

ANTONIO LIMA GONÇALVES PEREIRA

ENGENHEIRO AGRÔNOMO, MAGISTER SCIENTIÆ

Chefe da Secção de Bacteriologia Vegetal

Instituto Biológico - São Paulo

**CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO DA ETIOLOGIA DA MANCHA OLEOSA DA
FÔLHA DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* SIMS) CAUSADA
POR *Xanthomonas passiflorae* n. sp.**

Tese para obtenção do título de Doutor
em Agronomia, apresentado à Escola
Superior de Agricultura "Luiz de
Queiroz" da Universidade de São Paulo

PIRACICABA
1968

À minha espôsa

Olga

e aos meus filhos

Maria Teresa

Marco Antônio

dedico

Aos meus irmãos

José

Maria José

Sylvio

Francisco

Horácio

Maria Aparecida

José Bonifácio

homenagem

ÍNDICE

		<u>Páginas</u>
1.	Introdução	4
2.	Revisão bibliográfica	5
3.	Distribuição geográfica	7
4.	Sintomatologia	8
4.1	Fôlha	8
4.2	Frutos	9
4.3	Ramos	9
5.	Material e Método	11
5.1	Material	11
5.1.1	Isolamento da bactéria	11
5.1.2	Culturas de bactérias	11
5.1.3	Meios de cultura	13
5.1.3.1	Meios líquidos	13
5.1.3.2	Meios sólidos	17
5.1.4	Reativos	21
5.1.5	Corantes	22
5.1.6	Indicador	25
5.1.7	Antibióticos	26
5.2	Métodos	26
5.2.1	Isolamento da bactéria	26
5.2.1.1	Fôlha	26
5.2.1.2	Haste	27
5.2.2	Inoculação	28
5.2.3	Reisolamento	29
5.2.4	Anaerobiose	29
5.2.5	Temperatura	33

		<u>Paginas</u>
5.2.6	Produção de fluoresceína	34
5.2.7	Meios sintéticos	35
5.2.8	Mobilidade da bactéria	36
5.2.9	Coloração de Gram	36
5.2.10	Coloração de esporos	38
5.2.11	Coloração de flagelos	39
5.2.12	Coloração de cápsulas	40
5.2.13	Hospedeiros	41
5.2.14	Sensibilidade aos antibióticos , .	42
5.2.15	Método de liofilização	44
6.	Resultados	46
6.1	Caracteres morfológicos	46
6.2	Caracteres culturais	47
6.3	Fisiologia	52
6.4	Sensibilidade aos antibióticos . .	60
6.5	Liofilização	61
7.	Discussão dos resultados	64
8.	Resumo e conclusões	77
9.	Summary	80
10.	Agradecimentos	83
11.	Bibliografia citada	84

1. INTRODUÇÃO

O maracujazeiro é uma planta trepadeira, pertencente à família das Passifloraceas, da qual, segundo J.C. Hoehne (1939), se conhecem mais de 120 espécies. Entretanto, a Passiflora edulis Sims é a espécie mais difundida em nosso Estado, onde o clima não apresenta inverno rigoroso.

O produto de maior aceitação do maracujá é o suco, perfumado, com o qual se fazem refrescos, gelatinas, xaropes, geléias e licores. O suco de maracujá possui taxa razoável de açúcar, de celulose e de vitaminas B e C e tem, também, propriedades medicinais, como sedativo. É indicado em moléstias do coração.

Atualmente a cultura de maracujá, devido à hãa aceitação de seu fruto, está se desenvolvendo de modo racional, obrigando os investigadores agrícolas a aprimorar as práticas culturais dessa planta. Na exploração intensiva da passifloraceia, começam a aparecer doenças nunca antes observadas em nosso país. Uma delas nos prendeu a atenção pelos prejuízos totais causados aos agricultores da zona Araraquarense. Pelos sintomas apresentados e pelos testes sumários de laboratório, fomos levados a acreditar tratar-se de doença de origem bacteriana.

O principal objetivo dêste trabalho foi realizar a identificação e o estudo do agente causal responsável pela mancha oleosa da fôlha de maracujá (Passiflora edulis Sims) causada por bactéria.

2. REVISÃO DE LITERATURA

A bibliografia sôbre a mancha oleosa da folha do maracujá é tão escassa que se torna difícil ter uma idéia panorâmica do assunto.

Vamos verificar que, não faz muito tempo, em 1938, nas Ilhas do Norte, da Nova Zelândia, Reid observou uma doença que estava, há 4 anos, causando considerável perda aos agricultores de maracujá daquela região. Os frutos apresentavam sintomas de "lesões de formas definidas, grosseiramente circulares e, nas folhas, manchas de aspecto oleoso, apresentando inicialmente a cor cinza claro". Isolando o patógeno causador dessa doença verificou tratar-se de uma bactéria e, pelos testes bioquímicos efetuados, situou-a entre as Phytomonas, denominando-a de Phytomonas passiflorae.

Reid & Brien (1945), com base em experimentos conduzidos em 1942-43-44, aconselharam, para o contrôle da mancha oleosa, causado por Phytomonas passiflorae, a póda do maracujazeiro e 6 tratamentos de calda bordaleza na proporção de 3-4-50.

Na edição do Manual de Bergey (Breed, 1948), há uma completa revisão das espécies descritas anteriormente e pelas características genéricas introduzidas por Burkholder & Starr (1948), Phytomonas passiflorae passou a denominar-se Pseudomonas passiflorae.

Novamente, Reid & Brien (1948), continuando seus estudos de controle da bacteriose do maracujá, realizam trabalhos no "Department of Scientific and Industrial Research", Nova Zelândia, durante 1945-46-47, aplicando Cuprox (oxicloreto de cobre c/50% de cobre) na dosagem de 2.250 g em 454 litros de água e calda bordaleza (6-8-100) e chegaram a conclusão de que o primeiro produto causava injúria às folhas e aos frutos e não devia ser recomendado naquela formulação, em substituição à calda bordaleza.

Baigent & Starr (1963) constataram a ocorrência de uma doença que causava mancha oleosa em folhas de maracujá, na Ilha do Norte, de Nova Zelândia. Isolaram o agente causal e classificaram-no como sendo Phytomonas passiflorae descrita por Reid em 1938 e reclassificada por Burkholder, em 1948, como Pseudomonas passiflorae.

Na literatura nacional ao nosso alcance, não encontramos nenhuma referência ao assunto, parecendo-nos ser este o primeiro trabalho realizado.

Como dissemos ao iniciar esta revisão de literatura, é patente a pobreza de trabalhos no que toca ao estudo da Pseudomonas passiflorae.

3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

Segundo os trabalhos de Killig (1938), o maracujá amarelo, vulgarmente conhecido por maracujá peroba, maracujá mirim, o "parchê" dos venezuelanos, é originário do norte do Brasil. Encontramos essa cultura no Paraguai, norte da Argentina, em quase toda a América Latina e parte da América do Norte (Flórida). É cultivada, também, na Austrália, Haí e Nova Zelândia.

De todas as espécies da família Passifloraceae as mais importantes são as de casca roxa (Passiflora edulis Sims) e as de casca amarela (Passiflora edulis var. flavicarpa Deg.), consideradas de alto valor comercial.

O levantamento bibliográfico nos deu uma visão panorâmica da distribuição da cultura de maracujá no globo. Entretanto, a ocorrência da mancha oleosa, na fôlha ou no fruto de Passiflora edulis, sómente foi assinalada em 1938, por Reid, em Nova Zelândia. Entre nós, é a primeira vez que doença bacteriana, que vem causando prejuízos aos maracujazeiros na zona Araraquarense, está sendo relatada.

4. SINTOMATOLOGIA

Os sintomas da doença manifestam-se, sobretudo, nas partes tenras ou suculentas dos tecidos, estendendo-se aos elementos vasculares adjacentes, podendo, além de inutilizar os frutos ao consumo, acarretar a destruição total das culturas.

4.1 Fôlha

Nas folhas, o sintoma mais conspícuo é o de diminutas manchas bem delimitadas, grosseiramente circulares e raramente angulares, ocupando posição variável, às vêzes acompanhando as nervuras; são verde escuras, úmido aquosas, de aspecto oleosa, translúcidas, aparentando ser mais claras quando vistas por transparência, apresentando conspícuos halos cloróticos, podendo ainda exibir ao exame binocular a forma de goticulas formadas pelo exudato bacteriano (Fig. nº 1). Progressivamente as manchas tornam-se mais deprimidas, sobretudo na página inferior, como consequência da desintegração e seca da área do limbo foliar, passando as manchas a tomar a cor parda escura. O último estágio é o secamento da fôlha.

A infecção que teve sua origem no limbo foliar pode estender-se ao pecíolo e ramos, através dos feixes vasculares (Fig. Nº 2).

Em condições favoráveis, como no caso das mudas em viveiros, as manchas nas folhas podem, quando bem isoladas,

atingir até 1 cm de diâmetro, com grande índice de destruição

4.2 Frutos

Nos frutos, os sintomas mais observados são as pequenas áreas, verde-escuras, úmido-aquosas, as quais evoluem para áreas circulares ou irregulares, oleosas, de cor pardacenta, essencialmente superficiais, necróticas, com margens bem definidas. Forma-se, em seguida, uma crosta dura, analoga à "hard grease-spot" ou "mancha oleosa dura", conforme cita Baigent & Starr (1962). Esta crosta pode recobrir diversas manchas originalmente isoladas. Esse fato pode ser verificado recortando-se a camada superficial endurecida com um canivete e observando, logo abaixo, a região das manchas originais pardo-claras, que se aprofundam até a região das sementes, tornando o fruto impróprio ao comércio (Fig. nº 3).

4.3 Ramos

A parte dos ramos novos, afetada pelo progresso da infecção que avança pela via limbo foliar pecíolo, sofre um secamento progressivo bem delimitado, apresentando caneluras longitudinais e escurecimento dos feixes vasculares subjacentes. Nestes feixes vasculares, bem como naqueles do pecíolo, por corte transversal e compressão, há típica exsudação de goma bacteriana.

Folhas e ramos atacados sofrem queda prematura, ocasionando a morte da planta.



Figura 1 — Lesão típica de mancha na fôlha de *Passiflora edulis*, mostrando na 3.^a fôlha, da esquerda para direita, coalescência das manchas absorvendo quase tôda a superfície da fôlha.

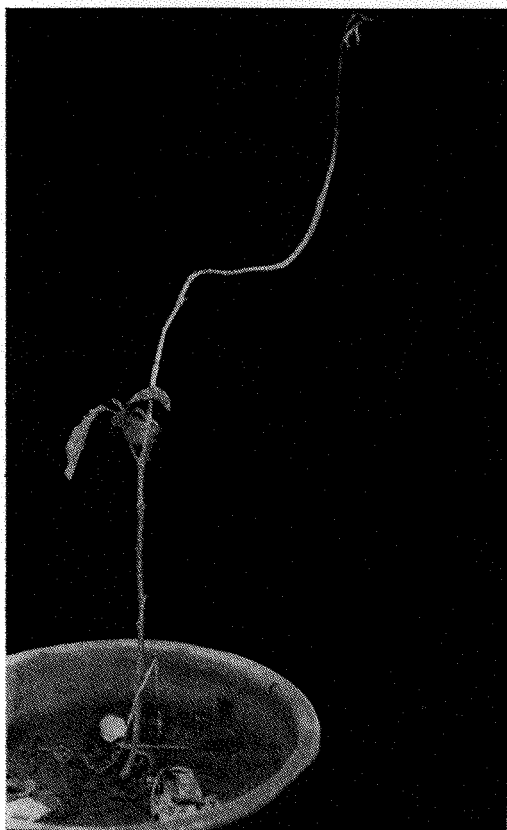


Fig. 2

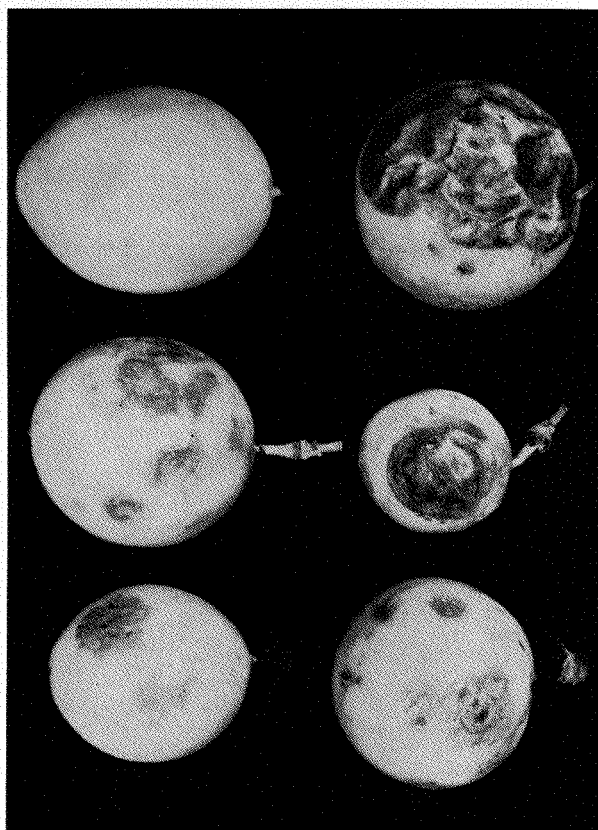


Fig. 3

Figura 2 — A infecção bacteriana originando-se no limbo foliar da *Passiflora edulis*, estendeu-se ao pecíolo e ramos através dos feixes vasculares.

Figura 3 — Infecção natural em fruto de maracujá, mostrando diferentes estágios da doença em desenvolvimento. No alto, fruto à esquerda sadio e o da direita, exibindo uma crosta dura envolvendo parte do fruto.

