

ANTONIO LIMA GONÇALVES PEREIRA

ENGENHEIRO AGRÔNOMO

Chefe-substituto da Secção de Bacteriologia Vegetal

Instituto Biológico

São Paulo

**ESTUDO DO ORGANISMO** *Pseudomonas sesami* **MALKOFF**  
**CAUSADOR DO CRESCIMENTO BACTERIANO DO**  
**GERGELIM** (*Sesamum orientale* L.)

Tese para obtenção do título de Magister Scientiae (M. S.) apresentada à Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz", da Universidade de São Paulo.

PIRACICABA

1966

À memória de meu pai

Dr. Horácio Gonçalves Pereira

Homenagem

À minha mãe, esposa e filhos

Dedico

# I N D I C E

	<u>Páginas</u>
1. Introdução .....	1
2. Revisão Bibliográfica .....	2
3. Distribuição Geográfica .....	5
4. Sintomatologia .....	6
5. Material e Método .....	7
5.1 Material .....	7
5.1.1 Isolamento de <u>Pseudomonas sesami</u> .....	7
5.1.2 Meios de cultura .....	7
5.1.2.1 Meios líquidos .....	7
5.1.2.2 Meios semi-sólidos .....	10
5.1.3 Reativos .....	14
5.1.4 Corantes .....	15
5.1.5 Indicadores .....	18
5.1.6 Antibióticos .....	19
5.2 Métodos .....	21
5.2.1 Isolamento da bactéria .....	21
5.2.2 Inoculação .....	22
5.2.3 Reisolamento .....	23
5.2.4 Anaerobiose .....	23
5.2.5 Temperatura .....	24
5.2.6 Produção de fluoresceína .....	25
5.2.7 Mobilidade da bactéria .....	25
5.2.8 Coloração de Gram .....	26
5.2.9 Coloração de esporos .....	27

	<u>Páginas</u>
5.2.10	Coloração de flagelos ..... 28
5.2.11	Método de liofilização ..... 30
6.	Resultados ..... 33
7.	Discussão dos resultados ..... 45
8.	Resumo e conclusões ..... 50
9.	Summary ..... 52
10.	Agradecimentos ..... 54
11.	Bibliografia ..... 55

## 1. INTRODUÇÃO

O gergelim (*Sesamum orientale* L.) é uma planta herbácea, anual, de cujas sementes se obtém óleo utilizado na alimentação humana, na indústria de sabões e cosméticos e como veículo de substâncias lipossolúveis, na indústria farmacêutica. Segundo Mazzani (1962), o óleo de gergelim tem papel importante na agricultura, devido a sua atividade sinérgica com substâncias inseticidas, como por exemplo, o piretro, cujos efeitos tóxicos são aumentados quando é adicionado à formulação óleo de gergelim.

A ampliação do cultivo dessa planta no nosso País, devido às exigências do mercado, começa a preocupar os agricultores com o aparecimento de doenças nessa cultura.

A primeira referência sobre bactérias que atacam gergelim no Brasil, está nas informações prestadas por Franco do Amaral (1942), que, pelos sintomas encontrados no vegetal, supunha tratar-se de *Pseudomonas sesami*.

O principal objetivo deste trabalho foi realizar a identificação e o estudo do agente causal responsável pelo crestamento bacteriano do gergelim, em material enviado pela Secretaria da Agricultura de Goiás, do município de Itumbiara.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

O primeiro relato do cretamento bacteriano da fôlha de gergelim foi feito na Estação Experimental de Sadova, Bulgaria, em 1903, em comunicação prévia, por Malkoff (1904) que estudou e descreveu o seu agente causal- Pseudomonas sesami. Três anos mais tarde, o mesmo Malkoff (1906) pesquisando a doença bacteriana em Sesamum orientale, verificou a presença de duas linhagens, de características bioquímicas ligeiramente diferentes, cujas colônias apresentavam coloração amarela ou cinza. A primeira, êle denominou de Bacillus sesami e a segunda de Pseudomonas sesami.

Kovacevski (1930), estudando a doença bacteriana causada por P. sesami, fez comparações de seus caracteres morfológicos e culturais com os de P. solanacearum e inoculações da primeira, em plantas de fumo e batata, nas quais obteve resultados negativos, levaram o autor a considerar os dois organismos como bem distintos.

Franco do Amaral (1942) assinalou a doença bacteriana em material de gergelim originário de Campinas.

Dunlap (1943), no "Texas Agricultural Experiment Station", verificou que no estado de "seedling", de Sesamum orientale, aparecia uma doença que era aparentemente idêntica à causada por Bacterium sesamicola, descrita por Takimoto.

Bremer & Ismen e outros (1947) acreditaram que a bacteriose que atacava a cultura de gergelim na Turquia, tinha como agente causal, Pseudomonas sesami, descrito por Malkoff. Diziam os autores que a doença podia assumir considerável importância econômica na região de Anatolian, onde o fator ambiente favorecia seu desenvolvimento.

Hildebrand (1949) na Fundação de Pesquisas, em Renner, Texas, verificou, em plantação experimental de gergelim, o aparecimento de manchas em fôlhas que se encontravam cêrca de 4 polegadas de altura do solo. Isolou das manchas o agente causal que identificou como sendo Pseudomonas sesami, que já havia sido descrita anteriormente por Dunlop.

Tarr(1954) observou em cultura de gergelim, no Sudão, os sintomas produzidos por bactéria que deveria ser o mesmo patógeno relatado na India como sendo Pseudomonas sesami.

Poole (1957) conseguiu isolar duas linhagens diferentes de Pseudomonas sesami e verificou que uma linhagem virulenta, quando associada a Xanthomonas spp, resultava na produção de lesões em uma variedade de gergelim comprovadamente resistente.

Thomas (1959), tratando sementes de gergelim com streptomocina na proporção de 250 - 1.000 p.p.m., conseguiu reduzir de modo significativo a incidência da mancha bacteriana nos campos experimentais de Beltsville.

Zachos & Panagopoulos(1960) descreveram, pela 1ª vez, manchas nas fôlhas de gergelim provocadas por bactérias, no verão de 1959, em vários distritos da Grécia.

Sabet & Dowson (1960) estabeleceram a etiologia bacteriana em manchas das folhas de gergelim, que atribuíram ao Xanthomonas sesami, realizando estudos comparativos com Xanthomonas phaseoli e Xanthomonas malvacearum.

Thomas et al (1962), estudando a perda de resistência das variedades de gergelim Margo e Dulce, verificaram a existência de uma nova raça de Pseudomonas sesami, de poder altamente patogênica.

Eulp (1964) observou que a raça "2" de Pseudomonas sesami, descrita por Thomas e outros (1962), era a mesma assinalada no Mississippi em 1963. A introdução da bactéria naquele Estado, deveria ter sido por sementes originárias do Texas.



### 3. DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

O gergelim é originário das Ilhas de Sonda (Pacífico), segundo os trabalhos de De Candolle (1912). Entretanto, não se tem relato do aparecimento da doença bacteriana no país de origem. Consultando a literatura foi verificado que a mancha bacteriana das folhas de gergelim apareceu na Bulgária, Grécia, Turquia, Índia, Japão, U.S.A. (Mississippi, Texas) e Norte da África (Somalia Italiana). No Brasil, a Pseudomonas sesami foi assinalada pela primeira vez por Franco do Amaral (1942), de material recebido do Instituto Agronômico de Campinas.

#### 4. SINTOMATOLOGIA

Não obstante a doença ocorre inicialmente em sementeiras, o sintoma mais conspícuo da doença localiza-se nas fôlhas, sob a forma de pequenas manchas, aquosas, de contôrno angular condicionado pelas nervuras, com exudação na face inferior. Mais tarde, passam à côr pardacenta e progressivamente, adquirem no centro uma côr escura e nos bordos, côr castanho claro. O peciolo e a haste afetados, vistos por transparência, adquirem tonalidade mais escura. Em secção transversal, e exercendo-se ligeira pressão com os dedos, observa-se, à binocular, a emissão de uma goma bacteriana de aspecto mucoso; nos pecíolos sadios, a exudação é de natureza aquosa. Com o desenvolvimento da doença, segue-se um secamento progressivo e total da planta.

O não conhecimento da doença pode ser atribuído a sua escassa divulgação e possível confusão com os sintomas da cercosporiose (Cercospora sesami Zim) muitas vêzes associada ao crestamento das fôlhas de gergelim, cujo agente causal é uma bactéria.

## 5. MATERIAL E MÉTODO

### 5.1. Material

#### 5.1.1. Isolamento de Pseudomonas sesami

Para os isolamentos foram coletadas fôlhas e hastes de Sesamum orientale L., aparentemente com sintomas da doença bacteriana. O primeiro isolamento da bactéria da planta original (variedade Morada) recebida de Goiás, foi realizado em 18/3/66, e catalogado como (SBV-793). Partindo dessa cultura, foram efetuadas inoculações e reisolamentos em plantas jovens em: 6/5/66 (SBV-794), 11/5/66 (SBV-795), 12/5/66 (SBV-796), 31/5/66 (SBV-797), 17/6/66 (SBV-798), 23/6/66 (SBV-799), 7/7/66 (SBV-800), 11/7/66 (SBV-801) e 20/7/66 (SBV-802) em casa de vegetação do Instituto Biológico.

