

Mutantes resistentes à Antibióticos  
em *Xanthomonas Campestris*  
(Fammel) Dowson (1)

J. LÚCIO DE AZEVEDO

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz»

## 1. INTRODUÇÃO

O aparecimento de mutantes bacterianos resistentes à antibióticos é fato bastante estudado como indicam as revisões de FINLAND (1956) e SCHNITZER e GRUNBERG (1957). Esses estudos são realizados de modo geral, com bactérias de interesse médico. No que se refere à bactérias fitopatogênicas, a literatura é bem mais restrita; MITCHEL e colaboradores (1952) obtiveram mutantes resistentes à estreptomicina em diversas bactérias que causam doenças em vegetais. ENGLISH e VAN HALSEMA (1953) estudaram a frequência de mutantes resistentes à estreptomicina e terramicina em diversas *Xanthomonas* e *Erwinias*. CARMONA-GOMES (1956) verificou que o mecanismo genético da resistência de *X. phaseoli* e *X. vignicola* ao antibiótico A-C produzido por um *Streptomyces* segue o modelo de "múltiplos-passos" (multiple-step) e efetuando diversas transferências das referidas bactérias em doses crescentes desse antibiótico conseguiu obter mutantes altamente resistentes. COREY e STARR (1957) isolaram mutantes de *X. phaseoli* resistentes à estreptomicina e verificaram que tais mutações ocorrem em "um só passo" (one-step). GYORFFY e colaboradores (1959) estudaram mutantes de *X. phaseoli* resistentes à penicilina, estreptomicina e cloranfenicol. QUADLING (1960) obteve mutantes de *X. phaseoli* não só resistentes como também dependentes da droga. AZEVEDO (1961) obteve mutantes resistentes à estreptomicina, penicilina e aureomicina em *X. campestris*. AZEVEDO, NEDER e MENEZES (1962) verificaram que o mecanismo da resistência à penicilina, aureomicina e cloranfenicol em *X. campestris* era o de "múltiplos-passos" enquanto que o mecanismo de resistência à estreptomicina e éritromicina era o de "um só passo".

O presente trabalho visou verificar o aumento da resistência à vários antibióticos em *X. campestris* bem como a verificação da existência ou não de resistência cruzada ou sensibilidade colateral nos mutantes obtidos.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Usamos uma linhagem de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson isolada por nós em trabalho anterior (Azevedo - 1961).

O meio líquido usado foi o líquido nutriente da Difco e o meio sólido foi o nutriente ágar também da Difco. Os antibióticos utilizados foram o sulfato de dihidroestreptomicina da Merck Sharp & Dohme S. A., penicilina G-potássica da Fontoura Wyeth

S. A., cloridrato de clortetraciclina cristalina da Cyanamid Química do Brasil S. A., cloromicetina da Park, Davis Co. e Eritromicina da Eli Lilly and Company. As soluções de antibióticos foram preparadas momentos antes de serem utilizadas por dissolução de quantidades apropriadas dos mesmos, no solvente adequado.

O isolamento de mutantes resistentes à estreptomina e éritromicina foi feito semeando-se 0,1 ml de cultura de *X. campestris* em placas contendo 100 mcg/ml de estreptomina e em placas contendo 100 mcg/ml de éritromicina. Colônias que apareceram nessas concentrações, eram isoladas, semeadas em nutriente ágar inclinado e mantidas em estoque.

Colônias isoladas das placas com estreptomina foram ensaiadas em meio líquido mais 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 mcg/ml de estreptomina. Colônias isoladas das placas com éritromicina foram ensaiadas em meio líquido mais 1; 2; 4; 8; 16; 32; 64 e 128 mcg/ml de éritromicina.