5. MATERIAL E MÉTODO

5.1 Material

5.1.1 Isolamento da bactéria

Para o isolamento foram coletadas folhas de maracujá (Passiflora edulis) com sintomas típicos de doença bacteriana. O primeiro isolamento do patógeno da fôlha do maracujá variedade amarela da zona Araraquarense foi realizado em 13/4/67 e catalogado como SBV-813. Partindo do primeiro isolamento, foram realizadas inoculações e reisolamentos em plantas jovens e em sementeiras em: 2/5/67 (SBV-815), 29/5/67 (SBV-817), 4/7/67 (SBV-819), 18/8/67 (SBV-821) e 13/9/67 (SBV-823), em casa de vegetação do Instituto Biológico.

5.1.2 Culturas de bactérias

No transcorrer do trabalho foram usadas como testemunhas e a título de comparação, as seguintes culturas de bactérias:

SBV-221 Pseudomonas sp, isolada por Pereira & Zagatto (1963) de lagartas de curuquerô..
(Alabama argillacea - Hubner).

- SBV-613 Xanthomonas marantae n.sp., isolada por Zagatto & Pereira (1963) de toucciras doentes de araruta (Maranta arundinacea L.) remetidas pela Secção de Raízes e Tuberculos, do Instituto Agronômico de Campinas.
- SBV-793 Pseudomonas sesami Malkoff, 1906, isolada por Pereira (1966), em material de fôlhas e hastes de gergelim (Sesamum orientale L.), enviado pela Secretaria da Agricultura de Goiás, do município de Intubiara.
- SBV-825 Xanthomonas manihotis (Arthaud-Berthet) Starr 1946). Isolada por Pereira & Zagatto, em 25/11/67, de material de mandioca (variedade Guaxupé) proveniente da Estação Experimental Theodureto de Carmargo.
- SBV-835 Agrobacterium tumefaciens (Erwin F. Smith & C. O., Townsend) Conn, 1942, isolada por Pereira & Zagatto (15/12/67), de galhas de roseiras, da chácara Adua, do município de Embú da Serra, São Paulo.

- ATCC Nº 7386 Pseudomonas lachrymans (Erwin F. Smith & Bryan) Carsner, 1918. American Type Culture Collection.
- ATCC Nº 9924 Xanthomonas malvacearum (Erwin F. Smith) Dowson, 1939. American Type Culture Collection.
- ATCC Nº 10197 Pseudomonas aeruginosa (Shroeter) Migula. American Type Culture Collection.
- b-224-D.S.I.R. Pseudomonas passiflorae (Reid, 1939) Burkholder, 1948. National Collection of Plant Pathogenic Bacteria, Plant Pathology Laboratory, Hatching Green, Harpenden, Herts, England.

5.1.3 Meios de cultura

Os meios de cultura utilizados no presente trabalho foram os seguintes:

5.1.3.1 Meios líquidos

5.1.3.1.1 Caldo simples (caldo extrato de carne)

Cloreto de sódio	5 g
Peptona bacteriológica	10 g
Água de carne bacteriológica	1000 ml
Ajustar o pH para 7.4	

5.1.3.1.2 Caldo glicosado

Glicose	1 g
Peptona	10 g
Cloreto de sódio	5 g
Água de carne	1000 ml
Ajustar o pH para 7.4	

Bier (1963)

5.1.3.1.3 Caldo Hottinger

Pâncreas de boi passado à máquina	150,0 g
Clorofórmio	20,0 ml
Solução de soda a 40% q. s.p. alcalinizar a tornasol	10,0 ml
Cloreto de sódio	5,0 g
Fosfato de sódio	0,2 g
Ajustar o pH para 7.4	

Bier (1963)

5.1.3.1.4 Leite simples

Preparação:- Colocar o leite de preferência tipo A, não pasteurizado, num recipiente e deixar na geladeira por uma noite para separar o creme. Retirar o leite isento de gordura, distribuir em tubos de ensaio e esterilizar.

5.1.3.1.5 Leite tornassolado

Corresponde ao "Bacto Litmus milk (b-107)"

"Bacto-skum milk"	100,00 g
"Bacto-litmus"	0,75 g

5.1.3.1.6 Hidratos de carbono

Empregou-se o meio básico para a fermentação de Hiss (1904), com adição do indicador Andrade, na quantidade de 10 ml, ao qual foi adicionado 1% do hidrato de carbono a ser testado. Também foi usado o meio básico sintético aconselhado por Ramamurthi (1959), com pequenas modificações, isto é, ausência de agar e de traços de metais. Como indicador, foi empregada a púrpura de bromo cresol. Os açúcares são suscetíveis à ação do calor e a esterilização foi feita por meio da filtração em velas esterilizadas. Ajustar o pH para 7.4.

5.1.3.1.7 Meio básico sintético

Fosfato ácido de amônia	1,0 g
Cloreto de potássio . .	0,2 g
Sulfato de magnésio . .	0,2 g
Extrato de levedura . .	0,2 g
Água destilada	1000 ml

5.1.3.1.8 Meio sintético asparagina

Fosfato monopotássico .	1,0 g
Cloreto de potássio . .	0,2 g
Sulfato de magnésio . .	0,2 g

Asparagina	5,0 g
Água destilada	1000 ml
Ajustar o pH para 6.4	

Starr & Weiss (1943)

5.1.3.1.9 Meio de Tarozzi

Fígado picado em pedaços do tamanho de avelãs	100 g
Caldo simples (5.1.2.1.2)	250 ml
Ajustar o pH para 7.4	

5.1.3.1.10 Meio fluido de tioglicolato (B-256)

Bacto casitone	15,90 g
Extrato de levedo	5,00 g
Bacto dextrose	5,00 g
Cloreto de sódio	2,50 g
L-cistina Difco	0,75 g
Agar	0,75 g
Ácido tioglicólico	0,30 ml
Resazurim	0,001 g
Ajustar o pH para 7.1	

Am. Phar. Ass. - (1950)

5.1.3.1.11 Meio de Clara

Sulfato de magnésio (anidro)	1,0 g
Fosfato dipotássico (anidro)	1,0 g
Asparagina	10,0 g

Água 1000 ml

Ajustar o pH para 7.5

Clara (1943)

5.1.3.2 Meios Sólidos

5.1.3.2.1 Agar simples (meio básico) ou agar nutritivo

Extrato de carne 10,0 g

Peptona 10,0 g

Cloreto de sódio 5,0 g

Agar 15,0 g

Água 1000 ml

Ajustar o pH para 7.5

Bier (1963)

5.1.3.2.2 Agar inclinado

Foi preparado usando o meio de agar simples ou meio básico em tubos de ensaio.

5.1.3.2.3 Meio B de King

Proteose peptona nº 3 20,0 g

Clicerina 10,0 g

Fosfato ácido de potássio 1,5 g

Sulfato de magnésio 1,5 g

Agar 15,0 g

Água q.s. 1000 ml

Ajustar o pH para 7.4

King et al (1954)

5.1.3.2.4 Meio YDC - (Yeast-dextrose-CaCo₃)

Bacto extrato de levedo . . .	10,0	g
Glicose	20,0	g
Carbonato de cálcio	20,0	g
Agar	15,0	g
Água q.s.1000	ml

5.1.3.2.5 Gelatina - "Nutrient gelatin b-11"

Bacto extrato de carne . . .	3,0	g
Bacto peptona	5,0	g
Bacto gelatina	120,0	g
Água destilada	1000	ml
Ajustar o pH para 6.8		

Difco (1965)

5.1.3.2.6 Meio de Teague

Agar simples - pH 5 - estéril	100	ml
Lactose (sol. a 10% estéril)	10	ml
Sol. aquosa de eosina 2% . .	2	ml
Sol. azul de metileno 0,5 %	2	ml
Ajustar o pH para 7.4		

5.1.3.2.7 Meio de Lignières

Gelatina	3	g
Agar	5	g
Caldo simples	1000	ml
Ajustar o pH para 7.4		

Bior (1963)

5.1.3.2.8 Cilindros de batata

Caldo glicerinado a 5%

Fragmentos de batata

Bier (1963)

5.1.3.2.9 Meio de Simmons-citrato

Sulfato de magnésio	0,2 g
Fosfato monoamônio	1,0 g
Fosfato dipotássico	1,0 g
Citrato de sódio	2,0 g
Cloreto de sódio	5,0 g
Agar	15,0 g
Azul de bromotimol	0,08 g
Água	1000 ml
Ajustar o pH para 7.4	

Simmons (1926)

5.1.3.2.10 Agar chumbo "Bacto lead acetate agar (B-88)"

Bacto peptona	15,0 g
Proteose peptona	5,0 g
Bacto dextrose	1,0 g
Acetato de chumbo	0,2 g
Tiosulfato de sódio	0,08 g
Bacto agar	15,0 g
Água q.s.	1000 ml

5.1.3.2.11 Sôro de Loeffler

Caldo glicosado a 1% 100 ml
 Sôro claro e fresco de boi . 300 ml
 Ajustar o pH para 7.4

Costa (1954)

5.1.3.2.12 Agar amido

Agar simples 100,0 g
 Amido solúvel 0,2 g

5.1.3.2.13 Agar sangue

Agar simples 100 ml
 Sangue de cavalo 5 ml
 Ajustar o pH para 7.2

5.1.3.2.14 Meio de Clark & Lubs

Peptona 7 g
 Glicose pura 5 g
 Fosfato dipotássico 5 g
 Água destilada 1000 ml

Clark & Lubs (1915)

5.1.3.2.14.1 Solução de vermelho de metila (V.M.)

Vermelho de metila 0,1 g
 Alcool 95% 300 ml
 Água destilada q.s. . . . 500 ml

5.1.3.2.14.2 Reação de Voges-Proskauer (V.P.)

Alfa-naftol (Sol. alcoólica 5%) 0,5 ml

Hidróxido de potássio (Sol. 40%) 0,2 ml

Barritt (1936)

5.1.4 Reativos

5.1.4.1 Reativo de Ehrlich Bohme (indol)

Paradimetilaminobenzaldeído . . . 4 g

Alcool a 95% 380 ml

Ácido Clorídrico concentrado . , 80 ml

Preparação:- Adicionar o paradimetilaminobenzaldeído num recipiente contendo 380 ml de alcool. Dissolver a 60°C durante 10 minutos, acrescentar ácido clorídrico concentrado e guardar em frascos escuros.

Bryan & Bryan (1959)

5.1.4.2 Reativo de Nessler (amônia)

Iodeto de potássio 50 g

Bi-cloreto de mercúrio 22 g

Hidróxido de sódio 5N 200 ml

Água q.s. 1000 ml

Preparação:- Dissolver 50 g de iodeto de potássio na menor quantidade de água possível (50 ml). Adicionar solução saturada de cloreto de mercúrio (22 g em 350 ml de água) juntando gota

a gota até a formação de precipitado. Em seguida adicionar 200 ml de hidróxido de sódio 5N e completar um litro. Deixar repousar uma semana e decantar. Guardar em vidro escuro de rolha esmerilhada.

Hodgman (1947)

5.1.4.3 Reativo de Griess-Ilosva (nitritos)

Sol.A - Ácido sulfanílico . . . 8 g
 - Ácido acético 5N . . . 1000 ml

Sol.B - Dimetil-alfa-naftalamina 5 g
 - Ácido acético 5N . . . 1000 ml

Após o preparo das soluções A e B, elas são guardadas separadamente em frascos escuros de rolha esmerilhada e usadas em quantidades iguais (1 ml) na ocasião de determinação de nitritos.

Levine (1954)

5.1.5 Corantes

5.1.5.1 Flagelos

Método de Zettnov mod. por Bongert

a.- Mordente de Pepper

Tanino 20 g
 Ácido crômico sol.2,5% 15 ml
 Água destilada 80 ml

A preparação foi amadurecida por 5 dias, a 20° C e filtrada antes de ser usada.

b.- Impregnador de Zettov

Sulfato de prata

Sol. 1 - Nitrato de prata . . . 5 g
 Água destilada . . . 30 ml
 Sol. 2 - Sulfato de magnésio 5 g
 Água destilada . . . 30 ml

Preparação:- Misturar a frio as soluções 1 e 2 em tubo de ensaio. Após o aparecimento de um precipitado branco, decantar o líquido e adicionar 20 ml de água destilada e obter cerca de 4 g de sulfato de prata.

Impregnador

Sulfato de prata 4 g
 Água destilada 500 ml
 Amônia sol. aq. a 35%

Preparação:- Dissolver o sulfato de prata, agitando-o em frasco com rolha de esmeril a fim de se obter uma solução concentrada. Tomar 50 ml da solução e adicionar amônia, gota a gota, até redissolver o precipitado escuro de óxido de prata. Em seguida, acrescentar algumas gotas da solução de sulfato de prata, até obter,

de novo, um começo de formação de precipitado. O produto obtido deve ser guardado em fresco escuro.

Songert (1927)

5.1.5.2 Espóros

Método de Dorner

I - Fucsina de Ziehl

Sol. A-Fucsina básica a

90% de pureza . . . 3 g

Alcool etílico 95% 10 ml

Sol. B-Fenol (cristais) . . . 5 g

Água destilada . . . 95 ml

Misturar as soluções A e B

A fucsina de Ziehl diluída 1/10 é utilizada para a coloração de fundo, no método de Gran.

Salle (1939)

II - Nigrosina

Água destilada 100 ml

Nigrosina 10 g

Bier (1963)

5.1.5.3 Gram

I - Cristal violeta, segundo Hucker (1921)

A - Cristal violeta . . .	4	g
Alcool etílico a 95%	20	ml
B - Oxalato de amônia . .	0,8	g
Água destilada . . .	80,0	ml

Misturar as soluções A e B em partes iguais.

