

Resistência de *Xanthomonas campestris* com  
relação à tilosina e vancomicina<sup>1</sup>

J. LÚCIO DE AZEVEDO<sup>2</sup>

TOBIAS J. B. DE MENEZES<sup>3</sup>

---

1 — Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de S. Paulo, entregue para publicação em 15-12-66.

2 — Cátedra de Citologia e Genética da E.S.A.L.Q.

3 — Estagiário do Instituto de Genética.

## RESUMO

Foi estudada a resistência da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* (Pammel) Dowson com relação a dois antibióticos: Tilosina e Vancomicina. Para a vancomicina, colônias resistentes apareceram até na mais alta concentração usada (256 mcg/ml.). Para a tilosina, em concentrações maiores que 128 mcg/ml não foram encontradas bactérias resistentes. Tais resultados indicam que a *X. campestris* seguiu o modelo de "um só passo" para adquirir resistência a vancomicina e, o modelo de "múltiplos passos" com relação a resistência a tilosina.

### 1. INTRODUÇÃO

Pesquisas realizadas com relação a resistência da bactéria fitopatogênica *Xanthomonas campestris* a diversos antibióticos bem como o mecanismo genético dessa resistência, já foram feitos por nós (AZEVEDO, 1961; AZEVEDO, NEDER e MENEZES, 1965). O presente trabalho visa continuar tais estudos apresentando dados referentes a resistência de *X. campestris* a mais dois antibióticos ensaiados: TILOSINA e VANCOMICINA.

### 2. MATERIAL E MÉTODO

Usamos uma linhagem de *X. campestris* isolada por nós: (AZEVEDO, 1961). Os meios usados foram o líquido nutriente e ágar nutriente, ambos da Difco.

Os antibióticos utilizados foram a Tilosina e Vancomicina fornecidos pela Eli Lilly and Co.. As soluções de antibióticos foram preparadas momentos antes de serem utilizadas, por dissoluções de quantidades apropriadas dos mesmos, no solvente adequado.

*X. campestris* foi semeada em líquido nutriente, incubada durante 48 a 72 horas a 28°C e semeada em diluições apropriadas em placas de Petri contendo ágar nutriente mais antibiótico.

Tanto par a Vancomicina como para a Tilosina, foram usadas as concentrações de 2; 4; 8; 16; 32; 64; 128 e 256 mcg/ml.

O controle foi feito semeando-se a mesma cultura em placa de Petri contendo meio sólido (ágar nutriente) sem antibiótico.

Semeou-se sempre 0,1 ml da cultura, incubando-se de 5 a 6 dias a 28°C. Após tal período de tempo, efetuou-se a contagem das colônias.

Por comparação entre controle e tratamento, foram tiradas as porcentagens de sobrevivência nas diversas concentrações de antibióticos utilizadas.

### 3. RESULTADOS

Os números de sobreviventes nas diversas concentrações de tilosina usadas, encontram-se no quadro 1. Colocando-se num gráfico, a porcentagem de sobreviventes em relação às concentrações de tilosina vamos obter uma curva que vai mostrar como se processa a queda de viabilidade com o aumento da concentração do antibiótico (Figura 1). A linha pontilhada nesse gráfico indica como se processaria teoricamente a queda de viabilidade se o material fosse uniforme com relação a resistência a tilosina.

Os números de sobreviventes em porcentagem, nas diversas concentrações de Vancomicina usadas, estão no quadro 2.

A Figura 2 mostra a queda de viabilidade com o aumento da concentração de Vancomicina. Também nesse caso, a linha pontilhada indica como seria a curva teórica se a bactéria fosse completamente uniforme com relação à resistência a Vancomicina.