O isolamento de mutantes resistentes à penicilina, cloranfenicol e aureomicina foi feito pela técnica da placa gradiente de Szybalsky e Bryson (1952). Foram feitas sete transferências para cada antibiótico com intervalos de 6 dias entre cada uma. Para a penicilina foram usados os seguintes gradientes:

1.º	0	a	10 mcg/ml
2.º	0	a	20 mcg/ml
3.º	0	a	50 mcg/ml
4.º	0	a	100 mcg/ml
5.º	0	a	200 mcg/ml
6.º	0	a	400 mcg/ml
7.º	0	a	1000 mcg/ml

Colônias isoladas do último gradiente foram ensaiadas em meio líquido mais 1, 2, 4, 8, 16, 32, 62 e 128 mcg/ml.

Para a aureomicina, os gradientes foram os seguintes:

1.º	0	a	0,4 mcg/ml
2.º	0	a	0,8 mcg/ml
3.º	0	a	1 mcg/ml
4.º	0	a	1,5 mcg/ml
5.º	0	a	2 mcg/ml
6.º	0	a	2,5 mcg/ml
7.º	0	a	3 mcg/ml

Colônias isoladas do último gradiente foram ensaiadas em meio líquido mais 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 e 1,28 mcg/ml.

Para o cloranfenicol foram usados os seguintes gradientes:

- 1.º 0 a 30 mcg/ml
- 2.º 0 a 60 mcg/ml
- 3.º 0 a 100 mcg/ml
- 4.º 0 a 200 mcg/ml
- 5.º 0 a 300 mcg/ml
- 6.º 0 a 400 mcg/ml
- 7.º 0 a 500 mcg/ml

Colônias isoladas do último gradiente foram ensaiadas nas mesmas concentrações usadas para a penicilina.

Para os 5 antibióticos foi feito contrôlo com a cultura original sensível ensaiada nas mesmas concentrações usadas para os mutantes. A leitura foi feita por turvação do meio de cultura, após 5 dias de incubação a 28°C. O inóculo foi sempre de cerca de 1000 bactérias por tubo contendo 10 ml de meio líquido.

Para o ensaio da resistência cruzada e sensibilidade colateral, foram ensaiados 1 mutante de cada antibiótico contra os 5 antibióticos em questão. O contrôlo foi feito com a linhagem original sensível. Os ensaios foram feitos inoculando-se cerca de 1000 bactérias em cada tubo com 10 ml de meio líquido mais as mesmas concentrações já citadas para o ensaio dos mutantes isoladamente. A leitura foi feita do mesmo modo que no ensaio dos mutantes isolados.

Em todos os ensaios, foi feito o contrôlo para a verificação de possível contaminação.

### 3. RESULTADOS

Foram isolados 6 mutantes resistentes à estreptomomicina, 4 à penicilina, 3 à aureomicina, 5 resistentes ao cloranfenicol e 5 resistentes à éritromicina. Os resultados obtidos estão nos quadros I, II, III, IV e V. Os resultados para a verificação de uma possível resistência cruzada ou sensibilidade colateral, estão nos quadros VI, VII, VIII, IX e X.

#### 4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

Pela observação dos quadros I a V, verifica-se que houve aumento de resistência em relação a todos os antibióticos ensaiados. Para a penicilina, os mutantes são cerca de 4 vezes mais resistentes que a linhagem original. Para a aureomicina, são cerca de 32 vezes mais resistentes, para o cloranfenicol cerca de 8 vezes mais resistentes. Para a estreptomina e éritromicina, os mutantes cresceram nas mais altas concentrações usadas, donde podemos dizer que eles são no caso da estreptomina, pelo menos 128 vezes mais resistentes e no caso da éritromicina pelo menos 16 vezes mais resistentes que a linhagem original sensível. Acresce notar que mutantes resistentes à esses 2 antibióticos são obtidos em um só passo. Tais mutantes adquirem de uma só vez resistência a altas doses dos antibióticos em questão.

No caso dos outros 3 antibióticos, como o incremento de resistência ocorre em vários passos, a técnica da placa gradiente de Szybalsky e Bryson (1952) teve de ser empregada.

