

MARIA RAQUEL SILVA

**COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS SEMI-SELETIVOS
PARA A DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2002

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

S586c
2002

Silva, Maria Raquel, 1976-

Comparação da eficiência de meios semi-seletivos para
detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em
sementes de feijoeiro / Maria Raquel Silva. – Viçosa :
UFV, 2002.
58 p. : il.

Orientador: José Rogério de Oliveira
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de
Viçosa

1. Crestamento bacteriano comum. 2. *Xanthomonas
axonopodis* patovar *phaseoli* – Detecção – Cultura e meios
de cultura. 3. *Xanthomonas axonopodis* patovar *phaseoli* –
Resistência a antibióticos. 4. *Xanthomonas campestris*
patovar *phaseoli*. 5. Feijão – Doenças e pragas. I. Univer-
sidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 19.ed. 635.65932

CDD 20.ed. 635932

MARIA RAQUEL SILVA

**COMPARAÇÃO DA EFICIÊNCIA DE MEIOS SEMI-SELETIVOS
PARA A DETECÇÃO DE *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*
EM SEMENTES DE FEIJOEIRO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Fitopatologia, para obtenção do título de *Magister Scientiae*.

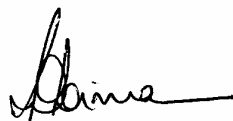
APROVADA: 2 de abril de 2002.



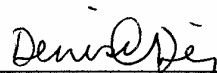
Prof. Reginaldo da Silva Romeiro
(Conselheiro)



Prof. Onkar Dev Dhingra
(Conselheiro)



Profª Rosângela D'Arc de L.Oliveira



Profª Denise C. F. dos Santos Dias



Prof. José Rogério de Oliveira
(Orientador)

A meus amados pais, Antônio Rafael e Hildebranda.

Aos meus queridos irmãos e amigos.

A Deus.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Fitopatologia, pela oportunidade de realização deste curso que muito contribuiu para minha formação profissional.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo provimento de recursos que permitiram o financiamento do projeto.

Ao Professor José Rogério de Oliveira, orientador e amigo, pelo interesse e incentivo, pela compreensão, serenidade e pelos conhecimentos transmitidos desde o princípio.

Ao Professor Reginaldo da Silva Romeiro, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e pelas valiosas sugestões para aperfeiçoamento do manuscrito.

Ao Professor Onkar Dev Dhingra, pelo estímulo e pela prontidão e seriedade com que sempre me atendeu.

À Professora Rosângela D'Arc de Lima Oliveira, pela compreensão e pelas preciosas contribuições para o engrandecimento do trabalho.

À Professora Denise C. F. dos Santos Dias, pelas sugestões apresentadas, pela atenção e colaboração demonstradas.

Aos pesquisadores que colaboraram com o envio de isolados bacterianos para execução da pesquisa.

À Maria Sueli de Oliveira Cardoso, pela amizade, pelo apoio e pelas sugestões na execução técnica deste trabalho.

Aos Professores do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, pelos ensinamentos.

À turma de Mestrado de 2000 (Alexandre, Cléia, Dagoberto, Dirceu, Eduardo, Márcio Suzuki e Renato) e aos colegas de departamento, pelo agradável convívio. Em especial, a José Luciano, Bernardo, Ivanete e Dagoberto, pela amizade, compreensão e auxílio no desenvolvimento do trabalho.

A meus pais, Antônio Rafael e Hildebranda, pelo referencial de dedicação, honestidade e perseverança, pelo carinho e apoio constantes e por estarem sempre presentes.

Aos meus irmãos José Renato, Ana Lúcia e Rafael e ao meu cunhado José Victor, pela torcida e pelo incentivo em todos os momentos.

A todos de minha família e aos amigos que manifestaram seu apoio através de palavras, gestos e orações.

A Deus, princípio e fim de todas as coisas, pelo dom da vida, pela força e coragem, pelas oportunidades e por Seu amor incondicional.

BIOGRAFIA

MARIA RAQUEL SILVA, filha de Antônio Rafael da Silva e Hildebranda Lucrécia da Silva, nasceu na cidade de Uberaba, Estado de Minas Gerais, no dia 18 de novembro de 1976.

Em janeiro de 2000, graduou-se em Agronomia pela Universidade Federal de Viçosa e, em 2002, concluiu o curso de Mestrado em Fitopatologia pela mesma instituição.

CONTEÚDO

	Página
RESUMO	ix
ABSTRACT	xi
1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro.....	3
2.2. Sintomas da doença	4
2.3. Etiologia e taxonomia.....	5
2.4. Epidemiologia	6
2.5. Detecção de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em sementes de feijoeiro.....	10
2.6. Meios semi-seletivos	15
3. MATERIAL E MÉTODOS	18
3.1. Local e época de realização da pesquisa.....	18
3.2. Origem e cultivo dos isolados de <i>X. axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> ...	18
3.3. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados.....	20
3.4. Preservação dos isolados.....	20
3.4.1. Preservação em óleo mineral	20
3.4.2. Repicagem tubo-a-tubo	21

	Página
3.5. Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a diferentes substâncias antimicrobianas	21
3.5.1. Antibiograma qualitativo	21
3.6. Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a diferentes concentrações de algumas substâncias antimicrobianas selecionadas	21
3.7. Crescimento dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meios semi-seletivos.....	23
3.8. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos.....	24
3.9. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos	25
4. RESULTADOS	27
4.1. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados.....	27
4.2. Sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a diferentes substâncias antimicrobianas	27
4.3. Sensibilidade de isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a diferentes concentrações de algumas substâncias antimicrobianas selecionadas	29
4.4. Crescimento dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meios semi-seletivos.....	30
4.5. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos.....	30
4.6. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos.....	33
5. DISCUSSÃO	35
5.1. Sensibilidade dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> a diferentes substâncias antimicrobianas	35
5.2. Crescimento dos isolados de <i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> em meios semi-seletivos.....	37
5.3. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos.....	37
5.4. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos.....	39
6. RESUMO E CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43

	Página
APÊNDICES	50
APÊNDICE A	51
APÊNDICE B	53

RESUMO

SILVA, Maria Raquel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2002.
Comparação da eficiência de meios semi-seletivos para a detecção de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro.
Orientador: José Rogério de Oliveira. Conselheiros: Reginaldo da Silva Romeiro e Onkar Dev Dhingra.

Sete meios semi-seletivos foram avaliados quanto à sua eficácia em permitir o crescimento de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e suprimir o crescimento de contaminantes, objetivando selecionar um meio para utilização na rotina de laboratório. Foram utilizados 48 isolados da bactéria, provenientes de diferentes regiões do Brasil. Todos os meios semi-seletivos apresentaram boa eficiência em permitir o crescimento da bactéria quando preparados sem a adição dos compostos antimicrobianos presentes em suas composições originais. Quando da adição desses compostos aos meios, apenas o meio MXP modificado (M-MXP) não foi eficiente na recuperação da bactéria. Através de antibiogramas qualitativo e quantitativo respectivamente, os isolados do patógeno foram expostos a 43 compostos antimicrobianos, em diferentes concentrações. Foram selecionados sete compostos aos quais todos os isolados se mostraram insensíveis. Quatro destes compostos foram adicionados separadamente e em conjunto ao meio padrão (meio 523), em

diferentes concentrações, e permitiram o crescimento de todos os isolados. Os meios semi-seletivos foram testados quanto à sua repressividade, utilizando-se, para tal, seis isolados representativos do total. Verificou-se que houve uma variação muito grande no valor do índice de repressão (IR) dos meios para cada isolado. Em alguns casos, os meios semi-seletivos permitiram maior desenvolvimento da bactéria que o meio padrão. Avaliando-se a supressividade, todos os meios semi-seletivos foram mais eficientes que o meio padrão em suprimir o crescimento de contaminantes associados a sementes de feijão nas duas amostras testadas.

ABSTRACT

SILVA, Maria Raquel, M.S., Universidade Federal de Viçosa, April, 2002.
Comparison of the efficiency of semi-selective media for the detection of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* in bean seeds. Advisor: José Rogério de Oliveira. Committee Members: Reginaldo da Silva Romeiro and Onkar Dev Dhingra.

Seven semi-selective media were evaluated for their efficiency to allow the growth of *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* isolates and suppress the growth of contaminants, to select a medium for use in laboratory routine tests. Forty-eight isolates of the bacterium, collected from distinct geographic regions of Brazil, were used. All semi-selective media permitted the growth of all isolates when prepared without the antimicrobial compounds presented on their original formula. When these compounds were added to the media, only the modified MXP did not permitted growth. Using qualitative or quantitative antibiograms, the isolates were exposed to forty-three different antimicrobial compounds and in different concentrations. Seven of these compounds to which the isolates showed insensibility were selected. Four of these compounds were added separately or together to the standard (523 medium), in different concentrations, and tested for growth of all the isolates. The semi-selective media were tested for their repression, using six representative

isolates. There was a very high variation in repressing index value of the different media for each isolate. In some cases, the semi-selective media allowed more growth of the bacteria than the standard medium. Evaluating the suppression, all semi-selective media were found to be more efficient than the standard medium for suppressing the growth of contaminants associated with two bean seed samples.

1. INTRODUÇÃO

O crestamento bacteriano comum (CBC), causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 é considerada a principal doença bacteriana da cultura do feijoeiro no Brasil (MARINGONI et al., 1994). Sementes contaminadas são o principal veículo de disseminação da bactéria e de sua introdução em áreas livres da doença (SAETTLER et al., 1989). Portanto, uma das medidas mais eficazes no controle do CBC é a utilização de sementes livres do patógeno.

A escolha do método de detecção depende da sua eficiência na recuperação do patógeno alvo, bem como de sua reprodutibilidade e da disponibilidade de tempo e material necessário para a realização do mesmo, além de mão-de-obra treinada e do custo. Alguns deles demandam longo período de tempo para serem concluídos, enquanto outros necessitam de material e equipamentos caros, nem sempre disponíveis na maioria dos laboratórios.

