

Comparação entre o crescimento de  
*Xanthomonas Campestris* (Pammel)  
Linhagens Mutantes resistentes a  
Antibióticos e Linhagens não Mutantes  
de Fammel Dowson <sup>(1)</sup>

J. LÚCIO DE AZEVEDO e RAHME NELLY NEDER \*

Escola Superior de Agricultura «Luiz de Queiroz»

---

(1) Recebido para publicação em 23 de setembro de 1963.

(\*) Instituto Zimotécnico — Piracicaba.

## 1. INTRODUÇÃO

Um dos tipos de mutação mais bem estudados em Genética de Bactérias, diz respeito a mutantes resistentes a agentes inibidores, incluindo aí os antibióticos. Mutantes resistentes aos mais diversos antibióticos tem sido encontrados em praticamente todas as espécies bacterianas estudadas como provam as revisões de BRYSON e SZYBALSKY em 1955 e SCHNITZER e GRUNBERG em 1957. Tais mutantes, muitas vezes têm uma taxa de crescimento igual ao do não mutante e, outras vezes essa taxa tem sido mais baixa. Assim é que, QUADLING em 1960, não verificou diferenças entre o crescimento de *Xanthomonas phaseoli* sensível, comparado com um mutante dessa bactéria resistente à estreptomicina; no entanto, comparando a linhagem original da bactéria em questão, com mutantes dependentes de estreptomicina, verificou que a taxa de crescimento dos mutantes dependentes era a metade da encontrada para a linhagem original.

A finalidade do presente trabalho, foi então, a de comparar as curvas de crescimento de uma linhagem de *Xanthomonas campestris* com as curvas de crescimento de três mutantes dessa bactéria resistentes à estreptomicina, penicilina e aureomicina, respectivamente. Estudos foram também realizados com misturas de células mutantes e não mutantes com o intuito de verificar se o crescimento da mistura sofria uma variação comparado com o crescimento da linhagem não mutante da referida bactéria.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

Em nosso trabalho foi utilizada uma linhagem da bactéria *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson e três mutantes dessa bactéria resistentes respectivamente à 8000 mcg/ml de streptomycina, 100 mcg/ml de penicilina e 1 mcg/ml de aureomicina. Tanto a linhagem sensível como os mutantes resistentes foram obtidos em trabalho anterior AZEVEDO (1961) e AZEVEDO (1963).

O meio sólido utilizado foi o Nutriente ágar da Difco. O meio líquido utilizado foi o líquido nutriente também da Difco. Os antibióticos utilizados foram o sulfato de dihidroestreptomicina da Merck Sharp Dohme S. A., a Penicilina G potássica cristalina da Fontoura Wyeth S. A. e o cloridrato de clotetracilina cristalina da Cyanamid Química do Brasil S. A. divisão Lederle. Para maior facilidade, tais antibióticos são designados no presente trabalho por Estreptomicina, Penicilina e Aureomicina respectivamente. As soluções de antibióticos foram preparados momentos

antes de serem usadas, por dissolução de quantidades apropriadas, em água destilada.

Para medir quantitativamente o crescimento bacteriano, empregou-se o método da contagem de células feito indiretamente através da contagem de colônias em placas conforme citam Pelezar e Reid em 1958. Culturas de uma semana da linhagem original e mutantes resistentes, eram diluídas de modo que 10 a 300 células fossem inoculadas em tubos com 10 ml de líquido nutriente. Foram assim inoculadas as seguintes séries de tubos (6 tubos para cada série).

Inóculo	Meio de Cultura
linha original	líquido nutriente
mut. resist. estreptomomicina	líquido nutriente
mut. resist. penicilina	líquido nutriente
mut. resist. aureomicina	líquido nutriente
mut. resist. estreptomomicina	líquido nutriente + 12 mcg/ml estrept.
mut. resist. penicilina	líquido nutriente + 50 mcg/ml penicilina
mut. resist. aureomicina	líquido nutriente + 0,2 mcg/ml aureomicina
linhagem orig. + mut. resist. estrept.	líquido nutriente + 0,2 mcg/ml aureomicina
linhagem orig. + mut. resist. penic.	líquido nutriente
linhagem orig. + mut. resist. aureo.	líquido nutriente

Amostras foram retiradas nas horas 0; 3; 24; 48; 72; 96 e, semeadas em placas com nutrientes ágar. As placas foram incubadas a 28°C e, depois de 3 dias foram contadas as colônias. Para cada tratamento foram feitas três repetições.