Pela observação dos quadros VI a X, verificou-se que nenhum dos mutantes ensaiados apresentou resistência cruzada no que diz respeito aos cinco antibióticos usados. Embora para tais antibióticos, a resistência seja bastante específica, vários casos de resistência cruzada entre eles já foram relatados na literatura como é possível verificar pela revisão de SCHNITZER e GRUNBERG (1957).

#### 5. RESUMO

O presente trabalho, visou o estudo de mutantes resistentes à antibióticos na bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson.

Foram obtidos mutantes resistentes à cinco antibióticos: penicilina, estreptomina, aureomicina, cloranfenicol e éritromicina. O incremento de resistência em relação à linhagem original foi 4 vezes para a penicilina, 8 para o cloranfenicol, 32 para a aureomicina e pelo menos 16 e 128 vezes para a éritromicina e estreptomina respectivamente. Em nenhum dos casos, verificou-se resistência cruzada ou sensibilidade colateral.

#### 6. SUMMARY

The present paper deals with study of mutants resistant against five antibiotics in a phytopathogenic bacterium *Xanthomo-*

*nas campestris* (Pammel) Dowson. One-step mutants to streptomycin and erythromycin were isolated. For the penicillin, aureomycin and chloranphenicol multiple-step mutants appeared the sensitive populations were grown in gradient plates with antibiotics.

The resistance increase was 4 fold for the penicillin, 8 fold for the chloranphenicol, 32 fold for the aureomycin; 16 fold for the erythromycin and 128 fold for the streptomycin.

It was not found cross resistance or collateral sensitivity when a certain antibiotic was tested against the others drugs.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AZEVEDO, J. L. DE — 1962 — Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* em relação a alguns antibióticos. Tese de doutoramento apresentada à E. S. A. «Luiz de Queiroz». Piracicaba, Brasil. 48 págs.
- AZEVEDO, J. L. DE, R. N. NEDER e T. B. J. MENEZES — 1962 — Comportamento «in-vitro» de uma bactéria fitopatogênica frente a diversos antibióticos. No prelo.
- CARMONA-GOMES, J. — 1956 — «In vitro» development of resistance to an antibiotic by two plant pathogenic bacteria. *Phytopathology*, **46**: 522-523.
- COREY, R. R. e M. P. STARR — 1957 — Genetic transformation of streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *J. Bact.* **74**: 146-150.
- ENGLISH, A. R. e G. VAN HALSEMA — 1954 — A note on the delay in the emergence of resistant *Xanthomonas* and *Erwinia* strains by the use of streptomycin plus terramycin combinations. *Plant. Dis. Repr.*, **38**: 429-431.
- FINLAND, M. — 1956 — Emergence of resistant strains in chronic intake of antibiotics. A Review. First International Conference on Antibiotics in Agriculture, Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Coun., publ. **397**: 233-258.
- GYORFFY, B., S. LIGALI, I. KALLAY, I. KÁRASZ, Z. KLEMENT e K. SZENDE — 1959 — Genetics studies on a phytopathogenic *Xanthomonas*. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung. suppl.* **3**:34.
- QUADLING, C. — 1960 — Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *Can. J. Microbiol.* **6**: 387-396.
- SCHNITZER, R. J. e E. GRUNBERG — 1957 — Drug resistance of microorganisms. Academic Press Inc., New York.
- SZYBALSKY, W. e V. BRYSON — 1952 — Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents. *J. Bact.*, **64**: 489-499.