II - Lugol

Iôdo	1	g
Iodeto de potássio . . .	2	g
Água destilada	200	ml

5.1.6 Indicador

5.1.6.1 Indicador Andrade

Fucsina ácida	0,1	g
Hidróxido de sódio N/1 . . .	16	ml
Água destilada q.s.	100	ml

5.1.6.2 Púrpura de bromo cresol

Bromo cresol	0,2	g
Alcool 95%	50	ml
Água	50	ml

Schaub & Foley (1952)

5.1.7 Antibióticos

Foi realizado um ensaio do comportamento "in vitro" da bactéria, em face de diversos antibióticos.

Para testar a atividade dos antibióticos sobre essa bactéria foram usados: cultura (S W-813), placas de agar simples e discos de papel filtro de concentração de antibiótico, denominados no comércio de "Comp.-Discos", do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de São Paulo.

5.2 Métodos

Os métodos utilizados neste estudo são os propostos pela "Society of American Bacteriologists" (1957) e outros, conforme se expõe, no decorrer deste trabalho.

5.2.1 Isolamento da bactéria

Os isolamentos foram realizados a partir de fôlhas e hastes apresentando lesões características de doença bacteriana. Foram empregados dois processos de acordo com o material utilizado.

5.2.1.1 Fôlha

A técnica posta em prática foi o do macerado em caldo simples, utilizando-se as partes das fôlhas com lesões novas e estágio tipicamente aquoso. Foi retirada uma pequena área foliar e emergida em álcool, a 70°C,

durante 3 minutos. O fragmento da fôlha foi lavado em água estéril em tubos de ensaios, passando em 5 tubos sucessivamente. Depois, foi a área foliar colocada em um cadinho estéril, macerada com 3 gotas de caldo simples, obtendo-se, assim, uma suspensão bacteriana. Foi pipetada uma gota e semeada a suspensão pelo método da diluição em 3 placas de Petri, contendo agar simples.

5.2.1.2 Haste

Empregou-se a técnica da "câmara super-úmida", idealizada por Amaral (1962), que aproveita o poder de absorção das raízes, quando mergulhadas no meio líquido. A água, penetrando pelas raízes e circulando pelos vasos, impele para cima as bactérias. Cortando a haste a uma certa altura e emborcando-se um tubo de ensaio de modo que a boca do tubo fique mergulhada no líquido, obtém-se, no interior do tubo, uma "câmara super-úmida", que evita o secamento dos tecidos e facilita a saída normal da goma bacteriana. A exsudação que se consegue com êsse processo serve, também, para indicar a presença da bacteriose. A boa exsudação foi conseguida após 4 horas. Em seguida, a goma bacteriana foi semeada, por diluição, em 5 placas de agar simples.

As 6 placas de Petri foram incubadas à temperatura de 27°C. Após 24 horas, as placas vistas à binocular revelaram pequenas gotículas aquosas, de contôrno irregular, mais ou menos planas. A boa caracterização das colônias só foi possível após 3 dias de incubação.

5.2.2 Inoculação

O teste de patogenicidade da amostra S3V-813 foi realizado por meio de inoculações em plantas jovens de maracujá, variedade amarela, cultivadas em vaso, provenientes do Instituto Agronômico de Campinas.

O inóculo necessário foi obtido, após um período de 3 dias de incubação, de placas de agar simples. Foi retirada, com auxílio de uma alça de platina, certa quantidade de massa bacteriana e transferida para um vaso de Erlenmeyer, contendo água estéril. Por tentativa foi estabelecida uma diluição aproximada de $3 \cdot 10^8$ células/ml, que corresponde ao tubo nº 1 da escala de Mac Farland, segundo Bier (1963).

Foram aplicados os seguintes métodos de inoculação:

- 5.2.2.1 Riscando levemente a face dorsal da fôlha de maracujá com agulha de injeção e encharcando-a com suspensão bacteriana (Fig. nº 4).
- 5.2.2.2 Inoculação, simplesmente, por aspersão, por intermédio de um vaporizador (Fig. nº 5).
- 5.2.2.3 Usando abrasivos (carborundum) preconizados por Bohn & Malott (1947) (Fig. nº 6).
- 5.2.2.4 Inoculação por picadas de agulha com a ponta úmida de inóculo (Fig. nº 7).

5.2.2.5 Encharcamento do limbo foliar com suspensão bacteriana em água estéril (Fig. nº 8).

As plantas foram mantidas em câmara úmida durante 24 horas antes e 48 horas depois de inoculadas em casa de vegetação, do Instituto Biológico, à temperatura média de 27°C. O ambiente úmido foi obtido recobrando-se os vasos com sacos plásticos transparente. As mudas testemunhas, recobertas com sacos plásticos, também foram submetidas a tratamento idênticos aos das inoculadas, mas, em lugar de suspensão bacteriana, receberam água esterilizada.

5.2.3 Reisolamento

O reisolamento do patógeno tornou-se bastante fácil não só pelo baixo índice de contaminação em virtude de ser a inoculação feita em ambiente fechado, como também do conhecimento prévio dos sintomas.

Após 7 dias da inoculação, obtiveram-se culturas até mesmo puras, pelo simples processo de maceração de lesões aquosas em caldo simples e posterior semeadura em placas de agar nutritivo.

5.2.4 Anaerobiose

Os métodos empregados no isolamento das bactérias anaeróbias exigem pessoas habilitadas e aparelhos caros. Eliminando esses inconvenientes, foi empregado no presente

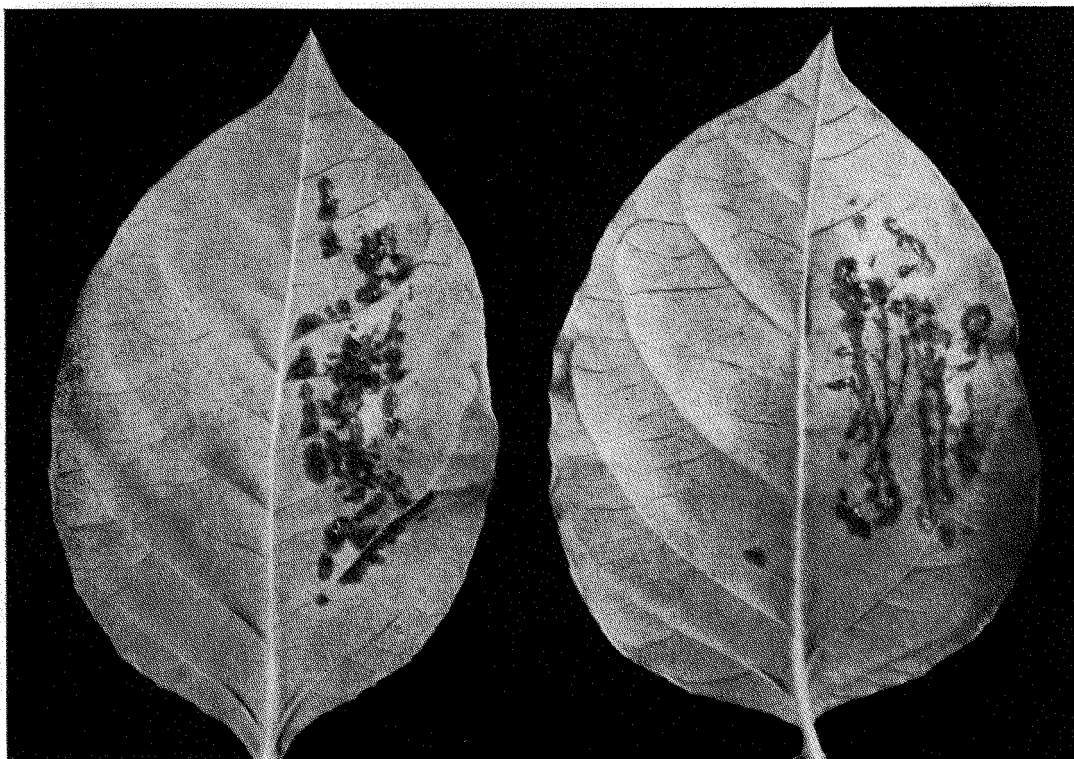


Foto 4 — Sintoma provocado por riscos à face dorsal da fôlha de maracujá e encharcamento com suspensão bacteriana. À esquerda da nervura principal foi sômente riscado e aspergida com água esteril e serviu como testemunha.



Foto 5 — Inoculação de fôlhas de maracujá, por aspersão de uma suspensão bacteriana, por intermédio de um vaporizador.



Fig. 6

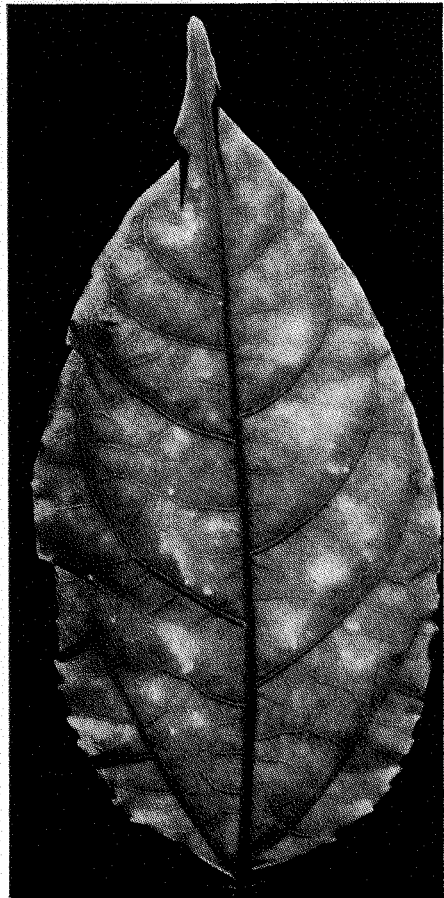


Fig. 7

Figura 6 — Inoculação em fôlha de maracujá, usando abrasivos mostrando infecção maciça.

Figura 7 — Inoculação por picada em fôlha de maracujá, mostrando halos cloróticos, visto por transparência.



Figura 8 — Inoculação por encharcamento, de suspensão bacteriana, em água esteril mostrando maior infecção próxima à nervura principal.

trabalho, o processo idealizado por Amaral (1955) que consiste numa modificação do método de Jacobsthal, semeando numa placa de Petri de agar glicosado, o anaeróbio e na outra de agar simples, o aeróbio. A cultura para absorção do oxigênio foi a Serratia marcescens (SBV-375) e, por tratar-se de bactéria facultativa, isto é, que se desenvolve bem nas condições de anaerobiose e aerobiose, essa bactéria foi escolhida para o teste. Em 30 ml de caldo glicosado foi feita a inoculação da bactéria (SBV-375) e incubada a 27°C. Após 24 horas, a suspensão bacteriana foi utilizada para embeber as fatias de pão de fôrma colocadas numa placa de Petri, sem requisitos especiais de assepsia.

A bactéria em estudo (SBV-813) foi semeada numa placa de agar glicosado, originária de cultura repicada em dia anterior. Eliminadas as tampas, as partes internas das placas foram justapostas e unidas entre si, por fita gomada, e incubadas à temperatura de 27°C.

Novo teste foi realizado, empregando-se o meio líquido de tioglicolato para verificar se a bactéria era aeróbio facultativa, microaerófila, anaeróbio ou aeróbio estrito. Com auxílio de uma pipeta estirada de Pasteur, a cultura SBV-813 foi introduzida no fundo do tubo de ensaio contendo meio líquido de tioglicolato. Em seguida, a pipeta foi retirada vagarosamente, de modo que a cultura se depositasse ao longo da picada, até a superfície do meio. Os tubos assim preparados foram incubados à temperatura de 27°C.

5.2.5 Temperatura

Foram usados dois métodos: um para determinar a temperatura ótima e a mínima de crescimento da bactéria e outro para conhecer o ponto crítico de sobrevivência do patógeno.

Para o primeiro caso, foi utilizado um conjunto de 6 câmaras à temperatura constante (21-24-27-30-33 e 36°C), da Divisão de Biologia Vegetal, do Instituto Biológico. O critério da escolha dessa escala de temperatura foi influenciado pelas nossas observações preliminares ao constatar que a bactéria desenvolvia-se bem à temperatura de 27°C.

Para cada uma das temperaturas escolhida, foram preparados 3 tubos com caldo simples, onde se aplicou, em cada placa, um volume de inóculo igual ao retido por uma alça de platina. A cultura (SBV-813), em caldo simples, foi preparada 24 horas antes da inoculação aos 3 tubos e mantida a 27°C. Nas placas de Petri, a inoculação foi efetuada, seguindo 3 linhas paralelas.

O processo para determinar a resistência da bactéria à temperatura (thermal death point) foi o descrito por Peltier e outros (1959) com pequenas modificações. A técnica seguida foi a seguinte: tomar 6 placas de Petri e dividir cada uma em 4 setores por meio de um pincel e etiquetar os setores com os seguintes dizeres: T (testemunha), NA (não aquecido) e duas temperaturas. Preparar 12 banho-marias com as temperaturas de 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56°C. Fazer uma suspensão da bactéria (SBV-813)

em caldo simples e incubá-los à temperatura de 27°C, durante 72 horas. Em seguida, tomar um tubo capilar estéril de 15 cm de comprimento, introduzir inóculo nesse tubo e fechar as extremidades a fogo. Essa operação deve ser repetida 12 vezes. Tomar um tubo capilar com inóculo, colocar em banho-maria a 45°C e, após 5 minutos de imersão, quebrar as extremidades do tubo capilar, retirar um volume de inóculo e plaquear no setor correspondente à etiqueta. No setor MA, colocar inóculo que não sofreu aquecimento e em "T", plaquear água estéril, para servir como testemunha. O mesmo ensaio deverá ser feito para os tubos de ensaio com cultura de bactéria, aquecidos a 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55 e 56°C. As placas de Petri assim preparadas, foram incubadas a 27°C durante 72 horas.

5.2.6 Produção de fluoresceína

Para verificar a formação de fluoresceína, através de sua fluorescência, foi empregado o método idealizado por Clara (1934).