Para a determinação do número de bactérias sensíveis e resistentes nos tratamentos que continham misturas de mutantes e não mutantes, empregou-se a técnica da réplica, de LEDERBERG e LEDERBERG (1952). Placas contendo 30 a 100 colônias foram utilizadas. Na mistura de células sensíveis + resistentes à estreptomomicina, foram feitas réplicas para placas com nutriente-ágar + 20 mcg/ml de estreptomomicina. Na mistura de sensíveis + resistentes à penicilina, as réplicas foram feitas para placas com nutrientes ágar + 5 mcg/ml de penicilina e, finalmente, as réplicas na mistura de sensíveis + resistentes à aureomicina, foram feitas para placas com nutrientes ágar + 0,5 mcg/ml de aureomicina. Quando as placas continham um número muito pequeno, ou, um número exagerado de colônias, fizeram-se repicagens de colônias para placas com as quantidades de antibióticos já citadas. Sem-

pre foi feito o controle, em placas com nutrientes ágar sem antibiótico. Puderam assim ser estabelecidas as porcentagens de células resistentes e sensíveis, nas misturas, nos diversos tempos ensaiados.

### 3. RESULTADOS

O quadro I, dá o número de bactérias encontradas, nos diversos tempos ensaiados, para as dez séries. Os gráficos I, II e III representam as curvas de crescimento da linhagem original comparadas com a dos mutantes resistentes em meio com e sem antibiótico e ainda dão as curvas das misturas de células sensíveis e resistentes.

O quadro II representa o número de gerações e o tempo de geração de todas as culturas ensaiadas tomando-se como referência para comparação, o incremento do número de bactérias entre 24 e 48 horas.

O quadro III dá as porcentagens de bactérias resistentes achadas, nos diversos tempos ensaiados, numa mistura de células sensíveis e resistentes à estreptomycina. O quadro IV dá a porcentagem de células resistentes encontradas, em mistura de bactérias sensíveis e resistentes à penicilina. O quadro V dá as porcentagens de bactérias resistentes encontrados em mistura de células sensíveis e resistentes à aureomicina.

### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÕES

Pela observação dos quadros I e II e dos gráficos I, II e III, podemos verificar que o crescimento da linhagem original, pouco difere do crescimento do mutante resistente à estreptomycina, tanto em meio com antibiótico como em meio sem antibiótico. A mistura da linhagem original sensível e do mutante resistente a estreptomycina apresenta uma curva de crescimento igual ao das duas linhagens separadas. O crescimento da linhagem original também não difere do crescimento do mutante resistente à penicilina em meio sem antibiótico. O crescimento do mutante resistente à penicilina em meio com 50 mcg/ml de antibiótico foi bem mais lento, comparado com o seu crescimento em meio sem antibiótico. Provavelmente, o que houve aí foi uma reversão de células resistentes para sensíveis com conseqüente morte dessas células revertidas. Colônias resistentes para penicilina, providas desse ensaio, foram isoladas e o seu crescimento novamente ensaiado. Os resultados foram os mesmos já encontrados anteriormente provando que o

mutante estava em estado puro e, não, misturado com células sensíveis iniciais. O mutante resistente à aureomicina apresenta um crescimento mais lento do que a linhagem original, tanto em meio com antibiótico como em meio sem o antibiótico em questão.

As taxas de crescimento representadas no quadro II, pelo tempo de geração das diversas linhagens ensaiadas, referem-se ao período de tempo entre 24 e 48 horas. São apenas dados aproximados, tomando-se somente 2 pontos da curva como referência, pois a nossa finalidade aí foi a de estabelecer apenas um termo de comparação entre o crescimento das diversas linhagens.

Pela observação dos quadros III e IV, podemos verificar que não houve uma variação significativa entre o número de bactérias sensíveis e resistentes nas misturas, nos diversos tempos ensaiados; as porcentagens encontradas não diferiram estatisticamente das porcentagens iniciais. Isso significa que o crescimento da linhagem sensível não prejudicou o crescimento do mutante ou vice-versa. No caso do mutante resistente à aureomicina (quadro V), sendo seu crescimento, mais lento que o da linhagem original, houve uma variação significativa em dois dos três experimentos feitos. O aumento das células sensíveis com o tempo, não foi no entanto proporcional, talvez devido ao fato de que a aureomicina, com o tempo, perde gradativamente sua ação, em meio sólido, o que acarretaria variações nas contagens.

