

JOÃO LÚCIO DE AZEVEDO .

Engenheiro Agrônomo

Assistente do Instituto de Genética

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz"

RESISTÊNCIA E MUTAÇÃO DE XANTHOMONAS CAMPESTRIS  
(PAMMEL) DOWSON, EM RELAÇÃO A ALGUNS ANTIBIÓTICOS.

Tese de doutoramento

apresentada à

Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", U.S.P.

Piracicaba, Outubro de 1961

## ÍNDICE GERAL DA MATÉRIA

	<u>Páginas</u>
1. Introdução . . . . .	1
2. Revisão da literatura . . . . .	2
3. Material e métodos . . . . .	5
3.1 - Bactéria usada: <u>Xanthomonas campestris</u> (Pammel) Dowson . . . . .	5
3.2 - Meios de cultura e drogas . . . . .	5
3.3 - Descrição dos experimentos em que se usaram antibióticos . . . . .	6
3.3.1 - Antibióticos em meio sólido. . . . .	6
3.3.2 - Antibióticos em meio líquido . . . . .	6
3.3.3 - Isolamento de mutantes resistentes . . . . .	7
3.3.4 - Resistência cruzada . . . . .	8
4. Resultados obtidos . . . . .	9
4.1 - Identificação e classificação da espécie. . . . .	9
4.2 - Determinação da curva de crescimento . . . . .	10
4.3 - Resistência da bactéria a antibióticos adi- cionados ao meio sólido . . . . .	13
4.3.1 - Estreptomicina . . . . .	13
4.3.2 - Penicilina . . . . .	13
4.3.3 - Aureomicina . . . . .	13
4.3.4 - Comparação entre as três curvas de sobrevivência obtidas . . . . .	13
4.4 - Resistência da bactéria a antibióticos adi- cionados ao meio líquido . . . . .	21
4.4.1 - Estreptomicina . . . . .	21
4.4.2 - Penicilina . . . . .	23
4.4.3 - Aureomicina . . . . .	26

	<u>Páginas</u>
4.5 - Isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos . . . . .	29
4.5.1 - Estreptomicina . . . . .	29
4.5.2 - Penicilina . . . . .	32
4.5.3 - Aureomicina . . . . .	32
4.6 - Resistência cruzada . . . . .	32
5. Discussão dos resultados . . . . .	34
5.1 - Curva de crescimento e tempo de geração. .	34
5.2 - Comportamento da bactéria em relação a antibióticos adicionados ao meio sólido . .	34
5.2.1 - Estreptomicina . . . . .	34
5.2.2 - Penicilina . . . . .	35
5.2.3 - Aureomicina . . . . .	36
5.2.4 - Comparação entre as 3 curvas de sobrevivência . . . . .	37
5.3 - Comportamento da bactéria em relação a antibióticos adicionados ao meio líquido . .	37
5.3.1 - Estreptomicina . . . . .	37
5.3.2 - Penicilina . . . . .	38
5.3.3 - Aureomicina . . . . .	38
5.4 - Isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos . . . . .	38
5.5 - Resistência cruzada . . . . .	40
6. Resumo e conclusões . . . . .	41
7. Summary and Conclusions . . . . .	43
8. Agradecimentos . . . . .	44
9. Bibliografia citada . . . . .	45

•••

## 1. INTRODUÇÃO

São numerosas as pesquisas efetuadas em todo o mundo, sôbre a resistência de bactérias aos mais diversos antibióticos, e, sôbre o mecanismo genético dessa resistência. Tais estudos, em sua quase totalidade, referem-se a bactérias de interêsse médico, devido principalmente, à larga aplicação que os antibióticos apresentam em medicina.

Em relação a bactérias de âmbito fitopatogênico, isto é, bactérias que causam doenças em vegetais, os trabalhos a êsse respeito, são bem menos frequentes.

Propuzemo-nos então, a estudar o comportamento da Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson, com respeito a três diferentes antibióticos. Tal bactéria, ataca a couve, além de outras Crucíferas, causando a doença conhecida pelo nome de "podridão negra das Crucíferas".

A principal finalidade de nosso trabalho foi a de fornecer uma contribuição ao estudo genético de uma bactéria tipicamente fitopatogênica e ao mesmo tempo, verificar "in vitro", o mecanismo da resistência da Xanthomonas campestris à penicilina, estreptomina e aureomicina. Tal estudo apresenta importância prática pois o tratamento, principalmente de sementes, com antibióticos, vem se difundindo como prática de grande valor na agricultura. Êste tratamento, visa o combate a diversas doenças produzidas por microrganismos em vegetais, incluindo a "podridão negra das Crucíferas", como no caso em aprêço.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

A literatura publicada a respeito da ação dos antibióticos é do aparecimento de formas resistentes em bactérias de interesse médico, é bastante vasta. As revisões de Bryson e Szybalski em 1955 (4), de Finland em 1956 (14) e a de Schnitzer e Grunberg (27) publicada em 1957, dão uma idéia da complexidade do assunto.

No que se refere à bactérias fitopatogênicas, a literatura a respeito é bem mais restrita. Encontramos trabalhos efetuados em campo, visando o controle de doenças vegetais, com finalidades práticas e, também encontramos, alguns estudos realizados com bactérias "in vitro", a fim de se ensaiar sua resistência à drogas. Sobre o assunto, Zaumeyer (34) em 1956 e novamente Zaumeyer (35) em 1958, apresentou notáveis revisões, dando uma perfeita idéia de como se encontra o problema até essa época.

Os trabalhos publicados, com bactérias fitopatogênicas, explorando o campo da Genética da resistência a antibióticos, infelizmente são raros.

Mitchel, Zaumeyer e Anderson (24) em 1952, referem-se à resistência que Xanthomonas phaseoli e outras bactérias fitopatogênicas podem adquirir, à estreptomina, quando em contacto com essa droga.

English e Van Halsema (13) em 1954, verificaram que em certas Xanthomonas e Erwinias, mutantes resistentes, eram muito menos frequentes quando se combinaram dois antibióticos, no caso a estreptomina e a terramicina.

Carmona-Gomez (5) em 1956, trabalhando com Xanthomonas phaseoli variedade fuscans e Xanthomonas vignicola, verificou, que o mecanismo genético da resistência dessas bactérias ao antibiótico A-C, produzido por um Streptomyces, seguia o modelo que Demerec, (9) denominou de "múltiplos passos" ("multiple-step"), isto é, efetuando-se várias transferências das bactérias em doses cada vez maiores do antibiótico, a resistência ia aumentando. A Xanthomonas phaseoli, que inicialmente crescia apenas em concentrações menores que 0,75 µg/ml, após nove transferências com intervalos de dez dias entre cada uma, conseguiu

suportar 300  $\mu\text{g/ml}$ . A Xanthomonas vignicola, inicialmente resistente a 3  $\mu\text{g/ml}$ , conseguiu resistir a 400  $\mu\text{g/ml}$ . Devido a tal fato, o autor aconselhou o uso de doses altas de antibióticos no combate a doenças de vegetais. Citou também o fato de que certos métodos de combate a bactérias em campo, a princípio deram bons resultados práticos para depois não serem mais efetivos. Isto só pode ser explicado pela resistência adquirida pela bactéria passo após passo.

Corey e Starr ( 6, 7 ) em 1957, selecionaram mutantes resistentes à estreptomicina, em Xanthomonas phaseoli. Semearam um grande número de bactérias em placas de Petri, contendo meio nutritivo mais 250  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina. Nessas condições, somente as bactérias resistentes puderam formar colônias. Verificaram que tais mutações ocorreram em um só passo. Realizaram ainda, experimentos de transformação, conseguindo obter bactérias resistentes ao antibiótico, misturando células sensíveis com DNA proveniente de bactérias resistentes.

Gyorffy, Iigali, Kallay, Karasz, Klément e Szende ( 16 ) em 1959 na Hungria, trabalhando com a Xanthomonas phaseoli variedade fuscans, estudaram mutantes dessa bactéria, resistentes a três diferentes antibióticos; penicilina, estreptomicina e cloranfenicol. Verificaram que a resistência à estreptomicina, ocorre num só passo, o que não acontece com a penicilina e cloranfenicol. Efetuaram também experimentos de transformação, com bactérias sensíveis e resistentes à estreptomicina, obtendo uma menor frequência de células transformadas do que a achada por Corey e Starr ( 7 ).

Starr ( 29 ) em 1959, fez uma revisão a respeito do estudo genético de bactérias fitopatogênicas, citando o fato de que o caráter resistência à estreptomicina da Xanthomonas phaseoli pode ser também incorporado a outras espécies do mesmo gênero, mediante experimentos de transformação .

Quadling ( 26 ) em 1960, no Canadá, publicou um estudo bastante completo sobre a resistência da Xanthomonas phaseoli linhagem XP 8 ao antibiótico estreptomicina. Obteve não só, mutantes resistentes à droga, como também dependentes. Estudou a taxa de mutação espontânea de resistência à estreptomicina e, várias propriedades dos mutantes resistentes.

Tratando agora, mais particularmente, da Xanthomonas campestris, verificamos que até o presente, as publicações a respeito, referem-se apenas à aplicação de drogas "in vitro" e à aplicação de antibióticos em sementes de vegetais atacados por essa bactéria, com finalidades práticas. Não se cogitou, ao que parece, da realização de um trabalho sob o ponto de vista da genética da resistência a antibióticos, com a referida bactéria.

Em 1946, Gilliver ( 15 ), ensaiou "in vitro", a ação de treze substâncias antibióticas em fungos e bactérias fitopatogênicas, incluindo a Xanthomonas campestris. Utilizou diluições sucessivas de antibióticos em meio líquido. Para a penicilina, concluiu que, a bactéria era inibida, em doses maiores do que 8 unidades Oxford por mililitro.

Sutton e Bell ( 30 ) em 1954, partindo do fato de que a aureomicina, inibe o crescimento da Xanthomonas campestris em concentrações de 0,05  $\mu\text{g/ml}$  a 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , utilizaram soluções de aureomicina, em várias concentrações para o tratamento de sementes. Por comparação com outros tratamentos, verificaram que a aureomicina em solução de concentração 1:1000, atuando trinta minutos sobre as sementes, apresentou os melhores resultados no combate à bactéria.

Thirumalacher, Patel, Kulkarni e Dhand ( 33 ) em 1956, na Índia, ensaiaram "in vitro" a atividade da aureomicina, terramicina, penicilina G, dihidro-estreptomicina e cloranfenicol em trinta e duas espécies do gênero Xanthomonas. Os antibióticos foram ensaiados por difusão em meio sólido nas concentrações de 20  $\mu\text{g/ml}$  para a dihidro-estreptomicina, 50  $\mu\text{g/ml}$  para a penicilina e 60  $\mu\text{g/ml}$  para os outros antibióticos usados. Houve formação de halo de inibição em Xanthomonas campestris, para todos os antibióticos usados, exceção feita à penicilina.

Ark e Stanley ( 1 ) em 1956, fazendo uma revisão sobre o assunto, citaram a aureomicina como efetivo antibiótico contra Xanthomonas campestris.

Lindenfelser, Pridham, Shotwell e Stodola ( 21 ) em 1958, verificaram que a Xanthomonas campestris é inibida por 80  $\mu\text{g/ml}$  de duramicina e, que a concentração bactericida do antibiótico para essa bactéria foi de mais de 100  $\mu\text{g/ml}$ .

Mehta, Gottlieb e Powell ( 23 ) em 1959, fizeram estudos com trinta espécies de bactérias fitopatogênicas em relação à vancomicina. Para a Xanthomonas campestris, a concentração inibitória foi de 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 - Bactéria usada: Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson

Esta bactéria, encontra-se largamente espalhada por todo o globo ( 12 ), sendo isolada de certos vegetais como a couve e outras Crucíferas. Todo o nosso trabalho, foi conduzido com uma linhagem isolada de plantação de couves existente na Seção de Genética da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", em Piracicaba.

O isolamento e identificação da bactéria foi realizada segundo as normas ditadas pelo Manual of Methods for Pure Culture Study of Bacteria ( 28 ) e sua classificação, feita com o auxílio do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology ( 3 ).

Após ser isolada e classificada, a bactéria foi mantida em estoque e repicada de mês em mês. Todos os experimentos sempre que possível foram conduzidos com a bactéria na fase logarítmica de crescimento.

Para determinar-se o número de bactérias viáveis numa cultura de tempos em tempos e a fase logarítmica de crescimento, foi necessário o estudo da curva de crescimento da bactéria, efetuada através do número de bactérias viáveis na cultura. Para tal, um número determinado de bactérias, de cultura idosa, era inoculado em tubos com meio de cultura e, de tempos em tempos, amostras de 0,1 ml eram plaqueadas, em diluições apropriadas, em placas de Petri, com meio sólido. Após incubação por quatro dias a 28°C, foi feita a contagem de colônias nas placas. Conseguiu-se assim, determinar a curva de crescimento e o tempo de cada geração da bactéria.

#### 3.2 - Meios de cultura e drogas

O meio líquido usado, foi o líquido nutriente, contendo 5 gramas de peptona e 3 gramas de extrato de carne dissolvidos em 1000 ml de água destilada. O meio sólido foi o nutriente

ágar, contendo peptona (5 gramas) extrato de carne (3 gramas) e ágar (15 gramas) dissolvidos em 1000 ml de água destilada.

Os antibióticos utilizadas foram: Sulfato de Dihidro-estreptomicina de Merck Sharp & Dohme S.A., penicilina G potássica cristalina da Fontoura - Wyeth S.A. e cloridrato de clortetracilina cristalina de Cyamamid Química do Brasil S.A., divisão Lederle. Para maior facilidade, tais antibióticos serão designados por estreptomicina, penicilina e aureomicina, respectivamente. As soluções de antibióticos foram sempre preparadas, momentos antes de serem utilizadas, por dissolução de quantidades apropriadas dos mesmos, em água destilada esterilizada.

### 3.3 - Descrição dos experimentos em que se usaram antibióticos

#### 3.3.1 - Antibióticos em meio sólido

Xanthomonas campestris, no estágio máximo de crescimento, era semeada em diluições apropriadas, em placas de Petri, contendo meio sólido mais antibiótico.

Para a estreptomicina foram usadas as concentrações de 1; 2; 3; 5; 6; 10; 20; e 40  $\mu\text{g/ml}$ .

Para a penicilina, concentrações de 10; 20; 30; 50; 100; 200; 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  foram usadas.

Para a aureomicina, usou-se concentrações de 0,025; 0,05; 0,075; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 1 e 2  $\mu\text{g/ml}$ .

O controle foi feito por plaqueamento da mesma cultura em meio sólido sem antibióticos.