Duas metodologias básicas – a direta e a indireta – podem ser usadas na detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e outras partes propagativas de plantas (SAETTLER et al., 1989). Os métodos diretos são aqueles em que o patógeno é detectado sem um processo de extração, como, por exemplo, a inspeção visual das sementes (VALARINI, 1990) e o teste de crescimento

(VALARINI, 1990). Nos métodos indiretos, faz-se a extração da bactéria alvo para posterior detecção, podendo-se dividi-los em viáveis e não-viáveis. Os métodos viáveis envolvem a inoculação em plantas hospedeiras de um extrato de sementes, o qual pode conter o patógeno, ou no isolamento do patógeno alvo em um meio de cultura. Dentre estes estão o isolamento direto (SAETTLER et al., 1989), o isolamento indireto (VALARINI, 1990), a inoculação em plantas indicadoras (WALLEN & SUTTON, 1965) e a utilização de meios seletivos e semi-seletivos (SCHAAD, 1988). Já os procedimentos não-viáveis se referem à identificação do organismo no extrato, sendo que esse organismo não precisa estar vivo, pois a identificação é baseada em reações químicas. Neste caso, pode-se fazer uso de bacteriófagos, técnicas sorológicas e testes de DNA.

Os meios semi-seletivos são meios de cultura que têm como finalidade permitir o crescimento de determinados microrganismos em detrimento de contaminantes. Os meios semi-seletivos são mais fáceis de serem desenvolvidos do que os meios seletivos, uma vez que é muito difícil suprimir completamente o crescimento de microrganismos contaminantes, especialmente outras bactérias. Os meios seletivos e semi-seletivos constituem uma alternativa viável para a detecção de patógenos em sementes, uma vez que têm mostrado boa eficiência na recuperação desses microrganismos, são de fácil preparo e armazenáveis por longo tempo. Além disso, é uma metodologia de baixo custo e que demanda pouco espaço físico em laboratório. Diversos meios semi-seletivos têm sido desenvolvidos visando à detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro.

O presente trabalho teve como objetivo comparar a eficiência de diferentes meios semi-seletivos utilizados para a detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, de forma a se verificar qual, ou quais, seriam os meios adequados para utilização na rotina de laboratório.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Crestamento bacteriano comum do feijoeiro

O feijoeiro pode ser atacado por diversos fungos, bactérias, nematóides e vírus. Como, nos últimos anos, a cultura do feijão passou também a ser cultivada em grandes áreas irrigadas, muitas doenças consideradas de menor importância têm ocorrido com alta intensidade (DO VALLE & ZAMBOLIN, 1997), dentre elas o crestamento bacteriano comum (CBC).

O CBC é considerado a principal doença bacteriana da cultura do feijoeiro no Brasil (MARINGONI et al., 1994) e uma das principais no mundo. Há relatos de perdas de 38-40% na produção (AUDY et al., 1994).

O CBC está amplamente distribuído, podendo ser encontrado em quase todas as regiões brasileiras produtoras de feijão, geralmente com maior ocorrência na safra das águas (VALARINI et al., 1996) ou em cultivos sob irrigação. No entanto, há relatos de que os sintomas da doença também podem ser observados durante épocas secas (CLAFLIN, 1987; MABAGALA, 1997). Além do Brasil, essa doença causa perdas consideráveis de grãos na Argentina, Austrália, Canadá, Colômbia, Chile, Estados Unidos, Nova Zelândia, Porto Rico, Venezuela, e também em alguns países na África e na Europa (BURKHOLDER, 1921; VELÁSQUEZ & TRUJILLO, 1984; COPELAND et al., 1975).

2.2. Sintomas da doença

Os sintomas do CBC ocorrem na parte aérea da planta, podendo ser encontrados nas folhas, caules, vagens e sementes (OLIVEIRA & SOUZA, 1997). Inicialmente, os sintomas foliares aparecem como pequenas manchas aquosas. Com o desenvolvimento, as lesões crescem irregularmente e se tornam marrons, com aspecto de queimadura ou crestamento, circundados por estreito bordo amarelo. Frequentemente, as lesões adjacentes coalescem tomando grandes áreas do tecido foliar. O desfolhamento pode ocorrer quando o ataque é severo (OLIVEIRA & SOUZA, 1997). No caule, as lesões começam como manchas ou estrias úmidas, que aumentam gradualmente de tamanho, adquirindo coloração avermelhada. Podem ocorrer rachaduras na superfície das lesões, com o acúmulo de exsudato bacteriano (ZAUMEYER & THOMAS, 1957). Segundo JIAO et al. (1996), folhas de feijoeiro inoculadas com o patógeno apresentaram, 14 dias após a inoculação, uma redução da fotossíntese e da exportação de assimilados de 25 e 50% respectivamente, embora apenas 7-10% da área total medida estivesse necrosada.

Nas vagens, podem ser observadas manchas com encharcamento, as quais gradualmente aumentam em diâmetro, dando origem a lesões irregulares, cobertas pelo exsudato bacteriano. À medida que as lesões envelhecem, o tecido afetado perde a aparência de encharcamento, tornando-se seco, deprimido e de coloração avermelhada. As sementes infectadas podem apresentar descoloração no hilo e massas de células nessa mesma região. Variedades com certo nível de resistência à doença podem produzir sementes assintomáticas, mas contendo grande quantidade do patógeno (MABAGALA, 1997).

No período reprodutivo das plantas, foram observadas lesões translúcidas em flores e pétalas de variedades altamente suscetíveis, especialmente em épocas de clima seco e ensolarado, e de onde foi possível isolar o patógeno (MABAGALA, 1997).

Em inspeções de campo, a bactéria pode estar presente e as plantas não apresentarem sintomas, devido à condição ambiental desfavorável ao seu desenvolvimento (OLIVEIRA & SOUZA, 1997). Sintomas observados na maturidade da cultura podem ser confundidos com outros eventos como seca, danos químicos, problemas fisiológicos e outras doenças das vagens e das folhas (CLAFLIN et al., 1987; OLIVEIRA & SOUZA, 1997).

2.3. Etiologia e taxonomia

O CBC, causado por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Smith, 1897) Vauterin, Hoste, Kersters & Swings 1995 foi constatado pela primeira vez no Brasil em 1938, no Estado do Pará, por Caldeira e Travassos Vieira, e o patógeno foi descrito por Robbs (1954) em material proveniente do Estado do Rio de Janeiro (OLIVEIRA & SOUZA, 1997). Em 1965 foi descrita, no Estado de São Paulo, a variante *fuscans* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (NAKAMURA & KIMATI, 1967; PARADELA FILHO et al., 1967), causadora do crestamento bacteriano fosco. O termo *fuscans* é considerado oficialmente não válido por não estar em conformidade com o Código Internacional de Nomenclatura de Bactérias (YOUNG et al., 1996; ISPP, 2002), embora seja usado como caráter diferenciador em trabalhos de rotina. *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* apresentam similaridades quanto às características morfológicas, fisiológicas e patogênicas. No campo, não é possível distinguir com precisão os dois tipos de crestamento. Em condições de laboratório, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* diferencia-se por produzir um pigmento escuro em meio de cultura, o que não é observado para *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (MARINGONI et al., 1994). *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* são freqüentemente consideradas como um único patógeno e como tal são tratados em termos de diagnose e detecção (TOTH et al., 1998).

Desde 1980, têm sido propostas várias mudanças relacionadas à nomenclatura e taxonomia do gênero *Xanthomonas*. A proposta mais abrangente para a reclassificação de *Xanthomonas* foi feita por VAUTERIN et al. (1995), com base na utilização de fontes de C e N, perfil de ácidos graxos e homologia DNA/DNA. De acordo com essa proposta, o gênero passaria a ter vinte e uma espécies e vários patovares de *X. campestris* seriam reclassificados como patovares de *X. axonopodis*. SCHAAD et al. (2000) avaliaram a proposta e questionaram essa mudança de nomes. Segundo esses autores, as propostas apresentadas não estão baseadas em dados ou critérios consistentes (TAKATSU, 2000).

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* apresenta a forma de bastonete reto, isolado, medindo 0,4-0,7 x 0,7-1,8 µm, com apenas um flagelo polar. É Gram-negativa, aeróbica, catalase positiva e incapaz de utilizar asparagina como única fonte de carbono e nitrogênio (SCHAAD, 2001). Essa bactéria é fraca produtora de ácidos a partir de carboidratos. As colônias são mucóides e convexas. Produz pigmentos chamados xantomonadinas, que fornecem a coloração amarela das colônias. Esses pigmentos são insolúveis em água, mas solúveis em éter de petróleo, metanol e benzeno. Em espectrofotômetro, apresentam uma curva característica com um pico (441 nm) e dois ombros (420 nm e 468 nm de comprimento de onda) (SCHAAD, 2001).

2.4. Epidemiologia

Para penetrar em um hospedeiro, bactérias fitopatogênicas necessitam de aberturas naturais ou ferimentos, uma vez que não possuem mecanismos para penetração ativa.

Embora plantas com sintomas de CBC tenham sido observadas em épocas secas, as condições ambientais favoráveis à doença são temperaturas elevadas (em torno de 28-30°C) e alta umidade, seja decorrente de água de chuva, irrigação ou condensação (orvalho) (BURKHOLDER, 1921; SUTTON & WALLEN, 1970; WEBSTER et al., 1983). Por ser uma cultura produzida

praticamente durante todo o ano no Brasil e somando-se as condições ideais fornecidas para a produção em larga escala, é previsível o surgimento de epidemias da doença no campo (COPELAND et al., 1975; DO VALE & ZAMBOLIM, 1997; WALKER & PATEL, 1964).

Para muitos patógenos, entre eles *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, sementes contaminadas funcionam como a principal fonte de inóculo primário, sendo responsáveis pela sua disseminação a longas distâncias e a sua introdução em áreas antes isentas (SAETTLER et al., 1989). Segundo NEERGAARD (1977), esse patógeno bacteriano pode sobreviver por quinze anos em sementes de feijão. A infecção por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode reduzir o peso e a germinação das sementes (VALARINI et al., 1992), afetando a emergência (VALARINI et al., 1996) e produzindo sintomas em toda a planta.