#### 5.1.2. Meios de cultura

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

##### 5.1.2.1 Meios líquidos

5.1.2.1.1 Caldo simples (caldo de extrato de carne)

Água de carne bacteriológica ... 1.000 ml

Peptona bacteriológica ..... 10 g

Cloreto de sódio ..... 5 g  
Água destilada ..... 1.000 ml  
Ajustado o pH a 7.4 - 7.6

Bier (1963)

#### 5.1.2.1.2 Caldo glicosado

O mesmo meio básico anterior, acrescentando 0,1%  
de glicose.

Bier (1963)

#### 5.1.2.1.3 Caldo Triptose

É uma variante de Bacto Triptose (B-124), do qual  
foi retirado a glicose e a tiamina.

Difco (1958)

#### 5.1.2.1.4 Caldo Hottinger

Solução de soda a 40% q.s.p. alcalinizar  
ao tornassol ..... 10 ml  
Clorofórmio ..... 25 ml  
Pâncreas de bio passado à máqui-  
na ..... 150 g

Bier (1963)

### 5.1.2.1.5 Leite simples

Corresponde ao leite desnatado

### 5.1.2.1.6 Leite tornassolado

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

"Bacto-skim milk" .....	100 g
"Bacto-Litmus" .....	0,75 g

### 5.1.2.1.7 Hidratos de carbono

Para estudar a fermentação dos hidratos de carbono, empregou-se o meio básico para fermentação de Hiss (1904)

Peptona bacteriológica .....	1.0 g
Cloreto de sódio .....	0.5 g
Indicador Andrade .....	1 ml

ao qual foi adicionado 1% do hidrato de carbono a ser testado..

### 5.1.2.1.8 Meio Tarozzi

Fígado picado em pedaços do tamanho

de avelãs .....	100 g
Caldo simples, pH 7.2.....	250 ml

Bier (1963)

5.1.2.1.9 meio de Clara (1943)

Sulfato de magnésio (anidro) ....	1.0 g
fosfato dipotássico (anidro) ....	1.0 g
Asparagina .....	10.0 g
Água .....	1.000 ml

pH ajustado para 7.5

5.1.2.2 Meios semi-sólido

5.1.2.2.1 Agar simples (Meio Básico) ou

Agar nutritivo

Extrato de carne .....	10 g
Peptona .....	10 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Agar .....	15 g
Água .....	1.000 ml

pH 7.4

5.1.2.2.2 Agar glicerinado

Foi usado o agar simples e adicionado 5% de glicerina

5.1.2.2.3 Gelatina -"Nutrient Gelatin (B-11)"

Bacto extrato de carne .....	3 g
------------------------------	-----

Bacto peptona .....	5 g
Bacto gelatina .....	120 g
	Difco (1958)

#### 5.1.2.2.4 Meio de Teague

Agar simples - pH 5, estéril .....	100 ml
Lactose (sol. a 10% estéril).....	10 ml
Sol.aquosa de ecosina 2% .....	2 ml
Sol. azul de metileno 0.5% .....	2 ml
	Holt & Teague (1916)

#### 5.1.2.2.5 Agar chocolate

Ao meio de agar simples foi adicionado 10% de sangue e aquecido a 80°C.

Bier (1963)

#### 5.1.2.2.6 Meio de Sabouraud

Peptona .....	10 g
Glicose .....	40 g
Agar .....	20
Água q.s.p. ....	1.000 ml
	Sabouraud (1893)

### 5.1.2.2.7 Sôro Loeffler

Extrato de carne .....	3 g
Peptona .....	10 g
Cloreto de sódio .....	10 g
Glicose .....	10 g
Água .....	1.000 ml
Sôro de cavalo .....	3.000 ml

Loeffler (1887)

### 5.1.2.2.8 Agar amido

Ao agar simples (Meio Básico) foi adicionado amido solúvel e esterilizado a 110-115°C durante 30 minutos.

### 5.1.2.2.9 Meio de Simmons -Citrato

Sulfato de magnésio .....	0.2
Fosfato monoamônico .....	1 g
Fosfato dipotássico .....	1 g
Citrato de sódio .....	2 g
Cloreto de sódio .....	5 g
Agar .....	15 g
Azul de bromotimol .....	0.08 g
Água q.s.p. ....	1.000 ml

Simmons (1926)



5.1.2.2.10 Agar Chumbo-"Bacto-Lead Acetate agar (B-88)".

Bacto peptona ..... 15 g  
Proteose peptona ..... 5 g  
Bacto dextrose ..... 1 g  
Acetato de chumbo ..... 0,2 g  
Tiosulfato de sódio ..... 0,08 g  
Bacto agar ..... 15 g

Difco (1958)

5.1.2.2.11 Meio de "Kligler iron agar(B-26)"

Bacto extrato de carne .... 3 g  
Bacto extrato de levedo ... 3 g  
Bacto peptona ..... 15 g  
Proteose peptona ..... 5 g  
Bacto lactose ..... 10 g  
Bacto dextrose ..... 1 g  
Sulfato de ferro ..... 0.2 g  
Cloreto de sódio ..... 5 g  
Tiosulfato de sódio ..... 0.3 g  
Bacto agar ..... 12 g  
Bacto vermelho de fenol ... 0.024 g

Difco (1958)

### 5.1.2.2.12 Batata glicerinada

Foram empregados tubos de "Roux" contendo fragmentos de batata e caldo glicerinado a 5%.

Bier (1963)

### 5.1.3 Reativos

#### 5.1.3.1 Reativo de Ehrlich (Indol)

Paradimetilaminobenzaldeído ... 4 g  
Alcool a 90º ..... 380 ml  
Ácido clorídrico concentrado .. 80 g

Bryan (1959)

#### 5.1.3.2 Reativo de Nessler (Amônia)

Segundo Cunningham (1947), o reativo de Nessler (iodo mercurato de potássio), foi preparado da seguinte maneira:

a) Foi adicionado 62.5 g de iodeto de potássio a 250 ml de água destilada e reservada 10 ml.;

b) Ao restante foi adicionada, gôta a gôta, uma solução saturada de cloreto de mercúrio até que persistiu a formação de um precipitado;

c) Em seguida, juntou esta última solução de cloreto de mercúrio até a obtenção de um leve, porém, distinto precipitado vermelho.

d) Foram dissolvidas 150 g de hidróxido de potássio em 150 ml de água destilada e adicionadas à solução acima, sendo o volume completado com água destilada a um litro;

e) Após um período de repouso de uma semana, seguido de decantação, o reativo foi considerado em condições de uso.

### 5.1.3.3 Reativo de Griess-Ilosva(Nitritos)

Sol.A Ácido sulfanílico .....	8 g
Ácido acético 5N .....	1.000 ml
Sol.B Dimetil-alfa-naftilamina.	5 g
Ácido acético 5N .....	1.000 ml

Bryan (1959)

### 5.1.4 Corantes

5.1.4.1 Flagelos: Método de Zettnow modificado por Bongert (1927).

#### a. Mordente de Pepper

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

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

b. Impregnador de Zettnow - Preparo do sulfato prata

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

Foram misturadas a frio as soluções 1 e 2 em tubo de ensaio com aparecimento de um precipitado branco. Decantando o líquido, foram adicionados 20 ml de água destilada, e procedeu-se cêrca de 4 g de sulfato de prata.

Preparo do Impregnador:

Sulfato de prata .....	4 g
Água destilada .....	500 ml
Amônia sol. aq. a 33% .....	

Foi dissolvido o sulfato de prata, agitando-se fortemente em frascos com rolha de esmeril a fim de obter uma suspensão concentrada. Tomou-se 50 ml de suspensão e adicionou-se amônia, gôta a gôta, até redissolver completamente o precipitado escuro de óxido de prata. Acrescentou-se depois algumas gôtas de solução de sulfato de prata, até se obter de novo um começo de formação de precipitado. A solução apresentou-se opalescente, sem excesso de etilamina ou de óxido de prata.

### 5.1.4.2 Esporos

#### Mistura sulfocrômica

Bicromato de potássio (comercial).. 60 g  
Água destilada ..... 300 ml  
Ácido sulfúrico comercial ..... 460 ml

#### Fucsina de Ziehl

Sol. A - Fucsina básica a 90% de pureza 0.3 g  
          Alcool etílico 95% ..... 10 ml  
Sol. B - Fenol (cristais) ..... 5 g  
          Água destilada ..... 95 ml

Misturar as soluções A e B

#### Nigrosina

Água destilada .....100 ml  
Nigrosina ..... 10 g

Adicionar 0.5 ml de formalina para evitar crescimento de bactérias.