Semeou-se sempre 0,1 ml da cultura, espalhando-se a seguir com o espalhador de vidro e, incubando-se de cinco a seis dias, a 28°C. Após êsse período, efetuou-se a contagem das colônias.

Por comparação entre controle e tratamentos, tirou-se a percentagem de sobreviventes nas diversas concentrações de antibióticos.

#### 3.3.2 - Antibióticos em meio líquido

Um pequeno número de bactérias foi inoculado em tubos contendo 10 ml de líquido nutriente mais antibiótico.

Para a estreptomicina foram usados tubos com seis diferentes concentrações, a saber: 3; 4; 5; 6; 10 e 20  $\mu\text{g/ml}$ ; amostras de 0,1 ml foram retiradas depois de 1, 2, 2 1/2 e 24 horas, e semeadas em nutriente ágar.

Para a penicilina, foram usados sete tubos, com as concentrações de 10; 20; 40; 100; 200; 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$ . Amostras de 0,1 ml foram retiradas após 1; 4; 6 e 24 horas e semeadas em nutriente ágar.

Finalmente, para a aureomicina, foram usados oito tubos com concentrações de 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,16; 0,32; 0,64 e 1,28  $\mu\text{g/ml}$  e amostras de 0,1 ml foram retiradas após 1 hora, 2 horas, 4 horas, 24 horas e 48 horas e, semeadas em nutriente ágar.

Os plaqueamentos sempre foram de 0,1 ml das culturas, em placas de Petri com nutriente ágar, espalhando-se com o espalhador de vidro.

O controle foi feito por inoculação do mesmo número de bactérias em tubo contendo 10 ml de líquido nutriente sem antibiótico. As amostras do controle foram retiradas na hora zero e toda vez, que se retiravam amostras dos tratamentos.

Tôdas as placas foram incubadas por quatro a cinco dias a 28°C e após, procedia-se a contagem das colônias. Por comparação entre o controle na hora zero e os tratamentos, puderam ser estabelecidas as diversas porcentagens de sobreviventes.

### 3.3.3 - Isolamento de mutantes resistentes

Para a estreptomicina, grande quantidade de bactérias era plaqueada em nutriente ágar, ao qual se adicionou 10  $\mu\text{g/ml}$  e 20  $\mu\text{g/ml}$  do antibiótico. Para cada placa com 20  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina, foi feito título para contagem do número de colônias, semeando-se a bactéria em placas sem estreptomicina. Incubou-se por cinco a seis dias a 28°C. As colônias que cresceram nas placas com antibióticos, eram assim resistentes à estreptomicina e foram em seguida isoladas. Algumas foram ensaiadas em tubos com meio líquido contendo concentrações de 0; 0,5; 1; 2; 10; 100; 1000; 2000; 4000; 8000 e 10.000  $\mu\text{g/ml}$ . Para tal, inoculou-se um pequeno número de bactérias em cada tubo e depois de incu-

bação por 5 a 6 dias a 28°C observou-se a turvação do líquido de cultura. Foi feito o contrôle, com 0  $\mu\text{g/ml}$  de antibiótico e também como contrôle a linhagem original, sensível, foi ensaiada.

Para a penicilina e aureomicina, utilizou-se o método da placa gradiente (31,32) fazendo-se sete transferências na penicilina e sete na aureomicina com intervalos de seis dias entre cada uma. Os gradientes usados para a penicilina foram os seguintes:

1º.	0 a	10 $\mu\text{g/ml}$
2º.	0 a	20 $\mu\text{g/ml}$
3º.	0 a	50 $\mu\text{g/ml}$
4º.	0 a	100 $\mu\text{g/ml}$
5º.	0 a	200 $\mu\text{g/ml}$
6º.	0 a	400 $\mu\text{g/ml}$
7º.	0 a	1000 $\mu\text{g/ml}$

Colônias isoladas do último gradiente, foram ensaiadas em meio líquido mais 0; 10; 20; 50; 100; 200; 400; 500 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  e a leitura feita pela turvação do meio de cultura. A cultura original foi também ensaiada nas mesmas concentrações.

Para a aureomicina, os gradientes foram os seguintes:

1º.	0 a	0,4 $\mu\text{g/ml}$
2º.	0 a	0,8 $\mu\text{g/ml}$
3º.	0 a	1 $\mu\text{g/ml}$
4º.	0 a	1,5 $\mu\text{g/ml}$
5º.	0 a	2 $\mu\text{g/ml}$
6º.	0 a	2,5 $\mu\text{g/ml}$
7º.	0 a	3 $\mu\text{g/ml}$

Colônias isoladas do último gradiente, foram ensaiadas em meio líquido mais 0; 0,01; 0,02; 0,04; 0,1; 0,5; 1; 2 e 4  $\mu\text{g/ml}$  e, a leitura, feita pela turvação do meio de cultura após 5-6 dias de incubação a 28°C. A cultura original também foi ensaiada nas mesmas concentrações.

#### 3.3.4 - Resistência cruzada

Foi ensaiado mutante, resistente à estreptomicina, em relação à resistência para aureomicina e penicilina. Mutante, resistente à penicilina, foi ensaiado em aureomicina e estreptomi-

cina c, mutante resistente à aureomicina, foi ensaiado em estreptomicina e penicilina.

Os ensaios foram feitos, inoculando-se um pequeno número de bactérias em 10 ml de meio líquido mais 0,5; 1; 2; 10; 100 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  de estreptomicina, 10; 20; 50; 100; 200; 400 e 1000  $\mu\text{g/ml}$  para a penicilina e, 0,01; 0,02; 0,04; 0,08; 0,1; 0,5; 1; 2 e 3  $\mu\text{g/ml}$  de aureomicina.

Após incubação por cinco a seis dias a 28°C, foi feita a leitura nos tubos inoculados, considerando-se a turvação do meio de cultura. Foi feito sempre, o contrôlo, com a bactéria sensível.

#### 4. RESULTADOS OBTIDOS

##### 4.1 - Identificação e classificação da espécie

Uma vez isolada a bactéria, em cultura pura, em vasos de caule, tipicamente infestados, de Brassica oleraceae variedade acephala aplicaram-se os testes morfológicos e bioquímicos para a identificação da mesma. Obtiveram-se os seguintes resultados:

Forma - Bacilos retos, isolados

Dimensões - 0,3 a 0,4  $\mu$  de largura por 1 a 3  $\mu$  de comprimento.

Coloração de Gram - Gram negativas

Motilidade - móveis

Coloração de flagelos - flagelo presente, em posição polar.

Esporos - ausentes

Produção de gás sulfídrico - positiva

Produção de catalase - positiva

Amido - fortemente hidrolizado

Nitrato - não reduzido

Leite - coagulou em uma semana

Indol - fracamente produzido

Vermelho de metila - negativo

Voges-Proskauer - negativo

Ação em carboidratos - glucose, sacarose, lactose, manitol e glicerol - acidificaram e não produziram gás.

Gelatina - pouco liquefeita

Tipo de crescimento em tubos com nutriente - ágar inclinado - crescimento - bom

coloração - amarelo forte

linha - filiforme

lustro - luzidio

Colônias em nutriente-ágar - bordos - lisos

forma - circular

côr - amarela

lustro - luzidio

Colônias em extrato de carne-ágar - côr - amarela

Crescimento a 28°C no líquido nutriente - bom, turvando todo o meio e sedimento amarelo no fundo.

Crescimento a 37°C - nulo.

Pela chave de classificação do Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, ( 3 ) a referida bactéria ficou enquadrada dentro do gênero Xanthomonas e, na chave de espécies dêsse gênero, enquadrou-se na espécie Xanthomonas campestris (Pammel, 1895) Dowson, 1939.

#### 4.2 - Determinação da curva de crescimento

A curva de crescimento em líquido nutriente, a partir do número de bactérias viáveis, foi calculada. Os resultados de três experimentos estão no quadro I. O gráfico I, representa o número de bactérias viáveis em função do tempo.

O cálculo do tempo de geração ( 20 ), foi feito entre 24 e 54 horas: sendo pela fórmula que se segue abaixo,  $N_f$  = número de bactérias na hora 54,  $N_i$  = número de bactérias na hora 24 e  $n$  o número de gerações,  $N_f = N_i \times 2^n$ . Substituindo-se os dados obtidos (Quadro I), na fórmula, teremos:

$$3,0 \times 10^8 = 5,3 \times 10^2 \times 2^n$$

$$n = 19,1126 \text{ gerações (30 horas)}$$

$$1 \text{ geração} = 93,6 \text{ minutos.}$$

15.975

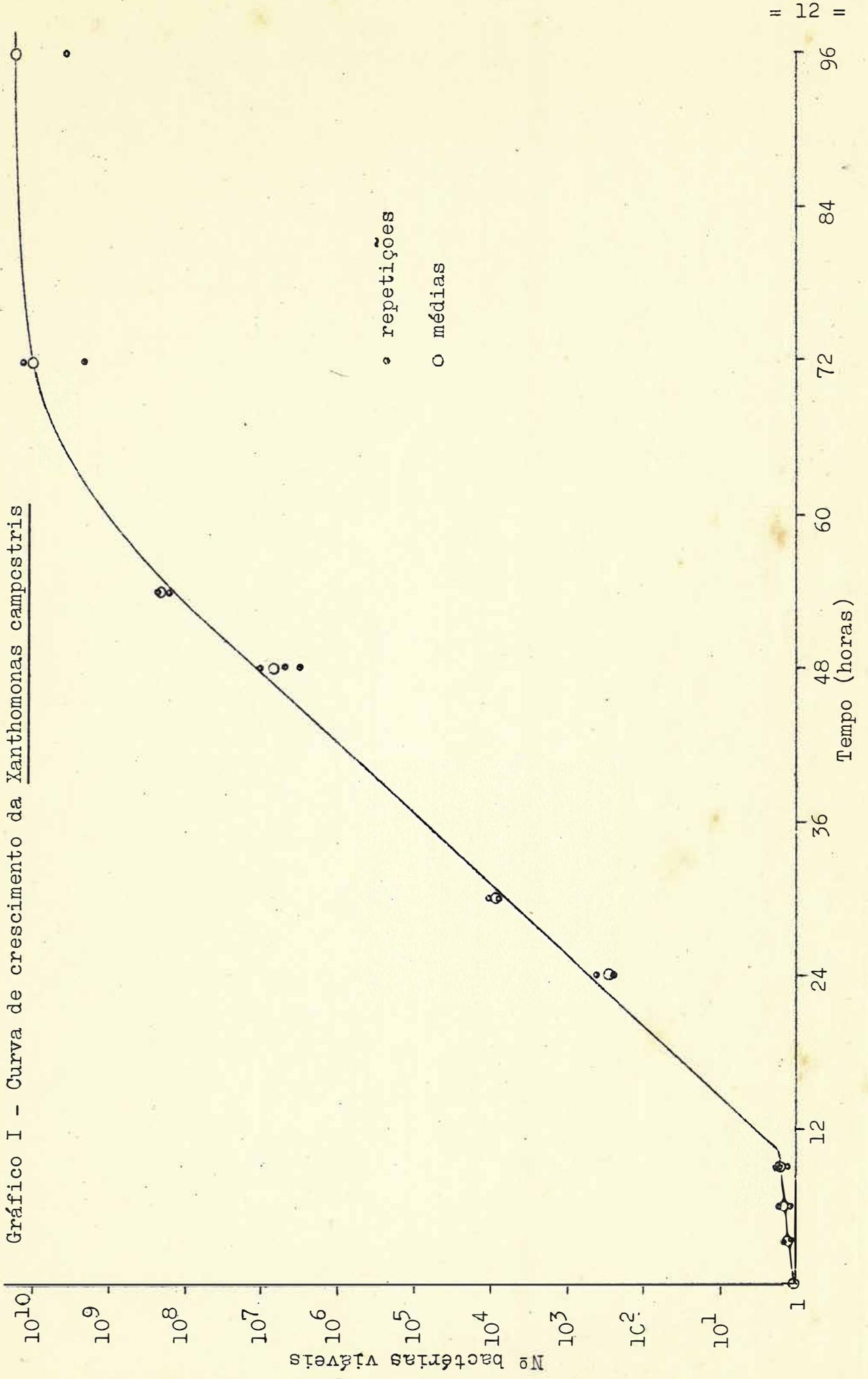
Quadro I - Número médio de bactérias viáveis/ml em diversos tempos  
(Resultados de 3 experimentos)

Horas	Diluições *	Nº médio de colônias por placa <sup>+</sup>	Nº de bactérias viáveis/ml	Redução a uma bactéria	Médias
0	sem diluir	8	80	1	1
		311,3	3113	1	
		8,6	86	1	
3	sem diluir	11	110	1,4	1,5
		457	4570	1,5	
		14	140	1,6	
6	sem diluir	14	140	1,8	2,2
		768	7680	2,5	
		--	--	--	
9	sem diluir	26	260	3,2	2,7
		810	8100	2,6	
		16,3	163	1,9	
24	10 <sup>-3</sup>	5	5,0x10 <sup>4</sup>	6,2x10 <sup>2</sup>	5,3x10 <sup>2</sup>
		150	1,5x10 <sup>6</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>	
		4,1	4,1x10 <sup>4</sup>	4,8x10 <sup>2</sup>	
30	10 <sup>-3</sup>	77	7,7x10 <sup>5</sup>	9,6x10 <sup>3</sup>	9,8x10 <sup>3</sup>
		3200	3,2x10 <sup>7</sup>	1,0x10 <sup>4</sup>	
		--	--	--	
48	10 <sup>-7</sup>	8	8,0x10 <sup>8</sup>	1,0x10 <sup>7</sup>	7,3x10 <sup>6</sup>
		220	2,2x10 <sup>10</sup>	7,0x10 <sup>6</sup>	
		4,3	4,3x10 <sup>8</sup>	5,0x10 <sup>6</sup>	
54	10 <sup>-8</sup>	21,2	2,1x10 <sup>10</sup>	2,6x10 <sup>8</sup>	3,0x10 <sup>8</sup>
		1194	1,1x10 <sup>12</sup>	3,5x10 <sup>8</sup>	
		--	--	--	
72	10 <sup>-10</sup>	3	3,0x10 <sup>11</sup>	3,8x10 <sup>9</sup>	9,4x10 <sup>9</sup>
		--	--	--	
		13,3	1,3x10 <sup>12</sup>	1,5x10 <sup>10</sup>	
96	10 <sup>-10</sup>	--	--	--	2,4x10 <sup>10</sup>
		81	8,1x10 <sup>12</sup>	2,6x10 <sup>9</sup>	
		40	4,0x10 <sup>12</sup>	4,6x10 <sup>10</sup>	

\* 0,1 ml plaqueados

+ pelo menos 3 placas

Gráfico I - Curva de crescimento da Xanthomonas campestris



#### 4.3. Resistência da bactéria a antibióticos adicionados ao meio sólido.

##### 4.3.1 - Estreptomina

Os números de sobreviventes nas diversas concentrações de estreptomina, encontram-se no quadro II. Colocando-se num gráfico, a porcentagem de sobreviventes em relação às concentrações de estreptomina, vamos obter uma curva que vai mostrar como se processa a queda da viabilidade com o aumento da concentração do antibiótico (gráfico II). A linha pontilhada nesse gráfico, indica como se processaria teoricamente a queda de viabilidade, se o material fôsse uniforme com relação à resistência à estreptomina.