## 5. RESUMO

Foi comparado o crescimento de uma linhagem de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, com o crescimento de 3 linhagens dessa bactéria resistente à estreptomomicina, penicilina e aureomicina. O crescimento da linhagem original, não diferiu do crescimento dos mutantes resistentes à estreptomomicina e penicilina. O crescimento do mutante resistente à aureomicina foi mais lento do que o da linhagem original. O mutante resistente à estreptomomicina apresentou o mesmo índice de crescimento, tanto em meio sem antibiótico, como em meio suplementado com a droga, o mesmo acontecendo com o mutante resistente à aureomicina. O mutante resistente à penicilina teve crescimento reduzido em meio suplementado com a droga em questão. Misturas de células sensíveis e resistentes à estreptomomicina mantiveram-se constantes quanto à porcentagem de células sensíveis e resistentes inicialmente inoculadas, o mesmo acontecendo com a mistura de bactérias sensíveis e resistentes à penicilina. Houve uma variação nessas porcentagens, para o caso da aureomicina.

## 6. SUMMARY

The present paper deals with the study of the growth of *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson sensitive to streptomycin, penicillin and aureomycin compared with the growth of three resistant mutants to these drugs.

The original strain sensitive, presented the same growth rate than the resistant strains to streptomycin and penicillin but, grew better than the resistant strain to aureomycin.

The resistant mutants to streptomycin and aureomycin presented the same growth rate in liquid medium plus antibiotic and in liquid medium without antibiotic.

The resistant strain to penicillin grew better in medium without this antibiotic.

The ratio between sensitive cells and resistant cells were studied when a mixture of cells were made.

## 7. BIBLIOGRAFIA

- AZEVEDO, J. L. DE — 1961 — Resistência e mutação de *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson, em relação a alguns antibióticos. Tese de Doutorado apresentada à E.S.A. «Luiz de Queiroz» — Piracicaba. Brasil.
- AZEVEDO, J. L. DE — 1963 — Mutantes resistentes a antibióticos em *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson. — No prélo.
- BRYSON, V. e SZYBALSKY, W. — 1955 — Microbial drug resistance. *Advanc. Genetic.* 7: 1-47.
- LEDERBERG, J. e LEDERBERG, E. M. — 1952 — Replica plating and selection of bacterial mutants. *J. Bact.* 63: 399-406.
- PELCZAR, M. J. Jr. e REID, R. D. — 1958 — *Microbiology* — McGraw-MHill Book Co. Inc., New York.
- QUADLING, C. — 1960 — Mutation conferring streptomycin resistance in *Xanthomonas phaseoli*. *Can. J. Microbiol.* 6: 387-396.
- SCHNITZER, R. J. e GRUMBERG, E. — 1957 — Drug resistance of microorganisms. Academic Press Inc., New York.

QUADRO I

Médias de bactérias viáveis por mililitro em diversos tempos e com diversas linhagens em meio com ou sem antibiótico e mistura dessas linhagens. (média de 3 experimentos).