A infecção por *X. axonopodis* pv. *phaseoli* tem caráter sistêmico, bastante pronunciado nos genótipos mais suscetíveis. Uma vez ocorrida a infecção nas plantas, o patógeno tem a habilidade de entrar nas vagens através do sistema vascular e infectar as sementes, mesmo sem causar lesões na parte externa das vagens (MABAGALA, 1997). A bactéria se estabelece não só na superfície, mas também internamente às sementes, sendo ambas importantes para o desenvolvimento da doença (BURKHOLDER, 1921; MARINGONI et al., 1994; VALARINI et al., 1996). ARCILA & TRUJILLO (1990) conseguiram isolar o patógeno a partir de sementes cuja superfície foi desinfetada antes do isolamento. Essas sementes se tornam a maneira mais eficiente de distribuição de inóculo primário no campo e constituem também um problema para os cultivos subseqüentes (IRWIN, 1987; CLAFLIN, 1987; COPELAND et al., 1975; MABAGALA, 1997).

A infecção da vagem freqüentemente ocorre nos elementos vasculares da sutura dorsal, alcançando as sementes geralmente através do funículo. Quando a infecção ocorre durante a formação da vagem e da semente, esta última pode apodrecer ou ficar enrugada. Se as bactérias penetram através do funículo, somente o hilo pode apresentar descoloração, que é amarelada em

sementes brancas (MABAGALA, 1997) e difícil de ser observada em sementes escuras (NEERGARD, 1977).

SUTTON & WALLEN (1970) relatam que uma semente infectada com *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em 10 mil é suficiente para resultar numa epidemia da doença no campo. Segundo OLIVEIRA & SOUZA (1997), uma das práticas culturais mais importantes no controle do CBC é a utilização de sementes livres do patógeno. VALARINI et al. (1996) observaram uma crescente incidência dessa doença em plantas, no campo, à medida que o nível de infecção na semente foi aumentando. Esses mesmos autores concluíram que, a taxa de transmissão do patógeno via sementes é alta, variando de 16 a 50,8%, em função da suscetibilidade da cultivar empregada. Geralmente, áreas plantadas com sementes comprovadamente sadias não apresentam problemas com a doença (WEBSTER et al., 1983). Logo, em muitas regiões onde o crestamento bacteriano é problema, procura-se utilizar sementes produzidas em áreas livres do patógeno, onde condições climáticas não favoreçam o desenvolvimento do CBC (COPELAND et al., 1975).

Outro fator que contribui muito para o desenvolvimento da doença é a introdução de novas variedades de feijão, as quais possuem excelentes características agronômicas, porém, podem apresentar-se suscetíveis à doença (SUTTON & WALLEN 1970; WEBSTER et al., 1983). Segundo SUTTON & WALLEN (1970), a utilização extensiva de certas variedades pode gerar um desequilíbrio na microbiota naturalmente presente numa área e provocar o aparecimento de novas variantes do patógeno, como a variante *fuscans*, causadora do crestamento bacteriano fosco, detectada em plantas suscetíveis.

A folhagem e os ramos de variedades consideradas “resistentes” são capazes de abrigar altas populações do patógeno sem apresentar sintomas, os quais se desenvolvem tardiamente. Os tecidos reprodutivos dessas cultivares apresentam, geralmente, menor quantidade do patógeno em relação às variedades suscetíveis. Ainda assim, não é seguro usar sementes provenientes dessas cultivares e que tenham sido produzidas em áreas infestadas (MABAGALA, 1997). Ao contrário das sementes de variedades suscetíveis,

que têm sua taxa de emergência reduzida devido à infecção (VALARINI et al., 1996), as sementes de cultivares “tolerantes” germinam e dão origem a plantas “sadias”, o que aumenta os riscos de desenvolvimento de uma epidemia de crestamento bacteriano comum posteriormente (MABAGALA, 1997). VALARINI et al. (1996) consideram que, para se determinar se uma variedade é tolerante ao CBC, é necessário conhecer os níveis de resistência que as cultivares apresentam, sob condições climáticas do local de sua utilização para que os índices de sanidade nas sementes sejam determinados.

Xanthomonas axonopodis pv. *phaseoli* pode sobreviver em restos de cultura infectados, os quais servem como fonte de inóculo de um ano para outro. COPELAND et al. (1975) afirmam que esse patógeno, quando presente em um campo de cultivo, pode sobreviver em restos culturais por pelo menos dez meses. A bactéria sobrevive melhor em restos mantidos à superfície do solo do que naqueles enterrados a 10-20 cm de profundidade (SCHUSTER & COYNE, 1977).

Dentro da área de cultivo, a disseminação pode ocorrer por meio de vetores ativos e passivos, como animais, maquinário, água de irrigação, outras espécies de plantas e o homem (CLAFLIN et al., 1987). VALARINI et al. (1996) observaram experimentalmente que, plantas originadas de sementes saudáveis apresentaram sintomas de CBC, fato atribuído à infecção cruzada, ou seja, à disseminação do patógeno de plantas doentes cultivadas em proximidade às plantas saudáveis.

O patógeno apresenta uma ampla gama de hospedeiros dentre os quais pode-se citar: *Phaseolus vulgaris* (feijão comum), *P. coccineus*, *P. mungo*, *P. aureus*, *P. acutifolius*, *P. aconitifolius*, *P. angularis*, *Lablab niger*, *L. purpureus*, *Strophostyles helvola*, *Glycine max* (soja), *Stizolobium deeringianum*, *Lupinus polyphyllus*, *Vigna sinensis*, *V. unguiculata*, *V. radiata*, *V. aconitifolia*, *V. angularis* e *Mucuna deeringiana* (BRADBURY, 1986; VAKILI et al., 1975; ZAUMEYER & THOMAS, 1957).

Algumas medidas podem ser adotadas para limitar o avanço da doença, além do uso de sementes certificadas, como a rotação de culturas e o uso de

variedades alternativas (com pequena relação genética entre si) em plantios sucessivos ou em diferentes campos de cultivo na mesma época de plantio (COPELAND et al., 1975). Estes mesmos autores recomendam que se realize o plantio de áreas adjacentes em diferentes datas, para que não se atinja o estágio ótimo de desenvolvimento da doença na mesma época, evitando sua disseminação. Entretanto, no caso de doenças bacterianas, essa prática tem sido condenada, pois lavouras novas contaminam-se rapidamente quando próximas a lavouras velhas já doentes (LOPES & QUEZADO-SOARES, 1997). Outras recomendações incluem o isolamento da cultura, o uso de sementes de qualidade, o tratamento químico das sementes, a eliminação de restos de cultura, a eliminação de plantas invasoras hospedeiras do patógeno, evitar o trânsito dentro da cultura e a utilização de variedades resistentes (RAVA & SARTORATO, 1994).

2.5. Detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro

Para se conhecer a sanidade das sementes é necessário que se façam inspeções de campo e, também, análises em laboratório (VALARINI, 1990). É por meio dessas análises que se pode ter mais segurança quanto à presença ou não de patógenos, tanto interna quanto externamente às sementes. AUDY et al. (1994) afirmam que o sucesso de programas de melhoramento e de certificação de sementes para o CBC depende da disponibilidade de métodos seguros para a detecção do patógeno em tecidos de feijoeiro, inclusive em sementes. Segundo SAETTLER et al. (1989), duas metodologias básicas - a direta e a indireta - podem ser usadas na detecção de bactérias fitopatogênicas em sementes e outras partes propagativas da planta. Os métodos diretos são aqueles em que o patógeno é detectado sem envolver qualquer processo de extração. Os métodos indiretos envolvem a extração do patógeno para posterior detecção e podem ser divididos em viáveis e não-viáveis. Os viáveis requerem a extração do patógeno das sementes e sua inoculação em plantas hospedeiras ou o isolamento do patógeno alvo em um meio de cultura. Já os procedimentos não-viáveis se referem à identificação do organismo no extrato,

sendo que esse organismo não precisa estar vivo, pois a identificação é baseada em reações químicas. Esses últimos são mais rápidos e mais baratos que os métodos viáveis (SAETTLER et al., 1989), mas apresentam a desvantagem de detectar o patógeno mesmo quando este estiver morto, fato que pode contribuir para a ocorrência de resultados falso-positivos.

Para a detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro, os seguintes métodos têm sido utilizados: inspeção visual de sementes, uso de bacteriófagos, testes de crescimento, inoculação de plantas indicadoras, isolamento direto ou indireto em meios semi-seletivos, técnicas sorológicas e testes de DNA (CLAFLIN et al., 1987; IRWIN, 1987; SAETTLER, 1989; VALARINI, 1990; VALARINI, 1996; VELASQUEZ & TRUJILLO, 1984).

A inspeção visual das sementes é feita juntamente com a análise de pureza e consiste na observação das mesmas em microscópio estereoscópico (VALARINI, 1990). Sementes contaminadas com o patógeno apresentam descoloração no hilo ou massa de células nessa mesma região. É um método rápido e que utiliza equipamentos simples, porém, muito passível de falhas, uma vez que o patógeno pode estar presente na semente sem que haja sintomas visíveis. Além disso, não fornece informações quanto à viabilidade do inóculo.

O uso de bacteriófagos consiste em colocar em contato uma suspensão de fagos de concentração determinada e macerados de sementes (ou mesmo sementes inteiras) em meio líquido, por determinado período de tempo. A suspensão é, então, filtrada e espalhada em placas com camadas de ágar semeadas com a bactéria indicadora. Observam-se as placas de lise para a contagem de fagos, sendo que um aumento de 100x nessa contagem indica a presença de patógenos na amostra (VALARINI, 1990). Essa técnica é bastante sensível, detectando infecções de 0,01% em sementes de feijoeiro (MALIN, 1983, citada por VALARINI, 1990), além de utilizar equipamentos simples e da possibilidade de analisar diversas amostras ao mesmo tempo. Entretanto, é limitada pela dificuldade de se encontrar bacteriófagos específicos para as bactérias a serem analisadas, além da presença de grande número de

organismos saprófitas afetando a sensibilidade do teste (EDNIE & NEEDHAM, 1973 e LUCCA FILHO, 1987, citados por VALARINI, 1990).