Nas placas com a estreptomina, aparecem dois tipos distintos de colônias; brancas puntiformes e amarelas normais. As primeiras surgem em concentrações mais baixas do antibiótico (até mais ou menos 10  $\mu$ g/ml). Para o cálculo da porcentagem de sobreviventes, as contagens foram feitas independentemente do tipo de colônia.

##### 4.3.2 - Penicilina

Os números de sobreviventes em porcentagem, nas diversas concentrações de penicilina usadas, estão no quadro III. Num gráfico, colocando-se concentração de penicilina, contra porcentagem de sobreviventes, vamos obter a curva característica para a penicilina, (gráfico III). A linha pontilhada indica como seria a curva teórica se o material fôsse completamente uniforme com relação à resistência à penicilina.

##### 4.3.3 - Aureomicina

As porcentagens de sobreviventes nas diversas concentrações de aureomicina usadas, encontram-se no quadro IV. O gráfico IV mostra a curva de resistência da bactéria ao antibiótico. A linha pontilhada indica como continuaria teoricamente a curva, se a população fôsse uniforme com relação à resistência à aureomicina.

##### 4.3.4 - Comparação entre as três curvas de sobrevivência obtidas.

As curvas obtidas em relação à sobrevivência à estreptomina, penicilina e aureomicina, adaptadas em uma mesma escala, apresentam o aspecto representado no gráfico V.

Quadro II - Porcentagem de sobreviventes à estreptomicina adicionada ao meio sólido

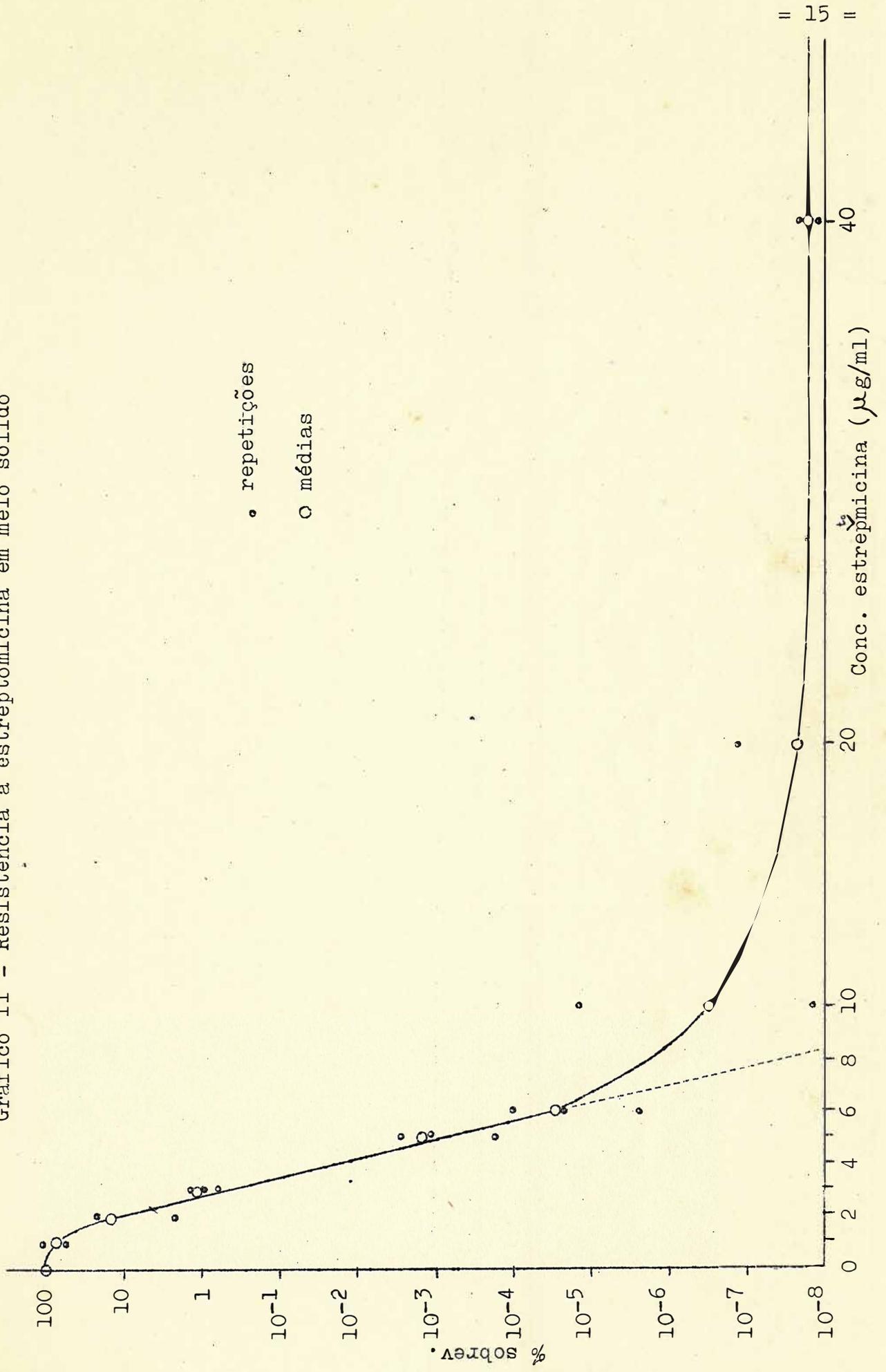
(Resultados de 3 experimentos)

Concentrações de estreptomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	diluição*	Nº médio de colônias por placa <sup>+</sup>	Nº sobreviventes	Porcentagem sobre viventes	Porcentagens médias
0	$10^{-9}$	50	$5,0 \times 10^{11}$	100,0	100,0
	$10^{-10}$	16	$1,6 \times 10^{12}$	100,0	
	$10^{-7}$	7	$7,0 \times 10^8$	100,0	
1	$10^{-8}$	400	$4,0 \times 10^{11}$	80,0	85,2
	$10^{-10}$	40	$4,0 \times 10^{12}$	100,0	
	$10^{-7}$	5,3	$5,3 \times 10^8$	75,7	
2	$10^{-8}$	140	$1,4 \times 10^{11}$	28,0	23,1
	$10^{-8}$	64	$6,4 \times 10^{10}$	4,0	
	$10^{-6}$	26	$2,6 \times 10^8$	37,1	
3	$10^{-6}$	400	$4,0 \times 10^9$	0,8	1,0
	$10^{-7}$	208	$2,1 \times 10^{10}$	1,3	
	$10^{-4}$	70	$7,0 \times 10^6$	1,0	
5	$10^{-4}$	106	$1,0 \times 10^7$	$2,0 \times 10^{-3}$	$2,4 \times 10^{-3}$
	$10^{-6}$	8	$8,0 \times 10^7$	$5,0 \times 10^{-3}$	
	$10^{-2}$	21	$2,1 \times 10^3$	$3,0 \times 10^{-4}$	
6	$10^{-2}$	22	$2,2 \times 10^4$	$4,4 \times 10^{-6}$	$5,1 \times 10^{-5}$
	$10^{-4}$	8	$8,0 \times 10^5$	$5,0 \times 10^{-5}$	
	s/diluir	80	$8,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-4}$	
10	s/diluir	62	$6,2 \times 10^2$	$1,2 \times 10^{-8}$	$5,7 \times 10^{-7}$
	s/diluir	23	$2,3 \times 10^2$	$1,4 \times 10^{-8}$	
	s/diluir	11	$1,1 \times 10^2$	$1,7 \times 10^{-5}$	
20	s/diluir	1	$1,0 \times 10^1$	$2,0 \times 10^{-9}$	$4,8 \times 10^{-8}$
	s/diluir	5	$5,0 \times 10^1$	$3,0 \times 10^{-9}$	
	s/diluir	0,1	1	$1,4 \times 10^{-7}$	
40	s/diluir	5	$5,0 \times 10^1$	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$
	s/diluir	48	$4,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^{-8}$	
	s/diluir	0	0	0	

\* 0,1 ml plaqueadas

+ média de 3 placas no mínimo

Gráfico II - Resistência à estreptomomicina em meio sólido



Quadro III- Porcentagem de sobreviventes à penicilina adicionada ao meio sólido

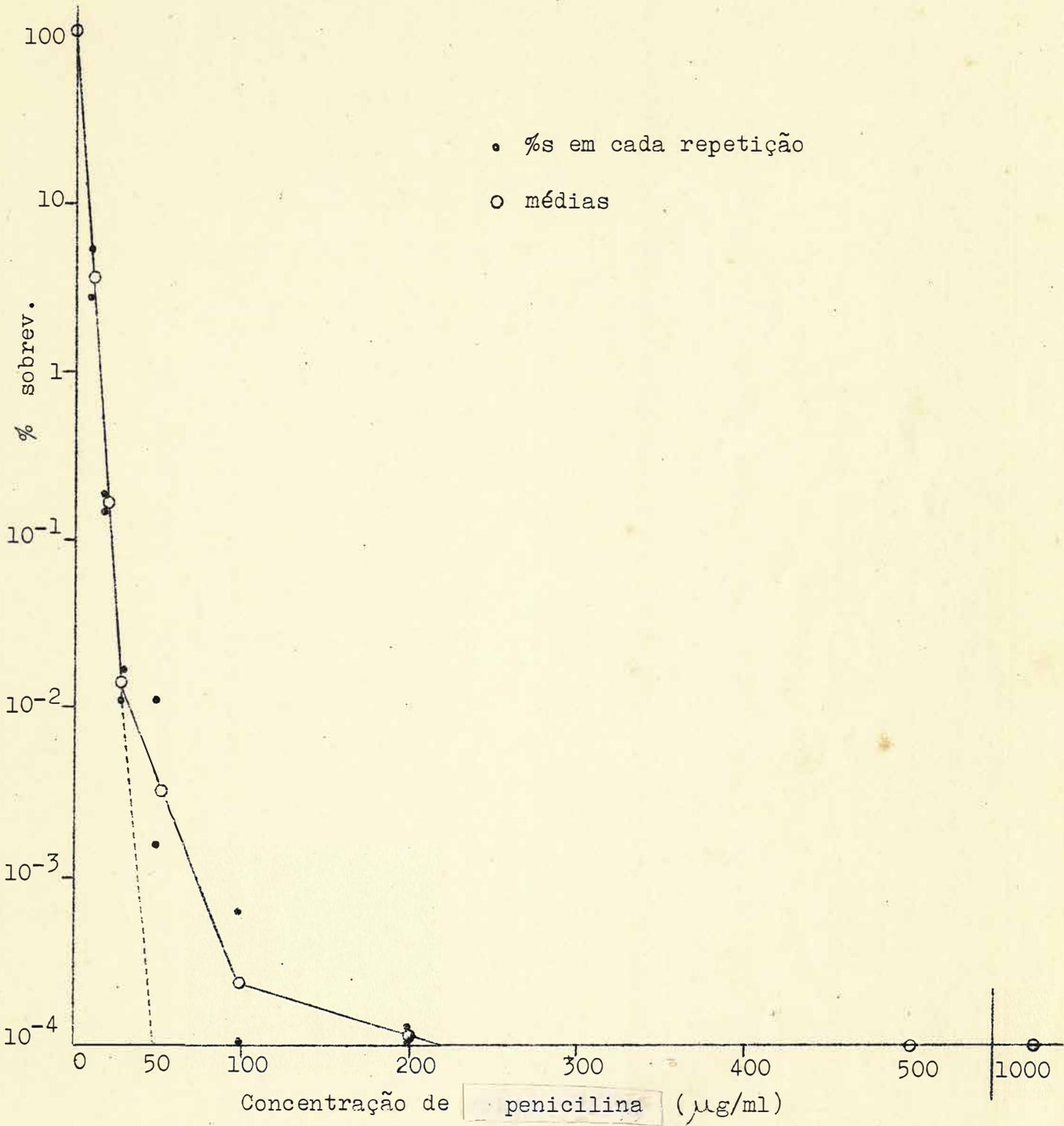
(Resultados de 3 experimentos)

Concentrações de penicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )	diluição*	Nº médio de colônias por placa†	Nº sobreviventes	Porcentagem sobre viventes	Porcentagens médias
0	$10^{-6}$	223	$2,2 \times 10^9$	100,0	100,0
		150	$1,5 \times 10^9$	100,0	
		60,8	$6,1 \times 10^8$	100,0	
10	$10^{-6}$	16,4	$1,6 \times 10^8$	7,4	5,7
	$10^{-4}$	735	$7,4 \times 10^7$	4,9	
	$10^{-4}$	298	$3,0 \times 10^7$	4,9	
20	$10^{-4}$	68	$6,8 \times 10^6$	$3,1 \times 10^{-1}$	$3,0 \times 10^{-1}$
	$10^{-4}$	50	$5,0 \times 10^6$	$3,3 \times 10^{-1}$	
	$10^{-2}$	1600	$1,6 \times 10^6$	$2,6 \times 10^{-1}$	
30	$10^{-4}$	3	$3,0 \times 10^5$	$1,4 \times 10^{-2}$	$2,3 \times 10^{-2}$
	$10^{-4}$	5	$5,0 \times 10^5$	$3,3 \times 10^{-2}$	
	$10^{-2}$	128	$1,3 \times 10^5$	$2,1 \times 10^{-2}$	
50	s/diluir	77	$7,7 \times 10^2$	$3,5 \times 10^{-5}$	$5,2 \times 10^{-3}$
	$10^{-2}$	39	$3,9 \times 10^4$	$2,6 \times 10^{-3}$	
	$10^{-2}$	79,3	$7,9 \times 10^4$	$1,3 \times 10^{-2}$	
100	$10^{-2}$	17	$1,7 \times 10^4$	$7,7 \times 10^{-4}$	$4,4 \times 10^{-4}$
	--	--	--	--	
	$10^{-2}$	0,6	$6,0 \times 10^2$	$1,0 \times 10^{-4}$	
200	s/diluir	260	$2,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^{-4}$	$1,4 \times 10^{-4}$
	s/diluir	250	$2,5 \times 10^3$	$1,7 \times 10^{-4}$	
	--	--	--	--	
500	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
1000	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	

