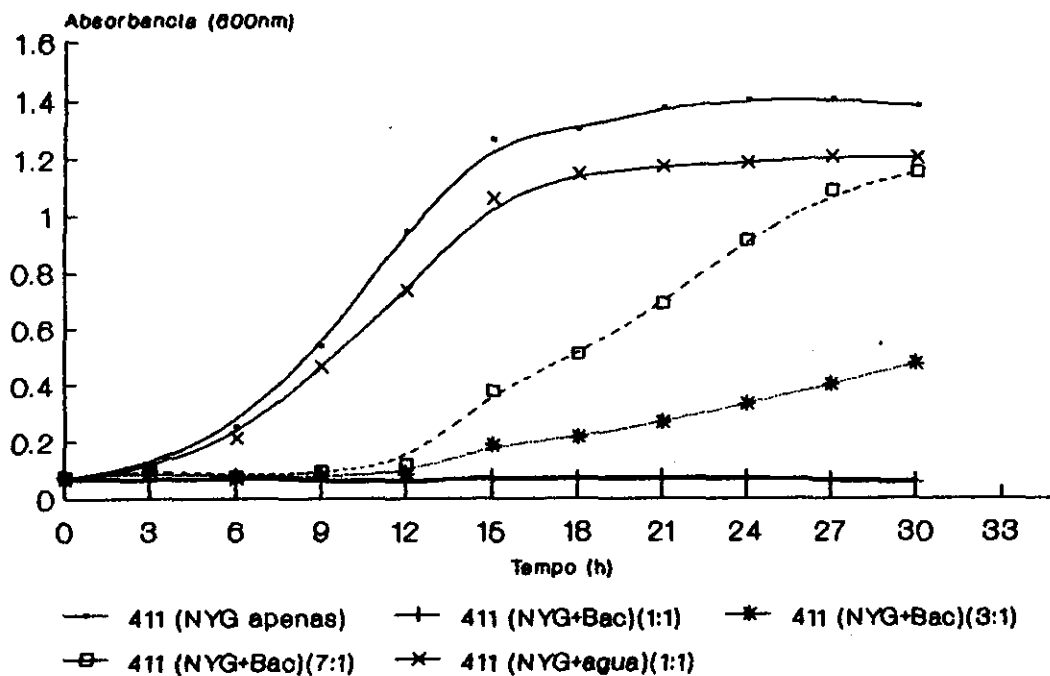


Figura 14 - Variação da absorbância (600nm) durante o crescimento da linhagem sensível 411 em meio NYG apenas e acrescido do sobrenadante estéril nas proporções 1:1, 3:1 e 7:1 (NYG:sobrenadante).

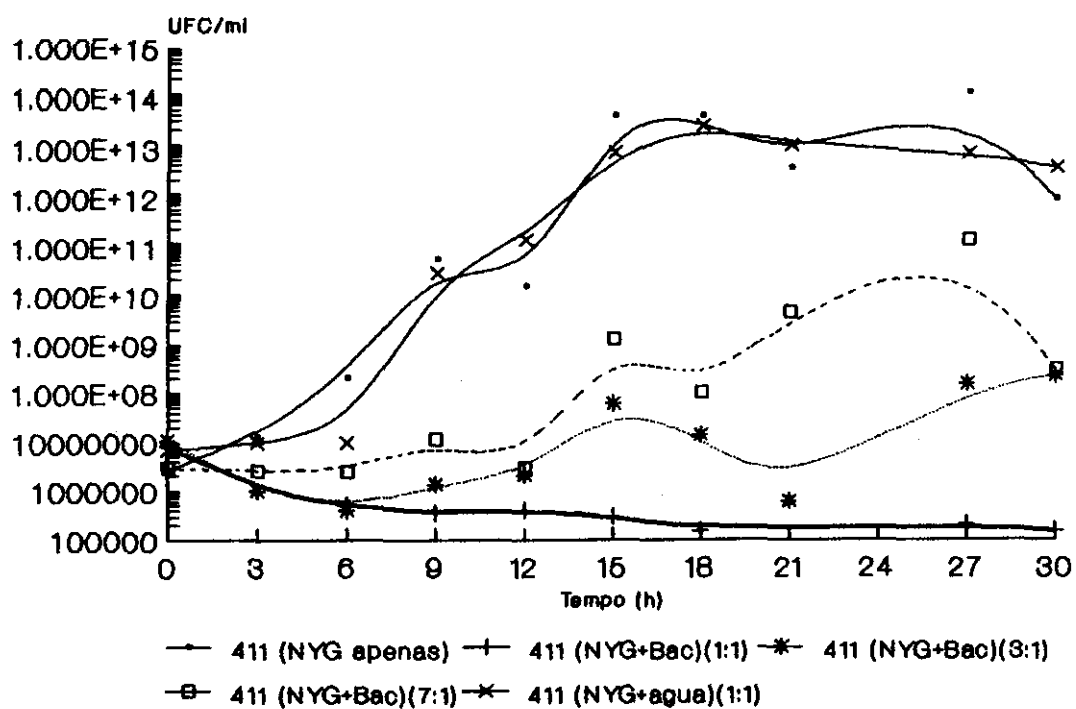


Figura 15 - Variação do número de células viáveis durante o crescimento da linhagem sensível 411 em meio NYG apenas e acrescido do sobrenadante estéril nas proporções 1:1, 3:1 e 7:1 (NYG:sobrenadante). No eixo x : $1.0E+x = 10^x$.

Com o intuito de se averiguar se a inibição da linhagem sensível era devida à bacteriocina produzida pela linhagem 333 e presente no sobrenadante da cultura desta, acompanhou-se o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio NYG com e sem a adição do sobrenadante da cultura bac⁺, na proporção 1:1. Esta linhagem foi também inoculada em meio NYG adicionado de água esterilizada, como um controle para a redução na quantidade de nutrientes que ocorre quando se adiciona o sobrenadante ao meio NYG na proporção 1:1.

As figuras 16 e 17 ilustram, respectivamente, a variação da A e do número de células durante o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio NYG apenas e adicionado do sobrenadante da cultura bac⁺ ou de água, na proporção 1:1. O gráfico da figura 16 demonstra que a partir de 24 horas há uma queda nos valores de A da cultura 479Sm^r em meio NYG adicionado do sobrenadante. Entretanto, durante toda a fase exponencial da curva, o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio NYG contendo o sobrenadante acompanha o crescimento da mesma nos tratamentos controle, ou seja, em meio NYG apenas ou contendo água esterilizada. A queda na A da cultura crescida em meio NYG adicionado do sobrenadante não se verifica quando a linhagem é cultivada neste meio adicionado de água na mesma proporção. Por outro lado, esta diferença nos valores finais de A entre os tratamentos não é tão acentuada quanto àquela verificada para a cultura da linhagem 411 sensível à bacteriocina.

A figura 17 mostra também que a variação do número de células durante o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio adicionado do sobrenadante da cultura bac⁺, acompanha a variação verificada para esta linhagem crescida em meio NYG apenas. Houve um aumento do número de células na fase exponencial do crescimento em ambos os casos, sendo que começa a decair em torno de 20 horas de crescimento em meio adicionado de sobrenadante e 22 horas em meio NYG apenas. Entretanto, a diferença no número final de células viáveis entre os dois tratamentos é grande, da ordem de 10³UFC/ml.

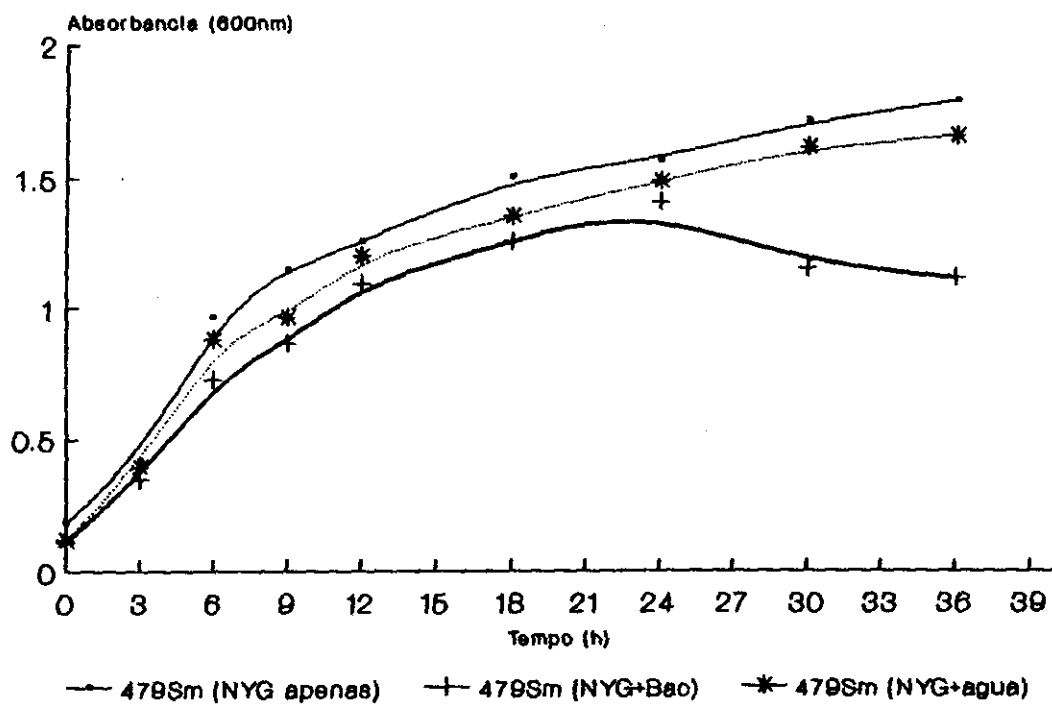


Figura 16 - Variação da A (600nm) durante o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio NYG apenas e adicionado de sobrenadante ou água estéril na proporção 1:1.

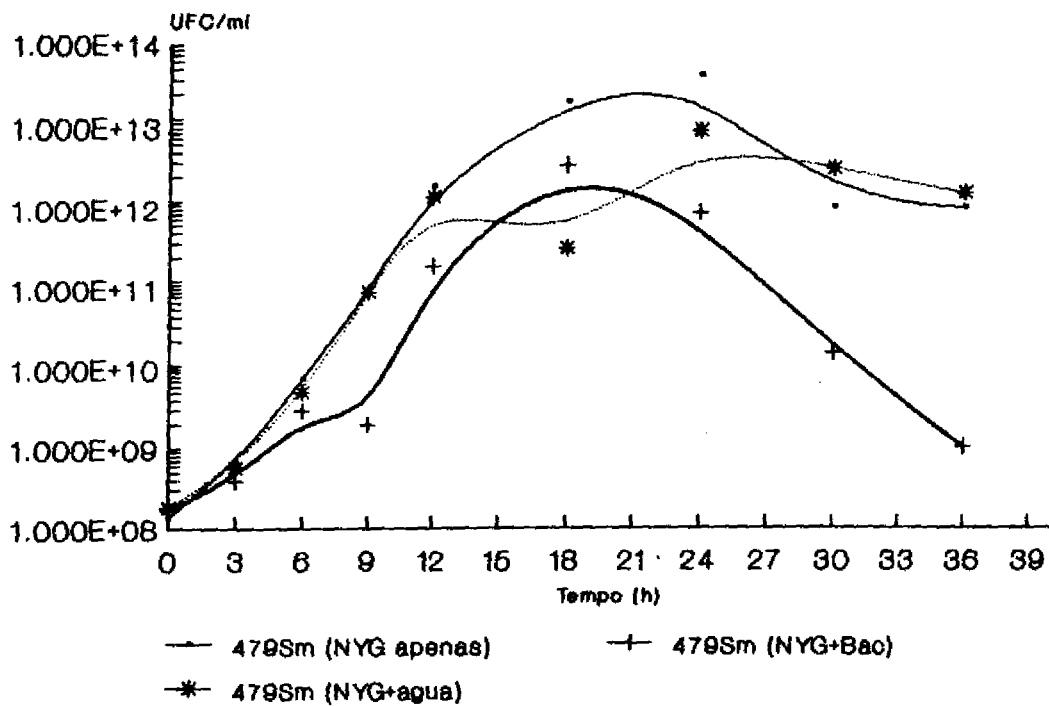


Figura 17 - Variação do número de células viáveis durante o crescimento da linhagem 479Sm^r em meio NYG apenas e adicionado do sobrenadante ou água estéril na proporção 1:1. No eixo x: $1.0+x = 10^x$.

2.3.3 Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bacteriocinogênica

2.3.3.1 *Teste em sementes*

Como regra geral, a análise estatística foi realizada considerando-se duas classes de plantas, analisados de 8 a 10 dias após o tratamento: sadias e doentes. Entretanto, a classe das plantas doentes englobou aquelas que desenvolveram sintomas bem pronunciados, como a murcha e o encharcamento e necrose das folhas, sendo que os "seedlings" se apresentavam caídos, embora o hipocótilo não exibisse sintomas, e também aquelas plantas com sintomas atenuados, como folhas úmidas com regiões semelhantes a tumores, ou folhas ligeiramente ressecadas e contorcidas com pontos de clorose. Estas últimas, embora se apresentassem eretas como as plantas sadias, foram classificadas como parcialmente doentes desde que exibiam a tendência a desenvolver os sintomas e eram menos vigorosas .

A figura 18 mostra os resultados obtidos com o tratamento das sementes do cv. Petomech com a linhagem patogênica 401 isolada e combinada com a linhagem bacteriocinogênica 333 ou com a linhagem controle 289. O que se observou foi uma redução ou extinção dos sintomas quando as sementes foram tratadas com a linhagem patogênica 401 combinada com a linhagem 333, sendo esta última aplicada

antes ou após o inóculo da linhagem patogênica. As letras indicam que os tratamentos não diferem significativamente entre si, portanto o tratamento com a linhagem 333 (c) é igual ao tratamento 333+401 (bc) e ao tratamento 401+333 (c). Isto não foi observado quando as sementes foram tratadas com a linhagem patogênica combinada com a linhagem 289, uma vez que a totalidade, ou quase, das plantas desenvolveu sintomas semelhantes àqueles desenvolvidos pela linhagem 401 quando inoculada isoladamente. Entretanto, mais de 60% do tratamento controle com a linhagem 289 desenvolveu algum tipo de sintoma, como folhas ligeiramente deformadas com pontos de clorose, sintomas estes bem diferentes daqueles descritos para os indivíduos considerados doentes.

Este efeito positivo obtido quando a linhagem patogênica 401 foi inoculada juntamente com a linhagem 333 nas sementes do cv. Petomech, pode ser visualizado na figura 19 (A), onde os "seedlings" do tratamento 401 apresentam-se caídos e com as folhas totalmente encharcadas, enquanto que os "seedlings" dos tratamentos combinados com a linhagem 333 bac⁺ apresentam-se eretos e com vigor. A figura 19 (B) ilustra os resultados obtidos com os tratamentos das sementes com a linhagem patogênica 401 combinada com a linhagem 289. Os "seedlings" apresentam-se de maneira semelhante àqueles tratados apenas com a linhagem 401.