5.2.6.1 Aplicar uma suspensão bacteriana obtida em cultura de 5 dias, em meio de Clara, sobre uma linha reta de 10 cm de comprimento em papel "Germini, Whatman Filter Paper nº 1", usado em cromatografia.

5.2.6.2 Secar com jato de ar à temperatura ambiente.

5.2.6.3 Repetir as operações anteriores 10 vezes, a fim de dar maior concentração à preparação.

5.2.6.4 Colocar o papel Whatman diante do aparelho ultra violeta, de ondas longas, do tipo empregado para detectar minerais fluorescentes.

A título de comparar com os resultados obtidos com a amostra SBV-813, foram usadas as culturas SBV-221, SBV-793, b-224-D.S.I.R. e ATCC-10197.

5.2.7 Meios sintéticos

Foi usado o método de Starr & Weiss (1943), que constituiu em fazer a transferência de cultura SBV-813 do agar simples para o meio sintético asparagina. Verificado o crescimento, após o 6º dia da 1ª repicagem, fazer nova transferência para o meio asparagina e repetir a operação por 4 vezes, aguardando sempre um intervalo de 6 dias, de cada repicagem.

Em cada passagem, foi verificado o crescimento da bactéria. Como testemunhas foram usadas as culturas: SBV-221, SBV-613, SBV-793, SBV-825, ATCC-7386, ATCC-9924 e b-224-D.S.I.R.

A inoculação da cultura SBV-813, no meio sintético de Simmons-citrato, constituiu-se em transferir colônias cultivadas em agar simples, para o meio sintético, com o máximo cuidado a fim de evitar a introdução de elementos nutritivos do meio de cultura, capazes de falsear os resultados. As testemunhas foram: SBV-221, SBV-793 e b-224 D.S.I.R.

5.2.8 Mobilidade da bactéria

Foi usado o método da gota pendente, para verificar a mobilidade da bactéria, empregando-se lâmina cavada e lamínula.

As formas móveis foram selecionadas, empregando-se o tubo de Braun & Howell (1950) que foi idealizado com o objetivo de separar amostras lisas e rugosas, quando misturadas numa suspensão. Consta de um tubo de vidro, em forma de U, contendo na parte recurvada uma placa porosa, com poros medindo 5 μ de diâmetro que facilitam a passagem das bactérias móveis. Ambos os ramos são cheios de caldo glicosado e o conjunto autoclavado. Em seguida, num dos ramos é colocado uma gota de cultura SBV-813 e incubada a 27°C. Após 48 horas é retirado uma gota do outro ramo e transferida para outro tubo de Braun. Essa operação é repetida 6 vezes.

Uma gota da suspensão bacteriana foi colocada na porção central da lamínula e justaposta à parte cavada da lâmina com a gota voltada para dentro. A aderência entre a lâmina e lamínula foi conseguida intercalando-se uma gota de água entre elas. Em seguida, a preparação foi levada ao microscópio.

5.2.9 Coloração de Gram

Esta reação das bactérias aos corantes foi observada pela primeira vez por Christian Gram, em 1884. Esse método baseia-se no fato de certas bactérias corarem pela

solução de cristal violeta fenicada e êste, depois de tratada pelo lugol, formar um composto de coloração escura, o qual é fortemente retido pelas bactérias, não sendo removido após o tratamento com álcool a 95%. Essas bactérias "tomam o Gram" e são consideradas positivas. Aquelas que são descoloradas pelo álcool "não tomam o Gram" e são as negativas. Após a operação álcool, fazendo uma coloração de fundo pela fucsina, as bactérias Gram-positivas conservam a cor roxa, ao invés das bactérias Gram-negativas que apresentam a cor vermelha.

A técnica de coloração da bactéria em estudo seguiu o seguinte esquema:

- 5.2.9.1 Tomar uma lâmina limpa e desengordurada e colocar uma gota da suspensão bacteriana recentemente repicada (72 horas).
- 5.2.9.2 Fazer o esfregaço e deixar secar com auxílio de leve jato de ar.
- 5.2.9.3 Fixar a preparação passando por 3 vezes pela chama do bico de Bunsen.
- 5.2.9.4 Recobrir a lâmina com uma solução de cristal violeta fenicada, durante 1 minuto.
- 5.2.9.5 Lavar em água corrente e recobrir com lugol durante 1 minuto.

5.2.9.6 Lavar, novamente, e recobrir com álcool etílico a 95% durante 30 segundos.

5.2.9.7 Lavar e colorir com fucsina de Ziehl por 30 segundos.

5.2.9.8 Lavar novamente a lâmina e deixar secar. em seguida, levar a preparação ao microscópio e observar na objetiva de imersão.

5.2.10 Coloração de esporos

Para verificar se a bactéria produz esporos, foi empregado o método de coloração idealizado por Dornier. A técnica foi a seguinte:

5.2.10.1 Lavar a lâmina e desengordurar, com solução sulfocrômica.

5.2.10.2 Lavar novamente e flambar.

5.2.10.3 Com alça de platina, retirar uma gota de água estéril e depositar na lâmina.

5.2.10.4 Em seguida, com a mesma alça, retirar uma suspensão da amostra SBV-813, de cultura velha (30 dias, meio de agar inclinado) e depositar na gota de água da lâmina e fazer um esfregaço, de mais ou menos, 2 cm de diâmetro.

- 5.2.10.5 Após a lâmina sêca, proceder à fixação pelo calor.
- 5.2.10.6 Recobrir a preparação com fucsina de Ziehl, cozer a quente, passando pelo bico de Bunsen, até desprender vapores.
- 5.2.10.7 Lavar em água corrente e deixar secar ao ar.
- 5.2.10.8 Colocar uma gota de negrosina na extremidade da lâmina e, com auxílio de uma lamínula, que toca a gota de negrosina, fazer correr sobre a superfície da lâmina.
- 5.2.10.9 Secar ao ar e observar a preparação ao microscópio, através da objetiva de imersão.

5.2.11 Coloração de flagelos

A cultura de bactéria utilizada foi a mesma empregada para verificar a mobilidade da bactéria. Foi empregado a técnica preconizada por Braun & Howell, usando-se tubos em U, tendo na parte recurvada uma placa porosa que permite a passagem dos microrganismos.

Após a 6ª. repicagem, uma porção da suspensão foi retirada, por capilaridade, com uma pipeta estirada, a qual, por simples contato, deixou-se escorrer sobre a lâmina ligeiramente inclinada, ficando assinalada estreita faixa.

Realizado o secamento da preparação, procedeu-se à coloração de flagelos pelo método de Zettnov, modificado por Bongert (1927):

- 5.2.11.1 Colocar o mordente apenas sobre a preparação durante 3 minutos.
- 5.2.11.2 Fazer uma lavagem bastante cuidadosa, com jato levê de água que deve ser dirigido apenas a uma das extremidades da lâmina.
- 5.2.11.3 Em seguida, secar e colocar o impregnador de Zettnov sobre a preparação durante 1 minuto.
- 5.2.11.4 Secar novamente e examinar ao microscópio, com objetiva de imersão onde há maior concentração de bactérias. Como testemunha foi empregada a amostra b-224.

5.2.12 Coloração de cápsulas

Foi empregado o método idealizado por Duguid e modificado por Sussuana e Pabst (1966) que consistiu no seguinte:

- 5.2.12.1 Colocar sobre uma lamínula uma gota de suspensão de 4% de amido solúvel e juntar um volume de inóculo (SEV-813), igual ao retido por uma alça de platina.

- 5.2.12.2 Sôbre a lâmina colocar uma gôta de água estéril, acrescentar 0,1% de gelose e juntar, com auxílio de pipeta estirada, uma gôta de solução de iôdo, na diluição de 0,5% de iôdo.
- 5.2.12.3 Com um pequeno bastonete misturar bem a preparação acima.
- 5.2.12.4 Em seguida, inverter a lamínula sôbre a gôta da solução de iôdo.
- 5.2.12.5 Levar ao microscópio e focalizar os campos microscópicos, em que se observe com mais nitidez a gelificação do amido.

5.2.13 Hospedeiros

Para testar a faixa de patogenicidade do patógeno (SBV-813), algumas plantas foram inoculadas para verificar o seu comportamento como hospedeiros dessa bactéria.

As plantas testadas foram as indicadas por Robbs (1959) na sua "chave de classificação de algumas espécies fitopagotênicas do gênero Pseudomonas que ocorrem no Brasil", que tem a faculdade de liquefazer a gelatina e se desenvolver em meio de Clara e de algumas representantes da série Parietales, onde se inclui a família Passifloraceae.

Foram feitas inoculações cruzadas, segundo os métodos transcritos às fls. 28 e 29, nas seguintes plantas:

fumo (Nicotina tabacum L.), pimenta do reino (Piper ni-
grum), feijão lina (Phaseolus lunatus L.), mamoeiro (Cari-
ca papaya), mamona (Ricinus communisL.), violeta (Viola
odorata), begonia (Begonia rex) e como testemunha, maracujá (Passiflora edulis).

5.2.14. Sensibilidade aos antibióticos

O método da avaliação da sensibilidade aos antibió-
ticos foi o de discos de papel de filtro originariamente
estabelecido por Sherwood & Beer (1944) para a determina-
ção quantitativa da penicilina. Para simplificar, foram em-
pregados discos de papel de concentração de antibiótico co-
nhecidos. Os discos de papel com antibióticos foram dis-
tribuídos inteiramente casualizados, com 3 repetições em 9
placas de agar simples. Após 24 horas de incubação (30°C),
uma cultura em caldo simples foi estirada, em agar simples,
contido em placas de Petri, de maneira a recobrir todo o
meio de cultura. Foi retirado o excesso de umidade, colo-
cando as placas em estufas, por 30 minutos à temperatura
de 37°C. Em seguida, os discos de antibióticos foram colo-
cados nas placas de Petri, numa distribuição radial e equi-
distante. Em seguida as placas foram guardadas em geladei-
ra, antecedendo à incubação, a fim de permitir que as subs-
tâncias anti-microbianas se difundissem antes que a cul-
tura bacteriana iniciasse o seu desenvolvimento. Após 48
horas, as placas foram incubadas durante 24 horas e obtive-
mos halos de inibição bastante definidos e de fácil leitura.

Foi feito o estudo comparativo entre os diferentes antibióticos, através do diâmetro do halo de inibição.

Os antibióticos usados estão relacionados no quadro I.

QUADRO I

Produtos empregados na avaliação da atividade antibiótica.

NOME COMUM	PRINCIPIO ATIVO	FONTE
Aureomicina	Cloridrato de clorotetraciclina	Lederle
Cloromicetina	Clorafenicol	Carlo Erba e Parke Davis
Eritromicina	Sulfato laurílico de propionil eritromicina	Eli Lilly e Abbott
Estreptomicina	Sulfato de estreptomina	E. E. Squibb Sons
Kanamicina	Sulfato de kanamicina	Laboterápica, Bristol e Lafi
Novobiocina	Novobiocina sódica	Upjohn e Merk-Sharp & Dome
Penicilina	Penicilina potássica	E. R. Squibb Sons
Terramicina	Oxitetraciclina	Laboraterápica Bristol Lederle
Tettrin	Cloridrato de tetraciclina	

5.2.15 Método de liofilização

As culturas da amostra (SBV-813) foram incubadas durante 24 horas, em 5 ml de caldo glicosado, contidas em tubos de ensaio e transferidas para frascos comumente usados para vacina (raiva, bouba, aftosa, etc) de uso veterinário. A técnica foi a de uso corrente na Secção de Produtos Veterinários, do Instituto Biológico, para vírus ou drogas, conforme segue:

- 5.2.15.1 Colocar os frascos contendo culturas bacterianas em caldo glicosado no liofilizador, cuja temperatura na câmara deve ser ajustada para -30°C .
- 5.2.15.2 Ao atingir a temperatura de -30°C , interromper o resfriamento e fazer o vácuo que deve ser mantido entre 25 a 30 micra durante todo o processo de liofilização. Com isso, provoca-se a sublimação e conseqüentemente um maior abaixamento de temperatura do produto que deve oscilar entre -30°C e -40°C .
- 5.2.15.3 A seguir, aquecer a câmara de liofilização, de maneira que a temperatura aumente gradativamente de 0°C até a temperatura inicial da operação.
- 5.2.15.4 Após 2 horas, se a pressão e a temperatura se

mantiverem constantes, fechar automaticamente os frascos e, assim, termina a operação de liofilização.

5.2.15.5 Restabelecida na câmara de liofilização a pressão ambiente, processa-se a retirada dos frascos.

6. RESULTADOS

6.1 Caracteres morfológicos

As bactérias apresentaram-se sob a forma de bastonetes, medindo, em média, 0.50 X 1.50 micra, com extremidades arredondadas, isoladas, aos pares ou em cadeias. Não tomaram o Gram portanto, foram consideradas Gram-negativas.

6.1.1 Mobilidade

A mobilidade da bactéria foi verificada pelo processo de gotas pendente, porém, para selecionar as formas móveis, foi empregado o tubo em U (Braun tube), contendo caldo simples para as 6 repicagens. Vista ao microscópio, revelou uma mobilidade regular. O número de flagelos foi observado pelo método de coloração de Zettnov e confirmado pela fotomicrografia eletrônica, apresentando a cultura SBV-813, um flagelo polar (Fig. nº 9) e a testemunha (b-224 D.S.I.R.) quatro flagelos polares (Fig. nº 10).