### 5.1.4.3 Gram

Cristal violeta, segundo Hucker

- A - Cristal violeta a 85% de pureza. 4 g
- Alcool etílico a 95° ..... 20 ml
- B - Oxalato de amônio ..... 0.8 g
- Água destilada ..... 80 ml

Misturar A e B em partes iguais

Lugol

- Iodo ..... 1 g
- Iodeto de potássio ..... 2 g
- Água destilada ..... 300 ml

Triturar os cristais de iodo com o iodeto de potássio e juntar água.

### 5.1.5 Indicadores

#### 5.1.5.1 Indicador Andrade (1905)

- Fucsina ácida ..... 0.1 g
- Hidróxido de sódio n/1 ..... 16 ml
- Água q.s. .... 100 ml

### 5.1.6 Antibióticos

Um ensaio foi realizado "in vitro", procurando verificar a sensibilidade da Pseudomonas sesami a vários antibióticos.

Para testar a atividade antibiótica foram usadas placas de agar simples, utilizando-se comprimidos de concentração conhecida, comercialmente denominados, COMP-DISCOS, cedidos gentilmente pelo Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de São Paulo. Permitem uma verificação rápida e prática da resistência e da sensibilidade relativa dos vários microorganismos, permitindo selecionar os antibióticos mais ativos sobre uma bactéria.

Os antibióticos, seu nome comum, princípios ativos e fontes, estão relacionados na Tabela I.

TABELA I

NOME COMUM	PRINCÍPIO ATIVO	FONTE
Penicilina	Penicilina potássica	E.R.Squibb Sons
Estreptomicina	Sulfato de estreptom- micina	E.R.Squibb Sons
Eritromicina	Sulfato laurílico de propionil eritromici- na	Eli Lilly e Abbott
Cloromicetina	Cloranfenicol	Carlos Erba e Parke Davis
Terramicina	Oxitetraciclina	Laboraterápica, Bristol Lederle
Tettrin	Cloridrato de tetra- ciclina	
Aureomicina	Cloridrato de cloro- tetraciclina	Lederle
Novobiocina	Novobiocina sódica	Upjohn e Merk- Sharp & Dome
Kanamicina	Sulfato de Kanami- cina	Laborterápica, Bristol e Lafi
Neomicina	Sulfato de neomi- cina	Eli Lilly
Colimicina	Sulfato de colimi- cina	Lafi
Rovamicina	Espiramicina-base	Rhodia



## 5.2 Métodos

Os métodos utilizados neste estudo estão contidos no "Manual of Microbiological Methods", e outros são citados especialmente no decorrer deste trabalho.

### 5.2.1 Isolamentos da bactéria

Conforme o material fôsse proveniente das folhas ou das hastes, foram empregadas técnicas diferentes.

Fôlha: - considerando-se que o material apresentava manchas atribuídas ao fungo Cercospora sesami, houve, preliminarmente, necessidade da separação dos dois tipos de manchas, inconfundíveis, mostrando as de origem bacteriana aspecto nitidamente úmido. Foi empregada a técnica do macerado em caldo simples, utilizando-se as partes das folhas com lesões. Em seguida, foi semeada a suspensão pelo método da diluição, em 3 placas de Petri, contendo agar simples.

Hastes: - empregou-se a técnica da "câmara super úmida", idealizada por Franco do Amaral (1952) 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 exudação que se consegue com êsse processo, serve, também, para indicar a presença da bacteriose. A boa exudação foi conseguida após 2 horas; em seguida, a goma bacteriana foi semeada, por diluição, em 5 placas de agar simples.

As placas de Petri provenientes das 2 técnicas foram incubadas à temperatura de 26°C e mesmo sendo o germe de crescimento lento, as colônias tornaram-se perceptíveis na placa, depois de 24 horas; vistas à binocular revelaram-se como gotículas aquosas, de contôrno grosseiramente irregular e mais ou menos planas. Entretanto, sòmente foi possível o isolamento após 4 ou 5 horas, tempo necessário para uma boa caracterização das colônias.

### 5.2.2 Inoculação

Para testar a patogenicidade das culturas, foram realizadas inoculações em plantas jovens cultivadas em vaso. O processo usado foi o de encharcamento do limbo foliar com suspensão bacteriana em água estéril, obtida de culturas em agar simples, em 24 horas (26°C). Após a inoculação, o vaso foi recoberto em saco de plástico transparente durante 24 horas, com a finalidade de obter um ambiente de câmara úmida. As testemunhas foram aspergidas com água estéril e cobertas com sacos de plástico transparentes.

### 5.2.3 Reisolamento

O método de reisolamento tornou-se bastante fácil, não só pela ausência de outras doenças, como também, pelo baixo índice de contaminação e conhecimento prévio dos sintomas que foram favorecidos pelo ambiente. Permitiu também, reisolamentos de 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

A exigência da bactéria em relação ao oxigênio livre foi testada segundo o processo de isolamento de germes anaeróbicos, idealizado por Franco do Amaral (1955) que é uma modificação do método de Jacobsthal.

Conforme preconiza o método, o microorganismo empregado a fim de se obter as condições anaeróbicas foi a Serratia marcescens (SBV-315), isolada em laboratório. Esta oferece os requisitos de rápido crescimento, o que pode ser verificado pela acentuada turvação do meio 3 horas após a semeadura em caldo glicosado, na temperatura ambiente. Por tratar-se de bactéria que revela bom desenvolvimento em condições de anaerobiose ou aerobiose, oferece ótimas faculdades de absorção de oxigênio. Em 30 ml de caldo glicosado, foi feita a inoculação da bactéria e sua incubação (30°C). Após 24 horas, a suspensão bacteriana foi utilizada, para

embeber as fatias de pão de forma, colocadas numa placa de Petri, sem requisitos especiais de assepsia.

Pseudomonas sesami, a ser testada, foi semeada numa placa de agar glicosado, proveniente 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 30°C.

### 5.2.5 Temperatura

Para o contrôle de temperatura de incubação, determinando-se o ótimo e o mínimo de crescimento da bactéria, foi utilizado um conjunto de 5 câmaras à temperatura constante (24, 27, 30, 33 e 36°C), da Divisão de Biologia Vegetal, do Instituto Biológico. As culturas foram incubadas às temperaturas acima, julgando-se desnecessário outros graus de temperatura, em virtude de nossas observações preliminares revelarem bom desenvolvimento da bactéria à temperatura de 28°C, portanto, aproximado do valor médio das temperaturas experimentais.

Para cada uma das temperaturas citadas, foram preparados 3 tubos com caldo glicosado e 3 placas de agar onde se aplicou em cada placa, um volume de inóculo igual ao retido por uma alça de platina. Para tanto, uma cultura em caldo glicosado foi preparada 24 horas antes e mantida a 28°C. Nas placas a inoculação foi efetuada, seguindo três linhas paralelas.

### 5.2.6 Produção de fluoresceína

No intuito de verificar a formação de fluoresceína através de sua fluorescência, adotou-se a técnica seguinte:

- a - Uma suspensão bacteriana obtida em cultura de 5 dias, em meio de Clara, foi aplicada sôbre uma linha reta de 7 cm de comprimento em papel de Whatman nº 1, usado em cromatografia.
- b - Em seguida, foi sêco com jato de ar à temperatura ambiente.
- c - As operações a e b foram repetidas por 10 vêzes, a fim de dar maior concentração à preparação.
- d - O papel foi colocado diante do aparelho ultra violeta, de ondas longas, do tipo empregado para detectar minerais fluorescentes com as seguintes especificações: Mineralight, model SL 3660, 110 v - 50. 60 cy. 9 watts, Ultra violet Products Inc., South Pasadena, Calif. U.S.A.

### 5.2.7 Mobilidade da bactéria

Para se verificar a mobilidade da bactéria, foi realizado o processo da gôta pendente, empregando lâmina

cavado a lamínula. Uma gôta de suspensão bacteriana foi colocada na porção central da lamínula e esta justaposta à parte cavada da lâmina com a gôta voltada para dentro. A aderência entre as lâminas foi conseguida intercalando-se uma gôta de água entre elas e, em seguida foram examinadas no microscópio.

#### 5.2.8 Coloração de Gram

O método foi idealizado por Christian Gram em 1884 e se baseia no fato de certas bactérias corarem pela solução de cristal violeta fenicada e esta depois de tratada pelo Lugol formar um composto de coloração escura, o qual é fortemente retido pela bactéria não sendo removido após o tratamento com álcool a 95°C. Essas bactérias "tomam o Gram" e são consideradas positivas. Aquelas que sofrem o descoloramento pelo álcool, "não tomam o Gram" e são negativas. Depois da ação do álcool, fazendo uma coloração de fundo pela fucsina, as bactérias Gram positivas, conservam a cor roxa, ao passo que as bactérias Gram negativas, apresentam a cor vermelha.