O teste de crescimento (“growing-on test”) consiste em permitir o crescimento de plantas originadas de sementes com suspeita de contaminação. As plantas são cultivadas em substrato estéril e observa-se o aparecimento ou não de sintomas do CBC. Por meio dessa técnica é possível verificar a transmissão da bactéria via semente (VALARINI, 1990), mas não é adequado para a avaliação de um grande número de amostras, uma vez que demanda muito espaço em casas de vegetação. Além disso, pode haver dificuldades na avaliação dos sintomas pela presença de outros patógenos (SCHAAD, 1987; RODRIGUES NETO, 1988; citados por VALARINI, 1990). Para inspeções quarentenárias, esse teste é fundamental (VALARINI, 1990).

O método de inoculação em plantas indicadoras é simples e potencialmente viável para testes de rotina, além de ter baixo custo e não exigir equipamentos nem treinamento sofisticados. As plantas indicadoras são altamente sensíveis ao patógeno e mostram sintomas da doença rapidamente após terem sido inoculadas. Geralmente o inóculo consiste de culturas isoladas em meios artificiais ou suspensão obtida por imersão de sementes, com ou sem assepsia, em água destilada esterilizada ou meios líquidos, sob condições variadas (VALARINI, 1990). WALLEN & SUTTON (1965) confirmaram o aparecimento da variante *fuscans* de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no Canadá utilizando a inoculação em plantas indicadoras. Porém, esse método pode apresentar alguns problemas como o aparecimento de sintomas atípicos, a demanda de espaço em casas de vegetação, além de necessitar de uma concentração mínima de 10^3 ou 10^4 células bacterianas/mL para a produção dos sintomas (VALARINI, 1990).

O isolamento do patógeno em meios semi-seletivos pode ocorrer de forma direta ou indireta. No isolamento direto, sementes desinfetadas superficialmente são depositadas em um meio semi-seletivo (SAETTLER et al., 1989) e, após um período de incubação, observa-se o crescimento de colônias da bactéria alvo. No isolamento indireto, as sementes são moídas ou

incubadas inteiras em água. Essa suspensão é, então, diluída e transferida para placas de Petri, contendo um meio semi-seletivo.

Dentre as técnicas sorológicas utilizadas para a detecção de bactérias em sementes estão a aglutinação em lâminas ou placas (chamada microprecipitina), a imunodifusão em gel-de-ágar, imunofluorescência, ELISA e “imuno-dot blot”. As duas primeiras são mais simples e as três últimas mais sofisticadas (VALARINI, 1990). A microprecipitina em placas consiste em colocar em contato quantidades definidas da suspensão bacteriana e do antissoro em placas de Petri e, após algumas horas, observar sob microscópio estereoscópico a formação ou não de um precipitado. Na técnica de imunodifusão em gel-de-ágar de Ouchterlony (ou dupla difusão) são feitos orifícios no ágar vertido em placas de Petri, sendo aí depositados a suspensão bacteriana e o anti-soro. Ocorre migração de substâncias através do ágar e estas, ao se encontrarem, formam ou não linhas de precipitação (KIMATI, 1975, citado por VALARINI, 1990). A imunofluorescência (IF) tem como princípio de funcionamento a marcação dos anticorpos com uma substância fluorescente. O anticorpo é, então, conjugado com a bactéria e pode ser visualizado ao microscópio (equipado com lâmpada ultravioleta mercurial de alta pressão e com filtros) como um halo fluorescente que envolve a célula. A IF pode ser direta ou indireta. Na primeira, uma substância fluorescente é conjugada diretamente com o anticorpo de coelhos e estes se ligam à célula bacteriana. No segundo processo, anticorpos de coelho envolvem as células bacterianas e são utilizados anticorpos de ovelhas (ou outro animal), conjugados com substâncias fluorescentes, para reagir com as imunoglobulinas de coelhos e produzir o halo fluorescente visível ao microscópio de fluorescência. A quantidade de fluorescência é proporcional à população da bactéria presente nas sementes. O teste de ELISA (“enzyme-linked immunosorbent assay”) é semelhante à imunofluorescência. Nesse caso, uma enzima funciona como marcador e o antissoro é conjugado a essa enzima, formando um complexo. Essa reação é específica e, quanto maior a quantidade de enzima-anticorpo fixado, mais intensa é a coloração observada

na placa de poliestireno que contém a proteína (VALARINI, 1990). Malin et al. (1985), citada por VALARINI (1990), utilizando a técnica de ELISA competitiva na identificação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, obtiveram reações cruzadas significativas para diversas bactérias não alvo como *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*, entre outras. O teste de “imuno-dot blot” tem o mesmo princípio do teste de ELISA, substituindo-se as placas de poliestireno por membranas de nitrocelulose. Essa técnica foi utilizada para a detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro (OLIVEIRA, 1995) e de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (Malin, 1985, citada por VALARINI, 1990). Estes últimos consideraram o método bastante específico, mas incapaz de detectar baixos níveis de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* diretamente do extrato de sementes de feijoeiro, com sensibilidade de aproximadamente 10^5 CFU/mL, o mesmo para tomateiro.

Desde o início da década de 80, os testes de DNA vêm sendo desenvolvidos e utilizados na diagnose de doenças e identificação de patógenos de plantas. Um dos métodos utilizados para a detecção de bactérias em sementes é a PCR (“Polymerase Chain Reaction”), técnica já bastante conhecida e utilizada na identificação de vírus fitopatogênicos. Esse teste consiste na amplificação de fragmentos de DNA do organismo, por meio de uma enzima polimerase, posteriormente a algumas reações pré-determinadas. Os produtos da PCR são analisados após a “corrida” em gel sob eletroforese, com o auxílio de um corante. Observam-se as bandas formadas no gel e compara-se com um controle (banda formada utilizando-se o organismo chave). A grande vantagem desse teste é que as seqüências de DNA hibridizadas são únicas para cada organismo e, por essa razão, geram padrões específicos no gel. No entanto, existe a possibilidade de ocorrer contaminação cruzada durante o processamento das amostras e esta ser “captada” pelo teste, o qual é muito sensível. É importante lembrar que, como nos testes sorológicos, a PCR também não discrimina entre células vivas e mortas do patógeno.

As diversas técnicas apresentam vantagens e desvantagens e, atualmente, não existe um método padrão para a detecção desse patógeno. A escolha do método de detecção depende da eficiência do mesmo na detecção do patógeno e de sua reprodutibilidade, além da disponibilidade de tempo e recursos financeiros para a realização do mesmo. A utilização combinada das técnicas de detecção do patógeno pode proporcionar maior segurança nos resultados.

2.6. Meios semi-seletivos

Diversos meios seletivos e semi-seletivos têm sido desenvolvidos, nas últimas décadas, visando à detecção de patógenos bacterianos em sementes, principalmente de espécies e de patovares de *Xanthomonas* e *Pseudomonas*.

Os meios usados para a detecção de patógenos em sementes devem ser baratos, possuir em sua composição reagentes comuns de laboratório, serem fáceis de preparar, armazenáveis por longo tempo sem alterações e evitarem ao máximo o crescimento de contaminantes durante os testes (CLAFLIN et al., 1987). Os meios semi-seletivos são mais fáceis de serem desenvolvidos do que os meios seletivos, uma vez que é muito difícil evitar o aparecimento de contaminações, especialmente por outras bactérias. Dentre os meios semi-seletivos usados para o isolamento de espécies de *Xanthomonas* estão: SX ágar e SM ágar (usados para *X. campestris* pv. *campestris* de tecidos de plantas e solo), NSCAA e BSCAA (para o isolamento de *X. campestris* pv. *campestris* a partir de sementes), BS (para *X. arboricola* pv. *juglandis*), XPS (*X. arboricola* pv. *pruni*), D-5 modificado (*X. hotorum* pv. *carotae* de sementes e solo), XCS ágar (para *X. hotorum* pv. *carotae* apenas de sementes), MXP (*X. axonopodis* pv. *phaseoli*), meio de Tween (para *X. campestris* pv. *vesicatoria*), entre muitos outros (SCHAAD, 1988).

O meio MXP, desenvolvido por CLAFLIN et al. (1987) mostrou-se bastante eficiente (70-100%) na recuperação de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* de plantas de feijão inoculadas e mantidas em casa de vegetação,

quando comparado com o meio YGC. Os mesmos autores relatam que esse meio (MXP) também apresentou bons resultados no isolamento do patógeno a partir de solo infestado e de restos culturais, mostrando pouca ou nenhuma contaminação tanto com bactérias quanto com fungos. No caso de detecção da bactéria em sementes, os autores relatam que o meio MXP foi igualmente eficiente e com baixo índice de contaminações. Com relação à variante *fuscans*, observou-se que não houve produção do pigmento amarronzado característico (que a distingue visualmente da *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em meio de cultura), mas os autores consideram ser possível diferenciar as duas bactérias por meio do tamanho, viscosidade e cor da colônia, além do grau de hidrólise de amido e do tempo de crescimento no meio. ANGELES-RAMOS et al. (1991) e PROSEN et al. (1993) também obtiveram resultados bastante satisfatórios ao isolarem *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, utilizando o meio MXP, em testes de sanidade para sementes de feijoeiro. ROMEIRO et al. (1993) utilizando um meio semi-seletivo desenvolvido a partir do meio MXP (M-MXP) conseguiram detectar e quantificar, com segurança, *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijão no Brasil. TRUJILLO & SAETTLER (1980) desenvolveram um meio semi-seletivo líquido (SSM) que aumentou o crescimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans*, ao passo que inibiu o crescimento de bactérias contaminantes. MABAGALA & SAETTLER (1992) modificaram o meio desenvolvido por Trujillo & Saettler (1980), adicionando ao mesmo amido, corantes e ágar e observaram que este meio modificado (MSSM) era mais eficiente que o meio líquido original e que o meio MXP, na recuperação da bactéria alvo de tecidos de feijão infectados. MARINGONI et al. (1994) obtiveram resultados semelhantes com um meio (MA) que permitiu um bom crescimento de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e, ao mesmo tempo, inibiu 62,5% do crescimento de saprófitas.