## QUADRO I

Mutantes resistentes à estreptomicina ensaiados em meio líquido + antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Culturas ensaiadas	Concentração de Estreptomicina (mcg/ml)								
	0	1	2	4	8	16	32	64	128
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linhagem original	+	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO II

Mutantes resistentes à penicilina ensaiados em meio líquido + antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Culturas ensaiadas	Concentração de Penicilina (mcg/ml)								
	0	1	2	3	8	16	32	64	128
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Linhagem original	+	+	+	+	+	+	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO III

Mutantes resistentes à aureomicina ensaiados em meio líquido + antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Culturas ensaiadas	Concentração de Aureomicina (mcg/ml)								
	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Linhagem original	+	+	+	—	—	—	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO IV

Mutantes resistentes ao cloranfenicol ensaiados em meio líquido + antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Culturas ensaiadas	Concentração de Cloranfenicol (mcg/ml)								
	0	1	2	4	8	16	32	64	128
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	—
Linhagem original	+	+	+	+	+	—	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação



## QUADRO V

Mutantes resistentes à éritromicina ensaiados em meio líquido + antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Culturas ensaiadas	Concentração de Éritromicina (mcg/ml)								
	0	1	2	4	8	16	32	64	128
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Linhagem original	+	+	+	+	+	—	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO VI

Linhagem original e mutantes resistentes ensaiados em meio líquido + estreptomina.

Linhagens ensaiadas	(Concentração de Estreptomina (mcg/ml)								
	0	1	2	4	8	16	32	64	128
Original	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Estreptomina	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Mut. Resis. Penicilina	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Aureomicina	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Cloranfenicol	+	—	—	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Eritromicina	+	—	—	—	—	—	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO VII

Linagem original e mutantes resistentes ensaiados em meio líquido + penicilina.

Linagens ensaiadas	Concentração de Penicilina (mcg/ml)							
	1	2	4	8	16	32	64	128
Original	+	+	+	+	+	—	—	—
Mut. Resis. Estreptomina	+	+	+	+	+	—	—	—
Mut. Resis. Penicilina	+	+	+	+	+	+	+	—
Mut. Resis. Aureomicina	+	+	+	+	+	—	—	—
Mut. Resis. Cloranfenicol	+	+	+	+	+	—	—	—
Mut. Resis. Eritromicina	+	+	+	+	+	—	—	—

+ = turvação

— = sem turvação

## QUADRO VIII

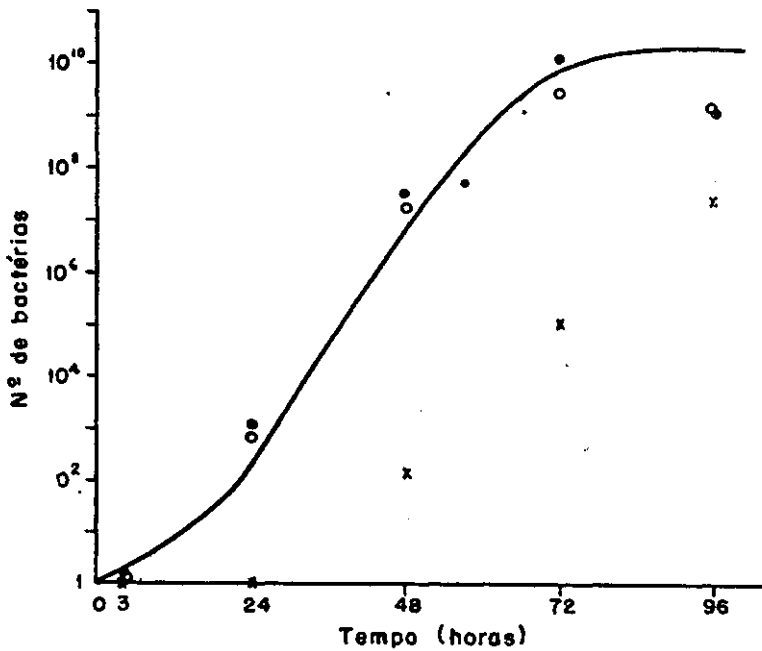
Linagem original e mutantes resistentes ensaiados em meio líquido + aureomicina.