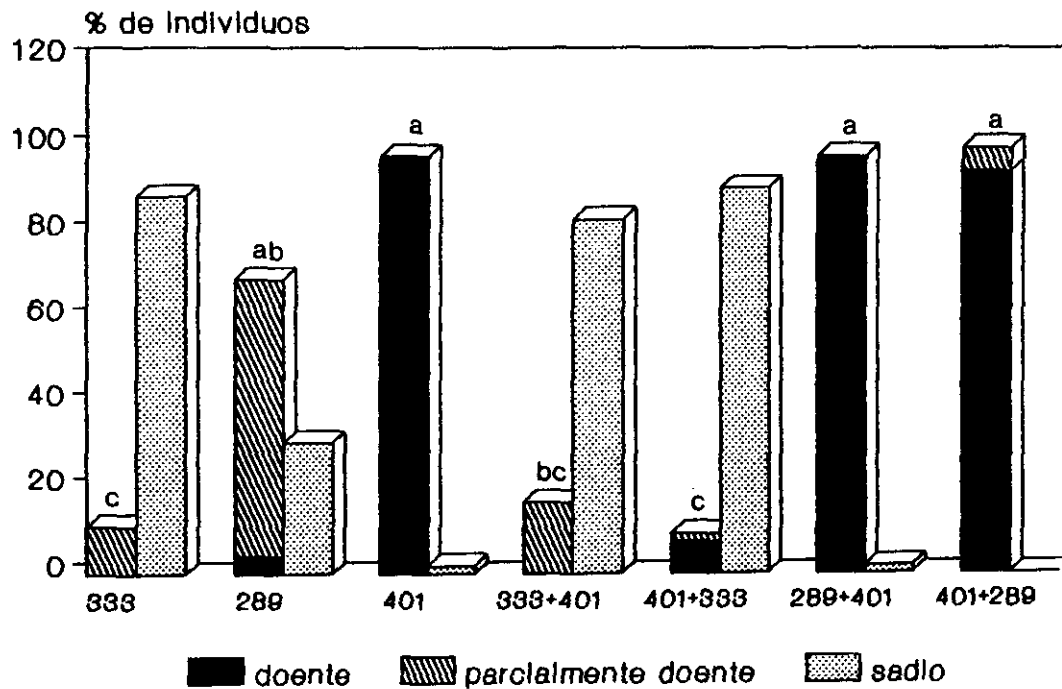


Figura 18 - Histograma da porcentagem de individuos doentes, parcialmente doentes e sadios após 9 dias de incubação das sementes tratadas em câmara de germinação a 28°C com 8 horas de escuro. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

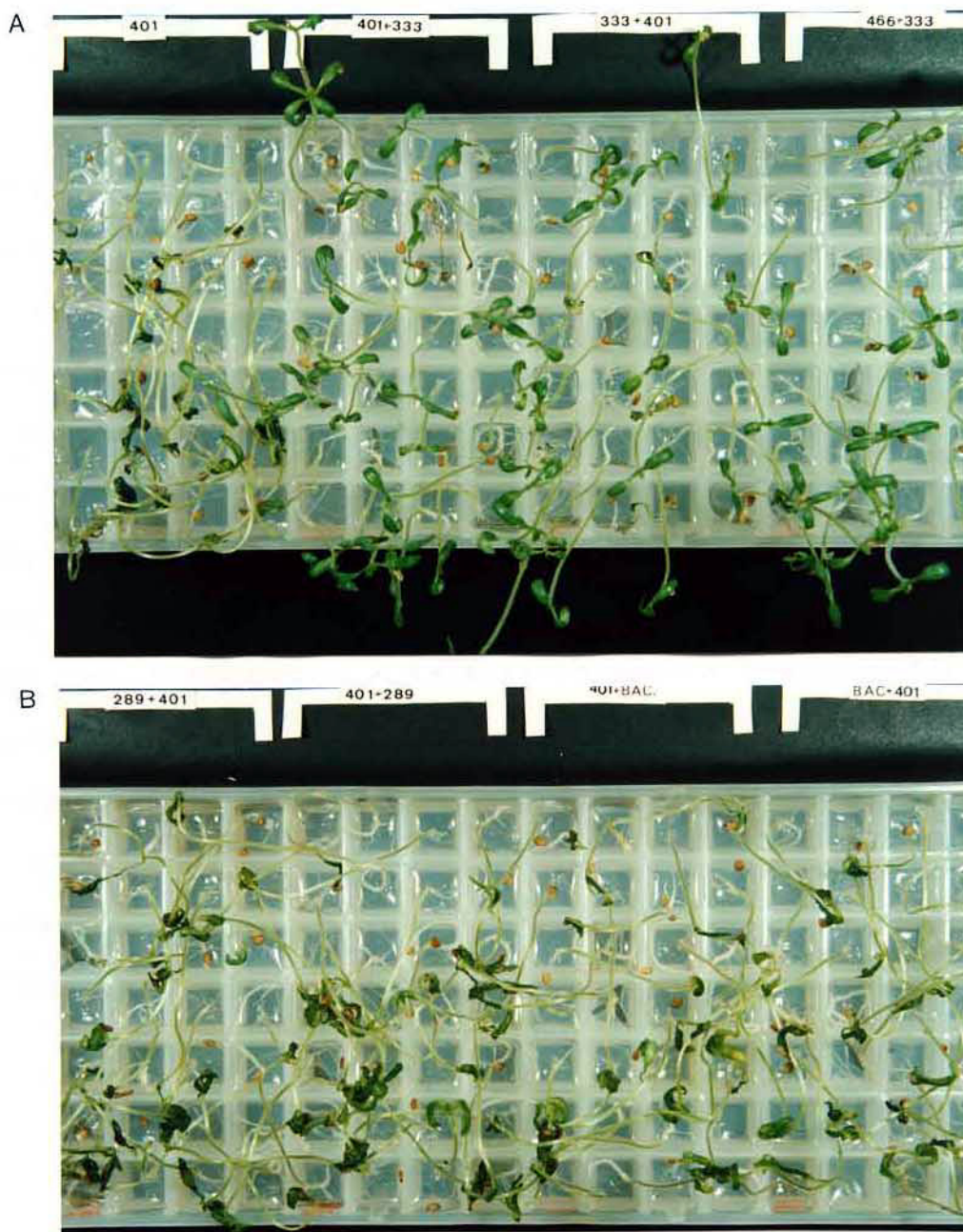


Figura 19 - "Seedlings" obtidos após os tratamentos das sementes com a linhagem patogênica 401 isolada e combinada com a linhagem 333 bac⁺ (A) e com a linhagem 289 (B), com 9 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C com 8 horas diárias de escuro.

O histograma da figura 20 mostra os resultados obtidos com a inoculação das sementes com a linhagem patogênica 411, isoladamente ou em diferentes combinações. As letras indicam que os tratamentos cujas inoculações com a linhagem 411 precederam ou seguiram o inóculo com a linhagem 333 bac⁺ não diferem estatisticamente do tratamento isolado com a linhagem 333. Como ocorreu com a linhagem 401, este efeito positivo sobre os "seedlings" não foi verificado quando a linhagem 289 foi combinada com a linhagem 411 patogênica. Entretanto, o tratamento onde a linhagem 411 foi inoculada antes que a 289 (ab) não diferiu significativamente dos tratamentos controle com a linhagem 333 (b) ou 289 (ab). Também o tratamento isolado com a linhagem 411 (ab) não diferiu dos tratamentos com a linhagem 333 (b) ou 289 (ab).

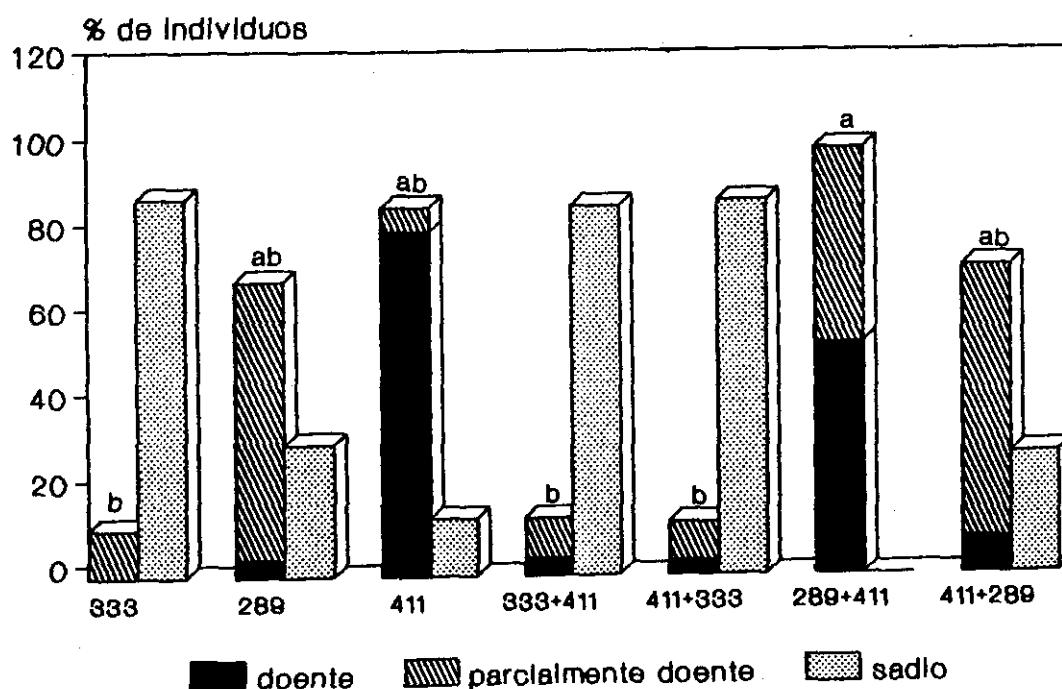


Figura 20 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 9 dias de incubação das sementes tratadas em câmara de germinação a 28°C com 8 horas de escuro. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

Os resultados obtidos com os tratamentos das sementes com a linhagem patogênica 466 combinada com a linhagem 333 bac⁺ ou com a linhagem 289 são mostrados na figura 21. Novamente, os tratamentos cujas inoculações com a linhagem patogênica 466 foram precedidas ou seguidas do inóculo com a linhagem bac⁺ não diferiram significativamente do tratamento isolado com a linhagem 333. Já os tratamentos com a linhagem patogênica combinada com a linhagem 289 (a) são iguais ao tratamento isolado com a linhagem 466 (a), onde 100% dos indivíduos desenvolveu sintomas de doença.

A aparência dos "seedlings" resultantes do tratamento combinado onde a linhagem patogênica 466 foi inoculada antes da linhagem bac⁺ 333 é mostrada na figura 19 (A).

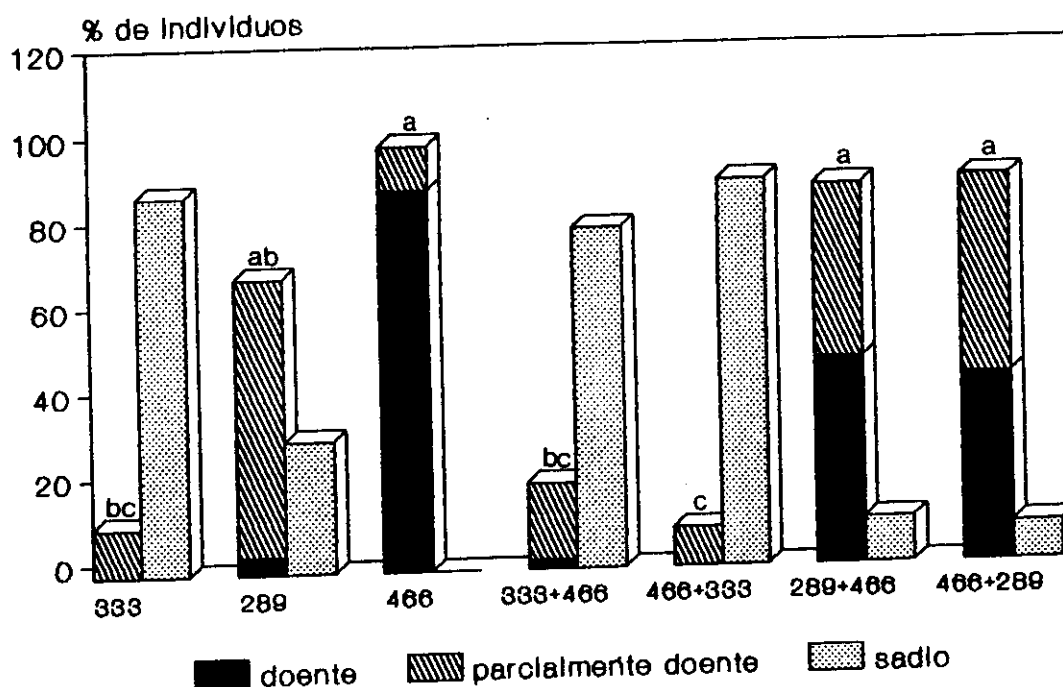


Figura 21 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 9 dias de incubação das sementes tratadas em câmara de germinação a 28°C com 8 horas de escuro. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

O histograma da figura 22 mostra os resultados obtidos com os tratamentos das sementes com as linhagens patogênicas combinadas com o sobrenadante estéril da cultura produtora de bacteriocina. O que se verificou foi que o tratamento das sementes com o sobrenadante com atividade de bacteriocina antes ou após o tratamento com uma das linhagens patogênicas não tem qualquer efeito sobre o desenvolvimento de sintomas pelos "seedlings" de tomate. As letras indicam que os tratamentos com as linhagens patogênicas combinadas com o sobrenadante não diferem significativamente dos tratamentos isolados com estas linhagens. Apenas o tratamento controle com o sobrenadante (b) difere dos outros, uma vez que cerca de 80% dos indivíduos mostraram-se sadios.

A aparência dos "seedlings" resultantes dos tratamentos combinados entre a linhagem patogênica 401 e o sobrenadante da cultura produtora de bacteriocina é ilustrada na figura 19 (B) .

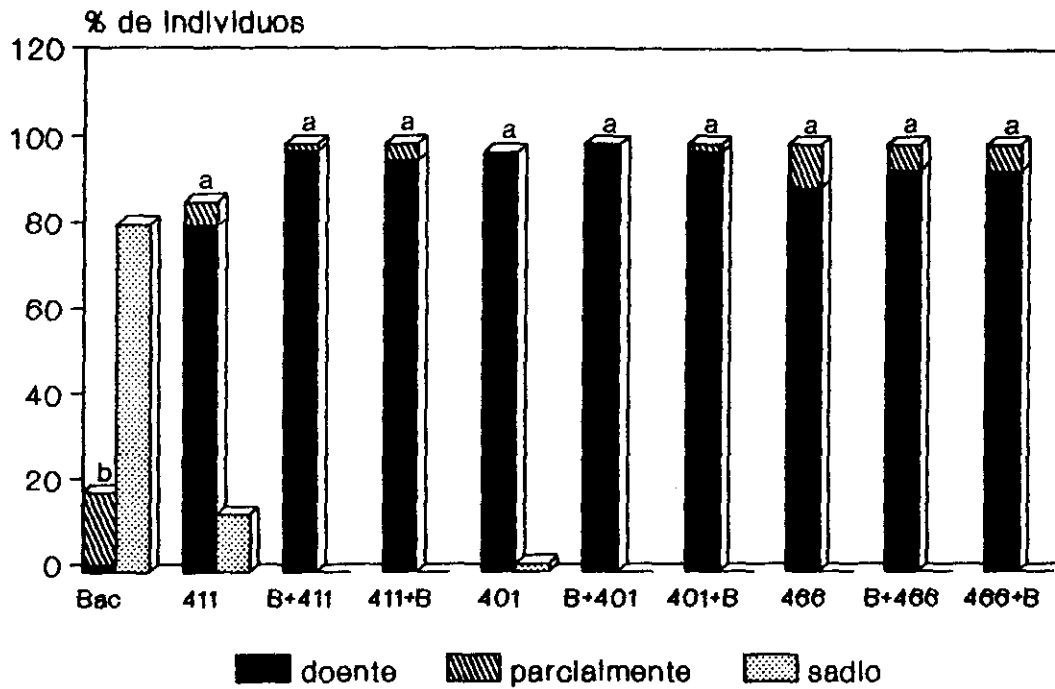


Figura 22 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 9 dias de incubação das sementes tratadas em câmara de germinação a 28°C com 8 horas de escuro. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

2.3.3.2 Teste em "seedlings"

Também neste caso, a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada considerando-se duas classes de indivíduos, doentes e sadios, analisados 5 dias após o inóculo com a linhagem patogênica. Como no item anterior, a classe dos indivíduos doentes englobou aqueles considerados como parcialmente doentes. Foram considerados parcialmente doentes os indivíduos que apresentavam as folhas ligeiramente ressecadas ou murchas e enroladas, e hipocótilos com início de constricção na porção superior. Os sintomas exibidos pelos hipocótilos destes indivíduos eram mais restritos ao local do inóculo, onde o tecido aparentemente se abriu. Os indivíduos considerados doentes apresentavam folhas totalmente ressecadas, assim como parte do hipocótilo. Os "seedlings" mostraram-se caídos, sendo que em alguns a constricção no local do inóculo foi total e, portanto, a porção do "seedling" acima do ponto de inóculo foi destacada do resto. Em alguns indivíduos o tecido do hipocótilo se abriu no local do ferimento e ao longo do seu comprimento. De maneira geral, os "seedlings" inoculados isoladamente com a linhagem patogênica 466 desenvolveram sintomas mais drásticos, com apodrecimento das folhas e do hipocótilo.

A figura 23 mostra os resultados encontrados para os tratamentos de "seedlings" com a linhagem 401

isoladamente e 24 horas após o inóculo com a linhagem 333 bac⁺ ou com a linhagem 289. As letras indicam que os tratamentos combinados entre a linhagem 333 ou a linhagem 289 e a patogênica 401 diferem estatisticamente entre si e com relação aos tratamentos controle 333 (d) e 289 (d), onde 100% dos indivíduos se mostrou sadio, assim como com relação ao tratamento isolado com a linhagem 401 (a).