Outros meios semi-seletivos têm sido utilizados para isolamento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro (*Vigna unguiculata* (L) Walp subs *unguiculata*), como o YCDA (=YDA+dextrose) (ARCILA &

TRUJILLO, 1990). Comparando o meio básico NA com o meio semi-seletivo NAS (= NA + sacarose, cefalexina, clorotalonil e benomil), VALARINI et al. (1996) verificaram que o segundo permitiu melhor detecção e quantificação (ufc/semente) de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* do que o primeiro. SAETTLER et al. (1989) relataram que, em meio Tween B, a identificação das colônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* pode ser melhorada pela adição de cristal violeta e amido solúvel de batata.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Local e Época de Realização da Pesquisa

O presente trabalho foi realizado no Laboratório de Bacteriologia de Plantas e Patologia de Sementes do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa, Minas Gerais, no período de fevereiro de 2000 a março de 2002.

3.2. Origem e cultivo dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli*

Foram obtidos isolados de diversos estados brasileiros, de forma a assegurar uma maior representatividade do patógeno no país. Alguns desses isolados fazem parte da bacterioteca do setor de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da Universidade Federal de Viçosa. Outros isolados do patógeno foram obtidos por meio de doação de fitopatologistas de outras instituições e outros ainda, de isolamento a partir de material vegetal com sintomas da doença. Os isolados utilizados no presente trabalho encontram-se listados no Quadro 1.

O meio de cultura utilizado para a repicagem e o preparo de inóculo foi o meio 523 de KADO & HESKETT (1970). As culturas bacterianas foram sempre incubadas a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ para crescimento.

Quadro 1 – Procedência dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* e *X. axonopodis* pv. *phaseoli* var. *fuscans* utilizados nos antibiogramas qualitativo e quantitativo

	Nº	Código	Origem	Doador	Instituição	
<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i>	1	RS-01	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	3	RS-04	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	5	RS-07	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	7	RS-09	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	10	RS-15	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	15	RS-23	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	17	RS-27	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	20	RS-36	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
	22	9813	Votuporanga – SP	R. M. SOUZA	UFLA/MG	
	23	9660	Capão Bonito – SP	M. F. ITO	IAC/SP	
	25	704-88	SP	R. M. SOUZA	IAC/SP	
	26	UFLA 2	Lavras – MG	R. M. SOUZA	UFLA/MG	
	27	Curvelo	Curvelo – MG	R. M. SOUZA	UFLA/MG	
	35	Moacir Mota-MM	DF	-	UFV/MG	
	36	UnB 644	PAD – DF	C. H. UESUGI	UnB/DF	
	37	UnB 324	Brazlândia – DF	C. H. UESUGI	UnB/DF	
	40	Ju. S. Prec.	DF	-	UFV/MG	
	41	7688	DF	R. P. LEITE JÚNIOR	IAPAR/PR	
	42	9757	Imbituva – PR	R. P. LEITE JÚNIOR	IAPAR/PR	
	43	7687	Realeza – PR	R. P. LEITE JÚNIOR	IAPAR/PR	
	44	9020	Vila Velha – PR	R. P. LEITE JÚNIOR	IAPAR/PR	
	45	8994	Siqueira Campos – PR	R. P. LEITE JÚNIOR	IAPAR/PR	
	46	54	Araguari – MG	A. TAKATSU	UFU/MG	
	47	85	Uberlândia – MG	A. TAKATSU	UFU/MG	
	<i>Xanthomonas axonopodis</i> pv. <i>phaseoli</i> var. <i>fuscans</i>	2	RS-02	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR
		4	RS-05	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR
		6	RS-08	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR
8		RS-11	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
9		RS-12	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
11		RS-16	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
12		RS-18	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
13		RS-19	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
14		RS-21	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
16		RS-25	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
18		RS-28	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
19		RS-33	RS	I. ANTUNES	CPACT/RSR	
21		Xp7	ES	-	UFV/MG	
24		7686	Ubiratã-PR	R.M. SOUZA	UFLA/MG	
28		Dourados	Dourados-MS	R.M. SOUZA	UFLA/MG	
29		Bandeirantes	Bandeirantes-MS	R.M. SOUZA	UFLA/MG	
30		HD Raj.	DF	-	UFV/MG	
31		FSJ I	Unaí-MG	-	UFV/MG	
32		FSJ II	Unaí-MG	-	UFV/MG	
33		Nob. Manica	Unaí-MG	-	UFV/MG	
34		PAD-DF	DF	-	UFV/MG	
38	JS cv. Carioca	DF	-	UFV/MG		
39	Joel C. Prec.	DF	-	UFV/MG		
48	86	Irai de Minas-MG	A. TAKATSU	UFU/MG		

3.3. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados

Todos os isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* utilizados no presente trabalho foram submetidos a teste de patogenicidade por meio de inoculação artificial do hospedeiro, *Phaseolus vulgaris* cultivar Ouro Negro. O inóculo foi preparado utilizando-se meio 523 fundente, o qual foi vertido em placas de Petri de 90 mm e, após a solidificação do mesmo, procedeu-se ao semeio de 100 µL de uma suspensão de células de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, previamente incubadas em meio 523 líquido, a 28±1°C por 36 horas. As placas semeadas com os isolados foram, então, mantidas em incubação a 28±1°C por 48 horas. Após esse período, foram feitas suspensões nitidamente turvas dos diferentes isolados em água.

A inoculação foi realizada no par de folhas primárias das plantas de feijão pelo método de incisão descrito por Ekpo (1975), citado por RAVA (1984). Todas as plantas inoculadas foram mantidas em casa de vegetação, realizando-se observações diárias para acompanhar o aparecimento dos sintomas.

3.4. Preservação dos isolados

3.4.1. Preservação sob óleo mineral

Os isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* foram cultivados em tubos contendo o meio Yeast Dextrose Carbonate (YCD) (WILSON et al., 1967), não inclinado, a 28 ± 1°C por 24-48 horas. Terminado o período de incubação, procedeu-se à adição de óleo mineral Nujol® (Ind. Quim. e Farm. Schering S. A.). O óleo foi previamente autoclavado a 121°C e 15 lb de pressão, por 15 minutos, e previamente à sua adição aos tubos, permaneceu em estufa a 60°C, por 24 horas, para remoção da água acumulada no erlenmeyer onde o óleo foi autoclavado e mantido. O óleo foi adicionado asépticamente a cada tubo, até a 1-2 cm de altura acima do meio. Os tubos contendo os isolados semeados e

cobertos com óleo foram mantidos em geladeira a 4°C. Para recuperação dos isolados, procedeu-se à transferência de células bacterianas dos tubos com óleo para meio 523 líquido.

3.4.2. Repicagem tubo-a-tubo

Tubos contendo o meio YDC foram utilizados para o semeio dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* e, posteriormente, mantidos a 28±1°C por 24-48 horas. Após esse período, os isolados foram transferidos para geladeira a 4°C. A cada período de dois meses, os isolados foram repicados para novos tubos contendo o meio YDC, incubados e mantidos em refrigeração, como descrito anteriormente (KIRÁLY et al., 1970; TUIITE, 1969).

3.5. Sensibilidade de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a diferentes substâncias antimicrobianas

3.5.1. Antibiograma qualitativo

Para a realização do antibiograma qualitativo, foram utilizados discos de papel-filtro contendo as substâncias antimicrobianas (Cefar®, Pimenta Abreu®, Cecon®) (Quadro 2). Para quatro substâncias, ácido bórico, cicloheximida, clorotalonil e kasugamicina, os discos para antibiograma foram produzidos usando-se discos de papel-filtro Whatman nº 1, com 0,6 cm de diâmetro, os quais foram autoclavados a 121°C e 15 lb de pressão, por 15 minutos, e mantidos em estufa a 60°C, por 24 horas, para secagem. Soluções dessas substâncias foram preparadas, em concentrações conhecidas, e distribuídas assepticamente, à razão de 10 µl por disco de papel-filtro. Após a absorção da solução, os discos de papel filtro permaneceram em placas de Petri estéreis até a completa secagem. A seguir, foram transferidos para frascos estéreis, os quais foram vedados e armazenados em geladeira (4°C).

Quadro 2 – Relação das substâncias antimicrobianas e suas respectivas concentrações, utilizadas no antibiograma qualitativo

Nº	Nome	mg/disco	Nº	Nome	mg/disco
1	Ácido nalidíxico	30	23	Gentamicina	10
2	Ácido pipemídico	20	24	Imipenem	10
3	Amicacina	30	25	Lincomicina	2
4	Amoxicilina	10	26	Neomicina	30
5	Ampicilina	10	27	Netilmicina	30
6	Aztreonam	30	28	Nitrofurantoína	300
7	Carbenicilina	100	29	Norfloxacin	5
8	Cefadroxil	30	30	Oxacilina	1
9	Cefalexina	30	31	Pefloxacin	5
10	Cefalotina	30	32	Penicilina G	10
11	Cefepime	30	33	Rifamicina B	30
12	Cefoperazona	75	34	Rifampicina	30
13	Cefotaxima	30	35	Sulfazotrim	25
14	Cefoxitina	30	36	Sulfonamida	300
15	Ceftazidima	30	37	Tetraciclina	30
16	Ceftriaxona	30	38	Tobramicina	10
17	Ciprofloxacina	5	39	Vancomicina	30
18	Clindamicina	2	40	Ácido bórico	30
19	Cloranfenicol	30	41	Kasugamicina	30
20	Cotrimoxazol	25	42	Cicloheximida	100
21	Eritromicina	15	43	Clorotalonil	100
22	Estreptomicina	10	-	-	-

Na realização do antibiograma qualitativo, foram utilizados os isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* listados no Quadro 1.