O estudo da reação do Gram, de Pseudomonas sesami seguiu o esquema seguinte:

- a - Foi tomada uma lâmina limpa e desengordurada onde foi colocada uma gôta da suspensão bacteriana.

- b - Foi feito o esfregação e deixado secar.
- c - A preparação foi fixada, passada por 3 vezes pela chama do bico de Bunsen.
- d - A lâmina foi coberta com uma solução de cristal violeta fenicada durante 1 minuto.
- e - Lavada em água corrente e recoberta com Lugol durante 1 minuto.
- f - Lavada, novamente e coberta com álcool etílico a 95% durante 30 segundos.
- g - Lavada e colorida com fucsina de Ziehl por 30 segundos.
- h - Novamente a lâmina foi lavada e deixada secar. Em seguida a preparação foi levada ao microscópio e observada (imersão).

#### 5.2.9 Coloração de esporos

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

- a - A lâmina foi lavada e desengordurada com mistura sulfocrômica.
- b - Novamente lavada e flambada.
- c - Com alça de platina, foi retirada uma gota

de água e depositada na lâmina.

- d - Em seguida, com a mesma alça, foi retirada uma suspensão de Pseudomonas sesami, de cultura velha (15 dias - meio de agar inclinado) e depositada na gota de água da lâmina, e feito um esfregão, de mais ou menos 2 cm de diâmetro.
- e - Após a lâmina seca, procedeu-se a fixação pelo calor.
- f - A preparação foi coberta com fucsina de Ziehl e corada a quente, passando pelo bico de Bunsen, até desprender vapores.
- g - Foi lavada em água corrente e deixada secar ao ar.
- h - Foi colocada uma gota de negrosina na extremidade da lâmina e com auxílio de uma lamínula, que tocada à gota de negrosina, distendeu-a à superfície da lâmina.
- i - Depois de seca ao ar, a lâmina foi observada ao microscópio (imersão).

#### 5.2.10 Coloração de flagelos

O microorganismo foi semeado em tubos de agar inclinado, recém preparados, e que continham, ainda, água de



condensação junto à parte inferior do meio.

Após 24 horas foi retirado, por capilaridade, com uma pipeta estirada, certa porção do líquido, o qual por simples contato, deixou-se correr sobre a lâmina ligeiramente inclinada, deixando assinalada estreita faixa. Realizado o secamento da preparação, à temperatura ambiente, procedeu-se a coloração do esporo:

- a - O mordente foi colocado apenas sobre a preparação durante 3 minutos.
- b - Foi feita uma lavagem muito cuidadosa, com jato leve de água que era dirigido apenas numa das extremidades da lâmina.
- c - Em seguida foi secado e colocado o empregnador de Zatoff sobre a preparação durante 1 minuto.
- d - Foi novamente seco e examinado ao microscópio (imersão) partindo dos contornos da preparação onde há maior concentração de bactérias.

#### 5.2.11 Sensibilidade aos antibióticos

Os antibióticos foram distribuídos inteiramente casualizados, com 3 repetições em 12 placas de agar.

Após 24 horas (30°C) de incubação, uma cultura em caldo simples, foi semeada, com auxílio de uma pipeta estirada, em agar simples, contido em placas de Petri, de maneira a recobrir todo o meio de cultura. Retirou-se o excesso do líquido deixando em seguida, as placas semi-abertas por 30 minutos em estufas (37°C), a fim de retirar o excesso de umidade. A seguir procedeu-se a colocação dos comprimidos que tiveram uma distribuição radial e equidistante. As placas, incubadas durante 24 horas, mostraram os halos de inibição de crescimento (antibiograma), permitindo, assim uma visão de conforto e comparativa entre os diferentes antibióticos.

A intensidade da ação do antibiótico foi apreciada através do diâmetro do halo de inibição, sendo considerados os halos bem definidos.

#### 5.2.12 Método de liofilização

As culturas de P. sesami, incubadas durante 24 horas em 5 ml de caldo glicosado contidas em tubos de ensaio, foram transferidas para frascos comumente usados para vacinas (raiva, bouba, aftosa, etc.) de uso veterinário. Em seguida foram sobrepostas aos gargalos dos vidros rólhas butílicas frezadas, que ofereceram condições à retirada de água do frasco sobre a forma de vapor. Estes frascos foram transportados à câmara de liofilização, onde permaneceram até o fim do processo, quando se efetuou automaticamente, o

seu completo fechamento. Retirados os frascos, seguiu-se a operação denominada "clavamento" que consiste em lacrá-los por meio de uma tampa de alumínio de 22mm de altura, colocada sôbre a rolha. A seguir é efetuado um "repuchamento" de sua parte inferior, de maneira a adaptar-se perfeitamente ao gargalo do frasco.

A liofilização foi executada tendo como temperatura inicial - 30°C, vácuo de 25 - 30 micra durante 24 horas, sendo que depois a temperatura foi elevada gradativamente até 30°C. A técnica foi a de uso corrente na Secção de Produtos Veterinários do Instituto Biológico para virus ou drogas, conforme segue:

- a - Os frascos contendo culturas bacterianas em caldo glicosado foram colocados no liofilizador cuja temperatura na câmara foi ajustada para - 30°C;
- b - Tendo atingido a temperatura de - 30°C, foi interrompido o resfriamento e feito o vácuo que foi mantido entre 25 a 30 micra durante todo o processo de liofilização, o qual provocou a sublimação e conseqüentemente um maior abaixamento de temperatura do produto que oscilou entre -30° e -40°C.
- c - A seguir, mediante comunicação de calor à câmara de liofilização, as temperaturas foram gradativamente aumentadas a 0°C, 10°C e 30°C,

sendo feita a passagem após ter sido verificado a estabilização das temperaturas e pressões. O produto tendo permanecido durante 2 horas, à temperatura de 30°C e apresentando bom aspecto, deu-se por terminado o processo de liofilização.

- d - Foi efetuado automaticamente o fechamento dos frascos.
- e - Tendo estabelecido na câmara de liofilização a pressão ambiente, seguiu-se a retirada dos frascos.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 Sinonimia

A classificação da bactéria sofreu várias alterações. O primeiro nome, Pseudomonas sesami foi proposto Malkoff - (1906), recebendo mais tarde as seguintes sinonimias:

Bacterium sesamicola Takimoto (1927)

Bacterium sesami (Malkoff) Nakata (1930)

Phytomonas sesami (Malkoff) Kavachevsky  
(1930)

Phytomonas sesamicola (Takimoto) Magron  
(1937)

Entretanto, permaneceu o nome original de Pseudomonas sesami (Bergey 1957 - Elliott 1951), dado por Malkoff em 1906.

### 6.2 Caracteres morfológicos

As bactérias apresentam-se sob a forma de bastonetes, medindo em média 0,65 x 2,70 micra, com extremidades arredondadas isolados, aos pares ou em cadeias. Não tomou o Gram, portanto foi considerada negativa.

#### 6.2.1 Mobilidade

A mobilidade da bactéria foi verificada pelo processo

de gôta pendente, vista ao microscópio, revelou em qualquer meio líquido, uma mobilidade bastante enérgica. O número de flagelo foi observado pelo método de coloração e confirmado pela fotomicrografia eletrônica, obtida de colônias em cultura de agar simples. A bactéria foi observada como tendo 2 flagelos - polares.

### 6.2.2 Espóros

O método empregado para a coloração de espóros foi o de Dorner e, a lâmina observada no microscópio apresentou o corpo bacteriano incolor sôbre fundo negro violáceo da preparação, sem aparecimento da côr vermelha, o que indicou que Pseudomonas sesami não esporula.

## 6.3. Caracteres culturais

### 6.3.1 Fluoresceína

Usando como meio nutritivo preconizado por Clara (1943), o crescimento da bactéria revelou escasso, não indo além de ligeira turvação, sem produção aparente de qualquer pigmento. A fluorescência foi determinada no papel Wachtman nº 1 que, sob a ação das radiações, do aparelho de ultra violeta, de ondas longas, observou-se uma estreita faixa luminescente ao redor da reta de aplicação da suspensão bacteriana, o que veio evidenciar que Pseudomonas

sesami produz fluoresceína no meio de Clara.

### 6.3.2 Placas de agar simples

As colônias desta bactéria apresentam características constantes e peculiares, facilitando bastante a própria identificação. Revelou-se, à semelhança da maioria de outras bactérias fitopatogênicas, crescimento apenas perceptíveis após 24 horas (30°C). As diminutas colônias, vistas à binocular, apresentavam-se como gotículas aquosas, de contorno grosseiramente irregular e algo planas. Boa individualização foi obtida após 4 - 5 dias com as seguintes características: translúcidas, cor branca opalescente, bordo liso (inteiro), ligeiramente ondulado, forma irregular, tendendo a circular; achatada, com superfície ligeiramente irregular (pequenas depressões); estrutura grosseiramente irregular. Consistência butirosa. Colônias bem isoladas, tendo em média, 3mm de diâmetro. Foi observado leve escurecimento do meio, melhor evidenciado onde havia maior acúmulo de colônias, que diluiu-se com o tempo através de todo o meio. Houve produção de fluoresceína.