O efeito dos tratamentos 401 e 333+401 após 5 dias de incubação, pode ser visualizado na figura 24 (A e B, respectivamente). O tratamento controle 333 é ilustrado na figura 25.

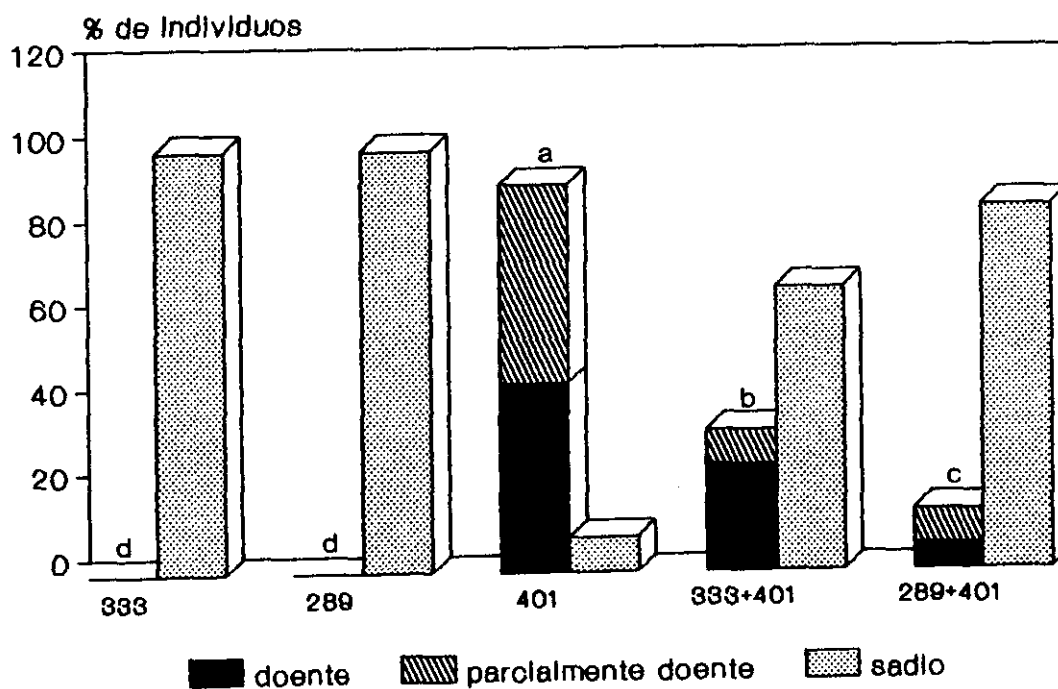


Figura 23 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 5 dias de incubação dos "seedlings" inoculados em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

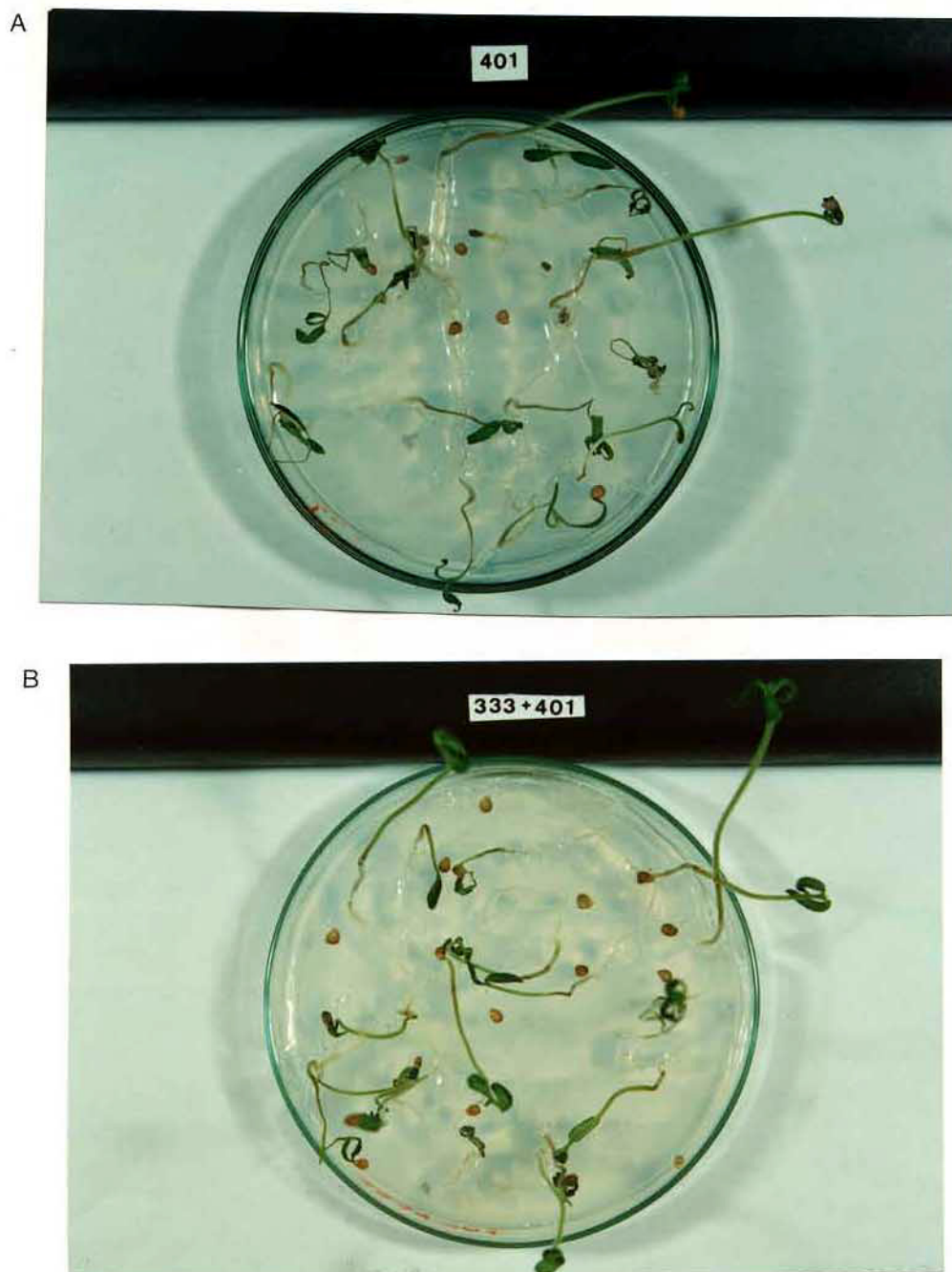


Figura 24 - "Seedlings" inoculados com a linhagem patogênica 401 isoladamente (A) e 24 horas após o inóculo com a linhagem 333 bac⁺ (B), depois de 5 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C.



Figura 25 - "Seedlings" inoculados com a linhagem 333 bac⁺ após 5 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C.

As porcentagens de indivíduos sadios e doentes encontradas para os tratamentos com a linhagem patogênica 411 inoculada isoladamente nos "seedlings" e 24 horas após o inóculo com a linhagem 333 ou com a linhagem 289, são mostradas no histograma da figura 26. A análise estatística dos dados mostrou que os tratamentos onde a linhagem patogênica foi inoculada após a 333 ou a 289 (b) não diferem significativamente dos tratamentos controle, inoculados apenas com a linhagem 333 (b) ou com a linhagem 289 (b). Apenas o tratamento isolado com a linhagem patogênica 411 diferiu ao nível de 5%. Neste caso, ambas as linhagens, 333 e 289, tiveram efeito positivo sobre os "seedlings" de tomate inoculados com a linhagem patogênica 411. Entretanto, deve-se considerar que a maior parte dos indivíduos não sadios resultantes da inoculação isolada com a linhagem 411 foram apenas parcialmente doentes.

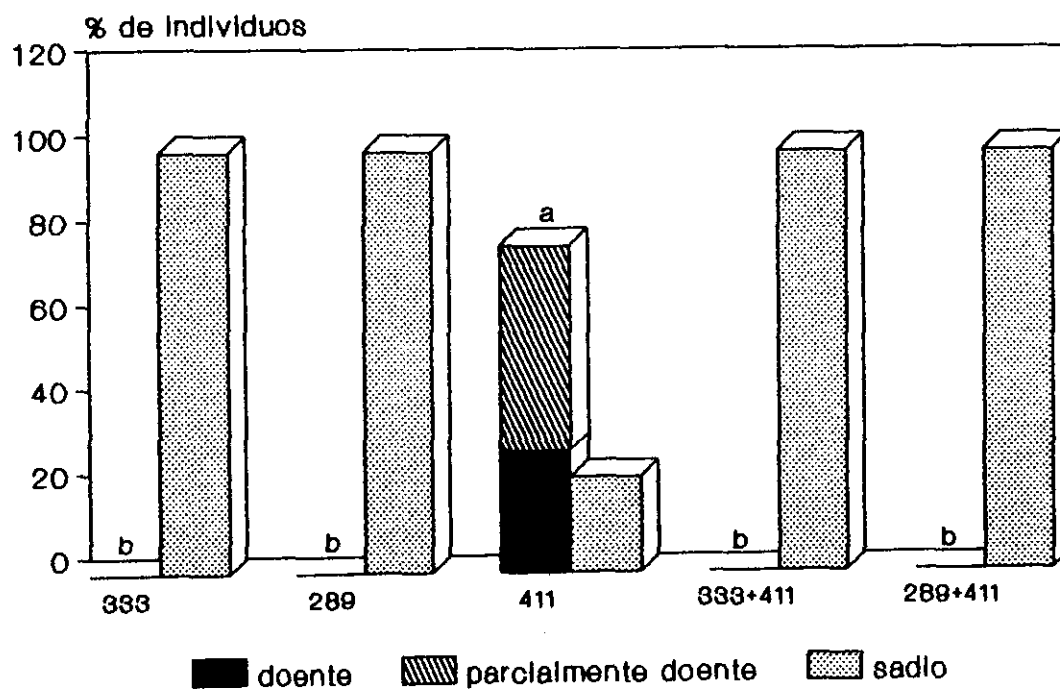


Figura 26 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 5 dias de incubação dos "seedlings" inoculados em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

A figura 27 ilustra as porcentagens de indivíduos sadios e doentes obtidas mediante o tratamento dos "seedlings" com a linhagem patogênica 466 isoladamente e 24 horas após o inóculo com a linhagem 333 ou com a linhagem 289. As letras indicam que os tratamentos combinados, 333+466 (a) e 289+466 (a), são iguais ao tratamento isolado com a linhagem 466, e estes diferem dos tratamentos controle 333 (b) e 289 (b). Neste caso, nem a linhagem bac⁺ e nem a linhagem controle 289 teve efeito sobre os sintomas desenvolvidos pela linhagem patogênica 466 em "seedlings" de tomate.

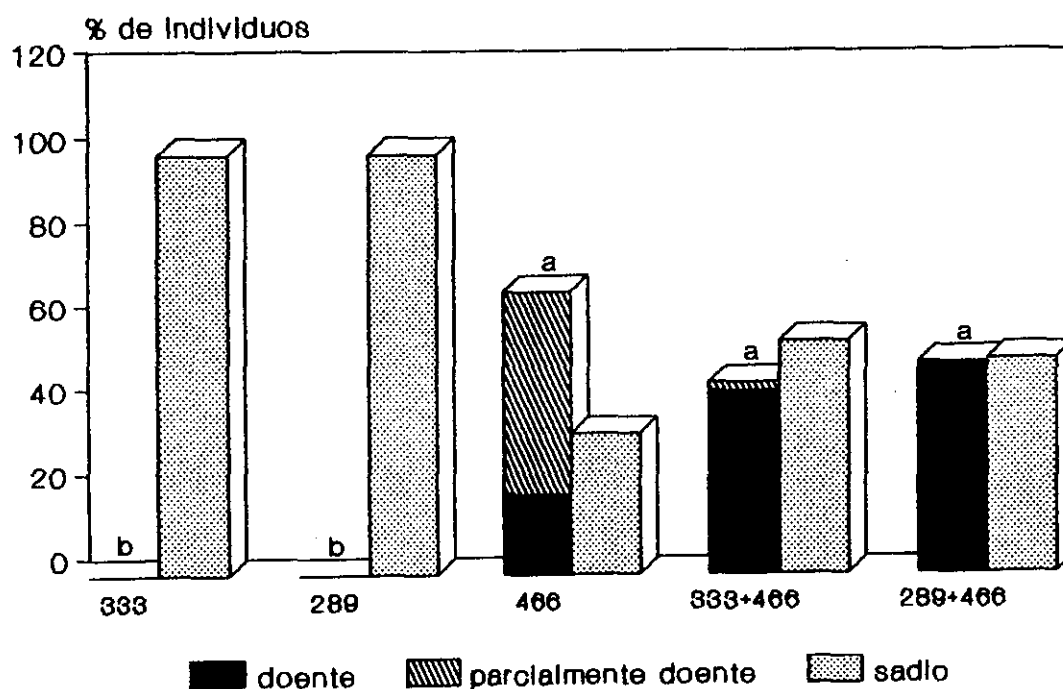


Figura 27 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios após 5 dias de incubação dos "seedlings" inoculados em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

2.3.3.3 Teste em hipocótilos

Novamente, a análise estatística dos resultados obtidos foi realizada considerando-se as classes de indivíduos doentes e sadios, analisados 7 dias após os tratamentos. Também neste caso, a classe de indivíduos doentes incluiu aqueles considerados parcialmente doentes. Foram classificados como parcialmente doentes os hipocótilos que apresentavam apenas as extremidades, menos de 50%, com apodrecimento. Os hipocótilos considerados doentes apresentavam-se totalmente, ou mais de 50% do tecido, com apodrecimento, caracterizado pela degradação do tecido do hipocótilo.

A figura 28 ilustra os resultados encontrados para o tratamento de hipocótilos com a linhagem patogênica 401 inoculada isoladamente e com a linhagem 333 ou com a 289. O inóculo da linhagem patogênica nos tratamentos combinados foi realizado simultaneamente ou 18 horas após o inóculo da linhagem 333 bac⁺ ou da linhagem 289 controle. O que se observou foi um efeito positivo sobre os hipocótilos quando se inoculou a linhagem 333 bac⁺ simultaneamente ou 18 horas antes da linhagem 401 patogênica, uma vez que se obteve 100%, ou quase, de indivíduos sadios, comparado com 100% de indivíduos doentes obtidos com o tratamento isolado com a linhagem patogênica 401. Isto não foi verificado quando se inoculou a linhagem 289 controle simultaneamente

com a linhagem patogênica 401, desde que 100% dos indivíduos apresentaram-se doentes. Já o tratamento onde a linhagem 289 foi inoculada 18 horas antes do inóculo da patogênica (b), mostrou-se igual aos tratamentos controle com a 333 (b) ou com a 289 (b) apenas, ou seja, 100% dos indivíduos sadios.

Os hipocótilos tratados com a linhagem 401 isoladamente e combinada com a linhagem 333 ou 289 são mostrados nas figuras 29 e 30, respectivamente.