\* 0,1 ml plaqueados

+ médias de 3 placas pelo menos

Gráfico III - Resistência à penicilina  
em meio sólido



Quadro IV - Porcentagem de sobreviventes à aureomicina adicionada ao meio sólido (Resultados de 3 experimentos)

Concentrações de aureomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )	diluição*	Nº médio de colônias por placa <sup>+</sup>	Nº sobreviventes	Porcentagem sobreviventes	Porcentagens médias
0	$10^{-6}$	880	$8,8 \times 10^9$	100,0	100,0
	$10^{-7}$	26	$2,6 \times 10^9$	100,0	
	$10^{-6}$	66,6	$6,6 \times 10^8$	100,0	
0,025	$10^{-6}$	800	$8,0 \times 10^9$	90,9	87,5
		208	$2,1 \times 10^9$	80,7	
		60	$6,0 \times 10^8$	90,9	
0,05	$10^{-6}$	500	$5,0 \times 10^9$	56,8	34,8
		90	$9,0 \times 10^8$	34,6	
		8,5	$8,5 \times 10^7$	12,9	
0,075	$10^{-6}$	2	$2,0 \times 10^7$	0,23	4,0
		11	$1,1 \times 10^8$	4,2	
		5	$5,0 \times 10^7$	7,6	
0,1	$10^{-4}$	26	$2,6 \times 10^6$	$2,2 \times 10^{-2}$	$4,8 \times 10^{-2}$
		25	$2,5 \times 10^6$	$9,6 \times 10^{-2}$	
		1,8	$1,8 \times 10^5$	$2,7 \times 10^{-2}$	
0,2	$10^{-2}$	23	$2,3 \times 10^4$	$2,3 \times 10^{-4}$	$9,1 \times 10^{-5}$
	s/diluir	50	$5,0 \times 10^2$	$1,9 \times 10^{-5}$	
	s/diluir	16	$1,6 \times 10^2$	$2,4 \times 10^{-5}$	
0,3	s/diluir	3	$3,0 \times 10^1$	$3,4 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-6}$
		9	$9,0 \times 10^1$	$3,5 \times 10^{-6}$	
		0,75	7,5	$1,1 \times 10^{-6}$	
0,4	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
0,5	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
0,6	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
1	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	
2	s/diluir	0	0	0	0
		0	0	0	
		0	0	0	

\* 0,1 ml plaqueados

+ pelo menos 3 placas

Gráfico IV - Resistência à aureomicina em meio sólido

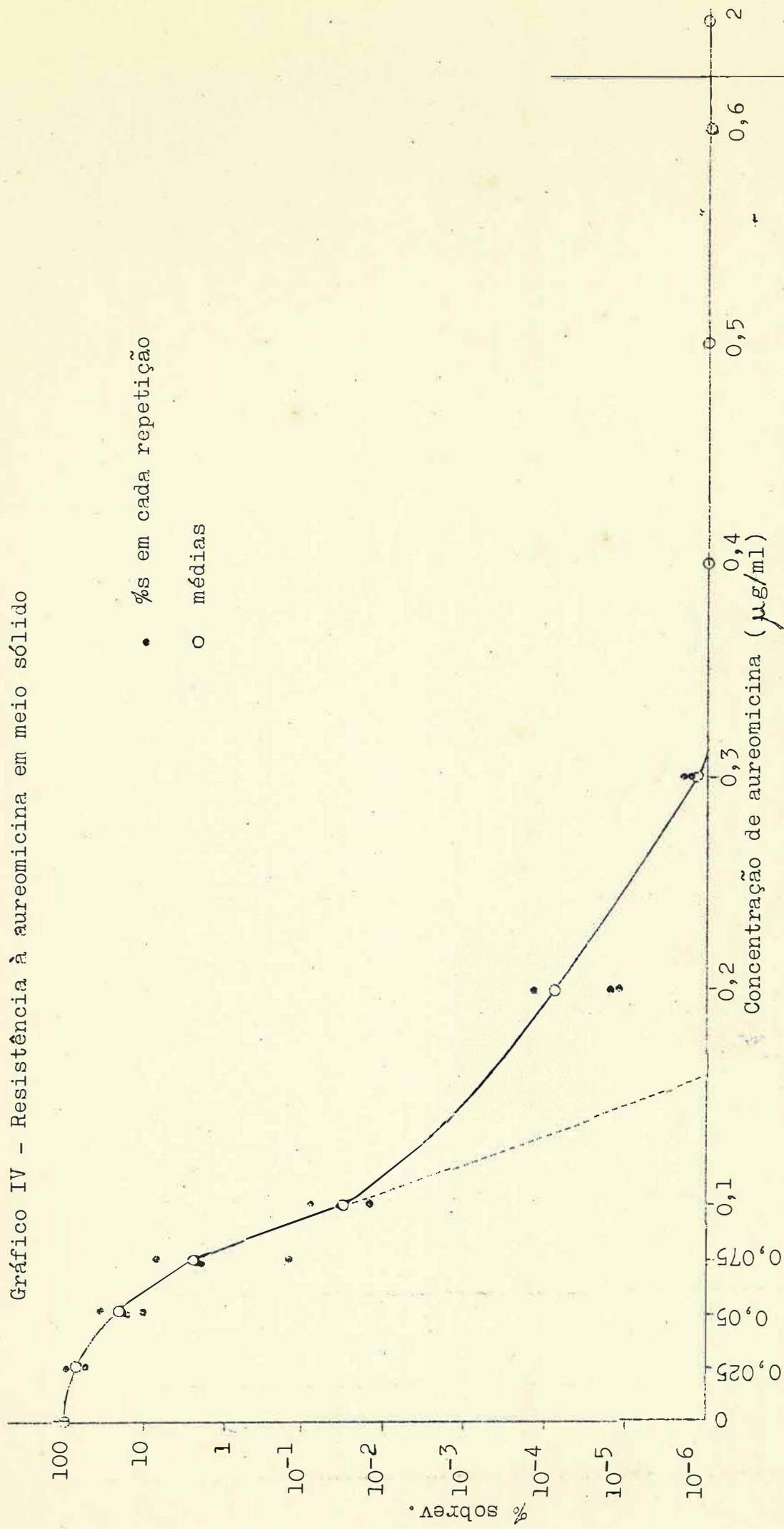
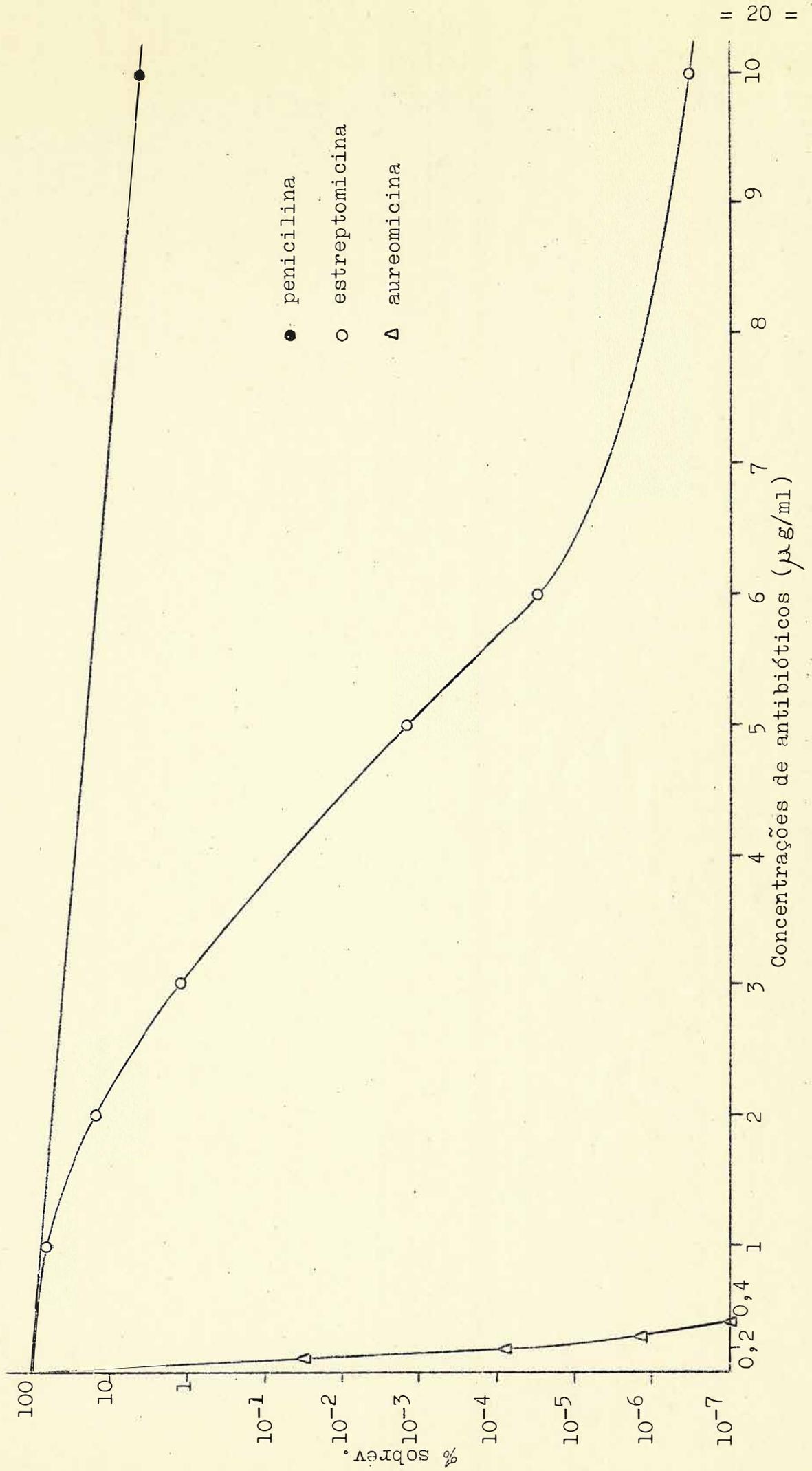


Gráfico V - Comparação entre as 3 curvas de sobrevivência obtidas



#### 4.4 - Resistência da bactéria a antibióticos adicionados ao meio líquido

##### 4.4.1 - Estreptomina

O quadro V dá o número de sobreviventes, em termos de porcentagem, nas diversas concentrações usadas.

Num gráfico, colocando-se nas ordenadas, a porcentagem de sobreviventes e, nas abcissas, o tempo de ação da droga, vamos obter curvas relativas a cada concentração de antibiótico usada. (gráfico VI). Para se salientar o decréscimo de viabilidade nas diversas horas em que foram retiradas as amostras, podemos colocar em um dos eixos a porcentagem de sobreviventes e no outro eixo as concentrações de estreptomina empregadas, (gráfico VII).

Quadro V - Porcentagens de sobreviventes em relação ao número de bactérias inoculadas. Estreptomina

(Porcentagens médias de 3 experimentos)

Tempo (Horas)	Concentrações de estreptomina ( $\mu\text{g/ml}$ )						
	0	3	4	5	6	10	20
1	100*	26,5	2,04	9,1	6,7	0,5	0
2	100	1,15	0,5	0,1	0,1	0	0
2 1/2	100	0,53	0,028	0	0	0	0
24	100	0	0	0	0	0	0

\* cêrca de  $3 \times 10^3$  a  $5 \times 10^3$  bac. inoculadas/ml.

Gráfico VI - Decréscimo da % de sobreviventes com o aumento da concentração de estreptomicina