6.1.2 Espóros

O método empregado para a coloração de espóros foi o preconizado por Dorner. A lâmina preparada por esse processo e observada ao microscópio, com objetiva de imersão,

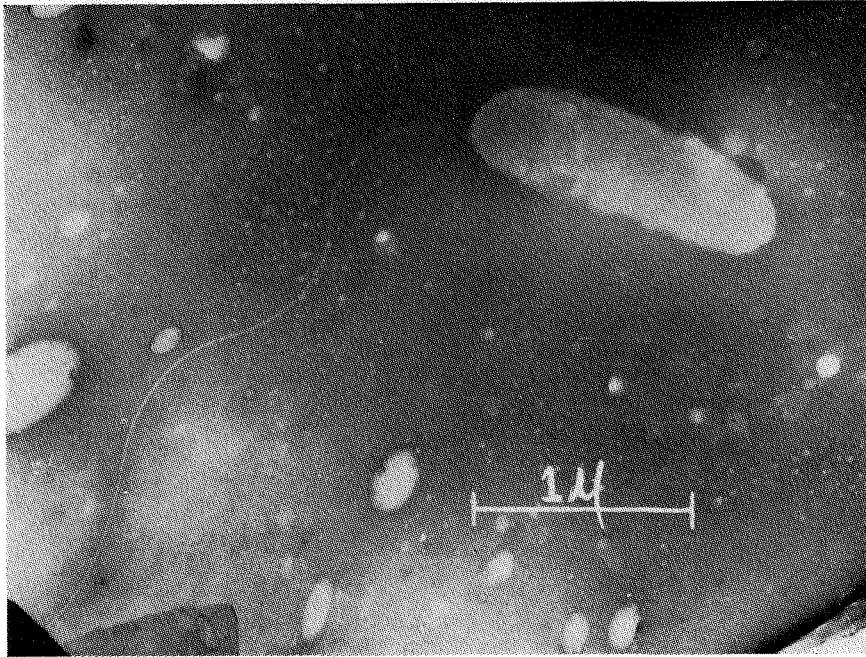


Figura 9 — Fotomicrografia eletrônica de *Xanthomonas passiflorae* n.sp. obtida em microscópio eletrônico, modelo EM 200, tipo 11.985. Bactéria sem tratamento, simplesmente transferida do meio de cultura ágar simples para a telinha porta objeto, coberta com parlódion, e depois recebendo o corante. Aumento 28.000 X. Seção de Microscopia Eletrônica — Instituto A. Lutz.

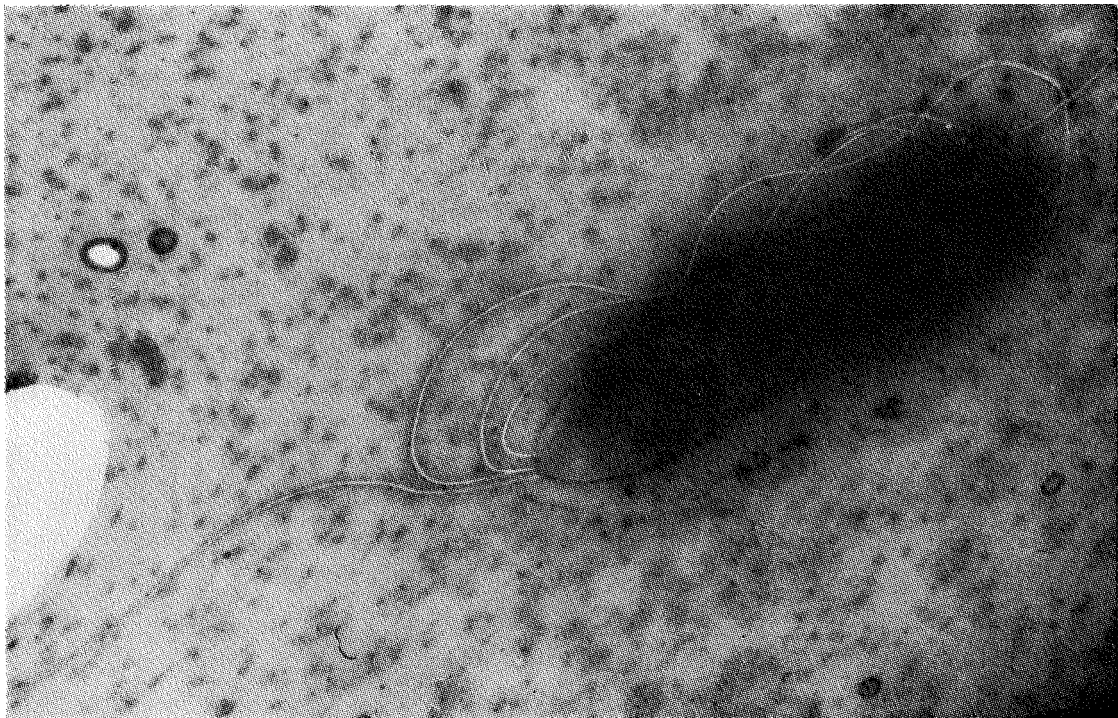


Figura 10 — Fotomicrografia eletrônica de *Pseudomonas passiflorae*, proveniente da cultura b-224 D.S.I.R. Aumento 50.000 X. Seção de Microscopia Eletrônica — Instituto A. Lutz.

apresentou o corpo bacteriano incolor sôbre o fundo negro violáceo da preparação, o que indicou que a bactéria (SBV-813) não esporula.

6.1.3 Cápsula bacteriana

Para verificar se a bactéria possuía cápsula, foi empregado o método de Duguid, modificado por Suassuna & Pabst. Observada a preparação ao microscópio, verificou-se que a suspensão de amido, tratada com iôdo, circunscreveu a bactéria, notando-se bem a cápsula, que se apresentou em negativo. Portanto, a bactéria em estudo é constituída de cápsula bacteriana.

6.2 Caracteres culturais

6.2.1 Caldo simples

Leve turvação do meio, decorridas 24 horas. Acentuou-se ligeiramente e assim permanecendo, transcorridos 4 dias. Uma lenta sedimentação, tipicamente mucosa, depositou no fundo do tubo.

6.2.2 Caldo glicosado

Turvação e sedimentação mais acentuada, do que a verificada no caldo simples, evidenciando assim acentuada influência da glicose. Após 7 dias, houve formação de um anel aderente às paredes do tubo.

6.2.3 Caldo Hottinger

Apresentou as mesmas características observadas para o caso do caldo glicosado.

Decorridos 10 dias, praticamente, em todos os meios líquidos, foi notado mediana turvação, sedimentação mucosa e anel aderente à superfície dos tubos, sendo mais conspícuo em certos meios que contêm amido, galactose e gelatina.

6.2.4 Meio de Tarozzi

A bactéria não cresceu neste meio. Após 30 dias, foi perfurada a camada de vaselina sólida que recobria o meio, de maneira a permitir o arejamento. Após 2 dias de incubação, a 27°C, foi observada, nítida turvação, o que provou a presença da bactéria no meio de Tarozzi.

6.2.5 Meio fluido de tioglicolato

Após 4 dias de incubação, foi observado ótimo crescimento da bactéria, somente na superfície do meio, indicando, assim, tratar-se de uma bactéria aeróbio estrito.

6.2.6 Meio de Clara

Decorridos 2 dias de incubação, foi notada uma pequena turvação no meio de Clara, sem apresentar sedimentação, como aconteceu no caso da glicose.

6.2.7 Meio sintéticos

6.2.7.1 Meio sintético-asparagina

Todas as culturas de bactérias cresceram relativamente bem, após 24 horas da 1a. inoculação. Os resultados, praticamente, puderam ser apreciados a partir da 2a. transferência. Os microrganismos que acusaram crescimento no meio sintético-asparagina, após a 4a. transferência, foram:

SBV-221	-	<u>Pseudomonas</u> sp.
SBV-793	-	<u>Pseudomonas sesami</u>
SBV-835	-	<u>Agrobacterium tumefaciens</u>
ATCC-7386	-	<u>Pseudomonas lachrymans</u>

As culturas que não apresentaram crescimento, após a 2a. repicagem, foram:

SBV-613	-	<u>Xanthomonas marantae</u>
SBV-825	-	<u>Xanthomonas manihotis</u>
ATCC-9924	-	<u>Xanthomonas malvacearum</u>
b-224-D.S.I.R.	-	<u>Pseudomonas passiflorae</u>
SBV-813		

6.2.7.2 Meio Simmons-citrato

Após 5 dias da inoculação da cultura SBV-813, SBV-221 e SBV-793, o meio sintético apresentou a mudança da cor verde para azul. Não houve modificação da cor, na cultura b-224-D.S.I.R.

6.2.8 Placas de agar simples

Revolou-se, à semelhança da maioria das bactérias fitopatogênicas, crescimento muito lento, tornando-se ligeiramente perceptível após 24 horas (27°C). Boa individualização, decorridos 5 dias (27°C). As colônias apresentaram as seguintes características: aspecto mucoso, circulares, convexas, salientes, elevadas, translúcidas, brilhantes, amarelo-cêra (mais acentuada na parte central), viscosas, com cerca de 1,5 mm de diâmetro e possuindo a capacidade de se unirem com facilidade. Os bordos são regulares (Fig. 11).

6.2.9 Agar inclinado

O traço foi realizado à superfície do meio e apresentou, após 4 dias, um desenvolvimento lento, de aspecto brilhante, cor amarelo-cêra, viscoso, filiforme e odor ligeiramente amoniacal.

6.2.10 Meio B de King

Depois de 2 dias, houve crescimento moderado, permitindo boa individualização das colônias após 4 dias da inoculação.

6.2.11 Meio Y.D.C. (yeast-dextrose-CaCO₃)

Crescimento das colônias, inicialmente, análogo ao



Figura 11 — Colônias de *Xanthomonas passiflorae* n. sp. em placas de agar simples, após 5 dias de incubação, de aspecto mucoso, circulares, convexas, salientes, elevadas, translúcidas, brilhantes e capacidade de se unirem com facilidade. 2 X.

anterior, tornando-se com o correr do tempo, bastante luxurriante.

6.2.12 Gelatina

Liquefação lenta, completada após 8 dias. Com relação ao tipo de fusão, podemos dizer tratar-se de uma fusão estratiforme.

6.2.13 Meio de Teague

Mostrou, no 5º dia da inoculação, colônias de bom crescimento, semelhantes às verificadas em meio de agar simples. Nesse meio, prolifera a maior parte das bactérias Gram negativas, com inibição das Gram positivas, fornecendo, assim, indicação para a classificação da bactéria.

6.2.14 Meio de Lignières

O crescimento mostrou-se mais acentuado próximo à superfície do meio e pequeno desenvolvimento ao longo da picada. Essa característica fornece indicações das condições de aerobiose da bactéria e de sua mobilidade.

6.2.15 Cilindros de batata

Decorridos 8 dias da inoculação, o meio com cilindros de batata apresentou crescimento abundante, de côr

amarelo-canário, úmido, brilhante, altamente viscoso, recobrando totalmente a batata, e digestão progressiva. Para efeito de apreciação de resultados, foram usadas as amostras SBV-613 e SBV-793.

A SBV-613 apresentou as mesmas características da SBV-813 e a amostra SBV-793, embora mostrando um bom crescimento, se caracterizou pela ausência de pigmentação amarela.

6.3 Fisiologia

A exigência da bactéria (SBV-813), em relação ao oxigênio livre, foi verificada pelo emprêgo da técnica de Jacobsthal, modificado por Amaral. Decorridos 10 dias, não foi observado nenhum crescimento da cultura semeada em placa de Petri, razão pela qual a bactéria foi considerada acróbia. Também, o microrganismo semeado em meio de Tarozzi não exibiu turvação, no mesmo período de incubação do teste anterior, comprovando, assim, o resultado do primeiro ensaio. O crescimento abundante, sómente na superfície superior do meio fluido de tioglicolato, nos indicou que a bactéria deve ser considerada aeróbio estrito.

Foi verificado, após 24 horas de incubação, que as culturas, tanto nas placas como nos tubos, retirados das câmaras de temperatura constante, apresentaram crescimento ótimo à temperatura de 27°C. Na temperatura de 24° e 30°C, a velocidade de desenvolvimento foi menor. Não foi notado crescimento à temperatura de 36°C.

A resistência da bactéria ao calor prolongado foi verificado pelo emprêgo do processo descrito por Peltier, com pequenas modificações. O crescimento da bactéria começou a ser prejudicado a partir de 50°C e foi mortal quando a suspensão bacteriana ficou exposta, durante 5 minutos, à temperatura de 52°C (thermal death point).

O primeiro isolamento da bactéria, realizado em 13/4/67, foi conservado em meio de batata-glicose-agar e, 8 meses depois, feitas inoculações em plantas jovens de maracujá, foi constatado que não houve qualquer perda de patogenicidade ou atenuação das características primitivas.

Foram realizados testes de inoculação em outras plantas para verificar a faixa de patogenicidade da amostra SBV-813. As inoculações foram efetuadas segundo os métodos descritos às fls 28-29, em fumo (Nicotina tabacum L.), pimenta do reino (Piper nigrum), feijão lima (Phaseolus lunatus L.), mamoeiro (Carica papaya), mamona (Ricinus communis L.), violeta (Viola odorata), begônia (Begonia rex) e maracujá (Passiflora edulis). Após 25 dias, foi feita a leitura e o único vegetal que apresentou sintomas característicos de bacteriose foi o maracujá, que serviu como testemunha.

6.3.1 Hidratos de carbono

Para as provas de fermentação foram usados os meios de Hiss e o meio básico sintético. Ao primeiro, foi adicionado o indicador Andrade e, ao segundo, a púrpura de bromo cresol. Os hidratos de carbono formam os seguintes: arabi

nose, galactose, glicerina, glicose, lactose, levulose, maltose, manita, rafinose, sacarose, salicina e xilose. Semeadado o microrganismo (SBV-813) nos meios de Hiss e sintético, foi verificado, após 4 dias, comportamento semelhante: lento crescimento, notado pela ligeira turvação, sedimentação mucosa e formação de anel nos tubos contendo maltose e levulose. No meio de Hiss, contendo galactose, notou-se ligeira acidez, pela cor rósea conferida ao líquido. Em nenhum hidrato de carbono houve a produção de gás.