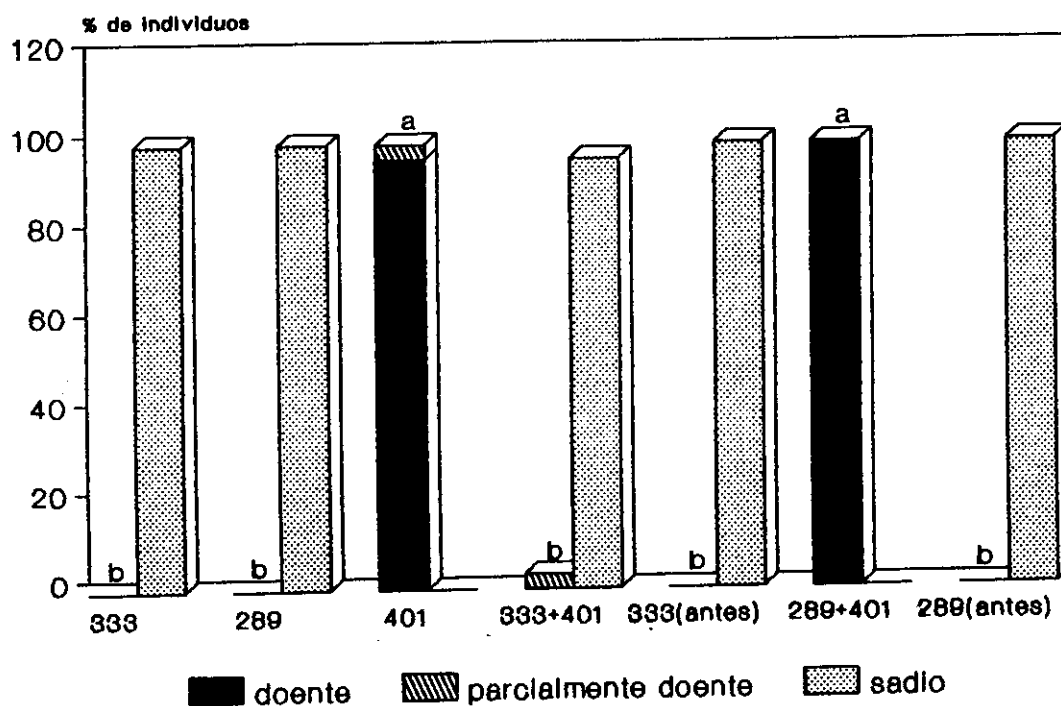


Figura 28 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios resultantes do tratamento de hipocótilos após 7 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

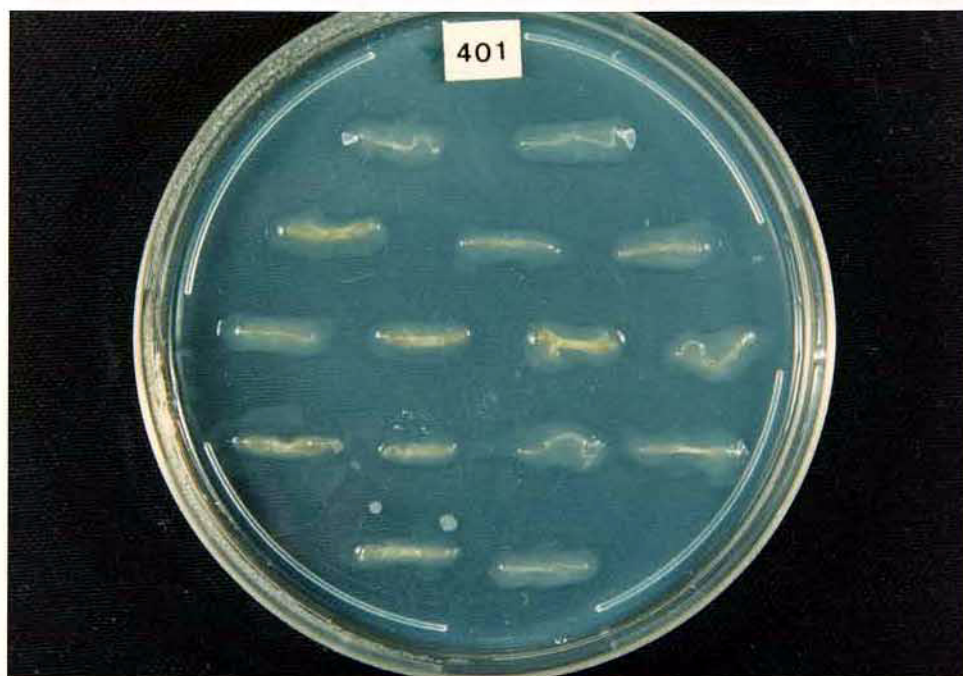


Figura 29 - Hipocótilos tratados com a linhagem patogênica 401 após 7 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C.

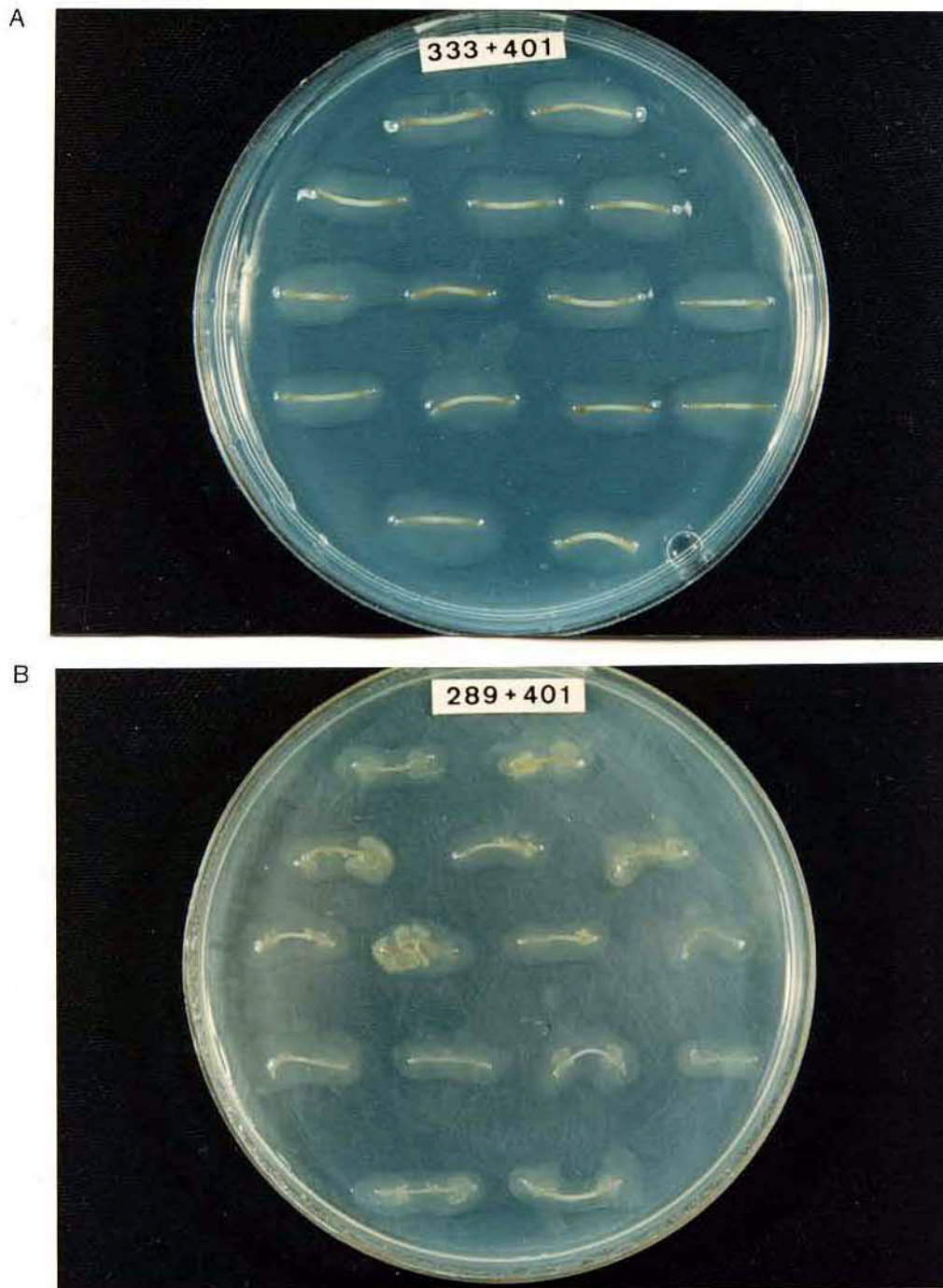


Figura 30 - Hipocótilos tratados com a linhagem 401 combinada simultaneamente com a linhagem 333 bac⁺ (A) e com a linhagem 289 (B), após 7 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C.

O histograma da figura 31 demonstra os resultados obtidos do tratamento de hipocótilos com a linhagem patogênica 411, inoculada isoladamente e combinada com a linhagem 333 ou com a 289. O inóculo da linhagem 411 nos tratamentos combinados foi realizado como descrito para a linhagem 401. Não houve valores intermediários dentro destes tratamentos, ou seja, obteve-se zero ou 100% de indivíduos doentes. Portanto, os tratamentos nos quais se obteve 100% de indivíduos doentes foi discriminado como "a", e aqueles em que o valor para esta classe foi zero, como "b". Verificou-se que nos tratamentos em que se inoculou a linhagem 333 simultaneamente ou 18 horas antes do inóculo com a linhagem patogênica 411, assim como no tratamento em que os hipocótilos foram inoculados 18 horas antes com a linhagem 289, obteve-se 100% de indivíduos sadios, contrastando com 100% de indivíduos doentes obtidos com o tratamento isolado com a linhagem 411. Por outro lado, todos os hipocótilos tratados simultaneamente com a linhagem 411 e a 289 mostraram-se doentes.

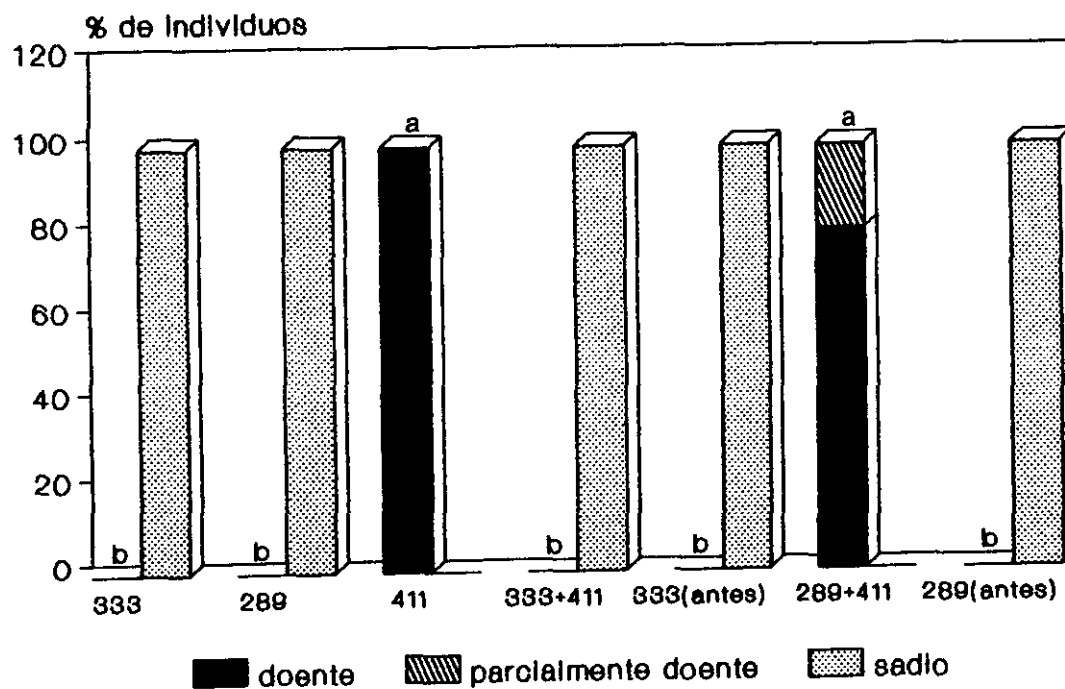


Figura 31 - Histograma da porcentagem de individuos doentes, parcialmente doentes e sadios resultantes do tratamento de hipocótilos após 7 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

A figura 32 mostra os resultados obtidos dos tratamentos de hipocótilos com a linhagem 466. Esta foi inoculada isoladamente e combinada com a linhagem 333 bac⁺ ou com a linhagem 289 controle, como descrito para as linhagens 401 e 411. O tratamento simultâneo dos hipocótilos com a linhagem 333 e a linhagem patogênica 466 (b) diferiu significativamente, ao nível de 5% de probabilidade, dos tratamentos controle 333 e 289 (c), uma vez que mais de 80% dos indivíduos desenvolveram sintomas. Por outro lado, este mesmo tratamento se mostrou estatisticamente diferente do tratamento isolado com a linhagem patogênica 466 (a). Já os tratamentos combinados onde a linhagem 333 bac⁺ ou a 289 controle foi inoculada 18 horas antes da linhagem patogênica 466, mostraram-se iguais aos tratamentos controle com a linhagem 333 ou com a 289 (c), desde que a porcentagem de indivíduos sadios foi 100% em todos estes casos. O tratamento onde a linhagem 289 foi inoculada simultaneamente com a linhagem patogênica 466, não teve qualquer efeito sobre os sintomas causados pela linhagem patogênica, pois todos os indivíduos tratados mostraram-se doentes depois de 7 dias.

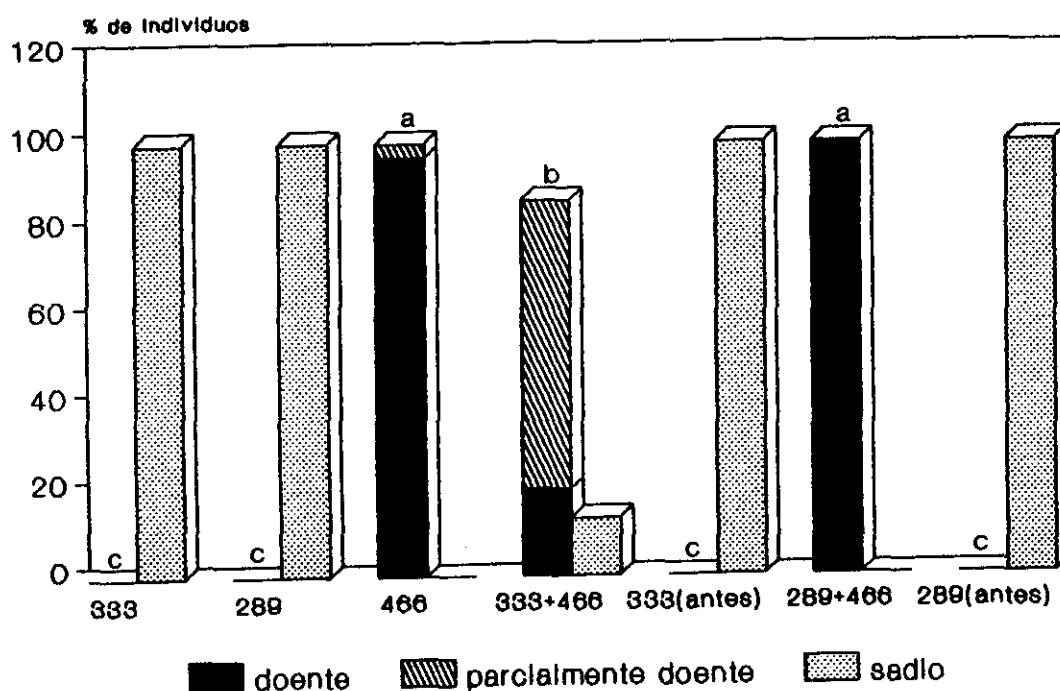


Figura 32 - Histograma da porcentagem de indivíduos doentes, parcialmente doentes e sadios resultantes do tratamento de hipocótilos após 7 dias de incubação em câmara de germinação a 28°C. Os tratamentos estão especificados abaixo das barras.

2.4 DISCUSSÃO

2.4.1 Competição *in vitro* entre a linhagem produtora de bacteriocina e a linhagem sensível

As curvas de crescimento das linhagens 333Sm^r e 411Sp^r construídas a partir do experimento de competição entre as duas linhagens (figuras 8 e 9) sugerem uma forte inibição do crescimento da linhagem sensível 411Sp^r em culturas mistas, embora o número de células viáveis da linhagem produtora 333Sm^r também tenha sido reduzido nestas culturas. Observa-se na figura 9 que à medida que se aumenta a proporção da linhagem produtora 333Sm^r, a inibição do crescimento de ambas as linhagens é maior.

Considerando-se as curvas construídas a partir do experimento controle de competição entre as linhagens 333Sp^r produtora de bacteriocina e a 479Sm^r insensível a esta em placa (figuras 10 e 11), vemos que também a linhagem 479 parece ser inibida quando em cultura mista, assim como a própria linhagem 333. Entretanto, neste caso, o perfil de variação da A₅₀₀ da cultura mista é similar ao da A da cultura 333 incubada isoladamente, e o número final de células viáveis desta última é inferior ao da linhagem 479. Já os resultados obtidos com o experimento controle de competição entre as linhagens 289Sm^r, que não inibe a

linhagem 411 em placa, e esta última (figuras 12 e 13), mostram que a linhagem 411 teve vantagem em cultura mista, sendo que a linhagem 289 é que foi deslocada (figura 13).

Entretanto, os dados obtidos a partir destes experimentos, em conjunto, não permitem afirmar que a inibição da linhagem 411 se deu realmente em virtude de sua sensibilidade em placa à bacteriocina produzida pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines*. Por outro lado, o comportamento da linhagem 411 em cultura mista com a linhagem 289 aliado ao fato de que a inibição da linhagem 411 é maior à medida que se aumenta a proporção da linhagem 333, são fortes indícios de que esta inibição seja um fenômeno específico provocado pela linhagem 333 bacteriocinogênica, e não apenas um efeito de competição entre as duas linhagens. Dessa forma, a redução do número de células viáveis da linhagem 333 em cultura mista poderia ser explicada pela própria tendência de queda da curva dessa linhagem após 15 horas de crescimento aliada à presença de produtos tóxicos liberados pelas células da linhagem 411 que estão sofrendo lise.