### 4. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS E CONCLUSÕES

Pela observação do quadro 1 e Figura 1 verifica-se que o número de sobreviventes diminui com o aumento da concentração de Tilosina. A curva, apresenta 3 partes: de 0 a 2 mcg/ml há pequena redução na porcentagem de sobreviventes, de 2 a 16 mcg/ml queda acentuada de viabilidade e de 16 a 128 mcg/ml a queda de viabilidade já é menos acentuada. Com 256 mcg/ml não são encontrados mais sobreviventes. A diferença entre a linha pontilhada e a realmente encontrada indica que na população existem normalmente

indivíduos mais resistentes à tilosina do que na maioria da população. O não aparecimento de colônias em concentrações superiores a 128 mcg/ml indica que o modelo de resistência da *X. campestris* ao antibiótico tilosina é o de "múltiplos passos" (DEMEREC, 1945). O modelo de resistência à tilosina é bastante semelhante ao descrito por Azevedo e col (1965) com relação à resistência da mesma bactéria ao cloranfenicol.

Pela observação do quadro 2 e da Figura 2 verifica-se que também com relação à vancomicina, existe uma queda na porcentagem de sobreviventes com relação ao aumento da concentração de antibiótico. De 0 a 2 mcg/ml praticamente não há queda de viabilidade. De 2 a 32 mcg/ml a queda de viabilidade já é bastante acentuada e de 32 a 64 mcg/ml há diminuição na porcentagem de sobreviventes mas de forma menos drástica. Finalmente a curva fica paralela ao eixo horizontal do gráfico indicando que em todas as concentrações usadas, aparecem sobreviventes. Mutantes resistentes à vancomicina são obtidos então em "um só passo" ou de maneira abrupta segundo o mesmo esquema descrito para a estreptomomicina e éritromicina (DEMEREC, 1948; BRAUN, 1965; AZEVEDO e col., 1965).

A linha pontilhada no gráfico, da mesma forma que no caso anterior indica como se processaria a queda de viabilidade se a população fosse uniforme com relação à resistência à vancomicina.

Comparando-se os resultados encontrados no presente experimento com os dados obtidos com outros antibióticos (AZEVEDO e col., 1965) verifica-se que tanto a Tilosina como a Vancomicina são antibióticos menos eficientes do que a estreptomomicina e aureomicina com relação a *X. campestris*.

## 5. SUMMARY

*The present paper, deals with study of the resistance against two antibiotics in a phytopathogenic bacterium Xanthomonas campestris (Pammel) Dowson.*

*Colonies resistant to the vancomycin appeared even in the highest concentration used (256 mcg/ml.). For the tylosin in concentrations higher than 128 mcg/ml resistant*

*colonies did not appear. So, the results show that vancomycin follows the "single-step" model and the tylosin follows the "multiple-step" resistant scheme.*

## 6. BIBLIOGRAFIA CITADA

- AZEVEDO, J. L. DE 1961 — Resistência e mutação de *X. campestris* (Pammel) Dowson em relação a alguns antibióticos. Tese de doutoramento E.S.A. "Luiz de Queiroz" — Piracicaba. Brasil — 48 pp.
- AZEVEDO, J. L. DE, R. N. NEDER E T. B. MENEZES, 1965 — Comportamento "in vitro" de uma bactéria fitopatogênica frente a diversos antibióticos. Anais da Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz" 22:61-79.
- BRAUN, ". 1965 — Bacterial Genetics, W. B. Saunders Co. Philadelphia.
- DEMEREC, M. 1945 — Production of *Staphylococcus* strains resistant to various concentrations of penicillin. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. 31:16-24.
- DEMEREC, M. 1948 — Origin of bacterial resistance to antibiotics. J. Bact., 56:63-74.

**QUADRO 1**  
**Porcentagem de sobreviventes a Tilosina adicionada**  
**ao meio sólido**

(Resultados de 3 experimentos)