### 6.3.3 Caldo simples

Leve turvação do meio decorridas 24 horas e assim permanecendo. Com o correr do tempo ( 8 dias) apresentou leve sedimentação, não mucosa, que por ligeira agitação se dispersou do meio.

#### 6.3.4 Caldo glicosado

Turvação e sedimentação mais acentuadas, do que as verificadas no caldo simples, mostrando assim acentuada influência da glicose.

#### 6.3.5 Caldo Triptose

Esse caldo corresponde ao Bacto Triptose (B-124) Difco (1958). Não contém glicose e é usado para germes exigentes. Acusou ótimo crescimento. Seu emprego tornou-se interessante em substituição ao caldo glicosado que poderia mascarar certas reações que deveria processar na ausência de glicose, por exemplo, na repicagem em meio com açúcar puro.

#### 6.3.6 Leite simples

Sofreu boa peptonização, precedida de coagulação decorridos 15 dias. Durante esse período notou-se um proceso de clarificação do meio ficando o líquido sobrenadante quase límpido. Com o correr do tempo (40 dias) houve acentuado escurecimento do meio com total digestão do leite.

#### 6.3.7 Leite Litmus

Um processo de acidificação seguido de coagulação



transformou quasi todo o leite num coagulo de aspecto branco-cento. Ap6s 15 dias seguiu-se, gradativamente, uma alcaliniza7ao e peptoniza7ao que se completou no quadrag6simo quinto dia.

#### 6.3.8 Gelatina

Foi lenta a liquefa7ao, completada ap6s 13 dias. A liquefa7ao foi notada mais na superf6cie do meio, em contato com o ar, em virtude dessa bact6ria ser ser6bica.

#### 6.3.9 Batata glicerizada

O aspecto assumido pelos dois meios contidos nos tubos de Roux, isto 6, a batata glicerizada e o caldo glicerizado, fornecem 6teis indica7oes s6bre a identidade de F. sesami. Foi observado bom crescimento e ap6s 8 dias, tamb6m boa sedimenta7ao; os meios adquiriram tonalidade mel, que na batata ao lado de um recobrimento total por um induto 6mido aquoso de consist6ncia butirosa, a c6r acentuou-se gradativamente para a extremidade do bisel de batata que passou a c6r castanho claro, ou melhor, escuro.

#### 6.3.10 Hidrog6nio sulfurado

Embora fosse considerado negativo por Elliott(1915) notou-se ap6s 4 dias ao longo da picada evidentes tra7os es-

curos, bem como escurecimento do meio que poderia ser atribuído ao sulfato de chumbo. No interesse de afastar possível mascaramento de reação, motivada pela turvação, nova reação foi efetuada empregando o meio "Kliger iron agar" Difco-1958 que acusou ótimo crescimento do meio e revelou a ausência de hidrogênio sulfurado.

#### 6.3.11 Meio de Lignieres

Foram colocadas duas gotas de suspensão bacteriana na superfície do meio. Houve bom crescimento superficial, de aparência leitosa quando visto por transparência, mostrando certo escurecimento que se diluiu ao longo do meio.

#### 6.3.12 Agar inclinado

Desenvolvimento apenas visível, esparramado, translúcido, confundindo-se com o meio, inodoro, de consistência butirosa.

#### 6.3.13 Agar sangue

Depois de 4 dias houve crescimento moderado sem hemólise.

#### 6.3.14 Meio Teague

Após 4 dias apresentou colônias morfológicamente

análogas às de agar simples, porém, menores e de coloração preta.

Sabe-se que nêsse meio prolifera a maior parte das Gram negativas, com inibição das Gram positivas, permitindo esclarecimentos sôbre a ação fermentativa da lactose pelo aparecimento de pigmentação preta conferidas às colônias. Este teste forneceu, assim, indicações sôbre as duas características.

#### 6.3.15 Meio de Simons - Citrato

Acusou bom desenvolvimento, decorridos 3 dias da inoculação. Houve total mudança de coloração, passando de verde para azul (basificação do meio com libertação de amônia).

#### 6.3.16 Meio de Loeffler

Fraco crescimento de aspecto úmido, sem contudo mostrar qualquer digestão de albumina coagulada. Decorrido 8 dias, a faixa de crescimento de P. sesami tomou côr mel escura, motivada pela forte pigmentação que não se difundiu ao meio acentuado com o correr do tempo.

### 6.4. Fisiologia

A sua exigência ao oxigênio livre foi verificada

pelo processo de isolamento de bactérias anaeróbicas proposto por Franco do Amaral (1955). Transcorridos 4 dias, não foi observado nenhum crescimento, razão pela qual a bactéria foi considerada aeróbio estrito. Idêntica comprovação foi feita com o meio de Tarozzi que não exibiu nenhuma turvação. Por simples observação verificou-se que as culturas, tanto nas placas como nos tubos retirados das câmaras de temperatura constante, apresentaram crescimento ótimo à temperatura de 30°C. Na temperatura de 27°C e 33°C o crescimento foi reduzido, o mesmo acontecendo com a temperatura de 24°C. Não houve crescimento à temperatura de 36°C. Foi constatada a sua patogenicidade em cultura de cerca de 2 meses, conservada em caldo simples à temperatura ambiente e sem repique.

#### 6.4.1 Hidratos de carbono

Para as provas de fermentação foram usados os seguintes hidratos de carbono, com indicador Andrade: sacarose, glicose, levulose, maltose, trealose, rafinose, salicina, manita, adonita, inosita, glicerina, manose, galactose, dulcita, arabinose, dextrina, sorbita, inolina, xilose e ramosa.

Nas culturas usadas SBV-793 e SBV-794 isoladas respectivamente, em 18/3/66 e 6/5/66, observou o seguinte: sendo o microorganismo em todas fontes de carbono acima citadas, o crescimento foi assinalado por leve turvação e sedimentação havendo entre 4-8 dias, acidificação dos açúcares: glicose,

xilose, rafinose, arabinose, galactose, e manose. Decorridos 20 dias houve total desaparecimento da côr vermelha (acidez) conferida pelo indicador Andrade nos açúcares manose e arabinose inculadas com a cêpa SBV-793, mostrando escurecimento do meio, fato êsse também observado em relação à cêpa SBV-794 para os compostos glicerina e sacarose.

#### 6.4.2 Amido

Foi realizado em placas de agar amido e a hidrólise ficou evidenciada decorridos 5 dias depois de adicionada a solução de Lugol. A mesma prova efetuada com Xanthomonas citri bactéria de forte ação hidrolítica sôbre o amido, mostrou zô nas largas e claras circundando as colônias, contrastando com o restante da placa escurecido pelo amido.

#### 6.4.3 Meio de Tarozzi

Não houve qualquer crescimento nêste meio, corroborando assim com as pesquisas que revelaram ser P. sesami uma bactéria aeróbio estrito. Após 60 dias, foi perfurada a camada de vaselina sólida que recobria o meio de maneira a permitir o fornecimento de oxigênio. Após incubação a 30°C durante 24 horas foi observado nítida turvação do meio.

#### 6.4.4 Nitratos

Tubos com água nitrada foram inoculados com a bactéria causadora da mancha nas folhas de gergelim e incubados (30°C) conjuntamente com outros que serviram de controle. Os testes foram realizados depois de 5 dias. As soluções A e B do reativo de Griess - Ilosva na proporção de 0.5 ml de cada uma, foram adicionadas a cerca de 4 ml da cultura a ser testada. Não tendo surgido a cor vermelha ou rósea, o teste foi considerado negativo e não houve portanto, a redução de nitrato a nitrito.

#### 6.4.5 Produção de amônia

Foi adotada a técnica preconizada por Dowson (1957) que consiste em tomar quatro tubos de ensaio contendo água de peptona inoculados com Pseudomonas sesami e incubados a 30°C. Decorridos dois dias foram tomados dois tubos e adicionou-se igual volume do reativo de Nessler; o mesmo procedimento foi realizado com os tubos restantes, 5 dias após a inoculação. Nos tubos não foi verificada a formação de um precipitado de cor marron, o que indicou que a reação foi negativa, isto é, não houve formação de amônia.

#### 6.4.6 Produção de indol

A prova foi realizada após 7 dias de incubação da

cultura bacteriana em caldo de Hottinger (rico em triptofano) adicionando éter sulfúrico com uma pipeta estirada de Pasteur de maneira a obter-se uma camada sobrenadante de 6 - 7 mm. Com outra pipeta e entre as duas camadas líquidas, foi colocada pequena quantidade de reativo de Ehrlich que formou uma camada de 2 mm. de espessura. O conjunto foi deixado em repouso durante 10 minutos e não tendo sido verificado o aparecimento da cor vermelha na camada intermediária, o teste foi considerado negativo; portanto, a bactéria foi incapaz de produzir indol a partir do triptofano.