Resultados semelhantes foram registrados em experimentos de competição *in vivo* com *Pseudomonas syringae* em tecidos de feijão (Smidt & Vidaver, 1982) e com *Erwinia carotovora* em tubérculos de batata (Axelrood *et al.*, 1988), nos quais se verificou a inibição de linhagens sensíveis

quando co-inoculadas com a linhagem bacteriocinogênica, sendo a bacteriocina confirmada como a substância responsável pela inibição. Entretanto, há registros de experimentos de competição *in vivo* entre linhagens produtoras e não produtoras de bacteriocina de *Rhizobium phaseoli*, nos quais não foi detectada a vantagem seletiva das linhagens bacteriocinogênicas sobre as demais (Cassini & Azevedo, 1981). Resultados deste tipo também foram encontrados em experimentos de competição *in vitro* por Rosato e Daniels (comunicação pessoal), que não detectaram inibição do crescimento de uma linhagem sensível de *X. campestris* pv. *passiflorae* quando em cultura mista com a linhagem bac⁺ Ci2223 do pv. *citri*.

2.4.2 Inibição *in vitro* da linhagem sensível à bacteriocina utilizando o sobrenadante da cultura produtora

Os resultados obtidos com o experimento de inibição da linhagem sensível 411 crescida em meio NYG acrescido do sobrenadante esterilizado da cultura produtora (figuras 14 e 15), sugerem que a inibição da linhagem sensível se dá devido a alguma substância presente neste sobrenadante, e não à redução dos nutrientes presentes no meio NYG. Isto porque quando o meio NYG é acrescido de água, esta inibição da linhagem sensível não é observada. Nota-se ainda, nas figuras 14 e 15, que é necessário uma proporção de 1:1 (meio

NYG:sobrenadante) para que a inibição da linhagem 411 seja total, isto é, razão de crescimento igual a zero. Isto pode indicar que a substância responsável pela morte e lise da célula sensível não é reciclada, ou seja, não há um "turn over" das moléculas.

Entretanto, os resultados encontrados para a linhagem 479 crescida em meio NYG adicionado do sobrenadante da cultura produtora (figuras 16 e 17) não permitem afirmar que a inibição observada para a linhagem 411 realmente se deveu à bacteriocina produzida pela linhagem 333 e presente no sobrenadante, ou se a algum outro composto inespecífico resultante do metabolismo desta linhagem. Isto porque a linhagem 479 insensível à bacteriocina também foi inibida quando crescida na presença do sobrenadante. Por outro lado, observa-se na figura 17 que o perfil da curva de crescimento da linhagem 479 inoculada em NYG adicionado de sobrenadante, na proporção 1:1, é bem diferente daquele observado para a linhagem 411 cultivada nas mesmas condições. O número de células viáveis da linhagem 479 começa a decair apenas após 18 horas de crescimento, enquanto que o número de células viáveis da linhagem 411 não se altera desde o tempo zero, ou seja, não há crescimento algum. Esta inibição da linhagem 479 a partir da fase exponencial tardia poderia então ser explicada pela presença de algum outro composto presente no sobrenadante que começasse a ser incorporado nesta fase e provocasse a morte celular. Ainda, poderia ser resultado da

inespecificidade da ligação entre a bacteriocina e a célula da linhagem 479, insensível a esta substância em placa.

2.4.3 Inibição dos sintomas de patogenicidade em plantas de tomate pela linhagem 333 bacteriocinogênica

Estes experimentos foram realizados com o intuito de se avaliar o potencial da linhagem bacteriocinogênica 333 de *X. campestris* pv. *glycines* para inibir o desenvolvimento de sintomas em plantas de tomate por linhagens patogênicas do pv. *vesicatoria*. Diferentes metodologias foram testadas visando estabelecer um ensaio rápido que fornecesse resultados reproduzíveis e confiáveis.

2.4.3.1 Teste em sementes

A análise estatística dos resultados obtidos com o tratamento das sementes com a linhagem patogênica 401 isolado e combinado com a linhagem bac⁺ 333 ou com a linhagem controle 289 (figura 18) indicou que o tratamento com a linhagem 333 antes ou após o inóculo com a linhagem 401 reduziu significativamente os sintomas exibidos pelos "seedlings" após 9 dias de incubação. Estes resultados não foram obtidos quando as sementes foram tratadas com a linhagem controle 289 antes ou após o tratamento com a 401.

Esta linhagem tem sido utilizada correntemente no laboratório como controle em outros testes de patogenicidade, uma vez que não desenvolve sintomas nos cultivares de tomate utilizados. Entretanto, cabe salientar que a linhagem 289 não se mostrou inócua às sementes do cv. Petomech como se esperava, uma vez que mais de 60% exibiu algum tipo de sintoma, embora bem diferente daqueles apresentados pelos indivíduos considerados doentes.

Os resultados visualizados na figura 20 também sugerem um efeito positivo da linhagem bacteriocinogênica 333 sobre os "seedlings" quando esta foi inoculada antes ou após a linhagem patogênica 411. Entretanto, a análise estatística destes resultados indicam que os tratamentos combinados da linhagem 411 com a linhagem 333 não diferem significativamente ao nível de 5% do tratamento isolado com a linhagem 411, e que este não difere do tratamento isolado com a linhagem 333. Estes tratamentos, aparentemente tão distintos, foram considerados iguais pelo teste de Tukey devido ao valor elevado encontrado para a DMS (diferença mínima significativa), igual a 59,99. Este problema estatístico poderia ser contornado, possivelmente, aumentando-se o número de repetições dos tratamentos, ou mesmo utilizando um outro controle negativo nos testes de patogenicidade que se mostrasse mais confiável que a 289.

Quanto aos resultados obtidos com os tratamentos das sementes com a linhagem patogênica 466 (figura 21), a análise estatística indicou que os tratamentos combinados com a linhagem 333 reduziram de maneira significativa os sintomas desenvolvidos pela linhagem patogênica 466. Cabe lembrar, entretanto, que esta linhagem não é sensível à bacteriocina da linhagem 333 em placa. Resultados semelhantes foram registrados por Moore (1977), que verificou acentuada redução na incidência de galha em "seedlings" de cereja quando estes eram tratados com a linhagem 84 de *A. radiobacter* antes ou após terem sido inoculados com uma mistura de 6 linhagens patogênicas de *A. tumefaciens*, das quais 2 eram insensíveis à agrocina 84.

Esta inibição dos sintomas não foi observada nos tratamentos combinados com a linhagem 289, os quais foram considerados estatisticamente iguais ao tratamento isolado com a linhagem patogênica 466. Mais uma vez, é de interesse salientar que o tratamento controle com a linhagem 289 não se mostrou totalmente inócuo para as sementes de tomate e, portanto, os tratamentos combinados da linhagem patogênica 466 com esta linhagem não devem ser considerados.

Os tratamentos com o sobrenadante esterilizado da cultura produtora antes ou após o tratamento com qualquer uma das três linhagens patogênicas utilizadas (figura 22)

não demonstraram qualquer efeito de redução no desenvolvimento de sintomas por estas linhagens.

Estes tratamentos foram realizados também com sementes de pimentão cv. Magda (Produto Agroflora S/A, São Paulo, SP), dados não mostrados, exceto aqueles com a linhagem patogênica 466. Observou-se o mesmo efeito de inibição do desenvolvimento de sintomas pelas linhagens patogênicas 401 e 411, quando as sementes foram tratadas previamente ou posteriormente com a linhagem 333 bac⁺. Entretanto, isto não foi observado quando as sementes foram tratadas com a linhagem controle 289, antes ou após o tratamento com a linhagem patogênica.

Portanto, estes resultados indicam que para que ocorra a inibição dos sintomas desenvolvidos pelas linhagens patogênicas é necessário utilizar a cultura da linhagem 333 produtora de bacteriocina para tratar as sementes, e não apenas o sobrenadante esterilizado desta. O tratamento de sementes com uma linhagem bacteriocinogênica tem sido empregado com êxito no controle da galha da coroa, utilizando-se a linhagem 84 de *A. radiobacter*. Foi registrado um controle biológico significativo quando sementes de pêssigo foram inoculadas com a linhagem 84 antes de serem plantadas em solo naturalmente infestado com o patógeno, sendo que apenas 31% das plantas crescidas de sementes tratadas desenvolveram galha, comparado com 79% das

plantas oriundas de sementes não tratadas (Kerr, 1972). Dhanvantari (1976) obteve proteção significativa da galha da coroa em plantação comercial de pêsego por 2 anos quando tratou sementes com a linhagem 84 antes de plantá-las.

2.4.3.2 Teste em "seedlings"

A figura 23 mostra que o tratamento dos "seedlings" com a linhagem patogênica 401, após o inóculo da linhagem 333 bacteriocinogênica, diferiu estatisticamente do tratamento isolado com a linhagem patogênica 401, assim como do tratamento controle com a linhagem bac⁺, onde 100% dos indivíduos mostraram-se sadios. Isto significa que a linhagem 333 foi capaz de reduzir significativamente os sintomas, mas não a ponto do tratamento ser considerado igual ao tratamento isolado com a linhagem 333. Os mesmos resultados foram encontrados para o tratamento combinado com a linhagem 289, com a diferença que esta linhagem inibiu ainda mais os sintomas desenvolvidos pela linhagem 401 do que a linhagem 333.

Já a análise estatística dos resultados obtidos com o tratamento dos "seedlings" com a linhagem patogênica 411 (figura 26), após o inóculo da linhagem 333 bac⁺ ou da linhagem controle 289, mostrou que tanto uma como a outra inibiu significativamente o desenvolvimento de

sintomas pela linhagem 411, sendo o número de indivíduos sadios obtidos igual àquele verificado para os tratamentos controle com as linhagens 333 e 289.

A figura 27 ilustra os resultados obtidos com os tratamentos dos "seedlings" com a linhagem patogênica 466. A análise estatística dos dados mostrou que ambos os tratamentos com a linhagem 333 e com a 289 não inibiram significativamente o desenvolvimento de sintomas pela linhagem patogênica 466. Estes tratamentos mostraram-se estatisticamente iguais ao tratamento isolado com a linhagem 466.

Este teste forneceu resultados diferentes para cada linhagem patogênica combinada com as linhagens 333 ou 289. Além disso, os resultados obtidos com este teste diferem bastante daqueles obtidos com o teste de sementes, e indicam também que tanto a linhagem 333 bac⁺ como a linhagem controle 289 são capazes de inibir o desenvolvimento de sintomas pelas linhagens patogênicas 401 e 411.

Se considerarmos que neste teste o inóculo não pode ser sistematicamente padronizado, então alguns "seedlings" poderiam receber mais células do que outros, e, portanto, ser "mais" infectados. Assim, as próprias condições de ensaio poderiam ser um dos fatores responsáveis pelos resultados obtidos. Entretanto, antes de se afirmar

que o teste em "seedlings" não é viável para os propósitos deste trabalho, novos testes devem ser realizados a fim de se confirmar se os resultados encontrados são reproduzíveis, uma vez que foram feitas apenas duas repetições de cada tratamento.

Apesar dos resultados obtidos com este teste não terem sido conclusivos, o tratamento de "seedlings" de tomate já foi aplicado por vários investigadores utilizando o isolado 84 de *A. radiobacter* na prevenção da galha da coroa. Htay e Kerr (1974) registraram 100% de controle em plantas tratadas com a linhagem 84 imediatamente ou 1 ou 2 horas após o inóculo com o patógeno. Resultados similares foram obtidos com inóculos mistos de linhagens patogênicas sensíveis com a linhagem 84, na proporção 1:1 ou 1:10, em "seedlings" de tomate (Kerr & Htay, 1974; Moore, 1977).

2.4.3.3 Teste em hipocótilos

A análise estatística dos resultados obtidos neste experimento, considerando as três linhagens patogênicas utilizadas (figuras 28, 31 e 32), nos mostra que nos tratamentos combinados onde a linhagem bacteriocinogênica 333 ou a linhagem controle 289 foi inoculada simultaneamente com uma das linhagens patogênicas, a linhagem 333 foi capaz de reduzir significativamente os

sintomas desenvolvidos por qualquer uma das três linhagens patogênicas, ao passo que a linhagem controle 289 não teve qualquer efeito no sentido de proteger contra as linhagens patogênicas. Cabe salientar que a linhagem bac⁺ reduziu de maneira significativa os sintomas desenvolvidos pela linhagem 466, mas não drasticamente como o fez com as duas outras linhagens patogênicas, desde que a maior parte dos indivíduos analisados neste tratamento mostraram-se parcialmente doentes.

Quando a linhagem 333 ou a 289 foi inoculada 18 horas antes do inóculo de uma das linhagens patogênicas, ambas inibiram totalmente o desenvolvimento de sintomas nos hipocótilos. Neste último caso poderíamos sugerir que a linhagem controle 289 sendo inoculada 18 horas antes, poderia "colonizar" todo o tecido do hipocótilo, considerando que cada indivíduo consiste de um segmento de cerca de 1,2cm de comprimento, e assim impedir que a linhagem patogênica infectasse o hipocótilo. Entretanto, esta hipótese deve ser testada através da utilização de outras linhagens não bacteriocinogênicas e não patogênicas para a variedade de tomate utilizada.

Este teste foi também realizado com hipocótilos de pimentão cv. Cascadura Ikeda (Produto Agroflora S/A, São Paulo, SP), dados não mostrados, sendo a linhagem patogênica 401 ou 411 inoculada simultaneamente com

a linhagem 333 bac⁺ ou com a linhagem controle 289. Os resultados obtidos foram semelhantes àqueles encontrados para o teste em tomate, ou seja, a linhagem bacteriocinogênica inibiu o desenvolvimento de sintomas pelas linhagens patogênicas nos hipocótilos, ao passo que a linhagem 289 teve apenas um efeito de atenuação sobre os sintomas.

O ensaio em hipocótilos mostrou ser de rápida execução, e a demanda de "seedlings" para se realizar os tratamentos foi bem menor que nos outros dois testes realizados. Entretanto, os resultados podem variar dependendo de quando a inoculação da linhagem patogênica for realizada.

Capítulo 3

CONCLUSOES

Dos resultados encontrados com os experimentos realizados neste trabalho podemos concluir que:

3.1 Detecção da produção de bacteriocina

A linhagem 333 do pv. *glycines* produz bacteriocina frente às linhagens de *Xanthomonas campestris* testadas.

3.2 Caracterização da linhagem produtora

A linhagem bacteriocinogênica possui um espectro de ação biológica restrito. Além disso, a linhagem 333 produz a bacteriocina e a libera para o meio de cultura, sendo que em meio sólido contendo glicerol a produção é maior.

3.3 Caracterização parcial da bacteriocina

A bacteriocina da linhagem 333 tem um peso molecular superior a 12.000D e natureza proteica, embora esteja provavelmente associada a algum outro composto. Pode ser distinguida de bacteriófagos, uma vez que não é capaz de se reproduzir nas células sensíveis. Ainda, a bacteriocina produzida pela linhagem 333 é termosensível e altamente estável quando presente no sobrenadante "bruto" da cultura produtora. Apresenta ação bactericida sobre a célula sensível e baixa imunogenicidade.

3.4 Genética da produção da bacteriocina

Não foi possível determinar a localização do gene (ou genes) responsável pela produção da bacteriocina na linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* através dos experimentos realizados.

3.5 Avaliação do potencial da linhagem bac⁺ para proteção de plantas de tomate

Através dos testes realizados em sementes e hipocótilos de tomate cv. Petomech podemos concluir que a linhagem bacteriocinogênica tem um efeito positivo quando utilizada

antes ou depois do inóculo das linhagens patogênicas (no caso do teste em sementes) ou simultaneamente com estas (no caso do teste em hipocótilos), reduzindo de maneira significativa o desenvolvimento de sintomas de patogenicidade. Este efeito não foi verificado para a linhagem controle 289.

Capítulo 4

APLICAÇÕES E PERSPECTIVAS

4.1 APLICAÇÕES

4.1.1 Controle Biológico de Fitopatógenos

O potencial de linhagens bacteriocinogênicas para o controle de fitopatógenos foi amplamente revisado no capítulo 2 deste trabalho, principalmente com relação à linhagem K-84 de *A. radiobacter*, agente já utilizado comercialmente em vários países. Os aspectos vantajosos de se utilizar linhagens produtoras de bacteriocina no controle biológico, assim como as limitações concernentes ao seu uso, foram extensivamente abordados.