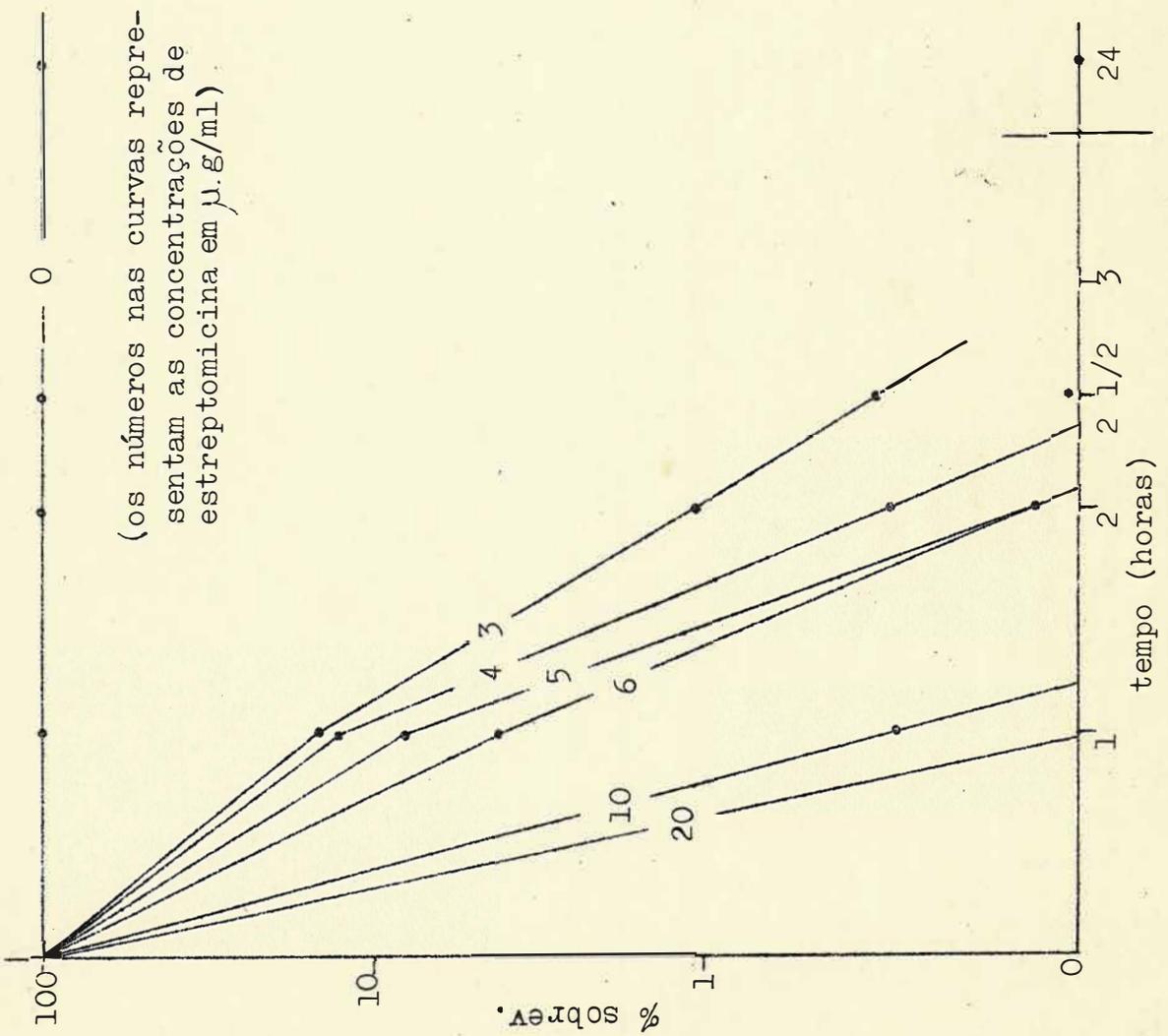
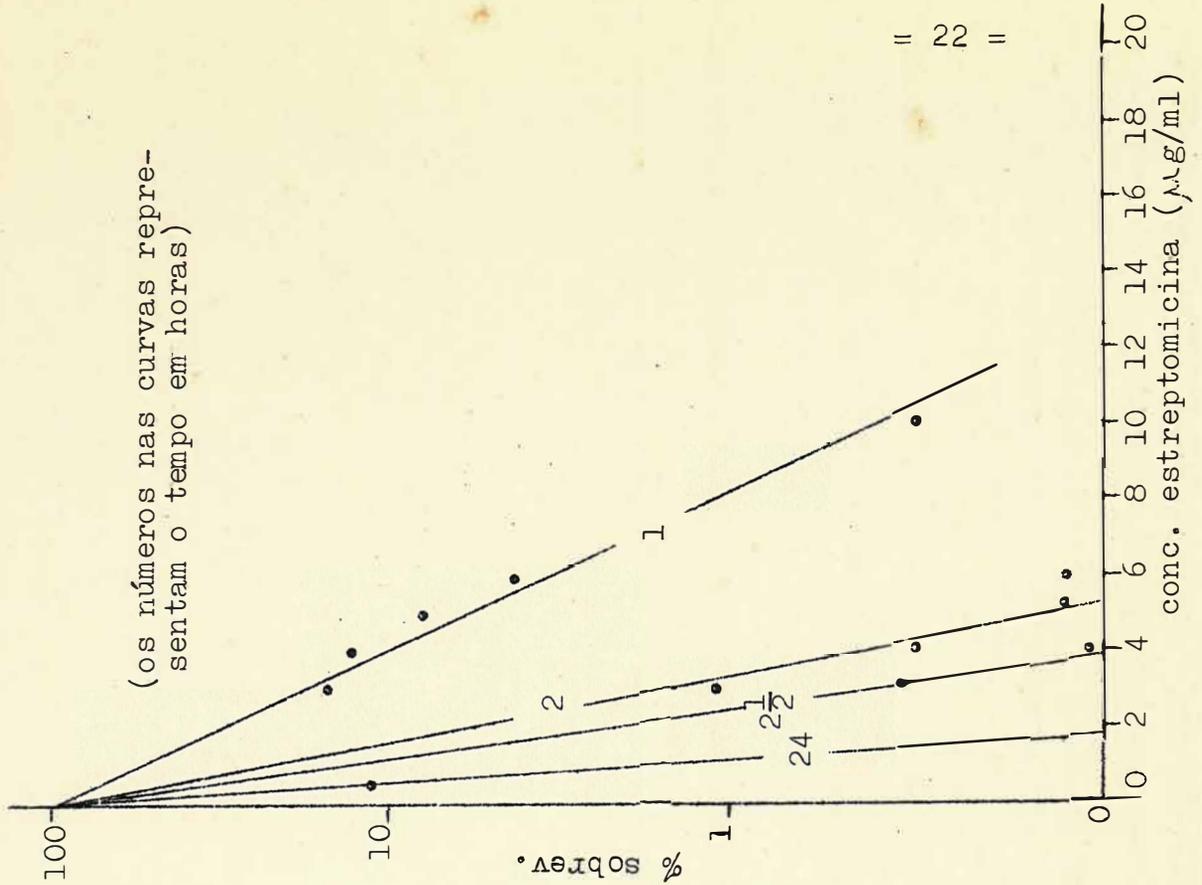


Gráfico VII - Decréscimo da % de sobreviventes com o tempo. Estreptomicina



4.4.2.- Penicilina

O quadro VI dá as porcentagens de sobrevivência nos diversos tempos de retirada de amostras e, concentrações usadas.

Da mesma forma que para a estreptomomicina, os gráficos VIII e IX dão as relações entre concentrações de antibióticos, tempo de contacto e porcentagem de sobreviventes.

Quadro VI - Porcentagens de sobreviventes em relação ao número de bactérias inoculadas. Penicilina.

(Porcentagens médias de 3 experimentos)

Tempo (Horas)	Concentrações de penicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )							
	0	10	20	40	100	200	500	1000
1	100*	100	100	34,0	69,0	22,7	34,0	4,9
4	100	100	100	23,8	22,7	10,6	1,8	0,45
6	100	100	100	17,0	5,0	2,5	0,85	0
24	100	100	4,9	-	0,51	0	0	0

\* de  $6 \times 10^3$  até  $2 \times 10^4$  bac/ml.

Gráfico VIII - Decréscimo da % de sobreviventes com o aumento da concentração de penicilina.

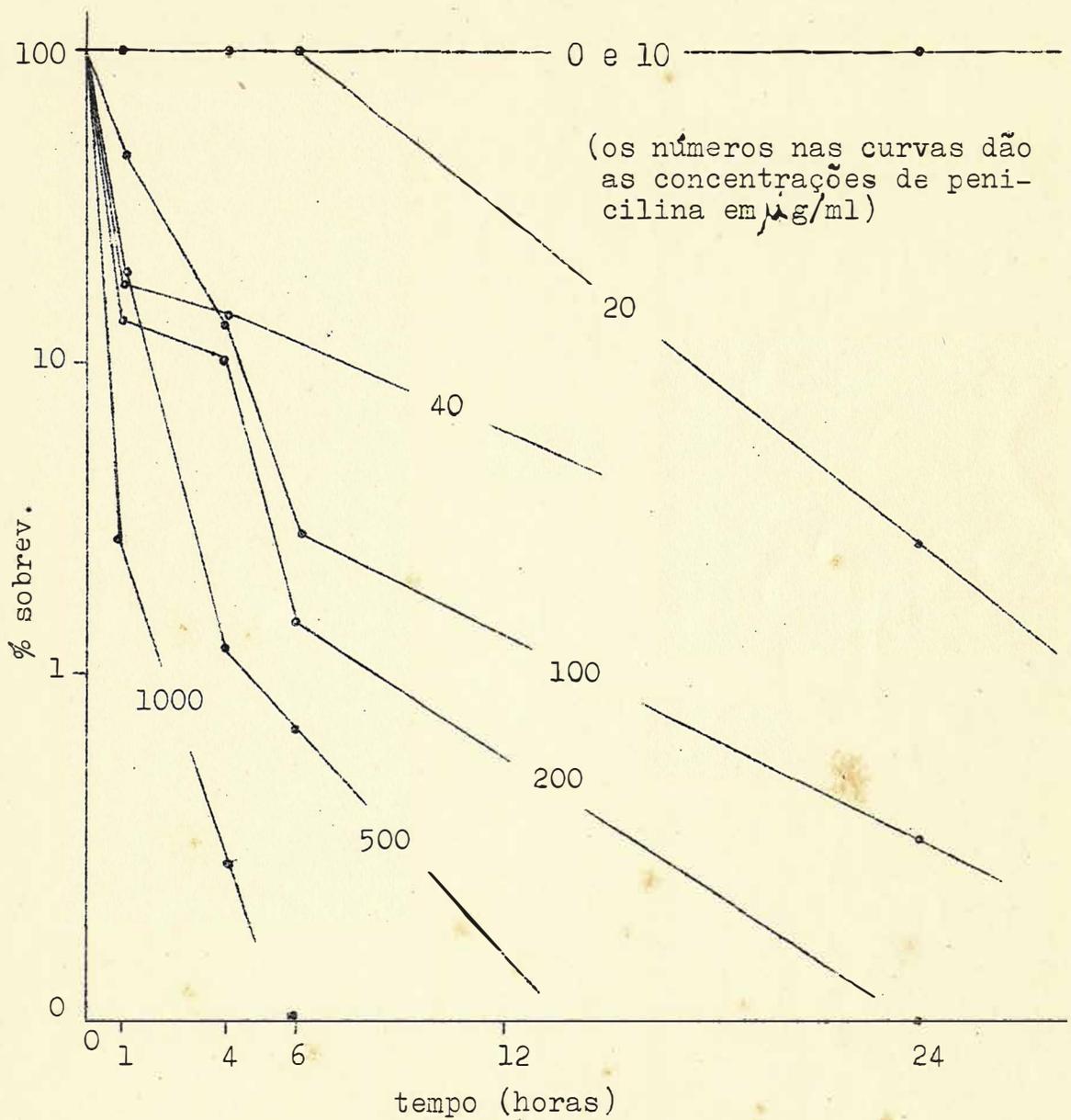
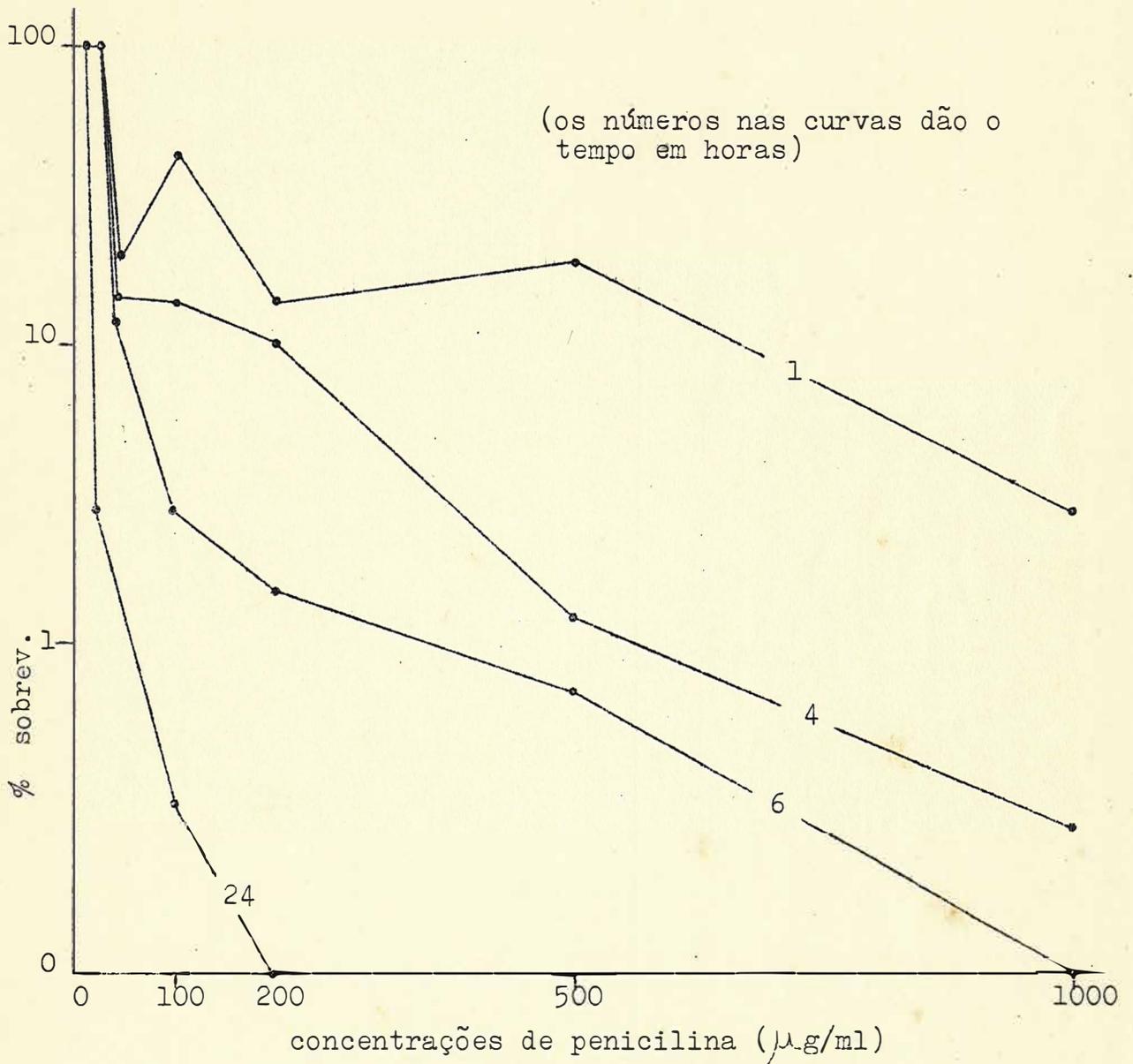


Gráfico IX - Decréscimo da % de sobreviventes com o tempo. Penicilina.



4.4.3 - Aureomicina

O quadro VII apresenta as porcentagens de sobrevivência nos tempos e concentrações usadas.

Como para os dois antibióticos anteriores, podem ser construídos gráficos salientando as relações entre o decréscimo da viabilidade com o aumento de concentração do antibiótico e tempo de contacto (gráficos X e XI).