Foi preparada uma camada básica de ágar-água 2% em placas de Petri de 140 mm de diâmetro. Após a solidificação dessa camada, verteu-se uma sobrecamada de 9 mL de meio 523, semi-sólido (0,85% de ágar), a 50°C, à qual foram incorporados 100 µL de suspensão de células do organismo-teste (cultura bacteriana com 36 horas de incubação em meio 523 líquido). Após a solidificação e a secagem da sobrecamada, foram distribuídos os discos de papel-filtro contendo as substâncias antimicrobianas, em número de quatro ou cinco por placa. As placas foram mantidas em incubadora a 28±1°C por 36-48 horas. Após esse período, foi observada a formação ou não de halos de inibição, medindo-se o seu diâmetro (centímetros) quando da ocorrência dos mesmos.

3.6. Sensibilidade dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* às diferentes concentrações de algumas substâncias antimicrobianas selecionadas

Com base nos resultados obtidos no antibiograma qualitativo, foram selecionadas algumas substâncias às quais os isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* se mostraram insensíveis, para a realização de um antibiograma quantitativo. Tais substâncias foram adicionadas ao meio 523 fundente, nas concentrações de 25, 50 e 100 mg/L, separadamente. Após a adição do meio em placas de Petri de 90 mm de diâmetro, estas foram subdivididas externamente em 16 seções, utilizando-se pincel marcador hidrográfico. Em cada seção, procedeu-se ao semeio de um isolado bacteriano (cultura em meio 523 líquido, incubada a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas), utilizando-se alça de repicagem. Os isolados foram incubados a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 36 a 72 horas, quando foi observado ou não o seu crescimento.

As substâncias selecionadas foram também incorporadas ao meio básico em conjunto, em dois tratamentos diferentes. O tratamento A consistiu na adição das substâncias nas mais altas concentrações previamente testadas e às quais os isolados se mostraram insensíveis. O tratamento B consistiu na adição das substâncias nas seguintes concentrações: kasugamicina, 5 mg/L; lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína, 10 mg/L, de forma a se verificar o efeito de interação entre as mesmas. O procedimento foi como descrito acima, com o tempo máximo de incubação de 96 h. Todos os testes foram conduzidos com três repetições.

3.7. Crescimento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em meios semi-seletivos

Foram testados os sete meios semi-seletivos apresentados, desenvolvidos para a detecção de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* (Apêndice A). O meio 523 foi adotado como meio padrão para o cultivo dos isolados.

Os meios semi-seletivos foram preparados conforme especificado nos trabalhos originais de elaboração dos mesmos. Os compostos antimicrobianos foram adicionados aos meios fundentes, imediatamente antes de serem vertidos em placas de Petri de 90 mm de diâmetro. O procedimento adotado foi como descrito no item 3.6. Os ensaios foram conduzidos com três repetições.

3.8. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos

A repressão é um termo utilizado para indicar a inibição de crescimento do organismo alvo no meio semi-seletivo.

Foram utilizados seis isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* para a determinação do IR (isolados números 4, 22, 28, 31, 39 e 43 apresentados no Quadro 1). Estes isolados foram cultivadas em tubos com meio 523 (modificado) a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. Nesse meio, a sacarose foi substituída por glicose. Após a incubação, células do organismo teste foram suspensas em solução salina (NaCl 0,85%) estéril, acrescida de 0,5% de Tween 80. A suspensão foi diluída em série (fator 1:5), também em solução salina estéril contendo 0,5% de Tween 80. Uma microgota de 10 μL de cada diluição foi depositada em placas contendo os diversos meios semi-seletivos e o meio padrão (meio 523), num total de 10 microgotas por placa. As placas contendo os isolados foram mantidas em incubadora a $28\pm 1^{\circ}\text{C}$, por 24 a 72 horas. Após esse período, foi realizada a avaliação e foi quantificado o número de microcolônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em cada meio. O ensaio foi conduzido com três repetições.

Após a quantificação, determinou-se o índice de repressão, segundo a fórmula:

$$\text{IR} = \frac{\text{média UFC/mL meio 523} - \text{média UFC/mL meio semi-seletivo}}{\text{média UFC/mL meio 523}} \times 100$$

sendo UFC o número de unidades formadoras de colônia, ou seja, o número de células viáveis da bactéria que formaram colônias no meio.

Os dados coletados (UFC/mL) também foram transformados em \log_{10} , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A análise estatística foi realizada no programa SAS.

3.9. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos

Supressão é um termo utilizado para indicar a inibição de crescimento de organismos contaminantes no meio semi-seletivo.

Foram utilizadas duas amostras de feijão de lotes comerciais provenientes do Distrito Federal. Foi retirada uma subamostra de 500 sementes de cada lote. Cada sub-amostra foi colocada em erlenmeyers contendo 200 mL de PBS [“phosphate buffer solution” (tampão fosfato 0,1 M, pH 7,2, em NaCl 0,85%)] estéril e incubadas por 3 horas a 4°C. Após o período de incubação, as amostras foram colocadas sob agitação por 2 horas à temperatura ambiente. A seguir, procedeu-se à filtração em gaze de algodão para retenção das sementes e impurezas maiores. As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10.000 xg por 15 min. O sedimento resultante para cada amostra foi ressuspendido em 6,0 mL de solução salina 0,85%. Realizou-se uma diluição em série de 10^{-1} a 10^{-10} , também em PBS. As diluições foram semeadas por espalhamento com espátula de Drigalsky, à base de 100 μ L/placa, nos meios semi-seletivos e no meio padrão. Os isolados foram incubados a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 72 horas. Após esse período, foi feita uma avaliação qualitativa do crescimento de contaminantes por meio de observação visual e contagem do número de colônias nos meios quando isso foi possível. O IS foi determinado pela fórmula:

$$\text{IS} = \frac{\text{média UFC/ml meio 523} - \text{média UFC/ml meio semi-seletivo}}{\text{média UFC/ml meio 523}} \times 100$$

Foram realizadas três repetições de cada uma das dez diluições em todos os meios semi-seletivos e no meio 523 (padrão).

4. RESULTADOS

4.1. Comprovação da fitopatogenicidade dos isolados

A fitopatogenicidade dos isolados (Quadro 1) foi confirmada pela presença de sintomas típicos de CBC nas plantas de feijão inoculadas, tendo sido observado um amarelecimento na região da inoculação e posterior escurecimento desses tecidos, até se tornarem marrons, com aspecto de crestamento ou queimadura, circundados por um bordo amarelo.

4.2. Sensibilidade de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a diferentes substâncias antimicrobianas

Os resultados da sensibilidade dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* aos produtos testados encontram-se na Quadro 3. Foram considerados sensíveis os isolados para os quais houve formação de halo de inibição, independente da magnitude de seu diâmetro (Apêndice B). Todos os isolados mostraram-se insensíveis às seguintes substâncias antimicrobianas: ácido bórico, cicloheximida, clorotalonil, lincomicina e clindamicina. Quanto às substâncias amoxicilina, carbenicilina, cefadroxil, cotrimoxazol, nitrofurantoína, oxacilina e sulfazotrim, a maioria dos isolados mostrou-se

Quadro 3 – Número de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* que apresentaram sensibilidade às diferentes substâncias antimicrobianas utilizadas, nas suas respectivas concentrações. Cada substância foi avaliada em um total de quarenta e oito isolados

Substância Antimicrobiana	mg/disco	Nº de Isolados		Substância Antimicrobiana	mg/disco	Nº de Isolados	
		Insen-síveis	Sensíveis			Insen-síveis	Sensíveis
Ác. bórico	30	48	0	Cotrimoxazol	25	25	23
Ác. nalidíxico	30	3	45	Eritromicina	15	0	48
Ác. pipemídico	20	6	42	Estreptomicina	10	0	48
Amicacina	30	0	48	Gentamicina	10	0	48
Amoxicilina	10	31	17	Imipenem	10	0	48
Ampicilina	10	13	35	Kasugamicina	30	22	26
Aztreonam	30	0	48	Lincomicina	2	48	0
Carbenicilina	100	36	12	Neomicina	30	0	48
Cefadroxil	30	41	7	Netilmicina	30	0	48
Cefalexina	30	7	41	Nitrofurantoína	300	31	17
Cefalotina	30	17	31	Norfloxacin	5	0	48
Cefepime	30	0	48	Oxacilina	1	46	2
Cefoperazona	75	0	48	Pefloxacin	5	0	48
Cefataxima	30	0	48	Penicilina G	10	11	37
Cefoxitina	30	0	48	Rifamicina B	30	0	48
Ceftazidima	30	0	48	Rifampicina	30	0	48
Ceftriaxona	30	0	48	Sulfazotrim	25	36	12
Cicloheximida	100	48	0	Sulfonamida	300	6	42
Ciprofloxacina	5	0	48	Tetraciclina	30	0	48
Clindamicina	2	48	0	Tobramicina	10	0	48
Cloronfenicol	30	0	48	Vancomicina	30	1	47
Clorotalonil	100	48	0	-	-	-	-

insensível. Em relação à kasugamicina, 45,8% dos isolados apresentaram insensibilidade, enquanto que para 54,2% deles, houve formação de halos pequenos, variando de 0,7 à 1,8 centímetros de diâmetro. Para as outras substâncias antimicrobianas testadas, houve sensibilidade por parte de todos ou quase todos os isolados utilizados. As substâncias lincomicina e clindamicina foram selecionadas para utilização no antibiograma quantitativo devido à insensibilidade de todos os isolados da bactéria testados a estas substâncias, enquanto que a oxacilina, a nitrofurantoína e a kasugamicina foram selecionadas com base na resposta insensível da maioria dos isolados bacterianos e também pela formação de halos de diâmetro pequeno (< 2,0 cm), para os isolados que se mostraram sensíveis a estas substâncias.

4.3. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a diferentes concentrações de algumas substâncias antimicrobianas selecionadas

Quando da adição individual das substâncias ao meio 523, observou-se que todos os isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* cresceram no meio acrescido com 25 mg/L de kasugamicina, mas, apenas três isolados cresceram quando a quantidade adicionada foi de 50 mg/L. Todos os isolados foram sensíveis a 100 mg/L dessa substância. Apenas dez dos 48 isolados testados cresceram no meio acrescido de 25 mg/L de oxacilina, não tendo sido observado crescimento bacteriano onde a concentração da substância no meio era de 50 ou 100 mg/L. As substâncias lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína, adicionadas individualmente ao meio 523 nas concentrações de 25, 50 ou 100 mg/L não afetaram, aparentemente, o crescimento dos isolados (Quadro 4).