4.1.2 Estudos de Tipagem e Epidemiologia

O estudo da produção de bacteriocinas visa, em muitos casos, estabelecer esquemas de tipagem para identificar ou diferenciar linhagens ou espécies bacterianas, uma vez que a produção de grupos particulares de bacteriocinas tende a ser

restrita a certos grupos taxonômicos. Estes esquemas de tipagem podem ser baseados também no padrão de sensibilidade a diferentes bacteriocinas, desde que estas matam especificamente as células da bactéria sensível. Uma identificação mais precisa de linhagens pode ser obtida pela combinação de ambos os métodos (Tagg *et al.*, 1976; Vidaver, 1983). Estes esquemas de tipagem têm sido discutidos e sugeridos por vários investigadores para diferentes bactérias, como *Lactobacillus acidophilus* (Barefoot & Klaenhammer, 1983); *Rhizobium* (Gross & Vidaver, 1978); *Corynebacterium* (Echandi, 1976; Gross & Vidaver, 1979); *Erwinia* (Echandi & Moyer, 1979); *Pseudomonas* (Vidaver *et al.*, 1972; Cuppels *et al.*, 1978; Vidaver & Buckner, 1978); *Yersinia* (Cafferkey *et al.*, 1989); *Xanthomonas* (Xu & Gonzalez, 1991), entre outras.

As bacteriocinas são ainda usadas com fins epidemiológicos, ou seja, para se seguir o "rastro" de determinados patógenos, identificando sua fonte e área de distribuição (Vidaver, 1983). Estes estudos são geralmente empregados em casos de infecções adquiridas em hospitais, cujas fontes são determinadas através do isolamento das bactérias de cada paciente e realizando a tipagem por bacteriocina, combinada com outros sistemas de tipagem (Aber & Mackel, 1981). A clonagem e purificação da klebicina B foram realizadas por James (1988) com o intuito de desenvolver um painel de klebicinas de título alto e

receptor-específicas para uso em esquemas de tipagem com fins epidemiológicos, desde que espécies de *Klebsiella* são causas comuns de infecções hospitalares. Estudos da produção e sensibilidade a bacteriocinas para aplicação na epidemiologia vêm sendo realizados também com espécies de estreptococos orais e estafilococos (Tzannetis et al., 1991).

4.1.3 Agentes anti-cáries

A bactéria *Streptococcus mutans* é considerada como o principal agente etiológico de cárie dental no homem, e a eliminação deste organismo da cavidade oral oferece uma estratégia potencialmente efetiva na prevenção de cáries. Assim, bacteriocinas produzidas por *S. mutans* são de considerável interesse, uma vez que estes inibidores podem eliminar *S. mutans* da placa dental sem afetar consideravelmente outras bactérias da microflora normal (Tagg et al, 1976). Ikeda et al. (1985) avaliaram o potencial da bacteriocina de *S. mutans* C3603 na prevenção de cáries em ratos e homens, uma proteína estável em uma ampla faixa de pH, ao calor e a várias enzimas digestivas. O autor discute ainda a vantagem do uso da bacteriocina sobre o antibiótico, desde que a aplicação deste último pode ter efeitos indesejáveis a longo prazo, resultando na resistência bacteriana e infecções oportunistas. Estudos com

o mesmo intuito têm sido desenvolvidos por outros pesquisadores utilizando diferentes linhagens de *S. mutans* (Hamada *et al.*, 1986; Kurita & Hirasawa, 1988).

4.1.4 Bioconservantes Alimentares

O estudo da produção de bacteriocinas dentre as bactérias do ácido lático se justifica, geralmente, pela habilidade destas bacteriocinas de inibir muitos patógenos presentes em alimentos, o que as torna atraentes como agentes potenciais na preservação de alimentos. Elas são degradadas por enzimas proteolíticas do trato gastrointestinal e parecem não ser tóxicas nem antigênicas para animais, assim podem ser usadas para aumentar a segurança e o período de conservação de muitos alimentos (Daeschel, 1989; Klaenhammer, 1988). Das bactérias do ácido lático, as bacteriocinas nisina, diplococcina e as pediocinas foram bem caracterizadas (Davey & Richardson, 1981; Davey, 1984; Daeschel & Klaenhammer, 1985; Gonzalez & Kunka, 1987; Klaenhammer, 1988; Spelhaug & Harlander, 1989), sendo que a nisina já é utilizada correntemente como agente de preservação alimentar em muitos países, aprovada para uso pela FDA, em certos queijos pasteurizados (Daeschel, 1989). Visando a posterior aplicação comercial efetiva, a otimização da produção destas substâncias por modificação da regulação gênica, assim como dos parâmetros de crescimento

do meio, vem sendo investigada correntemente (Harmon & McKay, 1987; Buckman *et al.*, 1988; Belkum *et al.*, 1991; Biswas *et al.*, 1991).

Dentre as espécies de *Propionibacterium*, o MICROGARD, um produto do leite desnatado, fermentado por *P. shermanii* e pasteurizado, foi aprovado pela FDA e está sendo usado como preservativo em requeijão. Foi demonstrado que o componente inibitório real deste produto é uma substância de baixo peso molecular, termo-estável e proteínáceo (Daeschel, 1989).

4.1.5 Marcadores Genéticos

Um primeiro passo para se realizar estudos genéticos com diferentes espécies bacterianas, é o desenvolvimento de um sistema de vetor adequado ao organismo em questão, e um dos primeiros atributos a se considerar num vetor de clonagem é a existência de um marcador genético. A produção de bacteriocinas é, muitas vezes, determinada por genes plasmidiais (Tagg *et al.*, 1976; Reeves, 1965) e já foi sugerida como marcador genético na seleção de recombinantes (Garnier & Cole, 1986). Vlasak *et al.* (1986) sugeriram a utilização da sensibilidade a agrocina 84 como marcador do plasmídio Ti em conjugações, nos casos onde a frequência de mutação espontânea para resistência a um determinado antibiótico é alta.

Embora um grande número de tipos de plasmídios estejam disponíveis, aqueles adequados para usos na produção industrial em larga-escala são limitados. Dentre as características desejáveis para produção em grande escala, destaca-se a estabilidade do plasmídio na cultura de células contínua. Lauffenburger (1987) aponta uma série de vantagens em se usar a produção de bacteriocinas como um método de se manter células portadoras do plasmídio de interesse em culturas contínuas. Dentre estas vantagens, o autor cita a possibilidade da ação bactericida da bacteriocina sobre células que perderam o plasmídio durante a divisão celular, o que poderia superar a vantagem da alta taxa de crescimento dessas células com relação às células portadoras de plasmídios.

4.1.6 Sondas para detecção de genes *bac*⁺

A clonagem de genes de bacteriocina pode ser bastante útil para a construção de probes específicos visando a detecção de genes de bacteriocina em linhagens relacionadas. O estudo a nível molecular fornece assim uma maior compreensão sobre a estrutura e a ação das bacteriocinas, o que pode facilitar a construção e melhoramento de linhagens produtoras de bacteriocinas usadas para os diversos fins citados anteriormente.

A clonagem de genes de bacteriocina e construção de probes específicos vêm sendo realizadas para bactérias Gram-positivas, como *Lactococcus lactis* (Belkum *et al.*, 1989), e gram negativas, como *Erwinia chrysanthemi* (Zhongmin *et al.*, 1988).

Algumas bacteriocinas podem ainda apresentar aplicações diversas, mas suas propriedades são mais particulares, ou seja, caracterizam bacteriocinas produzidas por determinadas espécies de bactérias. Em culturas de tecido de origem animal, isto é, sem qualquer barreira física, a bacteriocina piocina S2, produzida por *Pseudomonas aeruginosa*, parece mostrar uma toxicidade seletiva com relação a algumas células tumorais (Watanabe & Saito, 1980). Estes resultados sugerem uma possível aplicação na quimioterapia da medicina animal e humana.

Algumas bacteriocinas, como as colicinas e a cloacina DF13, são sintetizadas como proteínas maduras e solúveis no citoplasma, e são excretadas para o meio de cultura mediante a expressão de um produto gênico particular, a proteína de liberação de bacteriocina (BRP) (De Graaf & Oudega, 1986). Esta proteína ativa a fosfolipase A da membrana externa, resultando na permeabilização das membranas interna e externa e conseqüente liberação de algumas proteínas citoplasmáticas e periplasmáticas. Hsiung *et al.* (1989)

utilizaram esta habilidade da BRP da cloacina DF13 para construir um sistema capaz de excretar eficientemente e de maneira regulada o hormônio de crescimento humano em meio de cultura de células de *E. coli*. O autor aponta a simplicidade do processo de purificação da proteína liberada como uma das principais vantagens em se utilizar um sistema deste tipo para produção e excreção de proteínas de interesse médico ou industrial.

4.2 PERSPECTIVAS

Existem vários aspectos deste trabalho que poderiam ser abordados com maior precisão se novas estratégias experimentais fossem utilizadas. Neste item são apontadas algumas perspectivas a partir das quais se pode dar continuidade ao trabalho já desenvolvido.

4.2.1 Perfil plasmidial da linhagem produtora

Para se determinar o número preciso de plasmídios presentes na linhagem produtora 333, as bandas plasmidiais poderiam ser purificadas uma a uma a partir do gel de agarose e submetidas, posteriormente, a digestões enzimáticas com 2 ou 3 enzimas diferentes. Analisando-se o

padrão de restrição das bandas extraídas do gel poderíamos concluir quais plasmídios são iguais.

Para o cálculo do PM de cada plasmídio, um plasmídio intacto com PM conhecido poderia ser utilizado como padrão na eletroforese. A comparação da migração relativa do padrão com as migrações dos outros plasmídios forneceria a estimativa do PM.

4.2.2 Purificação da bacteriocina

Com o intuito de se purificar a bacteriocina, seria interessante, antes de tudo, tentar aumentar o seu título no sobrenadante da cultura produtora através da indução com luz ultra-violeta ou mitomicina C (Reeves, 1965; Tagg *et al.*; 1976).

A utilização de meios de cultura muito complexos pode também dificultar a purificação da bacteriocina. Meios de cultura alternativos poderiam ser testados, mas de maneira que não reduzisse a produção da substância. Ainda, as células da linhagem produtora poderiam ser crescidas sobre papel celofane em meio sólido. Considerando que, em muitos casos, parte da bacteriocina produzida e liberada fica "aderida" às células produtoras (Tagg *et al.*, 1976), esta estratégia permitiria a sua purificação sem a necessidade de

precipitar os componentes do meio. O papel celofane seria lavado em água estéril, as células seriam separadas do sobrenadante e este seria posteriormente concentrado. Para melhorar a extração da bacteriocina ligada às células produtoras, substâncias como cloreto de sódio ou lisozima poderiam ser utilizadas (Tagg *et al.*, 1976). Também o tratamento com calor poderia ser uma alternativa.

Reduzir a concentração de sulfato de amônia utilizado na precipitação do sobrenadante poderia também facilitar a purificação da bacteriocina, uma vez que um menor número de substâncias presentes no meio seria precipitado juntamente com a bacteriocina. Por outro lado, esta concentração reduzida talvez pudesse precipitar menos bacteriocina.

Os resultados apresentados neste trabalho indicam que grande parte da bacteriocina concentrada se perdeu durante as cromatografias em coluna, quando uma amostra viscosa e parecendo conter agregados era aplicada à coluna. A adição de compostos que pudessem solubilizar a solução, como SDS por exemplo (Joerger & Klaenhammer, 1986), poderia melhorar os resultados obtidos com a cromatografia. Ainda, a utilização de outras matrizes que não a Sepharose 4B, como Sephadex G-200, já utilizada para purificar propionicina (Lyon & Glatz, 1990) e helveticina J (Joerger & Klaenhammer, 1986), ou DEAE celulose, usada na purificação de

bacteriocinas de *Clostridium* (Higa et al., 1991), talvez fornecesse resultados mais satisfatórios.

Seria interessante ainda utilizar um marcador de peso molecular na cromatografia em coluna para que o PM da bacteriocina pudesse ser estimado.

Após a purificação através de cromatografia em coluna, a amostra de bacteriocina poderia ser submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida. O mesmo gel poderia conter o padrão de peso molecular e amostras de bacteriocina aplicadas em duplicata. Parte deste gel seria então corado e outra parte não. Fatias do gel não corado, que contivessem as bandas proteicas, seriam colocadas em tampão, esmagadas e mantidas em temperatura e tempo adequados para permitir a potencial eluição da bacteriocina (Joerger & Klaenhammer, 1986). A solução de cada fração, separada dos fragmentos de gel, seria posteriormente testada contra a linhagem sensível para a detecção de atividade biológica.

4.2.3 Genética da produção de bacteriocina

A fim de se obter um mutante *bac⁻*, uma alternativa seria tentar a exclusão dos plasmídios nativos da linhagem selvagem produtora de bacteriocina através da utilização de um outro plasmídio incompatível e de PM conhecido. Este

plasmídio teria que ser ainda de fácil eliminação. Caso o mutante *bac⁻* fosse obtido, o caráter plasmidial da produção de bacteriocina seria confirmado, e este mutante poderia ser posteriormente complementado com um banco plasmidial da linhagem *bac⁺*. Ainda, a obtenção deste mutante poderia permitir a identificação de uma banda proteica correspondente à bacteriocina, através da comparação do padrão de bandas em gel de poliacrilamida entre a linhagem *bac⁺* e o mutante *bac⁻*. Se o mutante *bac⁻* não fosse obtido, a produção de bacteriocina poderia ser associada com o cromossomo, e outros métodos de mutagênese teriam que ser empregados, como luz UV ou o agente químico EMS.

Uma outra possibilidade seria a utilização do plasmídio F^{lac}::Tn5, já utilizado neste trabalho, porém sem êxito. Tem sido observado ultimamente neste laboratório, para mais de um patovar de *Xanthomonas campestris*, que o plasmídio F^{lac}::Tn5, quando transferido para certas linhagens receptoras de *Xanthomonas*, promove a eliminação de todos os plasmídios nativos da linhagem selvagem. Como este é um plasmídio termosensível, ele seria facilmente eliminado. Por outro lado, a temperatura ótima de crescimento de *Xanthomonas* é de 28°C, o que poderia dificultar a eliminação do F^{lac}.

4.2.4 Potencial para proteção de plantas

Embora os resultados obtidos neste trabalho tenham evidenciado um efeito positivo da linhagem 333 bac⁺ sobre a inibição dos sintomas de patogenicidade em "seedlings" de tomate, alguns estudos complementares se mostram necessários a fim de esclarecer vários aspectos.

Um desses aspectos seria confirmar se este efeito positivo se deve ou não à bacteriocina produzida pela linhagem 333. Isto poderia ser verificado através da detecção de bacteriocina no tecido da planta. Para isto o extrato de tecido dos "seedlings" tratados com a linhagem 333, depois de centrifugado (para separação entre as células e o sobrenadante) e esterilizado em filtro (Smidt & Vidaver, 1982), teria que ser testado *in vitro* contra a linhagem sensível.

Outro aspecto seria ratificar se as linhagens não bacteriocinogênicas realmente não têm o mesmo efeito sobre o "seedling" infectado, uma vez que foi usada apenas uma linhagem como controle negativo e que não forneceu resultados confiáveis. Assim, seria interessante utilizar outras linhagens não patogênicas e não bacteriocinogênicas como controle negativo. Ainda, utilizar várias linhagens patogênicas sensíveis e insensíveis à bacteriocina, e inoculá-las isolada e combinadamente.

Uma questão que surge dos resultados obtidos no capítulo 2, é por quanto tempo se prolonga o efeito positivo da linhagem bac⁺ nas plantas de tomate quando as sementes são tratadas. Seria interessante transplantar os "seedlings" mantidos em laboratório para solo em estufas apropriadas, e realizar inoculações com linhagens patogênicas em diferentes fases de crescimento da planta e analisar o efeito do tratamento de sementes. Poderia-se ainda tentar tratar estes "seedlings" com a cultura bac⁺ antes de transplantá-los. Avaliar o potencial desta linhagem bacteriocinogênica a nível de experimentos de campo é também uma perspectiva de fundamental importância no futuro.

RESUMO

Com o intuito de se detectar linhagens de *Xanthomonas campestris* produtoras de bacteriocina com ação inibitória sobre linhagens do patovar *vesicatoria*, dezenove linhagens deste patovar e uma linhagem do pv. *glycines* foram testadas entre si. Verificou-se que apenas a linhagem 333 do pv. *glycines* produziu bacteriocina frente às indicadoras testadas.