Quadro VII - Porcentagens de sobreviventes em relação do número de bactérias inoculadas - Aureomicina

(Porcentagens médias de 4 Experimentos)

TEMPO (Horas)	Concentrações de aureomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0	0,01	0,02	0,04	0,08	0,16	0,32	0,64	1,28
1	100*	100	100	43,7	43,8	37,8	44,5	49,5	28,9
						41,37+			
2	100	100	100	40,7	42,2	35,8	42,1	31,8	21,1
						35,62+			
4	100	100	100	8,8	6,3	10,1	4,7	11,1	5,0
						7,67+			
24	100	100	100	$8,5 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$4,7 \times 10^{-2}$	$4,9 \times 10^{-2}$	$1,2 \times 10^{-1}$	$6,0 \times 10^{-2}$
						$4,82 \times 10^{-2}$ +			
48	100	100	100	0	0	0	0	0	0

\*  $3 \times 10^1$  até  $6 \times 10^4$  bac/ml

+ médias das %s nas concentrações de 0,04 até  $1,28 \mu\text{g/ml}$

Gráfico X - Variação da % de sobreviventes com o aumento da concentração de aureomicina

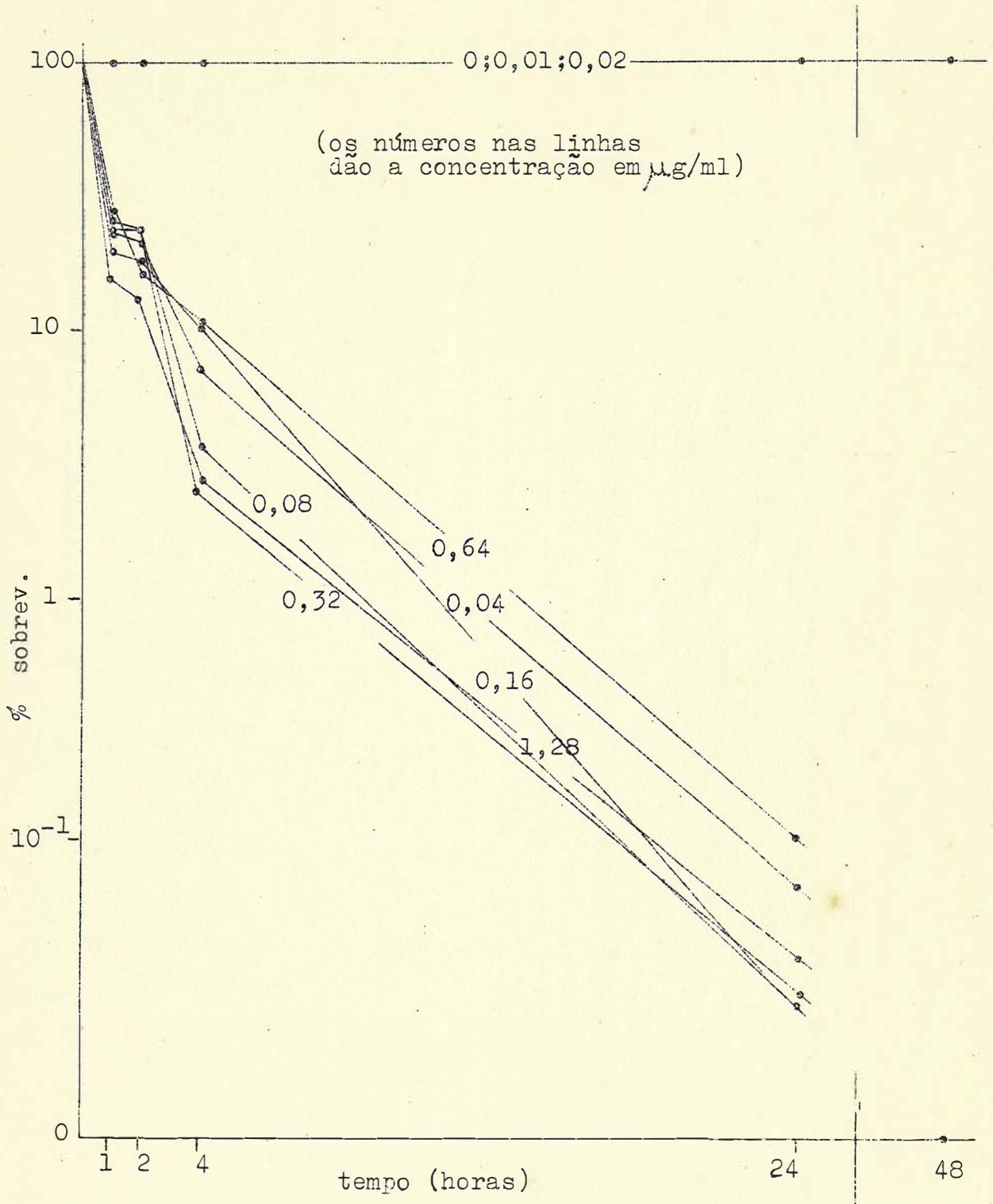
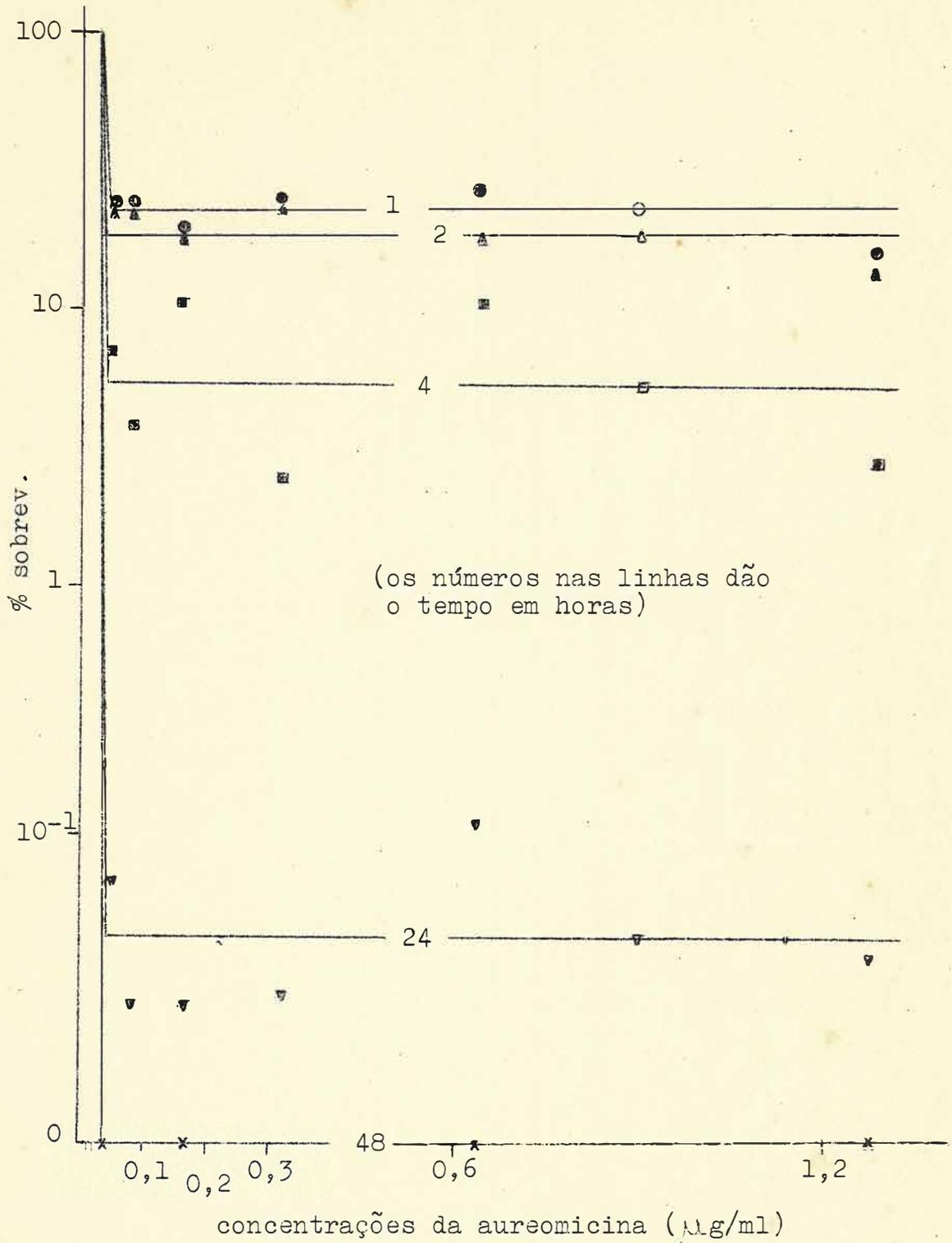


Gráfico XI - Decréscimo da % de sobreviventes com o tempo. Aureomicina



- |   |          |   |          |
|---|----------|---|----------|
| ● | 1 hora   | ○ | } médias |
| ▲ | 2 horas  | △ |          |
| ■ | 4 horas  | □ |          |
| ▼ | 24 horas | ▽ |          |
| × | 48 horas |   |          |

#### 4.5 - Isolamento de mutantes resistentes aos antibióticos

##### 4.5.1 - Estreptomicina

As colônias, que cresceram em placas de Petri com 20  $\mu$ g/ml de estreptomicina, foram isoladas e estocadas em nutriente ágar inclinado. Todas colônias foram amarelas, normais. Obtiveram-se 16 colônias amarelas normais num total de  $1,7 \times 10^{12}$  bactérias semeadas em 31 placas de Petri. A frequência foi então de 1 colônia amarela por  $1,06 \times 10^{11}$  bactérias semeadas.

As colônias crescidas em 10  $\mu$ g/ml de estreptomicina foram de dois tipos; amarelas normais e grande número de brancas puntiformes. Colônias brancas e amarelas foram isoladas e estocadas em nutriente ágar inclinado.

Cinco dessas colônias brancas puntiformes, foram ensaiadas para resistência ao antibiótico, em concentrações menores iguais e maiores do que 10  $\mu$ g/ml. Em concentrações menores ou iguais a 10  $\mu$ g/ml o material semeado deu o mesmo tipo de colônias, isto é, brancas puntiformes. Em concentração de 20  $\mu$ g/ml não apareceram colônias (Quadro VIII e gráfico XII).

As amarelas normais, crescidas em 10  $\mu$ g/ml foram também ensaiadas em placas com concentrações menores, iguais e superiores a 10  $\mu$ g/ml. Tais colônias deram crescimento total em todas as placas (quadro VIII e gráfico XII).

As colônias amarelas normais, então, são mutantes resistentes ao antibiótico. Seis desses mutantes, foram ensaiados em meio líquido mais estreptomicina. A leitura, feita com relação à turvação ou limpidez do meio, está representada no quadro IX.

Quadro VIII - Colônias brancas puntiformes e amarelas normais, ensaiadas em meio sólido mais estreptomicina

Colônias ensaiadas *	Concentrações de estreptomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )									
	0	1	2	3	5	6	10	20	40	100
Branca 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Branca 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Branca 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Branca 4	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Branca 5	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Amarela 1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amarela 2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Amarela 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

+ crescimento

- ausência de crescimento

\* plaqueados 0,1 ml de solução de cerca de  $10^8$  bactérias/ml

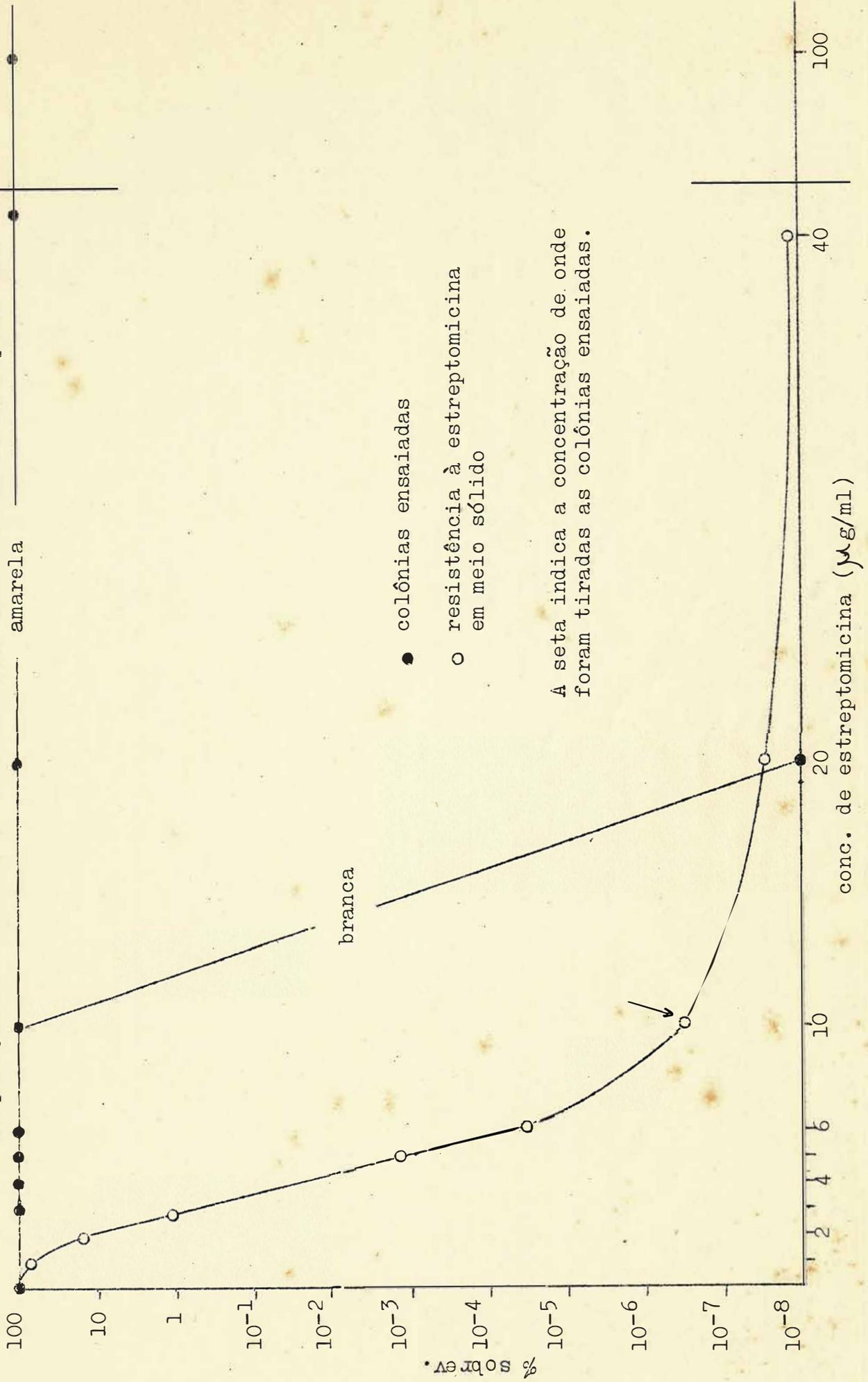
Quadro IX - Mutantes resistentes à estreptomicina ensaiados em meio líquido mais diferentes concentrações de antibiótico. Comparação com a linhagem original.

Colônias ensaiadas	Concentrações de estreptomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )										
	0	0,5	1	2	10	100	1000	2000	4000	8000	10.000
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
Mutante 4	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Mutante 5	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 6	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Linhagem original	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+ turvação

- sem turvação

Gráfico XII - Crescimento de colônias amarelas e brancas em meio sólido +estreptomicina e comparação com a curva de sobrevivência da bactéria em estrepptomicina amarela



4.5.2 - Penicilina

Os resultados estão no quadro X.

Quadro X - Mutantes resistentes à penicilina, e, linhagem original ensaiados em meio líquido mais antibiótico

Colônias ensaiadas	Concentração de penicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0	10	20	50	100	200	400	500	1.000
Linhagem original	+	+	-	-	-	-	-	-	-
Mutante 1	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	-	-	-	-
Mutante 4	+	+	+	+	+	-	-	-	-

+ turvação

- sem turvação

4.5.3 - Aureomicina

Os resultados estão no quadro XI.