Linagens ensaiadas	Concentração de Aureomicina (mcg/ml)							
	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28
Original	+	+	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Estreptomina	+	+	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Penicilina	+	+	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Aureomicina	+	+	+	+	+	+	+	—
Mut. Resis. Cloranfenicol	+	+	—	—	—	—	—	—
Mut. Resis. Eritromicina	+	+	—	—	—	—	—	—

+ = turvação

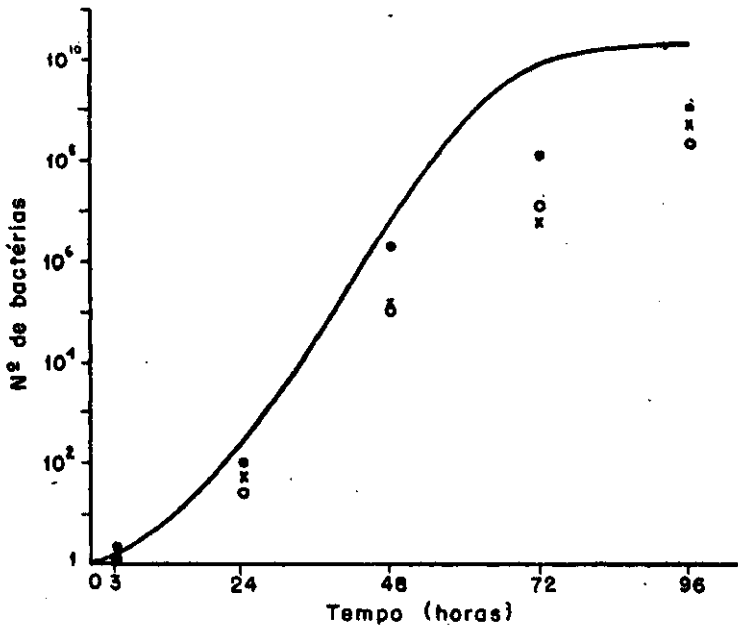
— = sem turvação





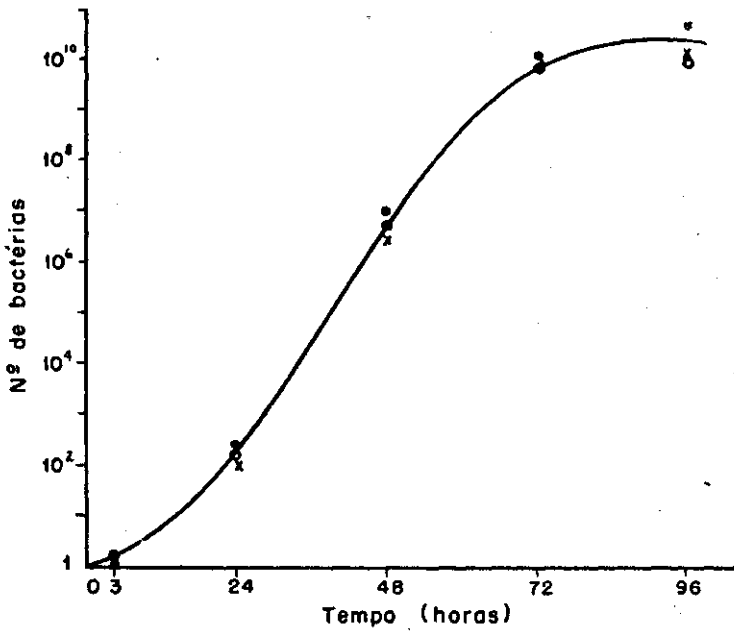
**GRÁFICO II - MUTANTE RESISTENTE À PENICILINA**

- Linhagem original
- Mutante resistente à penicilina
- x Mutante resistente em meio com antibiótico
- Mistura sensível + resistente



**GRÁFICO III - MUTANTE RESISTENTE À AUREOMICINA**

- Linhagem original
- o Mutante resistente à aureomicina
- x Mutante resistente em meio com antibiótico
- Mistura sensível + resistente



**GRÁFICO I - MUTANTE RESISTENTE À ESTREPTOMICINA**

- Linhagem original
- o Mutante resistente à estreptomicina
- x Mutante resistente em meio com antibiótico
- Mistura sensível + resistente