Conc. de Tilosina (mcg/ml)	× Diluição	N.º médio de Col/placa <sup>+</sup>	N.º sobreviventes	% sobreviv.	% log. de sobreviv.	% log. média
0	10 <sup>-6</sup>	193	1,93x10 <sup>9</sup>	100,0	2,00	
	10 <sup>-6</sup>	338	3,38x10 <sup>9</sup>	100,0	2,00	2,00
	10 <sup>-6</sup>	3302	3,30x10 <sup>10</sup>	100,0	2,00	
2	10 <sup>-4</sup>	6018	6,02x10 <sup>8</sup>	31,1	1,49	
	10 <sup>-6</sup>	301	3,01x10 <sup>9</sup>	89,0	1,95	1,79
	10 <sup>-6</sup>	2871	2,87x10 <sup>10</sup>	87,0	1,94	
4	10 <sup>-4</sup>	1045	1,04x10 <sup>8</sup>	5,4	0,73	
	10 <sup>-5</sup>	975	9,75x10 <sup>8</sup>	28,8	1,45	1,36
	10 <sup>-6</sup>	2554	2,55x10 <sup>10</sup>	77,2	1,89	
8	10 <sup>-4</sup>	880	8,80x10 <sup>7</sup>	4,6	0,66	
	10 <sup>-4</sup>	3447	3,45x10 <sup>8</sup>	10,2	1,01	0,85
	10 <sup>-5</sup>	2443	2,44x10 <sup>9</sup>	7,4	0,87	
16	10 <sup>-2</sup>	8	8,00x10 <sup>3</sup>	4,1x10 <sup>-4</sup>	4,61	
	10 <sup>-2</sup>	72	7,20x10 <sup>4</sup>	2,1x10 <sup>-3</sup>	3,32	4,98
	10 <sup>-2</sup>	336	3,36x10 <sup>5</sup>	1,0x10 <sup>-3</sup>	3,00	
32	s/diluir	98	9,80x10 <sup>2</sup>	5,1x10 <sup>-5</sup>	5,71	
	s/diluir	392	3,92x10 <sup>3</sup>	1,1x10 <sup>-4</sup>	4,04	5,57
	s/diluir	304	3,04x10 <sup>3</sup>	9,2x10 <sup>-6</sup>	6,96	
64	s/diluir	9,5	9,50x10 <sup>1</sup>	4,9x10 <sup>-6</sup>	6,69	
	s/diluir	125	1,25x10 <sup>3</sup>	3,7x10 <sup>-5</sup>	5,57	5,01
	s/diluir	203	2,03x10 <sup>3</sup>	6,1x10 <sup>-6</sup>	6,78	
128	s/diluir	0,66	0,66x10 <sup>1</sup>	3,4x10 <sup>-7</sup>	7,53	
	s/diluir	5	5,00x10 <sup>1</sup>	1,5x10 <sup>-6</sup>	6,17	7,75
	s/diluir	12	1,20x10 <sup>2</sup>	3,6x10 <sup>-7</sup>	7,56	
256	s/diluir	0	0	0	—	
	s/diluir	0	0	0	—	—
	s/diluir	0	0	0	—	

× — 0,1 ml semeado

+ — média de 3 placas pelo menos

**QUADRO 2**  
**Porcentagem de sobreviventes a Vancomicina adicionada**  
**ao meio sólido**

(Resultados de 3 experimentos)