Quadro 4 – Número de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* que apresentaram insensibilidade a diferentes concentrações de algumas substâncias antimicrobianas, adicionadas individualmente ao meio 523. Cada substância foi avaliada em um total de quarenta e oito isolados. Tempo de incubação: 36 a 72 h

Concentração (mg/L)	Substância Antimicrobiana				
	Kasugamicina	Oxacilina	Lincomicina	Clindamicina	Nitrofurantoína
0	48	48	48	48	48
25	48	10	48	48	48
50	3	0	48	48	48
100	0	0	48	48	48

Portanto, apenas a adição de kasugamicina nas dosagens de 50 e 100 mg/L e de oxacilina a 25, 50 e 100 mg/L reduziram o crescimento de isolados do patógeno.

As substâncias foram também adicionadas em conjunto ao meio 523, em dois tratamentos. A interação entre as substâncias kasugamicina, clindamicina, lincomicina e nitrofurantoína aparentemente não afetou o

crescimento da maioria dos isolados após 72 horas de incubação, sendo que, após 96 horas de incubação, observou-se o crescimento de todos os isolados, tanto no tratamento A quanto no tratamento B (Quadro 5).

Quadro 5 – Número de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* que apresentaram insensibilidade à adição conjunta das substâncias antimicrobianas utilizadas nos tratamentos A e B, em suas respectivas concentrações. Foram utilizados quarenta e oito isolados em cada tratamento

Tempo (h)	Controle ¹	Tratamento A ²	Tratamento B ³
72	48	46	48
96	48	48	48

¹ meio 523

² meio 523 + 25 mg/L de kasugamicina + 100 mg/L de lincomicina + 100 mg/L de clindamicina + 100 mg/L de nitrofurantoína

³ meio 523 + 5 mg/L de kasugamicina + 10 mg/L de lincomicina + 10 mg/L de clindamicina + 10 mg/L de nitrofurantoína

4.4. Crescimento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em meios semi-seletivos

Conforme esperado, todos os meios quando testados sem a adição de substâncias antimicrobianas deram suporte ao crescimento dos isolados. Quando foram acrescidos dos componentes antimicrobianos de suas composições originais, apenas o meio M-MXP não permitiu o crescimento dos mesmos (Quadro 6).

4.5. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos

A avaliação foi realizada após 24 a 72 horas de incubação e foi quantificado número de microcolônias de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em cada meio. Esses números foram utilizados para determinar os índices de repressão. Calculou-se um valor de IR para os diferentes meios semi-seletivos testados,

Quadro 6 – Número de isolados que apresentaram crescimento nos meios com e sem a adição de substâncias microbianas. Foram utilizados quarenta e oito isolados em cada tratamento

Meios	523	MXP	M-MXP	SSM	M-SSM	MT	XCP1	MA
Sem adição de substâncias antimicrobianas	48	48	48	48	48	48	48	48
Com adição de substâncias antimicrobianas¹	-	48	0	48	48	48	48	48

¹ substâncias antimicrobianas presentes na composição original de cada meio.

em cada isolado (Quadro 7). As diluições cujos dados foram utilizados para os cálculos de ufc/mL nos meios básico e semi-seletivos variaram de acordo com o isolado e com o meio. Considerando-se um valor médio de IR = 50%, os meios MXP e SSM obtiveram 33% dos resultados abaixo desse valor médio, sendo que o primeiro alcançou IR > 90% em metade dos isolados utilizados. Para o meio M-SSM, 66% dos resultados mostram valores de IR abaixo do valor médio, enquanto para o meio MT, observa-se que em apenas 16,6% dos resultados os valores de IR estão nesse patamar. O meio XCP1 atingiu 80% dos valores de IR calculados abaixo do IR médio adotado, sendo que para, o isolado 31, não foi possível fazer a contagem de microcolônias devido ao grande número das mesmas (>300). Para o meio MA, metade dos valores de IR ficaram abaixo do IR médio.

Os dados coletados (UFC/mL) foram transformados em \log_{10} , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A avaliação foi feita para cada isolado separadamente (Quadro 8). Para os isolados 39 e 43, não houve diferença significativa entre as médias. Para os demais isolados, os resultados indicam que o meio MSSM alcançou resultados semelhantes ao observado no meio padrão. O meio XCP1 também se mostrou bastante promissor, embora a análise estatística tenha sido possível somente para três isolados nesse caso (4, 22 e 28). Isso foi devido ao grande número de microcolônias formadas para o isolado 31, mesmos nas maiores

Quadro 7 – Índice de repressão (%) para seis isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em seis meios semi-seletivos. Os valores representam o percentual de repressão no crescimento do isolado quando comparado ao meio 523. Valores negativos indicam um maior crescimento do isolado no meio semi-seletivo em relação ao crescimento do mesmo isolado no meio 523

Meio	Isolado					
	4	22	28	31	39	43
MXP	100,00	-26,25	95,33	-11,65	97,64	53,61
SSM	78,95	-0,78	64,80	40,28	79,29	56,93
M-SSM	15,95	-7,42	10,74	1,14	77,29	59,04
MT	99,98	49,06	100,00	70,60	86,65	69,43
XCP1	38,31	-55,04	-281,05	-	-32,55	62,05
MA	98,83	-15,17	24,21	52,13	84,03	43,52

Quadro 8 – Número de UFC/mL dos isolados, nos sete meios de cultura testados. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

Meio	Isolado			
	4	22	28	31
523	8,7992 A	9,4682 A	7,7284 A	10,0266 A
MSSM	8,7604 A	9,4972 A	7,6015 A	10,0510 A
XCP1	8,6446 A B	9,6582 A	5,6211 A B	-
SSM	8,1738 B	9,4530 A	7,2840 A	9,8830 A B
MA	6,9295 C	9,5293 A	7,5903 A	9,8455 A B
MT	5,1184 D	9,1182 B	0,0 B	9,5139 B
MXP	4,4918 E	9,5695 A	4,3021 A B	10,1027 A

diluições, o que impossibilitou a contagem nesse caso. O meio que apresentou o pior resultado para os isolados utilizados foi o MT. Os outros três meios tiveram desempenhos medianos, sendo o SSM melhor que o MA e este, por sua vez, melhor que o MXP.

4.6. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos

Os índices de supressão calculados para os semi-seletivos encontram-se no Quadro 9. Os meios semi-seletivos não inibiram totalmente o crescimento da microbiota associada às sementes de feijoeiro dos dois lotes testados, tendo sido a amostra 1 proveniente de uma mistura de lotes de sementes de feijão do cultivar “Carioca”, e a amostra 2 proveniente de um lote do cultivar “Ouro Negro”. Houve crescimento fúngico em apenas algumas diluições, nos meios SSM e M-SSM para a amostra 1, e nos meios SSM, M-SSM e MXP para a amostra 2. Para os cálculos de ufc/mL no meio básico, foram utilizados os valores da média da diluição 10^{-9} para a amostra 1, e da média da diluição 10^{-3} para a amostra 2. Todos os meios semi-seletivos suprimiram o crescimento de contaminantes quando comparados ao meio básico nas duas amostras (Quadro 9).

Quadro 9 – Índice de supressão (%) de contaminantes em amostras de lotes de sementes de feijoeiro em meios semi-seletivos, em relação ao crescimento de microrganismo contaminantes no meio 523

Meio	Índice de Supressão	
	Amostra 1 ¹	Amostra 2 ²
M-SSM	55,08	99,99
XCP1	58,92	99,99
SSM	44,91	99,97
MA	60,71	99,82
MT	58,12	99,99
MXP	64,82	99,99

¹ amostra retirada de uma mistura de lotes de feijão do cultivar “Carioca”.

² amostra retirada de um lote de feijão do cultivar “Ouro Negro”.

Os dados coletados (UFC/mL) foram transformados em \log_{10} , e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. A avaliação foi feita para cada amostra separadamente (Quadro 10). O meio 523 diferiu estatisticamente dos meios semi-seletivos. Dentre esses, o meio MXP foi que apresentou o melhor resultado, considerando-se as

duas amostras. Em seguida, está o meio MT. Os meios MSSM e XCP1 não diferiram entre si nas amostras 1 e 2. Os meios MA e SSM tiveram comportamento semelhante, avaliando-se as duas amostras em conjunto.

Quadro 10 – Número de colônias de microrganismos contaminantes, presentes nas amostras, observado nos meios de cultura testados. Médias seguidas da mesma letra não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância

Meio	Amostra	
	1	2
523	5,2633 A	10,6667 A
MSSM	4,9200 B C	6,4867 C
XCP1	4,8833 B C	6,5133 C
SSM	5,0100 B	6,9767 C
MA	4,8633 B C	7,8933 B
MT	4,8900 B C	5,7700 D
MXP	4,8100 C	4,5033 E

5. DISCUSSÃO

5.1. Sensibilidade de isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* a diferentes substâncias antimicrobianas

Houve variação no comportamento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em relação aos compostos antimicrobianos testados. Alguns apresentaram alta sensibilidade, enquanto outros se mostraram insensíveis a uma mesma substância (Apêndice B). Alguns isolados mostraram-se resistentes a uma série de substâncias antimicrobianas, fenômeno denominado de resistência múltipla constitutiva. ROMEIRO et al. (1998), avaliando o comportamento de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* em relação a diversos compostos antimicrobianos, observaram a ocorrência de resistência múltipla constitutiva. De acordo com estes mesmos autores, existe a tendência de um padrão característico para um patovar ou espécie, de forma que diferentes isolados se comportam como sensíveis ou resistentes aos mesmos compostos. Entretanto, este comportamento não foi observado. Variações entre isolados, tanto na sensibilidade a uma mesma substância, bem como a diferentes tipos de substâncias, são conhecidas (BAKER, 1970; LACAZ, 1975). Há que se considerar que os isolados são provenientes de diferentes regiões geográficas e que, portanto, alguma variabilidade ocorra entre eles.