O teste foi feito também, em tubos de ensaio contendo caldo simples com 1% de Triptofano. No interior do tubo foi inserido um papel de filtro seco, previamente embebido numa solução de ácido oxálico, disposto de maneira a não tocar a superfície do meio e retido pelo tampão de algodão. Após 5 dias, o papel de filtro não tendo adquirido a cor rósea, não revelou a presença de indol, confirmando a prova anterior.

#### 6.5 Sensibilidade aos antibióticos

Os resultados obtidos pelos ensaios, segundo o método de discos em placa, visando determinar a sensibilidade de Pseudomonas sesami aos antibióticos, acham registrados na tabela II e representam a média dos halos de inibição, em cultura em agar simples.

Tabela II

NOME COMUM	DOSES	MÉDIAS DOS HALOS DE INIBIÇÃO (EM mm)
Penicilina	10 unidades	0,0
Estreptomicina	10 microgramas	7,2
Eritromicina	15 "	0,0
Cloromicetina	30 "	0,0
Terramicina	30 "	26,0
Tettrin	30 "	27,0
Aureomicina	30 "	27,3
Novobiocina	30 "	0,0
Kanamicina	30 "	32,8
Neomicina	30 "	0,0
Colimicina	16.000 unidades	27,3
Rovamicina	30microgramas	0,0



## 7. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

As características culturais bastante constantes e peculiares reveladas em sucessivos isolamentos e sementeiras nos mais variados meios de cultura, notadamente em relação ao aspecto das colônias, oferecem um ótimo recurso na individualização de Pseudomonas sesami.

A bactéria apresentou forte pigmentação dos meios de agar simples (4 dias), sôro de Loeffler, batata glicerinada, leite simples, sacarose, salicina, glicerina, etc. Trata-se, portanto, de bactéria dotada de forte capacidade de pigmentação do meio.

Certos hidratos de carbono (glicose, glicerina e amido), tiveram influência positiva no crescimento da bactéria.

A patogenicidade das culturas bacterianas foi testada em uma variedade de gergelim utilizando-se quatro linhagens de bactérias oriundas de isolamentos originais com sucessivos reisolamentos. Em todos os casos foram obtidas culturas puras, de alto poder de patogenicidade.

Foram feitos experimentos "in vitro", visando testar a sensibilidade da bactéria à antibióticos mediante o emprego de comprimidos com dosagem estandarizadas. Os maiores halos de inibição foram obtidos com: kanamicina, colimicina, aureomicina, tetrin e terramicina.

Sabet & Dowson (1960) relataram ser Xanthomonas sesami, por êles classificado, o agente etiológico das manchas de côr castanho-avermelhado escuras, encontradas em fôlhas de gergelim procedente do Sudão. Os autores realizaram estudos de patogenicidade e bioquímico entre o citado organismo e Xanthomonas phaseoli e Xanthomonas malvacearum, chegando aos seguintes resultados: Xanthomonas sesami é específica para o gergelim, tem ação lenta sôbre o amido, liquefaz o sôro de Loeffler cresce moderadamente em cilindro de batata, em contraste com o crescimento luxuriante exibido pelas duas outras bactérias. Difere, também, de Xanthomonas malvacearum por utilizar a manita com produção de acidês. Relativamente ao nosso isolado, as diferenças encontradas, em relação às citadas por Sabet, são: não hidroliza o amido, não liquefaz o sôro de Loeffler e não determina acidês em manita.

A idéia de Sabet em comparar a bactéria isolada das fôlhas de gergelim com as duas Xanthomonas, surgiu, obviamente, em virtude de suas semelhanças. Entretanto, essa comparação não seria justificável em se tratando do nosso organismo pois, o mesmo deve ser classificado como sendo do gênero Pseudomonas, por diferir nos caracteres culturais, bioquímicos e, em testes de patogenicidade, não ter conseguido reproduzir experimentalmente a doença em plantas de algodão e feijão, sendo portanto, bactéria específica do gergelim.

As linhagens SBV-793 e SBV-794, oriundas, respectivamente do isolamento original e do primeiro reisolamento,

apresentaram sensíveis diferenças de comportamento, sobretudo no que se refere à pigmentação dos meios de cultura e ação sobre os hidratos de carbono. No intuito de dirimir dúvidas sobre a identidade bacteriana, através dos testes realizados na identificação, foram analisados os seguintes resultados:

- 1 - Mais acentuada pigmentação escura para a linhagem SBV-794 nos meios de agar simples, sôro de Loeffler, batata glicerinada e nos meios líquidos usados para testar os carboidratos (maltose, trealose, manita, sorbita, sacarose e galactose).
- 2 - Em todos os hidratos de carbono experimentados, a linhagem SBV-794 produziu maior acidês, com exceção da xilose, na qual a acidês foi praticamente idêntica para as duas linhagens.
- 3 - As diferenças não devem ser atribuídas ao enfraquecimento destas características, posto que a linhagem SBV-794, conservada nas mesmas condições de cultura e de tempo ainda conservou as mesmas propriedades com igual intensidade

Essas diferenças não foram significativas, e Malkoff, talvez, devido a insuficientes recursos de apreciação considerou os dois isolamentos como sendo duas espécies distintas. Entretanto, as pequenas diferenças culturais e bioquímicas encontradas nas duas linhagens não nos autoriza a considerar espécies diferentes.

Dentre outras características genéricas, citaremos aquelas que, do ponto de vista prático, colaboram no sentido de situar a bactéria fitopatogênica em estudo, entre aquelas pertencentes ao gênero Pseudomonas, de acôrdo com Bulkholder & Starr (1948) e Bowson (1957). São as seguintes: bactérias Gram-negativas, móveis por flagelos polares, crescimento lento em agar nutritivo, colônias de côr branca opalescente e circundadas por um halo de côr verde amarelada, quando as placas são examinadas em determinado ângulo e por transparência; escurecimento do meio de cultura em agar simples, acentuando-se com o envelhecimento da cultura; produção de fluoresceína que se difundindo através do meio de cultura, comunica-lhe uma fluorescência amarelo esverdeada. Bioquimicamente, foi verificada a fraca fermentação dos carboidratos, não acidificando a salicina e lactose; não produziu indol e hidrogênio sulfurado; aeróbio e a temperatura ótima está situada a 30°C. As culturas em agar simples permanecem viáveis por um período de cinco meses.

O interêsse do ensaio da sensibilidade convergiu, principalmente na ação da estreptomicina, porque, segundo Ark (1949), ela é muito ativa contra várias espécies de bactérias fitopatogênicas pertencentes ao gênero Xanthomonas, - Pseudomonas, Erwinia, Corynebacterium e Agrobacterium. Entretanto, pelo ensaio realizado e pelos resultados obtidos (tabela II), verificou-se que na estreptomicina o halo de inibição não é tão visível "in vitro" em relação à Pseudomonas sesami.

Embora as pesquisas de sensibilidade "in vitro" de Pseudomonas sesami, realizadas nos laboratórios Pfizer(1954) demonstrassem uma elevada atividade da estreptomicina e da terramicina, através de um estudo preliminar de determinação do nível mínimo de inibição, que correspondeu a 5 mcg/ml de terramicina e 20 mcg/ml de estreptomicina, em nosso trabalho verificamos maior ação com outros produtos, tais como a kana micina, colimicina, aeromicina, tetrin e terramicina.

Essas observações permitem plenamente justificar experimentos visando estabelecer tratamento de sementes, so**bre**tudo com os produtos acima citados.

Todos êsses itens mencionados coincidem com as ca**ra**cterísticas do gênero Pseudomonas relatadas nos trabalhos de Bulkholder e Dowson, e que confrontados com os dados con**ti**dos no Manual de Bergey (1953), permite classificar a bac**te**ria em estudo, como sendo Pseudomonas sesami Malkoff,1906.

## 8. R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

O objetivo dêste trabalho visa a identificação e o estudo do agente causal do crestamento bacteriano do gergelim (Sesamum orientale L.), de material proveniente da Secretaria da Agricultura de Goiás, município de Itumbiara. É uma doença bacteriana importante na cultura do gergelim e ataca um número grande de variedades. No Brasil foi assinalada pela primeira vez em 1942.

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

1. Morfologia - Bactérias em forma de bastonetes, medindo 0.65 x 2.7 micra, com extremidades arredondadas, isoladas, aos pares ou em cadeia, móveis, possuindo dois flagelos polares, Gram-negativos, não há formação de esporos, aeróbio estrito.
2. Características Culturais - Placas de agar simples, crescimento apenas perceptível ( 24 horas a 30°C ); após 4 dias, colônias achatadas, translúcidas, cor branca opalescente, bordo liso, ligeiramente ondulado, forma irregular, tendendo a circular, consistência butirosa, escurecimento do meio. Caldo simples, leve turvação e após 8 dias na temperatura ambi-

ente, ligeira sedimentação não mucosa, que por agitação se dispersa no meio. Fluorescência, houve produção de fluorescência nos meios de cultura.