Decorridos 15 dias, o líquido dos tubos, com meio de Hiss, apresentou turvação mais acentuada, anel mais evidente e continuava uma ligeira acidez no tubo contendo galactose. No meio sintético, o resultado foi bastante diferente e é apresentado no quadro nº 2.

QUADRO Nº 2 Reações, formação de anel aderente às paredes do tubo e crescimento de diferentes compostos de carbono em meio inorgânico, após 15 dias de incubação (27°C), da amostra SBV-813.

Carboidratos	Acidez	Formação de anel	Crescimento
Arabinose	+ +	S.A.	R
Galactose	+ +	M.E.	R
Glicerina	-	S.A.	R
Glicose	+	M.E.	O
Lactose	-	S.A.	R
Levulose	-	P.E.	B
Maltose	+ +	E	B
Manita	-	M.E.	R
Rafinose	-	S.A.	F
Sacarose	+ + +	M.E.	O
Salicina	-	P.E.	R
Xilose	-	S.A.	R

Anotação usada:

Cresc. ótimo	O	Acidez forte	+++	Anel muito evidente	M.E.
bom	B	" média	++	" evidente	E.
regular	R	" fraca	+	" pouco eficiente	P.E.
fraco	F	" nula	-	Sem anel	S.A.

Observação: A escala de apreciação foi estabelecida segundo o critério comparativo entre os diferentes compostos de carbono testados.

6.3.2 Leite simples

Evidenciou lenta peptonização após 8 dias mostrando um depósito no fundo do tubo. Esse processo foi iniciado na parte superior do líquido e paulatinamente estendeu-se por todo o meio (25 dias).

6.3.3. Leite tornassolado

A lactoalbumina do meio foi atacada pela bactéria mudando de cor malva para cor azul, decorridos 7 dias da inoculação. Depois desse prazo, iniciou a ação da bactéria sobre o caseinogênio provocando a digestão do meio, que se completou após 20 dias.

6.3.4 Meio de Simmons-citrato

Após 4 dias da incubação à temperatura de 27°C, acusou bom desenvolvimento. Houve total mudança de coloração, passando de verde para azul (basificação do meio com liberação de amônia). Como testemunha foi usada a amostra SBV-613 que tem a capacidade de se desenvolver num meio contendo sal inorgânico de amônia como única fonte de nitrogênio e citrato como única fonte de carbono.

6.3.5 Hidrogênio sulfurado

Nouve fraca pigmentação ao longo da picada. Outro

teste foi realizado, com o papel de acetato de chumbo, preso ao tampão do tubo, com o fim de detectar o desprendimento de gás sulfídrico da cultura, em água de peptona. Houve ligeira mudança de cor do papel; o teste foi considerado positivo.

6.3.6 Sêro de Loeffler

Proliferação moderada, aspecto mucoso e pigmentação amarela, no 5º dia de incubação (27°C), não exibindo alteração com o correr do tempo (20 dias).

6.3.7 Agar amido

Após 5 dias de incubação a 27°C as culturas em placas de Petri, pela adição de algumas gotas de solução de Lugol a 0,2%, foi evidenciada a hidrólise do amido que se manifestou por apresentar uma zona larga e clara, em contraste com a cor azul escura do agar circundante.

6.3.8 Agar sangue

No meio de agar sangue, as colônias apresentaram-se iguais, em todos os aspectos, às aquelas mostradas pelo agar simples. Ausência de hemólise.

6.3.9 Reação de Voges-Proskauer (V.P.)

Após 4 dias da inoculação da SBV-813 em 1 ml do meio

de Clark & Lubs, foi empregado o método de Barritt pelo em prêgo do alfa-naftol. A adição do reativo não conferiu, à solução, a côr rósea, indicando que a reação foi negativa.

6.3.10. Reação de vermelho de metila (V.M.)

Foram usados 5 ml de cultura de 4 dias de incubação (27°C) no meio de Clark & Lubs e adicionado 5 gôtas de uma solução hidroalcoólica de vermelho de metila. Apresentou coloração amarelo, indicando que a reação foi negativa.

6.3.11 Produção de indol

A prova foi realizada depois de 5 dias de incubação da cultura bacteriana em caldo de Hottinger (rico em triptofano). Foi adicionado éter sulfúrico com auxílio de uma pipeta e, entre as superfícies do meio e do éter, foi colocada pequena quantidade do reativo de Ehrlich, até formar uma camada de 2 mm de espessura. O conjunto foi deixado em completo repouso durante 15 minutos e, não tendo sido verificado o aparecimento da côr vermelha na camada intermediária, o teste foi considerado negativo.

6.3.12 Produção de amônia

A técnica usada foi a preconizada por Dowson (1957) que consiste em tomar 4 tubos de ensaio contendo água de peptona, inocular com a cultura SBV-813 e incubar a 27°C.

Após 2 dias de incubação, igual volume de reagente Nessler foi adicionado em 2 tubos, havendo ligeira reação não característica. Os tubos restantes foram testados, após 5 dias, e a reação foi nitidamente positiva, pela formação de um precipitado marron.

6.3.13 Nitratos

Tubos de ensaio, contendo 4 ml de água nitrata, foram inoculados com a cultura SBV-813 e incubados à temperatura de 27°C. Decorridos 5 dias, foram realizados os testes, adicionando, nos tubos, 0,5 ml das soluções A e B, do reativo de Griess-Ilosva, e não surgindo a cor vermelha ou rósea a reação foi considerada negativa, não havendo, portanto, a redução de nitrato a nitrito.

6.3.14 Produção de fluoresceína

O crescimento da bactéria (SBV-813) foi apenas perceptível, conferindo ao meio de Clara ligeira turvação.

A fluorescência foi determinada no papel de Whatman nº 1, e, sob a ação das radiações, do aparelho ultra violeta, de ondas longas, foram observadas, somente no papel aplicado com as amostras SBV-221 (Pseudomonas sp), SBV-793 (Pseudomonas sesami) ATCC-10197 (Pseudomonas aeruginosa) e b-224-D.S.I.R. (Pseudomonas passiflorae), estreita faixa luminescente, o que não ocorreu, com o papel fiscado, em face da cultura bacteriana SBV-813. Portanto,

a bactéria em estudo não produz fluoresceína em meio de Clara.

6.4 Sensibilidade aos antibióticos

Os resultados obtidos pelos ensaios, aplicando o método de discos de papel de filtro, em placas de agar para a determinação qualitativa do poder antibiótico a bactéria SBV-813, acham-se registrados na tabela I.

TABELA I - Determinação qualitativa do poder antibiótico de diversos produtos à bactéria SBV-813, pelo emprego de discos de papel de filtro.

Produtos	Doses	Médias dos halos de inibição (em mm)
Lureomicina	30 microgramas	12,3
Cloromicetina	30 "	10,1
Eritromicina	15 "	5,11
Estreptomicina	10 "	4,2
Kanamicina	30 "	15,1
Novobiocina	30 "	8,5
Penicilina	10 unidades	0,0
Terramicina	30 microgramas	7,9
Tetrim	30 "	12,1

6.5 Liofilização

As ampolas, contendo a cultura SBV-813 liofilizada, apresentavam aspecto normal. Três vidros foram abertos no espaço de 2, 3 e 4 semanas e testados a sua viabilidade e o poder de patogenicidade, pela inoculação em plantas jovens. Em todas os testes, foi comprovada a viabilidade e o alto poder de patogenicidade.

7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

A maioria das bactérias fitopatogênicas estão agrupadas nos gêneros Pseudomonas e Xanthomonas. Na descrição de muitas espécies, encontramos apenas características que as permitem colocar dentro de um desses gêneros, sendo frequentemente impossível a definição de "espécies" dentro dos gêneros das bactérias fitopatogênicas (Burkholder & Starr, 1948), existindo, assim, um grande número de formae speciales se preferir o emprêgo da terminologia micológica.

Na literatura bacteriológica e mesmo em citações em Bergey (1957), a conceituação de espécies parece não obedecer às normas gerais como no caso do Bacillus cereus Frankland and Frankland, 1887, Bacillus anthracis Cohn 1872, emend. Koch, 1876 e Bacillus thuringiensis Berliner, 1915, que poderiam ser consideradas como "cêpas" de uma mesma espécie bacteriana.

A apreciação dos resultados, que daremos a seguir, interessarão à classificação da bactéria SBV-813 e foi baseada segundo o conceito de Dowson (1939, 1957) e Bergey (1957).

Para efeito de contrôlo dos resultados, procuramos apoiar-nos no mais elevado número de testemunhas, mediante o emprêgo de cêpas de bactérias, de características conhecidas, provenientes de coleções estrangeiras e do acervo da Secção de Bacteriologia Vegetal.

7.1 Características Genéricas

Conforme já-foi assinalado por Dowson (1939) e verificado com a cêpa SBV-813, as colonias de bactérias são de crescimento lento com produção de pigmento amarelo nos meios semi-sólidos, podendo ainda ser facilmente reconhecidas pelo seu crescimento abundante e viscoso em meios contendo glicose e outros carboidratos. Dye (1962) faz objeções no sentido de que a produção de um crescimento viscoso e abundante e a habilidade da produção de pigmento amarelo, não difusível nos meios de cultura (insolúvel na água, porém solúvel no álcool etílico), não possuem valor diagnóstico para o gênero Xanthomonas.

Outras características da cêpa SBV-813 e relacionadas ao aspecto citológico estão de acordo com o mesmo Dowson (1939, 1957): aeróbias, forma de pequenos bastonetes, cilíndricas, com extremidades arredondadas e Gram negativas.

7.2 Mobilidade da bactéria

Em virtude da fraca mobilidade da bactéria, foi empregado o tubo de Braun, contendo caldo glicosado, havendo razoável seleção de formas móveis, após a 4a. passagem. Foi encontrada certa dificuldade, ao microscópio eletrônico, de visualizar bactérias isoladas, as quais revelaram possuir um único flagelo polar. Dowson (1957) e Bergey (1957) constataram que, no gênero Xanthomonas, raramente pode ser encontrado mais de um flagelo polar. Dye (1962, 1966), traba

lhando dentro de um grupo numeroso e notavelmente uniforme de Xanthomonas, no qual acreditamos estar incluída a SBV-813, apenas encontrou bactérias móveis e possuidoras de um só flagelo polar.

7.3 Cilindro de batata

Dowson (1957) assinala o crescimento, muito característico, em batata esterilizada, estando mesmo este teste integrado em nossos trabalhos de rotina, nas identificações bacterianas. Os resultados obtidos enquadram-se perfeitamente nos citados pelo mesmo autor: crescimento sob a forma de uma massa abundante, de cor amarelo-canário, viscosa, recobrando a batata, com hidrólise progressiva do amido.

7.4 Compostos de carbono

Em vista de a reação detectora da produção de ácidos com os carboidratos ser influenciada pela formação concomitante de amônia, conduzindo mesmo a um mascaramento, sempre será necessário, preliminarmente, verificar-se uma tal ocorrência. Efetivamente, a literatura contém muitas referências à possibilidade de "produção de amônia", o que já foi relatado por Burkholder (1937), Dowson (1957) e Sabet (1959).

Foi confirmado, em meio contendo peptona, que a bactéria foi capaz de utilizá-la, havendo produção de amônia, facilmente detectada pelo reativo de Nessler.

Essa característica reputamos importante e deverá acompanhar a descrição de uma bactéria, a fim de orientar os Materiais e Métodos, na tipificação da bactéria, o que não é frequentemente feito.

Uma produção de amônia, neutralizando eventual aci-
dês, tornaria inoperante os testes indicativos da utiliza-
ção de hidratos de carbono com o meio básico de Hiss, cita-
do neste trabalho. Portanto, a produção de amônia, da cêpa
SBV-813, aliada à fraca exigência em nutrientes, indicou o
emprego de um meio básico sintético, na verificação da ação
da bactéria sôbre os carboidratos.

Segundo Dye (1962), apenas a glicose pode ser in-
cluída na definição de gênero, sendo seu metabolismo estrit-
amente oxidativo, não sendo possível a diferenciação das
espécies pelos demais carboidratos.

As Xanthomonas parecem ser fracas produtoras de a-
cidês com carboidratos e não produtoras de gás, sendo que
Bergey (1957) assinala com exceção, apenas a Xanthomonas he-
mmiana.

Os testes foram realizados com os carboidratos se-
guintes: arabinose, galactose, glicerina, glicose, lactose,
levulose, maltose, manita, rafinose, sacarose, salicina e
xilose. Os resultados obtidos estão de acôrdo com os cita-
dos por Dye (1962), relativamente à arabinose, galactose,
glicose, lactose, levulose, maltose, manita, rafinose, saca-
rose e salicina, havendo certa discrepância com a xilose e
discordância absoluta com relação à levulose. A salicina
não foi arrolada pelo autor citado.

Comparações feitas com a chave das características bioquímicas citada por Dowson (1957), em que consta apenas os carboidratos (glicose, manose, sacarose, lactose e maltose), houve concordância com a glicose, sacarose, lactose e maltose.

7.5 Produção de acetoina

A cultura SBV-813 não mostrou produção de acetil-metil-carbinol, o que foi sugerido por Dye (1962), para de finição do gênero Xanthomonas.

7.6 Viabilidade

A cultura SBV-813 permaneceu viável em agar-batata glicose, até o limite de nossas observações, que foram de 8 meses, mostrando sempre uma alta infectividade, em condições praticamente ambientais e em qualquer das modalidades já referidas de inoculação coincidindo com Burkholder & Starr (1948), na caracterização do gênero Xanthomonas.

7.7 Produção de hidrógeno sulfurado

Alguns autores não estabelecem qualquer distinção sobre os compostos de enxofre, dos quais derivariam o H_2S . Dowson (1957) cita, como fonte, a peptona, tendo Dye (1962) verificado que as 52 espécies padrão por ele examinadas foram positivas na produção de H_2S , aparecendo, apenas a Xan-

thomonas punicae como exceção.