Quadro XI - Mutantes resistentes à aureomicina e, linhagem original, ensaiados em meio líquido mais antibiótico

Colônias ensaiadas	Concentração de aureomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )								
	0	0,01	0,02	0,04	0,1	0,5	1	2	4
Linhagem original	+	+	+	-	-	-	-	-	-
Mutante 1	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 2	+	+	+	+	+	+	+	-	-
Mutante 3	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ turvação

- sem turvação

4.6 - Resistência cruzada

As leituras feitas, pela turvação dos tubos inoculados com a bactéria sensível (contrôle) e com os mutantes resistentes aos três antibióticos usados, estão no quadro XII.

Quadro XII - Turvação nos tubos inoculados com bactéria da linhagem original e mutantes resistentes, com várias concentrações de antibióticos adicionados ao meio.

Linhagens ensaiadas	Concentrações de estreptomomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )						Concentrações de penicilina ( $\mu\text{g/ml}$ )						Concentrações de aureomicina ( $\mu\text{g/ml}$ )											
	0	0,5	1	2	10	100	1000	10	20	50	100	200	400	1000	0,01	0,02	0,04	0,08	0,1	0,5	1	2	3	
Original	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutante Resist. Estreptom.	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutante Resist. Penicil.	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-
Mutante Resist. Aureomic.	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-

+ turvação

- sem turvação

## 5. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

### 5.1 - Curva de crescimento e tempo de geração

O gráfico I e o quadro I, indicam que a bactéria, apresenta uma lag-fase de aproximadamente seis horas. Segue-se a fase logarítmica de crescimento que persiste até pouco mais de sessenta horas. Passado êsse tempo, a bactéria entra na fase estacionária, onde o número de bactérias que morrem é compensado pelo número de novas bactérias que aparecem.

O tempo de geração, isto é, o período necessário para as células dobrarem o seu número foi calculado na fase logarítmica de crescimento, dando aproximadamente 94 minutos. Tal resultado, concorda com o citado por Hildebrand ( 17 ) que dá o tempo de geração do gênero Xanthomonas a que pertence a bactéria estudada, entre 55 e 155 minutos e, coincide também com os resultados encontrados por Mason (22) que determinou o tempo de geração da Xanthomonas campestris como sendo de 78 minutos no caldo glicosado e 98 minutos no caldo simples, isto é, no mesmo meio por nós usado. Assim, os nossos resultados estão de acôrdo com os dados na literatura citada.

### 5.2 - Comportamento da bactéria em relação a antibióticos adicionados ao meio sólido.

#### 5.2.1 - Estreptomicina

Observando-se os resultados apresentados no quadro II, e o gráfico II, verifica-se que o número de colônias formadas decresce com o aumento de concentração da estreptomicina. A curva de sobreviventes pode ser dividida em quatro partes: A primeira (até cêrca de 1  $\mu$ g/ml), mostra que a viabilidade não decresce ou, cai muito pouco. A segunda parte da curva (2 a 7  $\mu$ g/ml) mostra um grande decréscimo do número de sobreviventes com o aumento da concentração do antibiótico. A terceira parte da curva, mostra que a viabilidade continua a cair, embora menos acentuadamente, para finalmente, a última parte da curva, tornar-se paralela ao eixo horizontal do gráfico, mostrando que em tôdas concentrações usadas aparecem sobreviventes.

Se o material em estudo, no caso a população de bactérias tratadas com o antibiótico, fôsse completamente uniforme com relação à sua resistência à estreptomicina, encontraríamos apenas as duas primeiras partes da curva, isto é, as bactérias não sofreriam ação de doses mínimas do antibiótico e a queda de viabilidade seria logarítmica, seguindo a linha pontilhada teórica, ( 10 ) indicada no gráfico II. A diferença entre essa linha teórica e a realmente encontrada (terceira parte da curva), mostra que existem na população, indivíduos mais resistentes à estreptomicina do que a maioria da população. A quarta parte da curva representa um pequeno número de bactérias que são inteiramente resistentes à estreptomicina.

Mutantes resistentes à estreptomicina são encontrados então após uma única passagem da bactéria no antibiótico, segundo o modelo denominado por Demerec ( 9 ) de "um só passo" ("one-step"). O comportamento da bactéria em relação à resistência à estreptomicina, pode ser explicado pela hipótese de que existem vários gens determinando tal resistência. Tais gens, apresentam diferentes potencialidades. Assim, se a mutação ocorrer em um gen que determina resistência a altas concentrações de estreptomicina, a bactéria torna-se altamente resistente ao antibiótico, em uma só passagem.

Demerec, em 1950 ( 10 ) já estudou a curva de sobrevivência da Escherichia coli em meio sólido com estreptomicina. Pelos nossos resultados verificamos que o comportamento de Xanthomonas campestris é bastante semelhante ao encontrado por Demerec em Escherichia coli. Quadling ( 26 ) em 1960, verificou que na Xanthomonas phaseoli, linhagem XP8, semeada em meio sólido mais diversas concentrações de estreptomicina, a maioria das bactérias são mortas em concentrações entre 2 e 8  $\mu\text{g/ml}$ . A Xanthomonas campestris mostra então um comportamento quase idêntico ao da Xanthomonas phaseoli com relação à resistência à droga.

### 5.2.2 - Penicilina

O quadro III e gráfico III indicam que o aumento da concentração de penicilina determina também uma diminuição no número de sobreviventes. No gráfico III, verifica-se que a curva tem duas partes distintas; de cerca de 10 a 50  $\mu\text{g/ml}$ , mostra

acentuada queda, que corresponde à grande diminuição na porcentagem de sobreviventes; de 50 a pouco mais de 200  $\mu\text{g/ml}$ , a diminuição é menos acentuada, e a curva atinge a linha de base. A ausência da primeira fase da curva, encontrada no caso da estreptomicina, isto é, da fase em que o número de sobreviventes seria praticamente igual ao número de bactérias inoculadas, muito provavelmente é devido ao fato de não terem sido utilizadas concentrações intermediárias de penicilina, entre 0 e 10  $\mu\text{g/ml}$  em nossos experimentos. A diferença entre a linha pontilhada teórica e a realmente encontrada, indica que também para a penicilina, existem na população indivíduos mais resistentes do que a maioria da população. A parte final da curva, encontrando o eixo da base do gráfico, mostra que com pouco mais de 200  $\mu\text{g/ml}$  de penicilina adicionada ao meio sólido, não aparecem bactérias resistentes. Tal fato concorda com os resultados de Demerec (8, 9) publicados em 1945 e 1948, referindo-se à ação de penicilina sobre Staphylococcus aureus.

Demerec (9) admitiu a hipótese de que, provavelmente vários gens estariam envolvidos no processo que determina a resistência da bactéria à penicilina. Ao contrário do que foi explicado para a estreptomicina, tais gens seriam iguais em sua potência. Para visualizar melhor essa interpretação poder-se-ia supor que cada gen mutado aumentasse a resistência da bactéria à droga em duas unidades. A mutação de um gen, determinaria então uma resistência de 2 unidades; um segundo gen mutado, aumentaria para quatro essa resistência, um terceiro gen que mutasse, aumentaria para 8 unidades a resistência da célula, e assim por diante, sempre em progressão geométrica. A probabilidade de duas mutações ocorrerem simultaneamente, seria tão pequena que poderia ser considerada como nula e devido a isso, uma resistência a altas doses de penicilina não poderia ser obtida num só passo. A resistência para esse antibiótico, como para a maioria dos antibióticos conhecidos, segue então o modelo denominado de "múltiplos passos" ("multiple-step").

### 5.2.3 - Aureomicina

O quadro IV e o gráfico IV indicam, como nos dois casos anteriores, que o número de sobreviventes diminui, com o aumento da concentração do antibiótico. A curva representada no

gráfico III apresenta 3 partes: de 0 a 0,025  $\mu\text{g/ml}$  representa pequena queda da viabilidade. De 0,025  $\mu\text{g/ml}$  até cerca de 0,1  $\mu\text{g/ml}$ , mostra que a queda é bastante acentuada e, de 0,1  $\mu\text{g/ml}$  em diante, mostra que o decréscimo na viabilidade é menos acentuado que o anterior, e a curva encontra a linha da base do gráfico. Como acontece para os dois outros antibióticos, a diferença entre a linha pontilhada e a realmente encontrada, indica que na população existem indivíduos mais resistentes à droga do que a maioria da população.

Como no caso da penicilina, não existe a parte final da curva paralela ao eixo da base, mas, ela encontra tal eixo mostrando que após certa concentração de aureomicina, não se podem obter mutantes "em um só passo", pois a resistência à aureomicina ( 2 ), funciona segundo o modelo de "múltiplos passos" já citado para o caso da penicilina.

#### 5.2.4 - Comparação entre as três curvas de sobrevivência.

No gráfico V, verifica-se que a Xanthomonas campestris resiste muito mais à ação da penicilina, seguindo-se por ordem, a estreptomomicina e a aureomicina. Tal resultado era de se esperar, pois a penicilina tem ação pouco acentuada em bactérias gram negativas, ao passo que a estreptomomicina age em bactérias gram negativas e, a aureomicina, é um antibiótico de largo espectro ( 18 ).

### 5.3 - Comportamento da bactéria em relação a antibióticos adicionados ao meio líquido.

#### 5.3.1 - Estreptomomicina

Pela observação do quadro V e gráficos VI e VII verifica-se que um aumento de concentração do antibiótico determina uma diminuição no número de sobreviventes. Verifica-se também que, o tempo de contacto da bactéria com a droga influi no decréscimo de viabilidade. Após vinte e quatro horas, não aparecem sobreviventes, provando o poder bactericida da estreptomomicina, em concentrações de 3  $\mu\text{g/ml}$  ou maiores. Demerec em 1951 ( 11 ) realizou experimento semelhante com Escherichia coli utilizando a estreptomomicina. Como a estreptomomicina não requer divisão da célula

para atuar, sua ação se faz antes mesmo de ocorrerem divisões celulares. Em Xanthomonas campestris, o mesmo fato deve ter ocorrido.

### 5.3.2 - Penicilina

Pela observação do quadro VI e gráficos VIII e IX verifica-se que no caso deste antibiótico, há uma queda da viabilidade com o aumento de concentração, a partir de 20  $\mu\text{g/ml}$  e com o aumento do tempo de contacto da bactéria com a droga. Após uma hora de contacto entre antibiótico e bactéria, em concentrações de 20  $\mu\text{g/ml}$  até 500  $\mu\text{g/ml}$  não houve influência da concentração, sobre queda de viabilidade. Assim é que, a porcentagem de sobreviventes em 20  $\mu\text{g/ml}$  foi menor que em 100  $\mu\text{g/ml}$  e, em 500  $\mu\text{g/ml}$  foi maior que em 200  $\mu\text{g/ml}$ , após uma hora de contacto.

### 5.3.3 - Aureomicina

Nos gráficos X e XI e quadro VII verifica-se que a queda de viabilidade depende do tempo de contacto da bactéria com a aureomicina. Quanto às concentrações, doses de 0,01  $\mu\text{g/ml}$  e 0,02  $\mu\text{g/ml}$  não causam diminuição da porcentagem de sobreviventes. De 0,04  $\mu\text{g/ml}$  até 1,28  $\mu\text{g/ml}$  o número de viáveis parece independe da concentração usada. Assim é que, as porcentagens de sobreviventes encontradas desde 0,04  $\mu\text{g/ml}$  até 1,28  $\mu\text{g/ml}$  após 24 horas de contacto são bem próximas umas das outras, o mesmo acontecendo após 2; 4 e 24 horas. Depois de 48 horas não apareceram mais sobreviventes.

## 5.4 - Isolamentos de mutantes resistentes aos antibióticos

Para a estreptomicina, como a mutação ocorre em um só passo, com um isolamento apenas, já aparecem mutantes altamente resistentes (quadros VIII e IX).

Todos os mutantes para a estreptomicina foram resistentes, sem serem dependentes da mesma. Mutantes dependentes de estreptomicina foram encontrados por muitos autores em diversas bactérias, como se pode verificar no trabalho de Newcombe e Hawirko ( 25 ). Quadling ( 26 ) encontrou mutantes dependentes deste antibiótico em Xanthomonas phaseoli, somente depois de tratar a bactéria com raios ultra violeta. Trabalhando com 78 mutantes resistentes, não encontrou dependente algum. No entanto,

depois do tratamento da bactéria com luz ultra violeta, cerca de 30% das colônias resistentes, tornaram-se completamente dependentes da estreptomicina. Estão em andamento estudos a fim de se verificar a ocorrência de mutantes dependentes da estreptomicina em Xanthomonas campestris depois do tratamento com luz ultra violeta.

Num total de  $1,7 \times 10^{12}$  bactérias semeadas, obtiveram-se 16 mutantes, dando uma frequência global de cerca de 1 mutante por  $10^{11}$  bactérias. Quadling ( 26 ) em Xanthomonas phaseoli, determinou a taxa de mutação para resistência à estreptomicina, ou seja, a frequência da mutação por bactéria e por geração obtendo o valor de  $3 \times 10^{-10}$  por bactéria e por geração. Estudos estão sendo realizados a fim de se determinar a taxa de mutação em Xanthomonas campestris com relação à resistência à estreptomicina.

Pela observação dos quadros VIII e IX e gráfico XII, verifica-se que as colônias amarelas normais são verdadeiros mutantes. As colônias brancas são constituídas por bactérias, que apresentam apenas um crescimento residual em placas contendo o antibiótico e são incapazes de crescerem em altas doses do mesmo, como acontece com as bactérias que constituem as colônias amarelas.

Dos 6 mutantes ensaiados em meio líquido mais estreptomicina, um deles, chegou a crescer em concentrações de até  $8000 \mu\text{g/ml}$  de estreptomicina, dois deles, cresceram em concentrações de até  $4000 \mu\text{g/ml}$ , outros dois em concentrações até  $2000 \mu\text{g/ml}$  e um deles até  $1000 \mu\text{g/ml}$ . Comprovou-se assim a hipótese, já citada, de que os gens que conferem resistência a estreptomicina apresentam diferentes potencialidades.

No caso da penicilina e aureomicina, como a mutação ocorre em vários passos, a técnica da placa-gradiente de Szybalski e Bryson (31, 32) teve que ser empregada. Dessa forma, com gradientes de antibióticos cada vez maiores, a bactéria teve oportunidade de sofrer mutações sucessivas nos gens que conferem resistência à penicilina ou aureomicina. Todos esses gens, como já foi explicado anteriormente, são iguais em sua potência daí decorrendo ser muito difícil a obtenção de mutantes altamente resistentes a essas duas drogas em uma só passagem pelos reforidos

antibióticos. Por meio de sete transferências sucessivas para a penicilina e sete para a aureomicina, conseguiram-se porém mutantes resistentes à 100  $\mu$ g/ml de penicilina e a 1  $\mu$ g/ml de aureomicina como pode ser verificado nos quadros X e XI.