3 - Bioquímicas - Carboidratos, bom crescimento, com acidificação, porém sem formação de gás em glicose, xilose, galactose e manose, não havendo hidrólise do amido. Hidrogênio sulfurado, indol e amônia, não houve produção. Nitratos, não reduziu. Gelatina, completa liquifação após treze dias, ótima foi de 30°C.

4 - Patogenicidade - Os diversos reisolamentos, inoculados experimentalmente, sempre revelaram um alto e constante poder de patogenicidade para o gergelim.

5 - Sensibilidade a antibióticos - Foram verificados maiores halos de inibição com a kanamicina, colimicina, aureomicina, tetrin e terramicina.

6 - Com base nas características morfológicas, culturais, bioquímicas e de patogenicidade, a bactéria foi classificada como sendo Pseudomonas sesami Malkoff, 1906.

## 9. S U M M A R Y

The object of the work was to realize the identification and the study of the agent responsible for the bacterial blight in sesame of the material that came from Itumbiara, Goiás. It is an important bacteria disease and attacks a great number varieties of sesame. In Brasil the disease was first noted in 1942.

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

a. Morphological - The microorganism appears as a rod, with round ends, 0.65 x 2.7 micra, Gram negative. It does not have spores. Motile by 2 polar flagella, easily stained. Aerobic.

b. Cultural - Agar plate - colonies only visible as aqueous drops (24 hr. at 30°C), becoming after 4 days flat with irregular outlines, translucent, opalescent, with entire margins, slightly undulated, irregular form with circular tendency, butyrous, with browning of medium. Beef broth: rapid growth, no pellicle. Green fluorescent pigment produced in culture.

c. Biochemical - Good growth in sugars, no gas but only fermentation from glucose, xilose, arabinose, galactose and monose.



Hydrolysis of starch, hydrogen sulphide, indol, ammonia and nitrate reduction negative; gelatine liquefaction completed after 13 days. Milk peptonized and coagulated; blood agar after 4 days, moderate growth without hemolysis. Litmus milk acid and curdled becoming alkaline and peptonized. Optimum temperature: 30°C.

d. Pathogenetical - Different isolates, reinoculated experimentally, a high and constant ability of the pathogenicity always appearing.

"In vitro" experiments for inhibition of growth of the bacteria showed as the most effective antibiotics: kanamycin, colimycin, aureomycin, tetryn and terramicin.

The organism is classified as Pseudomonas sesani Malkoff (1906).

## 10. AGRADECIMENTOS

Apresentamos os nossos sinceros agradecimentos:

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

Ao Dr. Paulo Nóbrega, Diretor Geral do Instituto Biológico, pelo apóio moral e facilidades concedidas quanto a frequência e conclusão do Curso Pós Graduados.

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

Ao Eng. Agr. Armando Guidetti Zagatto, pela colaboração expontânea prestada nos trabalhos de laboratório.

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

À Secção de Virologia do Instituto Agronômico, na pessoa do Eng. Agr. Elliot W. Kitagima, pela execução das fitomicrografias.

Aos Professores C. C. Allison, Eric Balmer, Hasime Tokeshi e Paulo de Campos Torres de Carvalho, pelo auxílio que, direto ou indiretamente nos prestaram no desenvolvimento dêste trabalho.

E finalmente, ao Conselho Nacional de Pesquisas, pela ajuda financeira que nos proporcionou durante o curso.

11. BIBLIOGRAFIA

- Andrade, E. - 1905 - 1906 - Influence of glycerin in defferen  
tiating certain bacteria. Jour.Med.Res.,  
14: 551-556.
- Anônimo - 1954 - "In vitro" studies of phytopatogenic bac-  
teria. Pfizer Internacional Service Co.Inc.  
- Agricultural Sales buletin. September.  
October, 1:15.
- Ark, P.A. - 1949 - Uses of streptomycin in agriculture. In  
"Streptomycin", edited by S.A. Waksman, pp  
607-612. Baltimore, Williams and Wilkins.
- Bergey, D.H. e Outros - 1957 - Bergey's manual of determina-  
tive bacteriology, 7<sup>th</sup> edition. pg.135. The  
Williams & Wilkins Company, Baltimore. USA.
- Bier, O.-1963 - Bacteriologia e imunologia.10ª edição. Edi-  
ções Melhoramentos. 971 pp.
- Bongert, J. -1927 - Bakteriologische diagnostik der tierseu-  
chen. Berlin. 7ª ed. pg. 41-43.
- Bremer, H. e outros - 1947 - Contributions to knowledge of  
the parasitic fungi of Turkey. Rev.Fac.Sci.  
Univ. Instanbul. Ser. B. XIII, 2. 122-172.
- Bryan, A.H. e Charles G.Bryan -1959 -Bacteriology principles  
and practice.Barnes & Noble, Inc.N.York.pg.40.

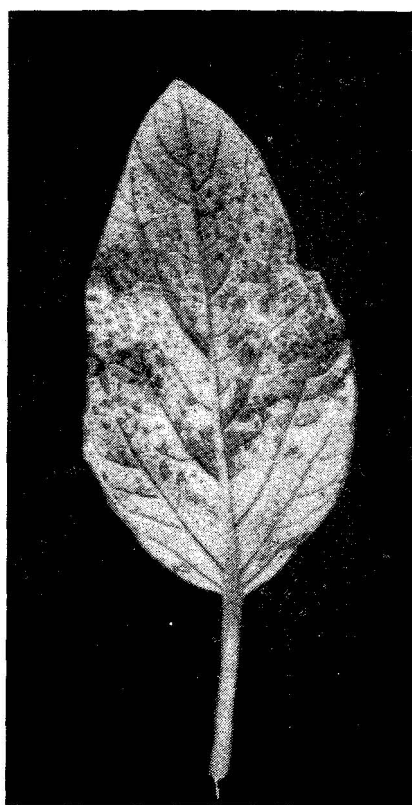
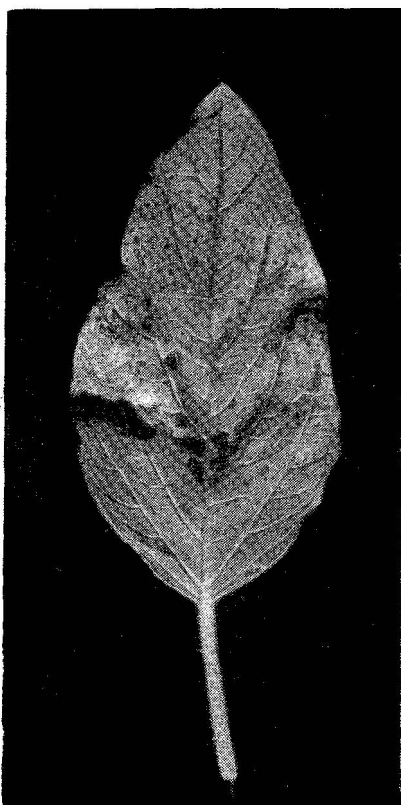
- Bryan, M.K. - 1930 - Studies on bacterial canker of tomato. Journ. Agric. Res., 41: 842-844.
- Burkholder, W.H. e N.P. Starr - 1948 - The generic and specific characters phytopathogenic species of Pseudomonas and Xanthomonas. Phytopath., 38 (1): 494-502.
- Clara, F.M. - 1934 - A comparative study of the green-fluorescent bacterial plant pathogens. Cornell Agr. Exp. Stat. Ithaca. N.Y. p.8.
- Culp, T.W. - 1964 - Pseudomonas sesami in Mississippi. Plant Dis. Repr., 48 (2): 86-87.
- De Candolle, A. - 1912 - Origine des plantes cultivées. 5<sup>a</sup> éd. Paris, F. Alcan., 337-339.
- Cunningham, A. - 1947 - Practical bacteriology, 3 rd. 210pg.
- Difco Laboratórios - 1958 - Difco manual of dehydrated culture. Media and Reagents. Detroit 1. Michigan. 350 pg.
- Dowson, W.J. - 1957 - Plant diseases due to bacteria. Second edition, p.43. University Press, Cambridge.
- Elliott, C. - 1951 - Manual of bacterial plant pathogens. 2<sup>th</sup> edition, pg.87. Waltham Mass. USA.
- Franco do Amaral, J.- 1942 - Doenças bacteriana (Phytomonas) do gergelim. O Biológico, 4: 119.
- \_\_\_\_\_ - 1955 - O isolamento dos germes anaeróbicos. O Biológico, 21: 169-170.