Nos testes por nós realizados em agar chumbo, o enxofre, que se encontrava sob a forma de compostos orgânico (cistina) e inorgânico (tiosulfato de sódio), permitiu suficiente produção de H_2S , que foi considerado como subsídio para a definição de gênero.

7.8 Utilização da asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio

A exigência do germe em relação a nutrientes foi relativamente simples, crescendo a bactéria em meio sintético de Simmons-citrato. Em meio sintético-asparagina, foi incapaz de usar a asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio. Starr & Weiss (1943) e Burkholder & Starr (1948) assinalaram que essa característica é comum à maioria das Xanthomonas.

Os testes efetuados vieram confirmar os resultados esperados, mostrando crescimento, após a 6a. passagem, os seguintes microrganismos: Pseudomonas sp. SBV-221, Pseudomonas sesami SBV-793, Agrobacterium tumefaciens ATCC-4720, Pseudomonas lacrymans ATCC-7386. Não cresceram: a cultura SBV-813, Xanthomonas manihotis SBV-825, Xanthomonas manihotis SBV-613, Xanthomonas malvacearum ATCC-9924, Corynebacterium michiganense SBV-622 e b-224-D.S.I.R.

As Xanthomonas mostraram, após 24 horas da primeira transferência em meio sintético-asparagina, uma fraca, porém distinta, turvação, assemelhando aos isolados de Pseu-

domonas. Este crescimento provavelmente ocorreu as expensas dos nutrientes carregados com o inóculo que são comumente viscosos neste grupo.

A amostra b-224-D.S.I.R. não mostrou crescimento, por tratar-se de uma Pseudomonas exigente em relação à certos nutrientes, não contidos no meio sintético-asparagina.

7.9 Liquefação da Gelatina

Segundo Burkholder & Starr (1948), as Xanthomonas são proteolíticas, liquefazendo a gelatina e peptonizando o leite, o que foi confirmado nos testes realizados. Não houve, para o leite, produção de reação ácida, característica que pode ser, possivelmente, usada na definição do gênero (Dye, 1962). Segundo o mesmo autor, a liquefação da gelatina é imprópria às espécies, ao passo que, segundo a chave de Burkholder, citado em Bergey (1957) e seguida neste trabalho, a liquefação da gelatina é fundamental.

7.10 Antibióticos

O interesse do ensaio da sensibilidade dos antibióticos, à amostra SBV-813, convergiu principalmente na ação da estreptomicina que, de acordo com Ark (1949), é bastante eficaz contra várias espécies de bactérias fitopatogênicas pertencentes ao gênero Xanthomonas, Pseudomonas, Erwinia, Corynebacterium e Agrobacterium. Pelos resultados obtidos em nossos ensaios (tabela 1), foi verificado que a estrepto-

micina não reagiu como era esperado, apresentando em relação aos outros antibióticos, menores médias de halos de inibição.

7.11 Hospedeiros

Conforme foi verificado experimentalmente por Dye (1962, 1966), muitas Xanthomonas formam um grupo homogêneo, não permitindo diferenciação pelos recursos de laboratório. Neste grupo acreditamos poder incluir a cultura SBV-813, sugerindo que muitas espécies de Xanthomonas possam ser encaradas como "formae speciales" de uma espécie adaptada a diferentes hospedeiros.

Igualmente Burkholder & Starr (1948), consideram ser impossível uma identificação inequívoca de todas as Xanthomonas pelos procedimentos laboratoriais. No entanto, nas inoculações experimentais, podemos encontrar um ótimo recurso de diagnose, levando mesmo Wernham (1948) a estabelecer, em vista da notável especificidade das reações em plantas hospedeiras, a impossibilidade de "erro diagnóstico", empregando-se hospedeiro como determinantes de "espécies".

Efetivamente, a cultura SBV-813, inoculada em fumo, pimenta do reino, mamona, violeta, begônia e mamoeiro, que poderiam ser encarados como hospedeiros prováveis, demonstrou ser apenas patogênica ao maracujá. Realmente, de acordo com Dowson (1957), todas as espécies de Xanthomonas são patogênicas, atacando, a maioria delas, apenas um gênero de planta, como foi constatado em nossos ensaios.

Foi verificado mediante testes sumários de identificação que a cêpa SBV-813 por nós isolada em 1967, possuía características bastante distintas da Pseudomonas passiflorae (Reid), Burkholder (1948) conforme descrição em Bergey (1957), razão pela qual sentimo-nos autorizados a ~~considerar~~ ^{classificar} espécies distintas. Foi solicitada uma amostra da cultura original liofilizada da P. passiflora (b-224-D.S.I.R.), cuja autenticidade se verificou, através de teste de determinação bacteriológica, conforme as características de identificação baseadas em Bergey (1957), Baigent (1963) e Elliot (1951), não obstante a bactéria não se mostrasse patogênica em inoculações experimentais em folha de Passiflora edulis. A perda da patogenicidade, já fora anteriormente verificada por Baigent (1963), que a atribuiu à manutenção da bactéria por muitos anos, em meio de cultura, antes da liofilização. Não foi completado, portanto, o postulado de Koch.

Entre outras características, a amostra da cêpa b-224-D.S.I.R. desenvolveu boa produção de um pigmento verde fluorescente (fluoresceína), típico das Pseudomonas, solúvel em água e que se difundiu no meio de cultura. Quatro flagelos polares foram observados no microscópio eletrônico. Não foi notado crescimento em meios de cultura (agar simples, caldo simples, caldo Hottinger, água peptonada) nos quais a cêpa SBV-813 mostrou bom desenvolvimento. A individualização das colônias da cêpa b-224-D.S.I.R. foi conseguida com o meio YDC e o meio B de King. Este último, ofereceu melhores condições de identificação, apesar do cresci

mento das colônias mostrar-se menos luxuriante.

Examinando a chave para identificação de bactérias do gênero Xanthomonas, proposta por Burkholder e citada por Bergey (1957), verificamos que a cêpa SBV-813, pelas suas características bioquímicas, poderia ocupar na referida chave, a posição seguinte:

Key to the species of genus Xanthomonas

- I. Colonies Yellow; pigment non-water-soluble
 - A. Gelatin liquefied.
 1. Starch hydrolysis feeble.
 - a. Nitrites not produced from nitrates.
 1. Xanthomonas hyacinthi.
 2. Xanthomonas pruni.
 3. Xanthomonas vitians.
 - aa. Nitrites produced from nitrates.
 4. Xanthomonas beticola.
 5. Xanthomonas rubrilineans.
 2. Starch hydrolysis strong.
 - a. Nitrites not produced from nitrates.
 - b. No brown pigment in beef-extract agar.
 6. Xanthomonas barbareae.
 7. Xanthomonas begoniae.
 -
 -
 -
37. Xanthomonas vignicola.

"Cêpa SBV-813"

As normas de classificação seguidas no presente trabalho obedeceram aos critérios de uso corrente na Secção de Bacteriologia Vegetal. Entretanto, poderão sofrer futuramente modificações ou reformulações em razão de certas evidências ligadas ao patógeno.

A Bacteriologia Vegetal primeiramente era orientada no sentido da sintomatologia, do ciclo infeccioso, da dispersão do patógeno e do contrôle da doença. Após oito décadas de pesquisas, tornaram-se necessários maiores conhecimentos relativos ao patógeno, em vista de certos conhecimentos básicos, a êle ligados, constituírem requisitos essenciais na solução de problemas práticos associados às doenças. Por outro lado, o acúmulo de certas evidências sobre a natureza dos patógenos e suas relações tornaram necessária uma extensa revidão taxonomica, surgindo novas conceituações. Stolp et al (1965) consideram que as Xanthomonas e Pseudomonas fitopagotênicas representam três principais agrupamentos de bactérias com grandes e mútuas semelhanças: as Pseudomonas fluorescentes, a Pseudomonas solanacearum e as Xanthomonas, que constituem três toxospecies (grupos fenotípicos). A relação entre as bactérias e plantas hospedeiras é elemento, presentemente, de diferenciação entre as "espécies" nas pseudomonadas fluorescentes e xanthomonadas e os "patotipos" na P. solanacearum. Por analogia com o que sucede com o P. solanacearum e mantendo o mesmo esquema de classificação, considerar-se-iam, também, as diferentes xanthomonadas e pseudomonadas fluorescentes como espécies-grupo. Haveria portanto, uma drástica redução de "espécies" onde as

"espécies", nada mais seriam que adaptações a um particular hospedeiro e que constituiriam formae speciales de espécies simples, sendo que melhor seria empregarmos o termo patotipo em lugar de formae speciales, já referido neste mesmo trabalho.

Considerando que um patotipo particular pode ser patogênico a uma ou mais plantas e que diferentes patotipos podem ser isolados de uma mesma planta hospedeira, conclui-se que não será simples e não haverá correlação direta entre os patotipos e as espécies hospedeiras de uma mesma planta. A individualização das bactérias fitopatogênicas em patotipos, envolverá uma soma de conhecimentos mais completos ligados ao comportamento patogênico, à natureza dos patotipos e aos fatores relacionados com a especificidade dos hospedeiros.

Pelo emprêgo do método de hibridização, pelo DNA (ácido desoxiribonucleico), De Ley & Friedman (1965) e De Ley et al (1966) verificaram o alto grau de hibridização entre grupos de membros dos gêneros Xanthomonas e Pseudomonas e também entre o DNA de Pseudomonas fluorescens e "espécies" de Xanthomonas, sugerindo a existência de uma só espécie dentro do gênero Xanthomonas, incluída entre as Pseudomonas.

Lelliott (1967) considera a patogenicidade e as escalas de hospedeiros apenas uma faceta da atividade bacteriana, insuficiente por si só para a delimitação de espécies e que parecem existir presentemente evidências para considerar-se as Xanthomonas como uma única espécie, Efeti-

vamente, um elevado número de bactérias do gênero Xanthomonas apresenta notáveis analogias, tornando lícito sua admissão dentro de uma única espécie-grupo.

Dye (1958, 1962 e 1966) verificou em estudos comparativos, não ser possível a distinção em "espécies" entre um numeroso grupo de Xanthomonas, notavelmente uniforme, ao qual acreditamos pertencer a cultura SBV-813. Não apenas as características de interesse taxonômico como também provavelmente uma escala de hospedeiros definiram determinada "espécie".

Entretanto, enquanto não houver uma opinião generalizada dos estudiosos, no que concerne aos problemas de taxonomia bacteriana, a cepa SBV-813 pode ser enquadrada pelas suas características morfológicas, bioquímicas e culturais como representante típica do gênero Xanthomonas, sendo proposta a essa bactéria a designação de Xanthomonas passiflorae n.sp.

8. RESUMO E CONCLUSÕES

O objetivo d'êste trabalho visou a identificação e o estudo do agente causal da mancha oleosa da fôlha de maracujá (Passiflora edulis), de material provenientes da zona Araraquarense, São Paulo. É uma doença de origem bacteriana que vem causando prejuizos substanciais aos produtores de frutos do maracujá. É a primeira vez que a mancha oleosa da fôlha do maracujá é assinalada no Brasil e no continente americano.

Para identificação da bactéria foram realizados testes morfológicos, culturais, bioquímicos e de patogenidade. Dos resultados obtidos, podem ser tiradas as seguintes conclusões:

8.1 Morfologia:- Bactérias em forma de pequenos bastonetes, medindo, em média, 0,50 X 1,5 micra, com extremidades arredondadas, isoladas e aos pares, raramente em cadeias, fracamente móveis, possuindo um flagelo polar, Gram negativas, não há formação de esporos, possuem cápsulas e são aeróbias estritas.

8.2 Características culturais:- Caldo simples: love turvação após 24 horas. Lenta sedimentação mucosa no fundo do tubo. Caldo glicosado: turvação e sedimentação mais acentuada de que as verificadas no caldo simples,

Após 7 dias, formação de anel, aderente às paredes do tubo. Meio sintético com asparagina: não houve crescimento após a 2a. passagem. Placas de agar simples: crescimento muito lento. Boa individualização após 5 dias. As colônias apresentaram as seguintes características: aspecto mucoso, circulares, convexas, salientes, elevadas, translúcidas, brilhantes, amarelo-cêra, bordos regulares, viscosas e capacidade de se unirem com facilidade. Cilindros de batata: crescimento abundante após 8 dias de inoculação. Côr amarelo-canário, úmido, brilhante, altamente viscoso e digestão progressiva.

8.3 Características bioquímicas: Carboidratos: bom crescimento em meio básico sintético. Acidificação, porém sem produção de gás em arabinose, galactose, glicose, maltose e sacarose. Leite simples: lenta peptonização após 8 dias. Hidrato sulfurado: fraca produção de H_2S , após 4 dias de incubação. Agar amido: forte hidrólise. Amônia: positiva. Reações de V.P., V.M., Nitratos e Indol: negativas. Gelatina: completa liquefação, após 8 dias. Fluoresceína: não houve produção nos meios de Clara. Temperatura: crescimento ótimo, 27°C: mortal, após 5 minutos de exposição.

8.4 Patogenicidade: Os diversos reisolamentos e inoculações experimentais revelaram, sempre, alto e constante poder de patogenicidade para o maracujá.

8.5 Sensibilidade aos antibióticos: Foram verificados "in vitro" os maiores halos de inibição com a Kanamicina, aureomicina, tetrin, cloromicetina, novobiocina, terramicina, eritromicina e estreptomina.

8.6 As características morfológicas, culturais, bioquímicas e de patogenicidade encontradas são comuns às citadas na chave para a identificação do gênero Xanthomonas publicada na 7a. edição do "Bergey Manual of Determinative Bacteriology". Considerando tratar-se de uma nova espécie bacteriana, diferindo do patógeno identificado por Reid - Pseudomonas passiflorae (Reid, 1939), Burkholder, 1948, é proposta a denominação de Xanthomonas passiflorae n.sp. para o agente causador da mancha oleosa da fôlha de maracujá (Passiflora edulis Sims).