A linhagem bacteriocinogênica 333 apresentou espectro de ação inibitória restrito, sendo apenas alguns outros patovares de *X. campestris* e a linhagem de *R. leguminosarum* biovar. *phaseoli* utilizada sensíveis à bacteriocina desta linhagem. A produção desta substância mostrou ser maior em meio sólido contendo glicerol e na fase descendente da curva de crescimento da linhagem produtora.

Através da precipitação com sulfato de amônia e cromatografia de exclusão em Sepharose 4B, a bacteriocina foi parcialmente purificada e caracterizada. A natureza proteica da substância inibitória foi confirmada, assim como sua termosensibilidade e baixa capacidade de induzir resposta imune. Verificou-se ainda o efeito bactericida da bacteriocina sobre a célula sensível.

Na tentativa de se localizar o gene para produção de bacteriocina, foram realizados experimentos de conjugação e de mutagênese da linhagem produtora, através da utilização de transposons e do mutagênico químico NTG. Entretanto, não se obteve êxito com as abordagens utilizadas e a genética da produção de bacteriocina pela linhagem 333 de *X. campestris* pv. *glycines* permanece por ser investigada.

Através de experimentos de competição *in vitro* entre a linhagem produtora e a linhagem sensível, observou-se acentuada inibição da linhagem sensível. Ainda, os resultados obtidos dos experimentos de inibição da linhagem sensível utilizando o sobrenadante esterilizado da cultura produtora, sugerem fortemente que a inibição observada se deveu a algum composto de ação específica presente neste sobrenadante.

Os ensaios *in vivo*, visando a avaliação do potencial da linhagem bacteriocinogênica para proteção de plantas de tomate contra a mancha bacteriana, foram realizados em sementes, hipocótilos e "seedlings" de tomate var. Petomech. Para isso, utilizou-se tanto a cultura de células bac⁺ como o sobrenadante esterilizado desta. Os resultados mais claros foram obtidos com o tratamento de sementes, onde pôde-se observar uma proteção significativa contra a infecção. Por outro lado, não foi verificado qualquer efeito quando se utilizou apenas o sobrenadante estéril da cultura bac⁺.

ABSTRACT

The detection of bacteriocin producing strains of *Xanthomonas campestris* inhibitory toward strains of *pv. vesicatoria* was carried out using nineteen strains of this pathovar and one strain of *pv. glycines*. Only *X. campestris pv. glycines* strain 333 produced bacteriocin against the indicators used.

The bacteriocinogenic strain 333 showed a restricted inhibitory activity spectrum and the production of the inhibitory compound was higher in glycerol-containing medium and in the descendent phase of growth curve.

The bacteriocin was partially purified and characterized by ammonium sulfate precipitation and sepharose 4B column chromatography. The proteic nature of the inhibitory substance was confirmed, as well as its thermosensitivity, low ability of inducing immune response and bactericide effect over the sensitive cell.

Trying to isolate a *bac⁻* mutant, mutagenesis experiments were carried out with the producing strain using transposons and the chemical mutagenic NTG. However, the attempts were not successful and the genetics of bacteriocin

production by *X. campestris* pv. *glycines* strain 333 remains to be investigated.

The sensitive strain was highly inhibited by the producing strain in *in vitro* competition experiments. The results obtained from the inhibition experiments of the sensitive strain, using the sterile producing culture supernatant, strongly suggest that the observed inhibition was due to a compound with specific activity present in this supernatant.

The evaluation of the bacteriocinogenic strain potential for tomato plants protection against leaf spots was carried out with *in vivo* assays with seeds, hypocotyls and seedlings of tomato var. Petomech. In these experiments both the producing cell culture and its sterile supernatant were employed. The best results were obtained with the seed treatment, where a significant protection against the infection was observed. On the other hand, no effect was registered when only the sterile supernatant of the producing culture was used.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ABER, R. C. & MACKEL, D. C. 1981. Epidemiologic typing of nosocomial microorganisms. *Am. J. Med.* 70:899-905.

ADELBERG, E. A.; MANDEL, M. & CHEN, G. C. C. 1965. Optimal conditions for mutagenesis by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in *Escherichia coli* K12. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 18:788-795.

AGRIOS, G. N. *Plant pathology*. 1988. 3rd ed. Academic Press, Inc. San Diego, California.

ALCONERO, R. 1980. Crown gall of peaches from Maryland, South Carolina, and Tennessee and problems with biological control. *Plant Disease* 64:835-838.

AXELROOD, P. E.; RELLA, M. & SCHROTH, M. N. 1988. Role of antibiosis in competition of *Erwinia* strains in potato infection courts. *Appl. Environ. Microbiol.* 54:1222-1229.

BAREFOOT, S. F. & KLAENHAMMER, T. R. 1983. Detection and activity of lactacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1808-1815.

- BARRY, G. T.; EVERHART, D. L.; ABBOT, V. & GRAHAM, M. G.
1965. Preparation, properties and relationship of substances processing colicine A activity obtained from enterobacteriaceae. *Zbl. Bakt. Par. Inf. Hyg. A* 196:248-263.
- BELKUM, M. J.; HAYEMA, B. J.; GEIS, A.; KOK, J. & VENEMA, G.
1989. Cloning of two bacteriocin genes from a lactococcal bacteriocin plasmid. *Appl. Environ. Microbiol.* 55:1187-1191.
- BELKUM, M. J.; HAEYMA, B. J.; JEENINGA, R. E.; KOK, J. & VENEMA, G. 1991. Organization and nucleotide sequences of two lactococcal bacteriocin operons. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:492-498.
- BIAGI, C. M. R. *Fatores que atuam na produção de bacteriocinas de bactérias fitopatogênicas.* 1982. Tese. Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiróz", Piracicaba (SP).
- BIRNBOIM, H. C. & DOLY, J. 1980. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucl. Ac. Res.* 7:1513-1523.

- BISWAS, S. R.; RAY, P.; JONHSON, M. C. & RAY, B. 1991. Influence of growth conditions on the production of a bacteriocin, pediocin Ach, by *Pediococcus acidilactici* H. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1265-1267.
- BOYER, H. W. & ROULLAND-DUSSOIX, D. 1969. A complementation analysis of the restriction and modification in *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41:459-472.
- BRADLEY, D. E. 1967. Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 31:230-314.
- BUCKMAN, G. W.; BANERJEE, S. & HANSEN, N. 1988. Structure, expression, and evolution of a gene encoding the precursor of nisin, a small protein antibiotic. *J. Biol. Chem.* 263:16260-16266.
- BUSTAMANTE, P. G. & CIAMPI, L. P. 1989. Control biológico de la marchitez bacteriana de la papa (*Solanum tuberosum* L.) inducida por *Pseudomonas solanacearum* E. F. SMITH. *Rev. Microbiol.* 20:18-26.
- BUSTAMANTE, P. G.; CIAMPI, L. P. & GUAQUIL, V. G. 1989. Inhibición "in vitro" de *Pseudomonas solanacearum* E. F. Smith. utilizando la cepa antagonista BC8 de *Pseudomonas fluorescens*. *Rev. Microbiol.* 20:27-33.

- CAFFERKEY, M. T.; McCLEAN, K. & DRUMM, M. E. 1989. Production of bacteriocin-like antagonism by clinical isolates of *Yersinia enterocolitica*. *J. Clin. Microbiol.* 27:677-680.
- CASSINI, S. T. A. & AZEVEDO, J. L. 1981. Competição entre estirpes produtoras e não produtoras de bacteriocinas de *Rhizobium phaseoli*. In: XI Congresso brasileiro de microbiologia, Florianópolis, SC.
- CAUFIELD, P. W.; SHAH, G. R. & HOLLINGSHEAD, S. K. 1990. Use of transposon Tn916 to inactivate and isolate a mutacin-associated gene from *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 58:4126-4135.
- COOKSEY, D. A. & MOORE, L. W. 1980. Biological control of crown gall with fungal and bacterial antagonists. *Phytopathology* 70:506-509.
- CUPPELS, D. A.; HANSON, R. S. & KELMAN, A. 1978. Isolation and characterization of a bacteriocin produced by *Pseudomonas solanacearum*. *J. Gen. Microbiol.* 109:295-303.
- DAESCHEL, M. A. & KLAENHAMMER, T. R. 1985. Association of a 13.6-megadalton plasmid in *Pediococcus pentosaceus* with bacteriocin activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 50:1538-1541.

- DAESCHEL, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43:164-167.
- DANIELS, M. J. Pathogenicity of *Xanthomonas campestris* towards plants. 1989. In: HOPWOOD, D. A. & CHATER, K. F. ed. *Genetic of bacterial diversity*. Academic Press.
- DAS, P. K.; BASU, M. M. & CHATTERJEE, G. C. 1978. Studies on the mode of action of agrocin 84. *J. Antibiot.* 31:490-492.
- DAVEY, G. P. & RICHARDSON, B. C. 1981. Purification and some properties of diplococcin from *Streptococcus cremoris* 346. *Appl. Environ. Microbiol.* 41:84-89.
- DAVEY, G. P. 1984. Plasmid associated with diplococcin production in *Streptococcus cremoris*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48:895-896.
- DE FEYTER, R.; KADO, C. I. & GABRIEL, D. W. 1990. Small, stable shuttle vectors for use in *Xanthomonas*. *Gene.* 88:65-72.
- DE GRAAF, F. K. & OUDEGA, B. 1986. Production and release of cloacin DF13 and related colicins. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 125:183-205.

- DHANVANTARI, B. N. 1976. Biological control of crown gall of peach in southwestern Ontario. *Plant Dis. Rep.* 60:549-551.
- EBINA, Y.; KISHI, F. & NAKAZAWA, A. 1982. Direct participation of *lexA* protein in repression of colicin E1 synthesis. *J. Bacteriol.* 150:1479-1481.
- ECHANDI, E. 1976. Bacteriocin production by *Corynebacterium michiganense*. *Phytopathol.* 66:430-432.
- ECHANDI, E. & MOYER, J. W. 1979. Production, properties, and morphology of bacteriocins from *Erwinia chrysanthemi*. *Phytopathology.* 69:1204-1207.
- ELLIS, J. G.; KERR, A.; van MONTAGU, M. & SCHELL, J. 1979. *Agrobacterium*: genetic studies on agrocin 84 production and the biological control of crown gall. *Physiol. Plant Pathol.* 15:311-319.
- ENGLER, G.; HOLSTERS, M.; van MONTAGU, M.; SCHELL, J.; HERNALSTEENS, J. P. & SCHILPEROORT, R. 1975. Agrocin 84 sensitivity: a plasmid determined property of *Agrobacterium tumefaciens*. *Mol. Gen. Genet.* 138:345-349.

EXPERT, D. & TOUSSAINT, A. 1985. Bacteriocin-resistant mutants of *Erwinia chrysanthemi*: possible involvement of iron acquisition in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 163:221-227.

FARRAND, S. K.; SLOTA, J. E.; SHIM, J. -S. & KERR, A. 1985. Tn5 insertions in the agrocin 84 plasmid: the conjugal nature of pAgK84 and the locations of determinants for transfer and agrocin 84 production. *Plasmid.* 13:106-117.

FAVRET, M. E. & YOUSTEN, A. A. 1989. Thuricin: the bacteriocin produced by *Bacillus thuringiensis*. *J. Invert. Pathol.* 53:206-216.

FETT, W. F.; DUNN, M. F.; MAHER, G. T. & MALEEF, B. E. 1987. Bacteriocins and temperate phage of *Xanthomonas campestris* pv. *glycines*. *Current Microbiol.* 16:137-144.

FIGURSKI, H. & HELINSKI, D. R. 1979. Replication of an origin containing derivative of plasmid RK2 dependent on a plasmid function provided in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 76:1648-1652.

FLEMING, H. P.; ETCHELLS, J. L. & COSTILOW, R. N. 1975. Microbial inhibition by an isolate of *Pediococcus* from cucumber brines. *Appl. Microbiol.* 30:1040-1042.

- GARNIER, T. & COLE, S. T. 1986. Characterization of a bacteriocinogenic plasmid from *Clostridium perfringens* and molecular genetic analysis of the bacteriocin-encoding gene. *J. Bacteriol.* 168:1189-1196.
- GHERSA, P.; LURZ, R.; DOBRINSKI, B.; DESHUSSES, J.; BELET, M. & FREY, J. 1988. Genetic evidence for the existence of a repressor that modulates colicin D expression on plasmid Cold-CA23. *Mol. Gen. Genet.* 213:36-41.
- GIBSON, L. F. & COLMAN, G. 1973. Diphthericin types, bacteriophage types and serotypes of *Corynebacterium diphtheriae* strains isolated in Australia. *J. Hyg.* 71:679-689.
- GILMORE, M. S.; SEGARRA, R. A. & BOOTH, M. C. 1990. An HlyB-type function is required for expression of the *Enterococcus faecalis* hemolysin/bacteriocin. *Infect. Immun.* 58:3914-3923.
- GONZALEZ, C. F. & KUNKA, B. S. 1987. Plasmid-associated bacteriocin production and sucrose fermentation in *Pediococcus acidilactici*. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:2534-2538.

- GRAHAM, P. H.; VITERI, S. E.; MACKIE, F.; VARGAS, A. T. & PALACIOS, A. 1982. Variation in acid soil tolerance among strains of *Rhizobium phaseoli*. *Field Crops Res.* 5:121-128.
- GRATIA, A. 1925. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de Colibacille. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie.* 93:1040-1041.
- GRATIA, A. & FREDERICQ, P. 1946. Diversité des souches antibiotiques de *E. coli* et étendue variable de leur champ d'action. *Comptes Rendus des Séances de la Société de Biologie.* 140:1032-1033.
- GROSS, D. C. & VIDAVER, A. K. 1978. Bacteriocin-like substances produced by *Rhizobium japonicum* and slow-growing Rhizobia. *Appl. Environ. Microbiol.* 36:936-943.
- GROSS, D. C. & VIDAVER, A. K. 1979. Bacteriocins of phytopathogenic *Corynebacterium* species. *Can. J. Microbiol.* 25:367-374.
- HAMADA, S.; IMANISHI, H. & OOSHIMA, T. 1986. Isolation and mode of action of a cell-free bacteriocin (mutacin) from serotype g *Streptococcus mutans* MT3791. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 261:287-298.

- HARMON, K. S. & MCKAY, L. L. 1987. Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM₄ and cloning of BclI fragments coding for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1171-1174.
- HAYMAN, G. T. & FARRAND, S. K. 1988. Characterization and mapping of the agrocinopine-agrocin 84 locus on the nopaline Ti plasmid pTiC58. *J. Bacteriol.* 170:1759-1767.
- HENDSON, M.; ASKJAER, L.; THOMSON, J. A. & van MONTAGU, M. 1983. Broad-host-range agrocin of *Agrobacterium tumefaciens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45:1526-1532.
- HENDSON, M. & THOMSON, J. A. 1986. Expression of an agrocin-encoding plasmid of *Agrobacterium tumefaciens* in *Rhizobium meliloti*. *J. Appl. Bacteriol.* 60:147-154.
- HENTGES, D. J. 1967. Influence of pH on the inhibitory activity of formic and acetic acids for *Shigella*. *J. Bacteriol.* 93:2029-2030.
- HERSCHMAN, H. R. & HELINSKI, D. R. 1967. Purification and characterization of colicin E2 and colicin E3. *J. Biol. Chem.* 242:5360-5368.

- HIGA, A.; YOSHIDA, E. & MIYOSHI, Y. 1991. Characterization of two bacteriocins produced by *Clostridium perfringens*. *Microbiol. Immunol.* 35:411-421.
- HIRSCH, P. 1979. Plasmid-determined bacteriocin production by *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.* 113:219-228.
- HOLLAND, I. B. & ROBERTS, C. F. 1964. Some properties of a new bacteriocin formed by *Bacillus megaterium*. *J. Gen. Microbiol.* 35:271-285.
- HOLLAND, I. B. 1965. A bacteriocin specifically affecting DNA synthesis in *Bacillus megaterium*. *J. Mol. Biol.* 12:429-438.
- HSIUNG, H. M.; CANTRELL, A.; LUIRINK, J.; OUDEGA, B.; VEROS, A. J. & BECKER, G. W. 1989. Use of bacteriocin release protein in *E. coli* for excretion of human growth hormone into the culture medium. *Bio/Technol.* 7:267-271.
- HTAY, K. & KERR, A. 1974. Biological control of crown gall: seed and root inoculation. *J. Appl. Bact.* 37:525-530.