Tempo (Horas)	Linhagem original	Mutante resistente a estreptomicina em meio sem antibiótico	Mutante resistente a estreptomicina em meio com 12 mcg/ml	Mistura de linhagem original e resistente a estreptomicina	Mutante resistente a penicilina em meio sem antibiótico	Mutante resistente a penicilina em meio com 50 mcg/ml de penicilina	Mistura de linhagem original e penicilina	Mutante resistente a aureomicina em meio com 0,2 mcg/ml de aureomicina	Mutante resistente a aureomicina em meio com 0,2 mcg/ml de aureomicina	Mistura de linhagem original e resistente a aureomicina
0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0	1,0
3	1,5	1,6	1,3	1,0	1,4	0,22	1,2	1,4	1,6	1,6
24	2,3x10 <sup>2</sup>	1,8x10 <sup>2</sup>	1,3x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>2</sup>	8,2x10 <sup>2</sup>	0,23	1,4x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	4,9x10 <sup>3</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>
48	7,3x10 <sup>6</sup>	7,3x10 <sup>6</sup>	4,8x10 <sup>6</sup>	1,1x10 <sup>7</sup>	2,3x10 <sup>7</sup>	2,0x10 <sup>2</sup>	5,0x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,6x10 <sup>5</sup>	3,0x10 <sup>6</sup>
72	9,2x10 <sup>9</sup>	9,0x10 <sup>9</sup>	1,0x10 <sup>10</sup>	1,0x10 <sup>10</sup>	4,8x10 <sup>9</sup>	1,0x10 <sup>5</sup>	1,4x10 <sup>10</sup>	1,3x10 <sup>7</sup>	7,8x10 <sup>8</sup>	1,9x10 <sup>8</sup>
96	3,0x10 <sup>10</sup>	1,4x10 <sup>10</sup>	1,9x10 <sup>10</sup>	7,8x10 <sup>10</sup>	1,2x10 <sup>9</sup>	3,8x10 <sup>7</sup>	1,9x10 <sup>9</sup>	3,7x10 <sup>8</sup>	7,6x10 <sup>8</sup>	1,5x10 <sup>9</sup>

QUADRO II  
 Número de gerações e tempo de geração para as diferentes  
 culturas ensaiadas

CULTURAS	N.º de gerações (entre 24 e 48 hs.)	Tempo de geração (min.)
Linhagem original	14,95	96,3
Mutante resistente à estreptomycina	15,31	94,1
Mutante resistente à estreptomycina em meio com estreptomycina	15,17	94,9
Mistura sensível + resistente à estreptomycina	14,90	96,6
Mutante resistente à penicilina	14,77	97,5
Mutante resistente à penicilina em meio com penicilina	9,76	147,5
Mistura sensível + resistente à penicilina	15,13	95,2
Mutante resistente à aureomicina	10,99	131,0
Mutante resistente à aureomicina em meio com aureomicina	11,12	129,5
Mistura sensível + resistente à aureomicina	13,87	103,8

QUADRO III

Mutante resistente à estreptomicina + linhagem original.

Tempo (horas)	N.º de bactérias ensaiadas	N.º de bactérias resistentes	% de resistentes
1.º Experimento			
0	1050	87	8,3
3	1000	90	9,0
24	7000	600	8,6
72	327	20	6,1
X2 = 5,06 n. s. p = 10 — 20%			
2.º Experimento			
0	953	171	17,4
3	337	44	13,0
24	421	72	17,1
48	87	10	11,5
72	412	54	13,1
X2 = 7,88 n. s. p = 5 — 10%			
3.º Experimento			
0	477	417	87,4
3	714	614	86,0
48	525	454	86,5
72	110	93	84,5
X2 = 3,41 n. s. p = 30 — 40%			

## QUADRO IV

Mutante resistente à penicilina + linhagem original.

Tempo (horas)	N.º de bactérias ensaiadas	N.º de bactérias resistentes	% de resistentes
1.º Experimento			
0	113	70	61,9
3	740	460	62,2
24	445	300	67,4
48	32	21	65,6
72	65	46	70,8
$X^2 = 5,32$ n. s. p = 20 — 30%			
2.º Experimento			
0	173	77	44,5
3	38	13	34,2
24	106	39	36,8
48	40	16	40,0
$X^2 = 2,46$ n. s. p = 30—50%			
3.º Experimento			
0	100	90	90,0
3	45	39	86,6
24	31	27	87,1
48	140	120	85,7
72	215	186	86,5
96	231	189	81,8
$X^2 = 5,66$ n. s. p = 30—50%			

QUADRO V

Mutante resistente à aureomicina + linhagem original.

Tempo (horas)	N.º de bactérias ensaiadas	N.º de bactérias resistentes	% de resistentes
1.º Experimento			
0	50	40	80,0
24	90	70	77,7
48	412	314	76,2
72	200	160	80,0
96	55	44	80,0
X2 = 1,99 n. s. p = 70 — 80%			
2.º Experimento			
0	33	16	48,5
3	79	35	44,3
24	130	28	21,5
48	229	63	27,5
72	70	10	14,3
X2 = 26,37*** p = 0,1			
3.º Experimento			
0	17	6	35,2
3	100	20	20,0
24	420	30	7,1
48	19	3	15,8
72	31	3	9,7
X2 = 25,76*** p = 0,1			