9. SUMMARY

The object of the work was to realize the identification and the study of the causal agent responsible for the grease-spot disease of the passion-fruit (Passiflora edulis Sims), of material from regions of Araraquara, São Paulo. This bacterial disease caused considerable loss in commercial groves during 1967. It is the first time, that the grease spot disease has been noted in Brazil and on the American continent.

For the identification of the organism, morphological, cultural, biochemical and pathogenetical tests were made with the following results:

- 9.1 Morphological: The ~~micro~~organism appears as a short rod, averaging 0.5 X 1.5 micra, with rounded ends, singly or in pairs, not actively mobile and has one polar flagella. Gram negative. It does not have spore. Capsules are present and are strict aerobics.
- 9.2 Cultural: Beef broth, weak turbidity after 24 hrs. Slow sedimentation. Glucose broth, turbidity and sedimentation more accentuated. After 7th day a ring was formed. Synthetic asparagine medium, no growth. Nutrient agar, growth very slow. Good individualization after 5th day. Colonies mucous aspect, circular, convex, salient,

Elevated, translucent, shining, wax yellow, margins entire, viscid and capacity of the connection very easy. Potato cylinders, growth bright yellow, after 8th day. The surface of the cylinder becomes entirely covered with a thick, yellow, glistening, viscid mass and digestion is progressive.

9.3 Biochemical: good growth in synthetic basic medium. Acid but no gas from arabinose, galactose, glucose, maltose and sucrose. Milk, slow peptonization, after 8th day. Hydrogen sulfide, production slight after 4th day. Starch agar, hydrolysis strong. Ammonia, positive. Indole, nitrates, V.M., V.P., negative. Gelatin, liquefied after 8th day. Fluorescein, not produced in Clara medium. Temperature, optimum, 27°C; death-point, 52°C.

9.4 Pathogenetical: different isolates, reinoculated experimentally, a high and constant ability of the pathogenicity always appearing.

9.5 Bacterial Sensitivity to Antibiotics: "in vitro" experiments for inhibition of growth of the bacteria showed as the most effective antibiotics: kanamycin, aureomycin and streptomycin.

9.6 Morphological, cultural, biochemical and pathogenetical characters found, are common with those named in the

key of the Xanthomonas genera given in Bergey's Manual (1957). Considering that this is a new bacterial species, different from the pathogen identified by Reid-Pseudomonas passiflorae (Reid, 1939) Burkholder, 1948, the organism was classified as a species of Xanthomonas and the name Xanthomonas passiflorae n.sp. is proposed by the author as the causal agent of the bacterial grease spot disease of the passion fruit (Passiflora edulis Sims).

10. AGRADECIMENTOS

Expressamos os nossos sinceros agradecimentos:

Ao Professor Dr. Ferdinando Galli, pela orientação e revisão dos originais desta tese.

Ao Eng^o Agr^o Júlio Franco do Amaral pela revisão e sugestões apresentadas.

Ao Eng^o Agr^o Armando Guidetti Zagatto pela colaboração nos trabalhos laboratoriais.

Ao Professor Paulo de Campos Torres de Carvalho, pelas oportunas sugestões apresentadas.

À Secção de Microscopia Eletrônica, do Instituto Adolfo Lutz, na pessoa do Dr. Dalton Ramalho Veigl pela execução das fotomicrografias.

Ao Químico Brasília Serafim de Oliveira Júnior, pela ajuda na preparação dos meios.

Ao Dr. Sylvio Pereira, pela revisão ortográfica.

Ao Sr. Vicente de Paula Forster pelas excelentes fotografias conseguidas.

À Sra. Lygia Padilha Leitão, pela dedicação no trabalho de datilografia.

Los Professores Eric Balmer, Hasimo Tokeshi e João Lúcio de Azevedo, pelas críticas em alto nível, que fizeram à nossa primeira defesa de tese (Magister Scientiae) nos estimulou à realização do presente trabalho.

11. BIBLIOGRAFIA CITADA

- AMARAL, J. Franco = O isolamento dos germes anaeróbios. Biológico, São Paulo, 21: 169-170, 1955.
- AMARAL, J. Franco - "Câmara super-úmida" e seu emprêgo na identificação da murcha bacteriana causada por Pseudomonas solanacearum (Smith). Biológico, São Paulo, 28 (5): 141-142, 1962.
- AMERICAN PHARMACEUTICAL ASSOCIATION - The national formulary. Washington, DC. Publ. Am. Pharm. Ass. 9th ed. p. 768, 1950.
- ARK, P.A. - Use of streptomycin in agriculture. In - "Streptomycin" Baltimore, William and Wilkins. 607-612, 1949.
- BALGENT, K.L. & Starr, M.P. - Bacterial grease spot disease of Passion fruit. New Z. J. Agric. Res., 6, 12, 24-38, 1963.
- BARRITT, M. M. - The intensification of the Voges-Proskauer reaction by the addition of alfa naphthol. J. Path. Bact., 42: 441-454, 1936.

- BIER, O. - Bacteriologia e Imunologia, 10a. edição, São Paulo, Edições Melhoramentos. 971 pp., 1963.
- BOHN, G. W. & Malott, J. G. - The effects of carborundum in the inoculating bean plants with bactéria. *Phytopatology*, 37: 195-198, 1945.
- BONGERT, J. Bakteriologische diagnostik der tiersenchen. 7th ed., Berlin, pg. 41-43, 1927.
- BRAUN, W. & Howell, V. - A simple method for the automatic separation of smooth bacterial types from mixed populations. *J. Bact.*, 60: 366-367, 1950.
- BREED, R.S., Murray, G.D. & Smith, W.R. - Bargey's manual of determinative bacteriology, 7th ed., Baltimore, USA. The Williams & Wilkins Co., 1957.
- BRYAN, A. H. & Bryan, C.G. - Bacteriology principles and practice. N. York, Barnes & Noble, Inc. pg. 40, 1959.
- BURKHOLDER, W.H. - A bacterial leaf spot of geranium. *Phytopathology*, 27: 554-560, 1937.
- BURKHOLDER, W.H. & Starr, M.P. - The generic and specific characters of phytopathogenic species of Pseudomonas and Xanthomonas. *Phytopathology*, 38: 494-502, 1948.

- CLARA, F. M. - A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens. N.Y. Cornell Agr. Exp. Stat. Ithaca. p. 8, 1934.
- CLARK, W. M. & Lubs, H. A. - The differentiation of bacteria of the colon aerogenes family by use of indicators J. infect. Dis., 17: 160, 1915.
- COSTA, A. Americano - Meios de cultura em microbiologia. Ser. Inform. Agrícola M. Agricult. (14) p.99, 1954.
- DIFCO LABORITÓRIOS - Difco Manual of dehydrated culture. Media and reagent. Detroit 1. Michigan. 350 p., 1958.
- DOWSON, W. J. - Plant diseases due to bacteria. 2th ed., Cambridge University Press, 1957.
- DE LEY, J. & Friedman, G. - Similarity of Xanthomonas & Pseudomonas deoxyribonucleic acid. J. Bact., 89: 1306-1309, 1965.
- DE LEY, J., Park, I.W., Tistgat, R. & Ermegen, J.V. - DNA homology and taxonomy of the genera Pseudomonas and Xanthomonas. J. gen. Microbiol., 42-43, 1966.
- DYE, D.W. - Host specificity in Xanthomonas. Nature. 182: 1813-1814, 1958.

- DYE, D. W. - The inadequacy of the usual determinative test for the identification of Xanthomonas spp. New Z.J. Sci., 5 (4): 392-416, 1962.
- DYE, D. W. - Comparative study of the biochemical reactions of additional Xanthomonas spp. New Z.J. Sci., 6: 483-486, 1963.
- DYE, D. W. - Cultural and biochemical reactions of additional Xanthomonas spp. New Z.J. Sci., 9: 913-919, 1966.
- ELLIOTT, C. - Manual of bacterial plant pathogens. 2th ed., Mass., USA., Waltham, p. 186, 1951.
- HISS, P.H. - On fermentative and agglutinative characters of bacilli of the "dysentery group". J. Med. Res., 13: 1-15, 1904-1905.
- HOCHNE, J. C. - Plantas e substâncias vegetais tóxicas e medicinais. Coletânea de 11/4 aulas. Dep. Bot. do Estado de São Paulo. 199-201, 1939
- HODGMAN, C. D. - Handbook of chemistry and physics. 30th ed., Cleveland, Ohio. Chemical Rubber Publishing Co., p. 1345, 1947.
- HUCKER, G. J. - A new modification and application of the Gram stain. J. Bact., 6: 395, 1921.

- HILLIP, E. P. - The american species of Passifloraceae. Field. Museum of Natural History, 19 (1): 393-396, 1938.
- KING, E. O., Ward, M. K. & Raney, D. E. - Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescin. J. Lab. Clin. Med. 44: 301-397, 1957.
- LELLIOTT, R. A. - Taxonomy and determination of phytopathogenic Pseudomonadales. Plant Pathology Laboratory, Ingham, Hatchin Green, Harpenden, Herts, Impress, 1967.
- LEVINE, M. - An introduction to laboratory technique in bacteriology. 3th ed., N.Y. The Macmillan Company, 413 pp., 1954.
- OGINSKY, E. L. & Umbreit, W.W. - The character of virulence. In:- An introduction to bacterial physiology. USA. W.H. Freeman and Company, 380-382, 1954.
- PELTIER, L.P., Georgi, C.E. & Lindgree, L.F. - Laboratory manual for general bacteriology. N.Y. London, Sydney, John Wiley & Sons, Inc., 159-160, 1959.
- PEREIRA, A. LIMA., & Zagatto, A. G. - Estudos comparativos entre um germe isolado da lagarta do curuquerê (Alaboma argillacea) e Pseudomonas aeruginosa (Shroeter) Migula. Arq. Inst. biol. São Paulo, 30: 77-81, 1963.

- PEREIRA, A. LIMA G. - Estudo do organismo Pseudomonas sesami causador da bacteriose do gergelim. Arq. Inst. biol. São Paulo, 34 (3): 113-125, 1966.
- PEREIRA, A. LIMA G. & Zagatto, A. G. -. Isolamento de Agrabacterium rhizogenes em associação com Agrobacterium tumefaciens em solos, mediante emprêgo de fragmentos de cenoura, nabo ou beterraba. Trabalho não publicado, 1967.
- RAMMURTHI, C.S. - Comparative studies on some Gram positive phytopathogenic bacteria and their relationship to the Corynebacteria. Mem, Cornell Univ. Agric. Exp. Stn., Ithaca, N.Y. 366: 15-16, 1959.
- REID, W. D. - Grease spot of Passion fruit. New Z. J. Sci. Tech., A XX 4, 260, 265, 1938.
- REID, W. D. & Brien. R. M. - Control of grease spot of Passion fruit. New Z. J. Sci. Tech., A XXVIII 1, 1-3, 1945.
- REID, W. D. & Brien, R. B. - A further report on control of grease spot of Passion-vine. New Z. J. Sci. Tech., A. 29, 306-308, 1948.
- ROBBS, F. C. - Bacterioses fitopatogênicas no Brasil. Inst. Econ. Rural, da Universidade Rural, Rio de Janeiro, Série Divulgação de Pesquisas, 2: 16-20, 1959.

- SABET, K. A. - Studies in the bacterial diseases of Sudan crops. III. On the occurrence, host range and taxonomy of the bacteria causing leaf blight diseases of certain leguminous plants.. Ann. appl. Biol., 47 (2): 318, 331, 1959.
- SABET, K. A. - Studies in the bacterial diseases of Sudan crops. IV Bacterial leaf spot and canker disease of Mahogany (Khaya senegalensis (Desr.) A. Juss and K. grandifoliola CDC). Ann. appl. Biol., 47 (4): 658-665, 1959.
- SALLE, A. J. - Fundamental principles of bacteriology. 7th ed., Mac Brax Hill Book Company 636 p., 1939.
- SCHLUB, J. G. & Foley, M. K. - Diagnostic bacteriology, 4th ed., St. Louis, The C.V. Mosby Company, p.333, 1952.
- SHERWOOD, M.B., Falco, E.A. & Beer, E.J. - A rapid quantitative method for the determination of penicillin. Science, 99: 247-248, 1944.
- SIMMONS, J.S. - A culture medium for differentiating organism of typhoid colon aerogenes and for isolation of certain fungi. J. infect. Dis., 39: 209-214, 1926.
- SOCIETY of American Bacteriologists - Manual of microbiological methods. N.Y. Mc Graw Hill Book Co. 315 pp., 1957.

- STARR, M.P. & Weiss, J.E. - Growth of phytopathogenic bacteria in synthetic asparagin medium. *Phytopathology*, 33: 314-318, 1943.
- STARR, M.P. - The nutritive of phytopathogenic bacteria. I Minimal nutritive requeriments of the genus Xantho-
J. Bact., 51: 131-143, 1946
- STOLP, H., Starr, M.P. & Baigent, M.L. - Problems in speciation of phytopathogenic Pseudomonads and Xanthom-
nads. *Phytopathology*, 3: 231-264, 1965.
- SUASSUNA, J. & Tabst, P.A. - Novo método para demonstração da cápsula bacteriana. *Ciênc. Cult. São Paulo*, 18 (2): 221, 1966.
- VERGILANI, C.C. - The species value of pathogenicity in the genus Xanthomonas. *Phytopathology*, 38: 283-291, 1948.
- ZIGANTTO, A.G. & Pereira, A. Lima G. - Estudo do organismo causador da "murcha bacteriana" da araruta (Maranta arundinacea L.). *Arq. Inst. biol. São Paulo*, 30: 33-36, 1963.