Conc. de Vanco- micina (mcg/ml)	× Diluição	N.º médio de Col/placa†	N.º sobrevi- ventes	% sobrev.	% log. de sobrev.	% log. média
	10 <sup>-6</sup>	4460	4,46x10 <sup>10</sup>	100	2,00	
0	10 <sup>-7</sup>	11	1,10x10 <sup>9</sup>	100	2,00	2,00
	10 <sup>-6</sup>	34	3,40x10 <sup>8</sup>	100	2,00	
	10 <sup>-6</sup>	3430	3,34x10 <sup>10</sup>	76,9	1,88	
2	10 <sup>-7</sup>	14,9	1,49x10 <sup>9</sup>	100	2,00	1,94
	10 <sup>-6</sup>	29,5	2,95x10 <sup>8</sup>	86,7	1,94	
	10 <sup>-5</sup>	6146	6,14x10 <sup>9</sup>	13,7	1,14	
4	10 <sup>-6</sup>	35,2	3,52x10 <sup>8</sup>	32,0	1,50	1,37
	10 <sup>-6</sup>	10,2	1,02x10 <sup>8</sup>	30,0	1,48	
	10 <sup>-5</sup>	710	7,10x10 <sup>8</sup>	1,60	0,20	
8	10 <sup>-5</sup>	142	1,42x10 <sup>8</sup>	12,9	1,11	1,02
	10 <sup>-5</sup>	186	1,86x10 <sup>8</sup>	54,6	1,74	
	10 <sup>-4</sup>	640	6,40x10 <sup>7</sup>	0,14	1,15	
16	10 <sup>-4</sup>	702	7,02x10 <sup>7</sup>	6,4	0,81	0,41
	10 <sup>-4</sup>	625	6,25x10 <sup>7</sup>	18,3	1,26	
	s/diluir	21	2,10x10 <sup>2</sup>	4,7 x 10 <sup>-7</sup>	7,67	
32	s/diluir	3740	3,74x10 <sup>4</sup>	3,4 x 10 <sup>-3</sup>	3,53	4,58
	10 <sup>-2</sup>	120	1,20x10 <sup>5</sup>	3,53x10 <sup>-2</sup>	2,55	
	s/diluir	321	3,21x10 <sup>3</sup>	7,2 x 10 <sup>-6</sup>	6,86	
64	s/diluir	37,4	3,74x10 <sup>2</sup>	3,4 x 10 <sup>-5</sup>	5,53	5,32
	s/diluir	12,9	1,29x10 <sup>2</sup>	3,8 x 10 <sup>-5</sup>	5,58	
	s/diluir	5790	5,79x10 <sup>4</sup>	1,3 x 10 <sup>-4</sup>	4,11	
128	s/diluir	37,4	3,74x10 <sup>2</sup>	3,4 x 10 <sup>-5</sup>	5,53	5,60
	s/diluir	4,7	4,70x10 <sup>1</sup>	1,4 x 10 <sup>-5</sup>	5,15	
	s/diluir	4900	4,90x10 <sup>4</sup>	1,1 x 10 <sup>-4</sup>	4,04	
256	s/diluir	18,7	1,87x10 <sup>2</sup>	1,7 x 10 <sup>-5</sup>	5,23	5,20
	s/diluir	0,74	0,74x10 <sup>1</sup>	2,2 x 10 <sup>-6</sup>	6,34	

× — 0,1 ml sementeado

+ — média de 3 placas pelo menos

FIGURA 1 - RESISTÊNCIA A TILOSINA EM MEIO SÓLIDO

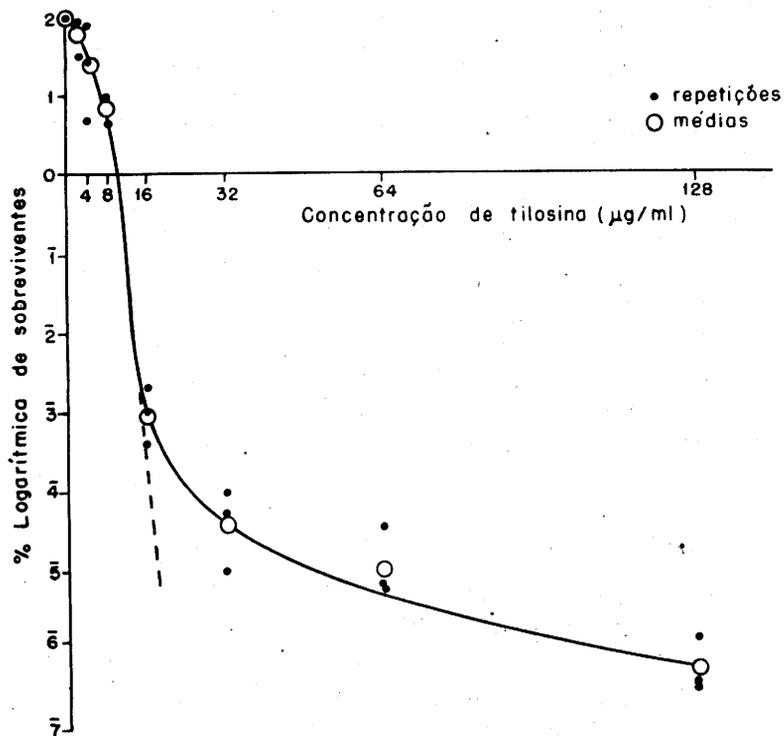


FIGURA 2 - RESISTÊNCIA A VANCOMICINA EM MEIO SÓLIDO