- IKEDA, T.; KOULOURIDES, T.; KURITA, T.; HOUSCH, T. & HIRASAWA, M. 1985. Anti-dental caries effect in rats and man of a bacteriocin purified from the oral bacterium *Streptococcus mutans* C3603. *Archs. Oral Biol.* 30:381-384.
- ITOH, Y.; IWATA, T.; IZAKI, K. & TAKAHASHI, H. 1981. Mode of action of a bacteriocin from *Erwinia carotovora* III. Properties of phospholipase A of *Erwinia carotovora* and its involvement in phospholipid degradation caused by carotovoricin. *J. Gen. Appl. Microbiol.* 27:239-251.
- IVANOVICS, G. 1962. Bacteriocins and bacteriocin-like substances. *Bacteriol. Rev.* 26:108-118.
- JACOB, F.; LWOFF, A.; SIMINOVITCH, A. & WOLLMAN, E. 1953. Définition de quelques termes relatifs à la lysogénie. *Annales de l'Institut Pasteur.* 84:222-224.
- JAMES, R. 1988. Molecular cloning and purification of klebicin B. *J. Gen. Microbiol.* 134:2525-2533.
- JEFFRIES, C. D.; HOLTMAN, D. F. & GUSE, D. G. 1957. Rapid method for determining the activity of microorganism on nucleic acid. *J. Bacteriol.* 73:590-591.

- JOERGER, M. C. & KLAENHAMMER, T. R. 1986. Characterization and purification of helveticin J and evidence for a chromosomally determined bacteriocin produced by *Lactobacillus helveticus* 481. *J. Bacteriol.* 167:439-446.
- KERR, A. 1972. Biological control of crown gall: seed inoculation. *J. Appl. Bact.* 35:493-497.
- KERR, A. & HTAY, K. 1974. Biological control of crown gall through bacteriocin production. *Physiol. Plant Pathol.* 4:37-44.
- KERR, A. 1980. Biological control of crown gall through production of Agrocin 84. *Plant Dis.* 64:25-30.
- KERR, A.; BEER, S. V.; SCHROTH, M. N. & BAHME, J. B. 1990. Biological control. In: KLEMENT, Z.; RUDOLPH, K. & SANDS, D. C. (eds.) *Methods in phytobacteriology*. Akademiai Kiado, Budapeste.
- KLAENHAMMER, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70:337-349.
- KONISKY, J. 1982. Colicins and other bacteriocins with established modes of action. *Ann. Rev. Microbiol.* 36:125-144.

- KURITA, T. & HIRASAWA, M. 1988. Biological and biochemical characterization of novel lipid-like antibacterial substances (mutalipocinas) produced by *Streptococcus mutans* strain 32K. *J. Gen. Microbiol.* 134:213-220.
- LANZA, S. A. & ROSATO, Y. B. 1986. Produção de goma xantana por diferentes mutantes e recombinantes de *Xanthomonas campestris*. In: Reunião anual de genética de microrganismos, Ribeirão Preto, SP.
- LANZA, S. A. & BOMURA, Y. R. 1991. Effect of transposon Tn5 on exopolysaccharide production by *Xanthomonas campestris*. *Rev. Brasil. Genet.* 14:599-607.
- LAUFFENBURGER, D. A. 1987. Bacteriocin production as a method of maintaining plasmid-bearing cells in continuous culture. *TIB tech.* 5:87-89.
- LEONG, S. A.; DITTA, G. S. & HELINSKI, D. R. 1982. Heme biosynthesis in *Rhizobium*. Identification of a cloned gene coding for -amino-levulinic acid synthetase from *Rhizobium meliloti*. *J. Biol. Chem.* 257:8724-8730.
- LOVREKOVICH, L. & FARKAS, G. L. 1965. Induced protection against wildfire disease in tobacco leaves treated with heat-killed bacteria. *Nature* 205:823-824.

- LYON, W. J. & GLATZ, B. A. 1991. Partial purification and characterization of a bacteriocin produced by *Propionibacterium thoenii*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:701-706.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. 1982. Molecular cloning: a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- MANIATIS, T.; FRITSCH, E. F. & SAMBROOK, J. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., USA.
- MAYR-HARTING, A.; HEDGES, A. J. & BERKELEY, R. C. W. 1972. Methods for studying bacteriocins. In: *Methods in Microbiology*. Vol. 7A. Pages:315-422. J. R. NORRIS and D. W. RIBBONS, eds. Academic Press, New York.
- McINTYRE, J. L.; KUC, J. & WILLIAMS, E. B. 1973. Protection of pear against fireblight by bacteria and bacterial sonicates. *Phytopathology* 63:872-877.
- MESSING, J. 1979. A multipurpose cloning system based on single-stranded DNA bacteriophage M13. *Recomb. DNA Tech. Bull.* 2:43.

- MOORE, L. W. 1977. Prevention of crown gall on *Prunus* roots by bacterial antagonists. *Phytopathology*. 67:139-144.
- MOORE, L. W. & WARREN, G. 1979. *Agrobacterium radiobacter* strain 84 and biological control of crown gall. *Ann. Rev. Phytopathol.* 17:163-179.
- MORTVEDT, C. I. & NES, I. F. 1990. Plasmid-associated bacteriocin production by a *Lactobacillus sake* strain. *J. Gen. Microbiol.* 136:1601-1607.
- MORTVEDT, C. I.; NISSEN-MEYER, J.; SLETTEN, K. & NES, I. F. 1991. Purification and amino acid sequence of lactocin S, a bacteriocin produced by *Lactobacillus sake* L45. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:1829-1834.
- MURASHIGE, T. & SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 115:473-497.
- MURIANA, P. M. & KLAENHAMMER, T. R. 1987. Conjugal transfer of plasmid-encoded determinants for bacteriocin production and immunity in *Lactobacillus acidophilus* 88. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:553-560.

- MURIANA, P. M. & KLAENHAMMER, T. R. 1991. Purification and partial characterization of lactacin F, a bacteriocin produced by *Lactobacillus acidophilus* 11088. *Appl. Environ. Microbiol.* 57:114-121.
- MURIANA, P. M. & KLAENHAMMER, T. R. 1991a. Cloning, phenotypic expression, and DNA sequence of the gene for lactacin F, an antimicrobial peptide produced by *Lactobacillus* spp. *J. Bacteriol.* 173:1779-1788.
- MURRAY, N. E.; BRAMMAR, W. J. & MURRAY, K. 1977. Lambdoid phages that simplify the recovery of *in vitro* recombinants. *Mol. Gen. Genet.* 150:53-61.
- NELSON, G. A. & SEMENIUK, G. 1964. An antagonistic variant of *Corynebacterium insidiosum* and some properties of the inhibitor. *Phytopathol.* 54:330-335.
- NEW, P. B. & KERR, A. 1972. Biological control of crown gall: field measurements and glasshouse experiments. *J. Appl. Bact.* 35:279-287.
- OUCHTERLONY, O. 1950. Diffusion in gel methods for immunological analysis. *Prog. Allerg.* 5:70.

- OHSUMI, Y. & IMAHORI, K. 1974. Studies on a factor enhancing colicin E3 activity *in vitro*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 71:4062-4066.
- OZAKI, M.; HIGASHYI, Y.; SAITO, H.; AN, T. & AMANO, T. 1966. Identify of megacin A with phospholipase A. *Biken. J.* 9:201-213.
- PANAGOPOULOS, C. G.; PSALLIDAS, P. G. & ALVIZATOS, A. S. 1979. Evidence of a breakdown in the effectiveness of biological control of crown gall. In: SCHIPPERS, B. & GAMS, W. (eds.). *Soil-borne pathogens*. Academic Press, London.
- PARROT, M.; CAUFIELD, P. M. & LAVOIE, M. C. 1990. Preliminary characterization of four bacteriocins from *Streptococcus mutans*. *Can. J. Microbiol.* 36:123-130.
- PIMENTEL GOMES, F. 1976. *Curso de estatística experimental*. 6ª ed. Livraria Nobel, Piracicaba, SP. 430pp.
- RAY, S. K.; KIM, W. J.; JONHSON, M. C. & RAY, B. 1989. Conjugal transfer of a plasmid encoding bacteriocin production and immunity in *Pediococcus acidilactici* H. *J. Appl. Bacteriol.* 66:393-399.
- REEVES, P. 1965. The bacteriocins. *Bacteriol. Rev.* 29:24-45.

- RILFORS, L.; WIESLANDER, A. & STAHL, S. 1978. Lipid and protein composition of membranes of *Bacillus megaterium* variants in the temperature range 5 to 70°C. *J. Bacteriol.* 135:1043-1052.
- ROBERTS, W. P.; TATE, M. E. & KERR, A. 1977. Agrocin 84 is a 6-N-phosphoramidate of an adenine nucleotide analogue. *Nature.* 265:379-381.
- ROBINSON, M. K.; BENNETT, P. M.; FALKOW, S. & DODD, H. M. 1980. Isolation of a temperature-sensitive derivative of RP1. *Plasmid* 3:343-347.
- ROGERS, A. H. 1972. Effect of the medium on bacteriocin production among strains of *Streptococcus mutans*. *Appl. Microbiol.* 24:294-295.
- ROGUL, M. & CARR, S. R. 1972. Variable ammonia production among smooth and rough strains of *Pseudomonas pseudomallei*: resemblance to bacteriocin production. *J. Bacteriol.* 112:372-380.
- ROSLYCKY, E. B. 1967. Bacteriocin production in the rhizobia bacteria. *Can. J. Microbiol.* 13:431-432.

- RYDER, M. H.; SLOTA, J. E.; SCARIM, A. & FARRAND, S. K.
1987. Genetic analysis of agrocin 84 production and immunity in *Agrobacterium* spp. *J. Bacteriol.* 169:4184-4189.
- SALLES, B.; WEISEMANN, J. M. & WEINSTOCK, G. M. 1987.
Temporal control of colicin E1 induction. *J. Bacteriol.* 169:5028-5034.
- SANSONETTI, P. J.; KOPECKO, D. J. & FORMAL, S. B. 1982.
Involvement of a plasmid in the invasive ability of *Shigella flexneri*. *Infect. Immunity* 35:852-860.
- SCHERWITZ-HARMON, K. & MCKAY, L. L. 1987. Restriction enzyme analysis of lactose and bacteriocin plasmids from *Streptococcus lactis* subsp. *diacetylactis* WM4 and cloning of BclI fragments coding for bacteriocin production. *Appl. Environ. Microbiol.* 53:1171-1174.
- SCHROTH, M. N. & HANCOCK, J. G. 1981. Selected topics in biological control. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:453-476.
- SCHWINGHAMER, E. A.; PANKHURST, C. E. & WHITFELD, P. R.
1973. A phage-like bacteriocin of *Rhizobium trifolii*. *Can. J. Microbiol.* 19:359-368.

- SCHWINGHAMER, E. A. 1975. Properties of some bacteriocins produced by *Rhizobium trifolii*. *J. Gen. Microbiol.* 91:403-413.
- SEO, Y. & GALLOWAY, D. R. 1990. Purification of the pyocin S2 complex from *Pseudomonas aeruginosa* PAO1: analysis of DNase activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 172:455-461.
- SHIM, J. -S.; FARRAND, S. K. & KERR, A. 1987. Biological control of crown gall: construction and testing of new biocontrol agents. *Phytopathology* 77:463-466.
- SHINOMIYA, T. & INA, S. 1989. Genetic comparison of bacteriophage PS17 and *Pseudomonas aeruginosa* R-type pyocin. *J. Bacteriol.* 171:2287-2292.
- SLOTA, J. E. & FARRAND, S. K. 1982. Genetic isolation and physical characterization of pAgK84, the plasmid responsible for agrocin 84 production. *Plasmid.* 8:175-186.
- SMIDT, M. L. & VIDAVER, A. K. 1982. Bacteriocin production by *Pseudomonas syringae* PsW-1 in plant tissue. *Can. J. Microbiol.* 28:600-604.

- SOW, P. & DEMAIN, A. L. 1979. Nutritional studies on xanthan production by *Xanthomonas campestris* NRLL B-1459. *Appl. Environ. Microbiol.* 31:1186-1192.
- SPELHAUG, S. R. & HARLANDER, S. K. 1989. Inhibition of foodborne bacterial pathogens by bacteriocins from *Lactococcus lactis* and *Pediococcus pentosaceus*. *J. Food Prot.* 52:856-862.
- STAHL, S. 1989. A new bacteriocinogenic activity: megacin BII encoded by plasmid pSE203 in strains of *Bacillus megaterium*. *Arch. Microbiol.* 151:159-165.
- STONIER, T. 1960. *Agrobacterium tumefaciens* Conn II. Production of an antibiotic substance. *J. Bacteriol.* 79:880-898.
- TAGG, J. R.; DAJANI, A. S. & WANNAMAKER, L. W. 1976. Bacteriocin of Gram positive bacteria. *Bacteriol. Rev.* 40:722-756.
- TOBA, M.; MASAKI, H. & OHTA, T. 1988. Colicin E8, a DNase which indicates an evolutionary relationship between colicins E2 and E3. *J. Bacteriol.* 170:3237-3242.

- TURNER, P.; BARBER, C. & DANIELS, M. 1984. Behaviour of the transposons Tn5 and Tn7 in *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Mol. Gen. Genet.* 195:101-107.
- TZANNETIS, S. E.; BIGIS, A.; KONIDARIS, N.; IOANNIDIS, H.; GENIMATAS, V. & PAPAVALASSILIOU. 1991. *In-vitro* bacteriocin-mediated antagonism by oral streptococci against human carrier strains of staphylococci. *J. Appl. Bacteriol.* 70:294-301.
- UPRETI, G. C. & HINSDILL, R. D. 1975. Production and mode of action of lactocin 27: bacteriocin from a homofermentative *Lactobacillus*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 7:139-145.
- URATANI, Y. & HOSHINO, T. 1984. Pyocin R1 inhibits active transport in *Pseudomonas aeruginosa* and depolarizes membrane potential. *J. Bacteriol.* 157:632-636.
- VERSCHOOR, E. J.; LUIRINK, J.; DE WAARD, S.; DE GRAAF, F. & OUDEGA, B. 1989. Cloning, expression and release of native and mutant cloacin DF13 immunity protein. *Antonie van Leeuwenhoek* 55:325-340.
- VIDAVER, A. K.; MATHYS, M. L.; THOMAS, M. E. & SCHUSTER, M. L. 1972. Bacteriocins of the phytopathogens *Pseudomonas syringae*, *P. glycinea*, and *P. phaseolicola*. *Can. J. Microbiol.* 18:705-713.

- VIDAVER, A. K. 1976. Prospects for control of phytopathogenic bacteria by bacteriophages and bacteriocins. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14:451-465.
- VIDAVER, A. K. & BUCKNER, S. 1978. Typing of fluorescent phytopathogenic pseudomonads by bacteriocin production. *Can. J. Microbiol.* 24:14-18.
- VIDAVER, A. K. 1983. Bacteriocins: the lure and the reality. *Plant Dis.* 67:471-475.
- VLASAK, J.; HROUDA, M.; BISKOVA, R. & ONDREJ, M. 1986. Modification of T-DNA of nopaline Ti plasmid by intermediary vector and utilization of agrocin 84 sensitivity as simple criterion of conjugation transfer of modified Ti plasmid. *Folia Microbiol.* 31:86-93.
- WATANABE, T. & SAITO, H. 1980. Citotoxicity of pyocin S2 to tumor and normal cells and its interaction with cell surfaces. *Biochem. Biophys. Acta.* 633:77-86.
- WEST, C. A. & WARNER, P. J. 1988. Plantacin B, a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193. *FEMS Microbiol. Lett.* 49:163-165.

- WRATHER, J. A.; KUC, J. & WILLIAMS, E. B. 1973. Protection of apple and pear fruit tissue against fireblight with nonpathogenic bacteria. *Phytopathology* 63:1075-1078.
- XU, G. -W. & GONZALEZ, C. F. 1991. Plasmid, genomic, and bacteriocin diversity in U.S. strains of *Xanthomonas campestris* pv. *oryzae*. *Phytopathology*. 81:628-631.
- YANO, T. *Estudo bacteriológico e sorológico de algumas amostras pertencentes a vários patótipos de Xanthomonas campestris (PAMMEL) DOWSON*. 1976. Tese de mestrado. Universidade Estadual de Campinas, Campinas (SP).
- ZINK, R. T.; ENGWALL, J. K.; McEVOY, J. L. & CHATTERJEE, A. K. 1985. *recA* is required in the induction of pectin lyase and carotovoricin in *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *J. Bacteriol.* 164:390-396.
- ZHONGMIN, W.; JINSHENG, W. & ZHONGDA, F. 1988. Tn5 mutagenesis of bacteriocin producing strain of *Erwinia chrysanthemi* and application of a constructed recombinant plasmid as a probe for detecting the bacteriocin gene(s). *J. Nanj. Agric. Univ.* 11:34-40.