#### 5.5 - Resistência cruzada

Pelo quadro XII, verifica-se que nenhum dos mutantes ensaiados apresentou resistência cruzada, no que diz respeito aos três antibióticos empregados.

Tal resultado, era de se esperar, pois, a resistência à penicilina, é em geral, específica para este antibiótico. Resistência cruzada de penicilina com estreptomicina só foi encontrada por Klimet et al ( 19 ) em Staphylococcus e, Szybalsky e Bryson ( 32 ) referem-se a uma fraca resistência cruzada existente entre penicilina e tetracilinas em Escherichia coli, linhagem B.

A resistência à estreptomicina, também mostra marcada especificidade. Resistência cruzada entre estreptomicina e penicilina (19, 27 ) e entre estreptomicina e aureomicina (27) não são comuns.

Finalmente, a aureomicina, tem resistência cruzada com outras tetracilinas, mas com penicilina e estreptomicina são raros os casos (27, 32).

Pode-se notar ainda, pelo quadro XII, que possivelmente não se verificou o fenômeno da sensibilidade colateral ( 2 ) em Xanthomonas campestris para as três drogas usadas, isto é, mutante resistente a um antibiótico, não se tornou mais sensível que a linhagem original em relação às duas outras drogas empregadas.

## 6. RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho, foi realizado com a finalidade de se estudar o mecanismo da resistência de Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson em relação a três diferentes antibióticos, no caso, estreptomicina, penicilina e aureomicina.

1 - A linhagem utilizada, foi por nós isolada e classificada. Ela apresentou uma lag-fase de aproximadamente seis horas, seguindo-se a fase logarítmica de crescimento que persistiu até pouco mais de sessenta horas. O tempo da geração da bactéria foi de cerca de noventa e quatro minutos.

2 - Em relação a antibióticos adicionados ao meio sólido, a bactéria comportou-se diferentemente, de acordo com a droga usada. Para a estreptomicina, colônias resistentes apareceram em  $40 \mu\text{g/ml}$ , ou seja, na mais alta concentração usada. Para a penicilina, em doses maiores que  $200 \mu\text{g/ml}$  e para a aureomicina, em doses maiores que  $0,3 \mu\text{g/ml}$  não apareceram colônias. Conclui-se, portanto, que a bactéria estudada comportou-se da mesma maneira que a grande maioria de outras bactérias no seu mecanismo de resistência aos três antibióticos, isto é, seguiu os clássicos modelos de "múltiplos passos" para a aureomicina e penicilina e de "um só passo" para adquirir resistência à estreptomicina. Por comparação entre as curvas de sobrevivência no meio sólido, conclui-se que a penicilina é o antibiótico que mais fraca ação teve sobre a bactéria, havendo necessidade de altas concentrações para impedir o aparecimento de formas resistentes. A aureomicina por sua vez, em concentrações mínimas, já causou inibição completa da bactéria em meio sólido.

3 - Um pequeno número de bactérias inoculado em meio líquido contendo diversas concentrações de antibióticos, também apresentou variações em seu comportamento, conforme o antibiótico usado. Embora o tempo de contacto da bactéria com a droga influísse da mesma maneira nos três casos, causando diminuição de viabilidade, para a estreptomicina, foi de importância a concentração do antibiótico usada. Quanto maior a concentração, maior foi a mortalidade para esse antibiótico. Para a penicilina, somente depois de quatro horas de contacto da bactéria com o antibiótico é que concentrações crescentes da droga causaram quedas

croscientes de viabilidade. Para a aureomicina, concentrações desde 0,04  $\mu$ g/ml até 1,28  $\mu$ g/ml influenciaram igualmente na queda de viabilidade, isto é, não importou a concentração usada; influiu apenas o tempo de contacto. Para a estreptomicina, em concentrações iguais ou superiores a 3  $\mu$ g/ml não apareceram sobreviventes em 24 horas, demonstrando o forte poder bactericida dessa droga. Para a penicilina, após 24 horas, apareceram sobreviventes até 100  $\mu$ g/ml. Para a aureomicina, após 24 horas, apareceram sobreviventes até na mais alta concentração usada, ou seja, até 1,28  $\mu$ g/ml.

4 - Mutantes resistentes aos três antibióticos foram isolados. Mutantes resistentes à estreptomicina, ocorreram em "um só passo". Enquanto a linhagem original não cresceu em meio líquido mais 0,5  $\mu$ g/ml de estreptomicina, o mutante mais resistente encontrado, suportou até 8000  $\mu$ g/ml. A frequência de mutação para resistência à estreptomicina foi de cerca de uma por  $10^{11}$  bactérias. Não houve no entanto, aparecimento de mutantes dependentes dessa droga. Dos dois tipos de colônias que apareceram, a saber, amarelas e brancas puntiformes, apenas as primeiras foram altamente resistentes à droga. Brancas puntiformes não foram capazes de crescer em doses mais elevadas de estreptomicina. Mutantes altamente resistentes à aureomicina e penicilina apareceram segundo o modelo denominado de "múltiplos passos". Pela técnica da placa gradiente, através de sete transferências, conseguiram-se mutantes resistentes até 100  $\mu$ g/ml de penicilina adicionada ao meio líquido, enquanto a linhagem original cresceu apenas até 10  $\mu$ g/ml. Por meio de sete transferências, conseguiram-se mutantes resistentes até 1  $\mu$ g/ml de aureomicina adicionada ao meio líquido, enquanto que a linhagem original cresceu somente até 0,02  $\mu$ g/ml dessa droga.

5 - Quanto à resistência cruzada e sensibilidade colateral, linhagens resistentes a um antibiótico, não apresentaram incremento ou diminuição de resistência em relação aos dois outros antibióticos ensaiados, comparando-se com a linhagem original. Não houve portanto, nem resistência cruzada, nem sensibilidade colateral nos casos estudados.

## 7. SUMMARY AND CONCLUSIONS

The present paper deals with the study of the growth and resistance against three antibiotics in a phytopathogenic bacterium Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson.

1 - The mean duration of the lag phase was 6 hours and the logarithmic phase, about 60 hours. The generation time was 94 minutes in average.

2 - When the antibiotics were added to the solid medium in which the bacteria were grown, the colonies resistant to the streptomycin, appeared even in the highest concentration (40  $\mu$ g/ml) of the latter; as to the penicillin and aureomycin when in concentrations higher than 200  $\mu$ g/ml and 0,3  $\mu$ g/ml respectively, resistant colonies did not appear. So, the results show that the penicillin was the least efficient antibiotic in relation to the induction of resistant cells in Xanthomonas campestris.

3 - When a small inoculum was grown in liquid medium plus streptomycin, the percentage of survivors was greatly reduced, depending of the time of contact of the bacteria with the antibiotic and the concentration of the drug. For the penicillin, during the first hour of contact between the bacteria and drug, the percentage of survivors was not affected; after that time, increases in concentration reduced the percentage of survivors. In the case of aureomycin, only the time was important; concentrations of antibiotic ranging from 0,04  $\mu$ g/ml to 1,28  $\mu$ g/ml had the same effect.

4 - One-step mutants to streptomycin were isolated. One resistant mutant grew in liquid medium plus 8000  $\mu$ g/ml of streptomycin; in the sensitive populations, the cells were inhibited by concentration of 0,5  $\mu$ g/ml. The mutation frequency was about 1 in  $10^{11}$  cells. It was not noted the appearance of streptomycin-dependent mutants. For the penicillin and aureomycin, multiple-step mutants appeared when the sensitive populations were grown in gradient plates with antibiotics. For the penicillin, mutants were found in concentrations up to 100  $\mu$ g/ml. For the aureomycin, mutants were found in concentrations up to 1  $\mu$ g/ml. The sensitive populations could grown in concentrations of 10  $\mu$ g/ml of penicillin and 0,02  $\mu$ g/ml of aureomycin.

5 - It was not found cross resistance or collateral sensitivity when a certain antibiotic was tested against the other two antibiotics.

## 8. AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Theóphilo do Amaral Gurgel, professor cooperador da 19a. Cadeira da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e chefe do Setor de Genética de Microorganismos do Instituto de Genética pela orientação e incentivo durante o transcorrer de nossos trabalhos.

A Dra. Rahme Nelly Neder, assistente do Instituto Zimotécnico de Piracicaba, pela sugestão do assunto, esforço e boa vontade demonstrados durante a realização de nossos estudos.

Ao Prof. Dr. Jayme Rocha de Almeida, Diretor do Instituto Zimotécnico, anexo à 8a. Cadeira da E.S.A. "Luiz de Queiroz", por nos permitir a realização da primeira parte de nosso trabalho no referido Instituto e, ao Prof. Dr. F. G. Brieger, Catedrático da 19a. Cadeira da E.S.A. "Luiz de Queiroz" e Diretor do Instituto de Genética por nos facilitar a continuação dos estudos no Instituto de Genética. A ambos, por valiosas sugestões apresentadas.

A todos que direta ou indiretamente colaboraram conosco durante as pesquisas e na confecção da tese.

9. BIBLIOGRAFIA CITADA

- 1 - ARK, P.A. e M.A. Stanley  
1956 - Antibiotics as bactericides and fungicides against diseases of plants, Plant Dis. Reprtr. 4:85-92.
- 2 - BRAUN, W.  
1953 - Bacterial Genetics, W.B. Saunders Co., Philadelphia.
- 3 - BREED, R.S., E.G.D. Murray, N.R. Smith  
1957 - Bergey's manual of determinative Bacteriology, The Williams & Wilkins Co., Baltimore. 7<sup>o</sup>. Ed.
- 4 - BRYSON, V. e W. Szybalsky  
1955 - Microbial drug resistance, Advanc. Genet., 7:1-47.
- 5 - CARMONA-GOMEZ, J.  
1956 - "In vitro" development of resistance to an antibiotic by two plant pathogenic bacteria, Phytopathology, 46:522-523.
- 6 - COREY, R.R. e M.P. Starr  
1957 - Genetic transformation of colony tipe in Xanthomonas phaseoli, J. Bact., 74:141-145.
- 7 - \_\_\_\_\_  
1957 - Genetic transformation of streptomycin resistance in Xanthomonas phaseoli, J. Bact. 74:146-150.
- 8 - DEMEREC, M.  
1945 - Production of Staphylococcus strains resistant to various concentrations of penicillin, Proc. Nat. Acad. Sci., U.S., 31:16-24.
- 9 - \_\_\_\_\_  
1948 - Origin of bacterial resistance to antibiotics, J. Bact., 56:63-74.
- 10 - \_\_\_\_\_  
1950 - Genetic mechanism controlling bacterial resistance to streptomycin, Trans.N.Y.Acad.Sci., 12:186-188.

- 11 - \_\_\_\_\_  
1951 - Studies of the Streptomycin resistance system of mutation in Escherichia coli, Genetics, 36:585-597.
- 12 - DOWSON, W.J.  
1957 - Plant diseases due to Bacteria, The University Press, Cambridge. 2<sup>o</sup> Ed.
- 13 - 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.
- 14 - 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.
- 15 - GILLIVER, K.  
1946 - The inhibitory action of antibiotics on plant pathogenic Bacteria and Fungi, Ann. Bot. Lond. 10:271-282.
- 16 - GYORFFY, B., S. Ligali, I. Kállay, I. B. Kárasz, Z. Klément e K. Szende.  
1959 - Genetics studies on a phytopathogenic Xanthomonas, Acta Biol. Acad. Sci. Hung. suppl, 3:34.
- 17 - HILDEBRAND, E.M.  
1938 - Growth rates of phytopathogenic bacteria, J. Bact., 35:487-493.
- 18 - KAREL, L. e E.S. Roach  
1951 - A dictionary of antibiosis, Columbia University Press, New York.
- 19 - KLIMET, J.W., C.J. Cavallito e J.H. Bailey  
1948 - Induced Resistance of Staphylococcus aureus to various antibiotics, J. Bact. 55:139-145.

- 20 - LAMANNA, C. e M.F. Mallette  
1953 - Basic Bacteriology, The Williams & Wilkins  
Co. Baltimore.
- 21 - LINDENFELSER, L.A., T.G.Pridham, O.L.Shtowell, e F.H.Stodola.  
1958 - Antibiotics against plant diseases - IV - Acti-  
vity of duramycin against selected Microorganisms, An-  
tibiotics ann. 1957-58, 241-247.
- 22 - MASON, M.M.  
1935 - A comparison of maximal growth rates of va-  
rious bacteria under optimal conditions, J.Bact.  
29:103-110.
- 23 - MEHTA, P.P., D.Gottlieb e D.Powell  
1959 - Vancomycin, a potential agent for plant di-  
sease prevention, Phytopathology, 49:177-183.
- 24 - MITCHELL, J.W., W.J.Zaumeyer e W.P.Anderson  
1952 - Translocation of streptomycin in bean plants  
and its effect on bacterial blights, Science,  
115:114-116.
- 25 - NEWCOMBE, H.B. e R.Hawirko  
1949 - Spontaneous mutation to streptomycin resis-  
tance and dependance in Escherichia coli, J. Bact.  
57:585-597.
- 26 - QUADLING, C.  
1960 - Mutation conferring streptomycin resistance  
in Xanthomonas phaseoli, Can. J. Microbiol. 6:387-396.
- 27 - SCHNITZER, R.J. e E.Grumberg  
1957 - Drug resistance of microorganisms, Academic  
Press, Inc., New York.
- 28 - Society of American Bacteriologists  
1952 - Manual of Methods for pure culture study  
of Bacteria, Biotech. Publications Geneva, New  
York, 10<sup>o</sup> Ed.
- 29 - STARR, M.P.  
1959 - Bacteria as plant pathogens, Ann.Rev.Microbiol.,  
13:211-238.

- 30 - SUTTON, M.D. e W.Bell  
1954 - The use of aureomycin as a treatment of swede seed for the control of Black Rot (Xanthomonas campestris), Plant Dis. Repr., 38:547-552.
- 31 - SZYBALSKY, W.  
1952 - Microbiol selection. I - Gradient plate technique for study of bacterial resistance, Science, 116:46-48.
- 32 - SZYBALSKY, W. e V.Bryson  
1952 - Genetics studies on microbial cross resistance to toxic agents J.Bact., 64:489-499.
- 33 - THIRUMALACHER, M.J., M.K.Patel, N.B.Kulkarni e G.H.Dhand  
1956 - Effects in vitro of some antibiotics on thirty two Xanthomonas species occurring in India, Phytopathology, 46:486-488.
- 34 - ZAUMEYER, W.J.  
1956 - Improving plant health with antibiotics. First international conference on Antibiotics in Agriculture, Nat. Acad. Sci., Nat. Res. Coun., Publ. 397:171-187.
- 35 - \_\_\_\_\_  
1958 - Antibiotics in the control of plant diseases, Ann.Rev. Microbiol. 12:415-440.