- Holt - Harris J.E. e O. Teague - 1916 - New culture medium for the isolation of bacillus typhons from stools. Journ. Infect. Dis., 18: 596-600.
- Hildebrand, E.M. - 1949 -Sesame seedling blight in Texas. Plant Dis. Repr., 33:331.
- Hiss, P.H. - 1904-1905 - On fermentative and agglutinative characters of bacilli of the "dysentery group". Jour. Med. Res., 13: 1-51.
- Kovacevski, I.C. - 1930 - New investigations of the etiology of "black rot" of sesame. Annuaire Univ. de Sofia Fac.Agron. et Sylvicult.; 455-468.
- Loeffler, F. - 1887 - Die ergebnisse weilterer untersuchungen weber die diphtheric bacillen. Zentralb.,F. Bakt., 2: 105-106.
- Magrou, J. - 1937 - Dictionnaire des bacterias pathogènes. Mason et Cie,Editeurs Paris, pp. 412-413.
- Malkoff, K. - 1904 -Eine bakterienkrankheit auf Sesamum orientale in Bulgarien. Centralblatt, Bakt. Parasit. und Infekt., 11: 333-336.
- \_\_\_\_\_ - 1906 - Weitere untersuchungen über die bakteri enkrankheit auf Sesamum orientale. Centralblatt, Bkt. Parasit. und Infekt.,15: 664-666.
- Mazzani, B. - 1962 -Mejoramiento del anjonjoli en Venezuela. Ministerio del Agricultura Y Cria Centro del Investigaciones Agronomicas. Maracay. Venezue la. 127 pg.

- Poole, D.D. - 1957 - Strain differences in Pseudomonas sesami and the effect of a secondary organism on symptom expression on sesame. *Phytopath.*, 47:27.
- Sabet, K.A. e W.J.Dowson - 1960 - Bacterial leaf spot of sesame (Sesamum orientale L.) *Phytopath. Z.* 37: 252-258.
- Sabouraud, R. - 1893 - Contribution à l'étude de la trichophytie humaine II<sup>e</sup> Memoire. Les trichophytions à grosses spores. *Ann. de Dermat et Wyph.*, 116-149
- Simmons, J.S. - 1926 - A culture medium for differentiating organism of thyphoid colon aerogenes and for isolation of certain fungi. *Jour.Infect Dis.*, 39: 209-214.
- Society of American Bacteriologists - 1957 - Manual of microbiological methods. Mc Graw Hill Book Co. N.Y. 315 pp.
- Tarr, S.A.J. - 1954 - Diseases of economic crops in the Sudan. *F.A.P. Pl. Prot. Bull.*, 11: 161-165.
- Thomas, C.A. - 1959 - Control of pre-emergence damping off and two leaf-spot disease of sesame by field treatment. *Phytop.*, 49: 461-463.

Thomas, C.A. e outros - 1962 - A second pathogenic race of Pseudomonas sesami. Plant Dis. Repr., 46(4): 248-250.

Zachos, D. G. e C. G. Panagopoulos - 1960 - The bacterium Pseudomonas sesami Malkoff in Greece. Ann. Inst. Phytop. Benaki, N. S., 3: 60-64.



Figuras 1 e 2 — *Pseudomonas sesami* — crestamento das fôlhas de gergelim; estágio inicial da infecção nas fôlhas de gergelim, mostrando pequenas manchas aquosas resultantes da inoculação por asperção de uma suspensão do patógeno obtido de pés doentes de gergelim. Figura 1, página inferior. Figura 2, página superior (aprox. X 1) Instituto Biológico.





Figura 3 — Pés de gergelim exibindo sintomas progressivos de secamento a partir da parte apical, produzidos por inoculação por encharcamento de *Pseudomonas sesami*, nas folhas próximas ao brôto terminal. O inóculo proveio de um segundo reisolamento originário de pés com infecção natural (aprox. X 1/25).  
Instituto Biológico.

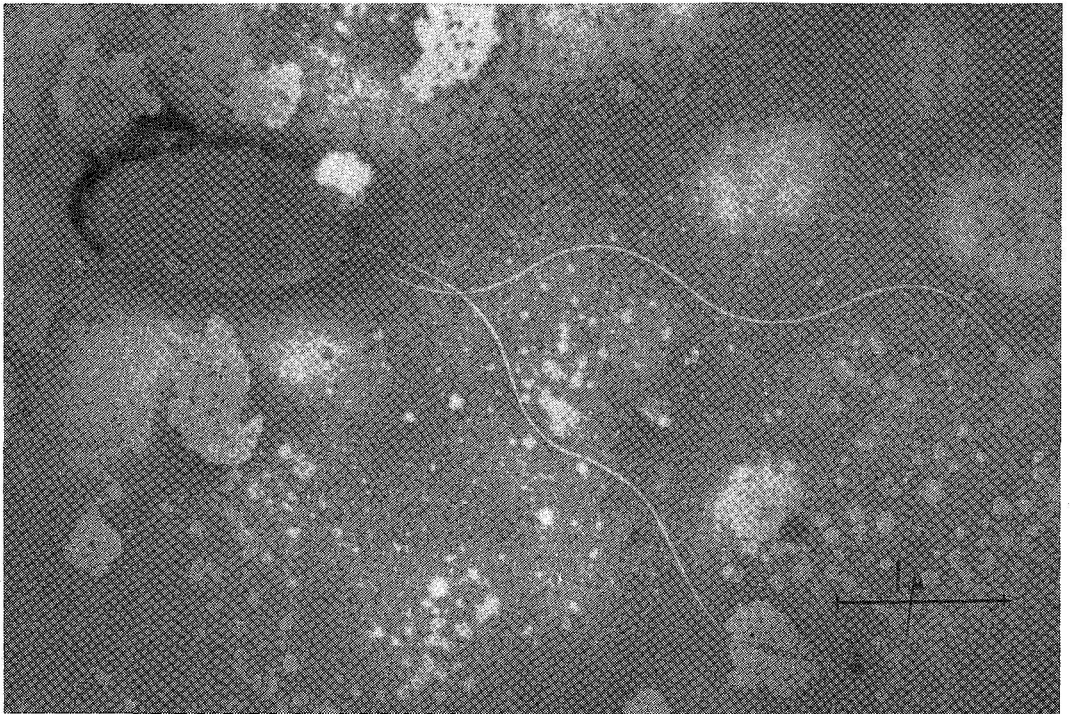


Figura 4 — Fotomicrografia eletrônica de *Pseudomonas sesami*, obtida em microscópio eletrônico Siemens Elmiskop I. Bactéria sem tratamento, simplesmente transferida do meio de cultura ágar simples para a telinha porta objeto, coberta com parlódion, e depois recebendo o corante. Aumento de 32.000 X. Secção de Virologia do Instituto Agrônomo de Campinas.



Figura 5 — Fotomicrografia eletrônica de *Pseudomonas sesami*, obtida em microscópio eletrônico Siemens Elmiskop I. 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 de 32.000 X. Secção de Virologia do Instituto Agronômico de Campinas.

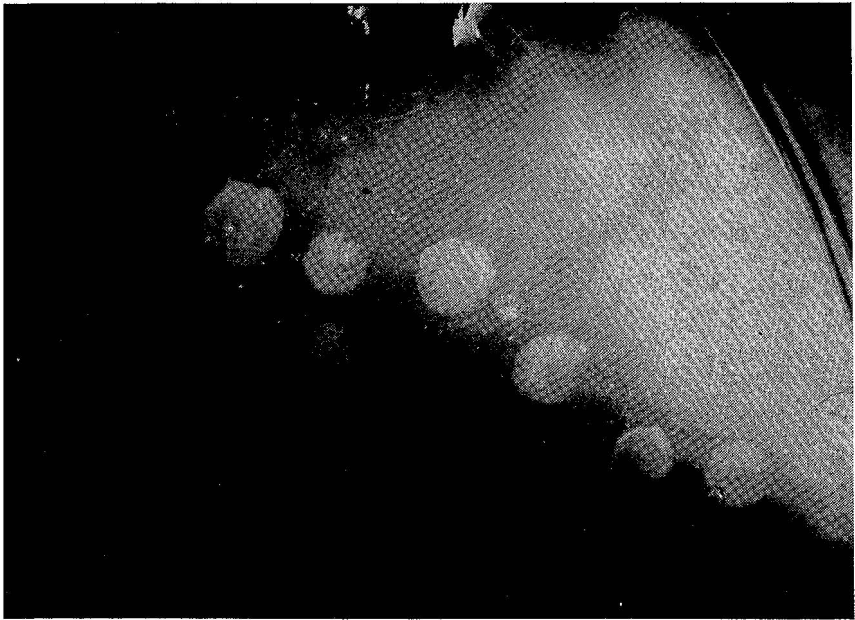


Figura 6 — Colônias típicas de *Pseudomonas sesami*, obtidas por diluição de uma suspensão bacteriana em ágar simples. Aumento de 3 X.  
Instituto Biológico.