VERNIERE et al. (1992), por exemplo, estudaram a sensibilidade/resistência de 65 isolados de *X. axonopodis* pv. *citri* a 63 diferentes antibióticos e verificaram que os resultados permitiam agrupar os isolados em relação à origem geográfica. Já WRUCK (2001) não encontrou correlação entre resistência/sensibilidade a antibióticos e a origem geográfica ou hospedeiro original de diferentes isolados de *X. campestris* pv. *campestris*.

Todos os isolados mostraram-se insensíveis a ácido bórico, cicloheximida, clorotalonil, lincomicina e clindamicina. A insensibilidade dos isolados a cicloheximida e ao clorotalonil era esperada, por serem as mesmas substâncias que tipicamente inibem fungos e outros microrganismos eucariotas (SIEGEL e SISLER, 1977). Já a lincomicina e a clindamicina, que são duas substâncias antimicrobianas que possuem estrutura e atividade semelhantes e atuam contra microrganismos Gram-positivos (KURYLOWICZ, 1981), esperava-se não atuarem contra *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, pois sabe-se que espécies de *Xanthomonas* são Gram-negativas. Apenas dois isolados se mostraram sensíveis a oxacilina, um antibiótico ativo contra bactérias Gram-positivas. A utilização apenas destes antibióticos em meios semi-seletivos para detecção de bactérias em sementes não é suficiente, uma vez que é bastante comum a associação de saprófitas Gram-negativas com lotes de sementes. Por esta razão, é importante se proceder a testes quantitativos com compostos antimicrobianos aos quais poucos isolados tenham se mostrado sensíveis e que possuam ação contra bactérias Gram-negativas. Dessa forma, poder-se-ia viabilizar a utilização dos mesmos, em concentrações que não afetariam significativamente o crescimento do patógeno alvo.

Os seguintes compostos antimicrobianos foram selecionados para a realização de um antibiograma quantitativo: kasugamicina, oxacilina, lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína. A maioria dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* testados mostrou-se sensível à oxacilina na concentração de 25 mg/L. É necessário testar-se dosagens menores para a determinação de uma concentração que possa ser utilizada em meios semi-seletivos. Já para a kasugamicina a maioria dos isolados teve seu crescimento

inibido na concentração de 50 mg/L, enquanto todos os isolados cresceram na concentração de 25 mg/L. Observa-se novamente variação entre os isolados no que se refere à sensibilidade às diferentes concentrações utilizadas. Os antibióticos lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína permitiram o crescimento de todos os isolados testados, mesmo na mais alta concentração utilizada, a qual foi de 100 mg/L.

Verificou-se um sinergismo entre os antibióticos kasugamicina, lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína quando incorporados em conjunto ao meio básico, afetando o crescimento de dois isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. A redução das concentrações (kasugamicina - 5 mg/L e lincomicina, clindamicina e nitrofurantoína – 10 mg/L) permitiu o crescimento de todos os isolados, o que torna possível, portanto, a utilização conjunta dos mesmos.

5.2. Crescimento dos isolados de *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* nos meios semi-seletivos

Os compostos antimicrobianos presentes nos meios semi-seletivos não afetaram o crescimento dos isolados, com exceção daqueles utilizados no meio MXP modificado (M-MXP). Nesse caso, a interação entre as substâncias antimicrobianas presentes nesse meio parece ter sido a razão para a ausência de crescimento dos isolados nesse meio, confirmando o observado no antibiograma qualitativo.

5.3. Determinação do Índice de Repressão (IR) dos meios semi-seletivos

Os isolados foram cultivados em meio 523 modificado, substituindo-se a sacarose por glicose, uma vez que o primeiro açúcar propicia intensa formação de cápsula. Isto não é desejado, pois os glumos resultantes da aglomeração de células podem interferir na contagem de microcolônias (ROMEIRO, 2001).

Os resultados mostraram uma variação muito grande de IR dos meios para um mesmo isolado e entre isolados. Isso pode ser explicado pela sua heterogeneidade, como mencionado anteriormente. Em alguns casos, os valores de IR foram muito altos, chegando a 100%. Segundo OLIVEIRA (1995), a ocorrência de um alto IR não invalida a utilização de um meio, pois a detecção do patógeno ainda é possível. O meio seletivo desenvolvido para *Pseudomonas marginalis* por SOARES et al. (1990), por exemplo, foi utilizado com sucesso, apesar do alto IR (90%). Alguns meios semi-seletivos permitiram um maior crescimento de alguns isolados da bactéria quando comparados ao meio padrão. Esse meio padrão (meio 523) foi desenvolvido para o cultivo de fitobactérias de diversos gêneros. Já os meios semi-seletivos em estudo foram desenvolvidos especificamente para a recuperação de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. Provavelmente, alguns isolados foram favorecidos pelo balanço de nutrientes presentes nesses meios, embora seja importante ressaltar que houve um retardamento de seu crescimento em comparação ao meio padrão. Esse retardamento no crescimento dos isolados pode ser explicado pela presença dos compostos antimicrobianos nos meios semi-seletivos.

O meio MSSM apresentou desempenho semelhante ao do meio padrão, não afetando significativamente, portanto, o crescimento dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*. O meio XCP1 apresentou, também, bons resultados, não se observando diferenças significativas entre ele e os meios padrão e MSSM. O meio SSM teve um desempenho melhor que o meio MA e este foi melhor que o meio MXP. Considerando-se a repressão ao crescimento de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, os meios que permitiram um melhor crescimento do patógeno alvo foram o MSSM e o XCP1.

A presença de amido no meio MSSM parece ter sido fator diferencial quando comparado ao meio SSM, uma vez que os compostos antimicrobianos em suas respectivas concentrações são os mesmo para ambos os meios. MABAGALA & SAETTLER (1992) observaram que o meio MSSM foi superior aos meios SSM e MXP na recuperação da bactéria alvo em tecidos infectados de feijoeiro.

Comparando-se os meios SSM, MA e MXP, a interação entre as substâncias antimicrobianas pode ter sido a causa da diferença de crescimento dos isolados nesses meios. Essa mesma interação foi, provavelmente, o que causou a repressão total no crescimento dos isolados no meio M-MXP. Entretanto, ROMEIRO et al. (1993) obtiveram bons resultados quanto ao crescimento de outros isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* no meio M-MXP. Esses resultados mostram uma diversidade do comportamento de isolados de uma mesma espécie e patovar quanto à sensibilidade/resistência a uma dada substância antimicrobiana.

O meio MT não apresentou bons resultados para a maioria dos isolados, embora não tenha havido diferença estatística entre este e os demais meios para os isolados 39 e 43. Houve crescimento do isolado 28 no meio MT; entretanto, como isso não aconteceu nas diluições utilizadas para realizar os cálculos, o resultado foi considerado zero.

5.4. Determinação do Índice de Supressão (IS) dos meios semi-seletivos

O fato de os meios semi-seletivos não terem inibido totalmente o aparecimento de contaminantes era esperado, dada a dificuldade de se desenvolver um meio que restrinja o crescimento de todos os organismos da diversa microbiota encontrada em sementes, tecidos de plantas, solo e água (CLAFLIN, 1987). A amostra 1 apresentou, de maneira geral, menor crescimento de contaminantes em todos os meios e para todas as diluições quando comparada com a amostra 2. A microbiota associada a cada lote de sementes é característica e varia em função do local de produção. Este fato foi observado por MOURA (1992), com um meio semi-seletivo desenvolvido para a detecção de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em sementes de pepino. O meio, que havia mostrado uma alta seletividade em testes preliminares, permitiu o crescimento de contaminantes quando do semeio de diferentes amostras de sementes. Observou-se pouco crescimento fúngico, especialmente quando comparado ao de bactérias, o que se deve à ação dos

compostos antifúngicos (clorotalonil, cicloheximida ou kasugamicina) presentes em cada meio semi-seletivo. Nas diluições 10^{-1} e 10^{-2} de todos os meios, não foi possível fazer a contagem de colônias devido ao crescimento abundante. Comparados ao meio padrão, todos os meios semi-seletivos suprimiram o crescimento de contaminantes em termos quantitativos. Em análise qualitativa, observou-se uma maior homogeneidade de colônias no meio MXP. Visualmente, o crescimento de contaminantes nesse meio foi o mais contido dentre os diversos meios testados.

O meio 523 diferiu significativamente de todos os outros meios, como já era esperado, uma vez que este meio não possui, em sua composição, qualquer substância antimicrobiana. O meio MXP apresentou os melhores resultados, especialmente na amostra 2, onde ele diferiu significativamente de todos os outros meios. Observou-se que, neste meio, as colônias de contaminantes eram bem menores quando comparados aos demais meios semi-seletivos e ao meio padrão. O meio MT, que não mostrou bons resultados quanto à repressividade, foi o segundo melhor meio quanto à supressão do crescimento de contaminantes. A interação entre os compostos antimicrobianos presentes nesses dois meios (MXP e MT), provável razão pela alta repressão dos isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli*, pode ter influenciado também o crescimento de contaminantes. Os meios MSSM e XCP1, que foram melhores quanto à repressão, geraram resultados semelhantes entre si no caso da supressão de contaminantes e podem ser considerados como o terceiro melhor resultado. Os meios MA e SSM foram os meios que permitiram o maior crescimento de contaminantes, respectivamente, com a exceção do meio padrão, tanto no aspecto quantitativo quanto no qualitativo.

6. RESUMO E CONCLUSÕES

Os antibiogramas qualitativos e quantitativos permitiram verificar uma grande variabilidade na sensibilidade/resistência de isolados de *X. axonopodis* pv. *phaseoli* a diferentes substâncias antimicrobianas, não tendo sido observado um padrão de comportamento, para este patovar, pela presença de determinado composto antimicrobiano.

Alguns dos meios semi-seletivos testados apresentaram IR relativamente altos e uma boa supressão de organismos contaminantes. A interação das substâncias antimicrobianas pode ter sido a razão pela alta repressividade de alguns meios, bem como por seu elevado índice de supressão, como no caso do MXP e do MT. Um valor de IR alto, entretanto, não invalida a utilização do meio. A interação das substâncias antimicrobianas pode também ter sido a razão ausência de crescimento dos isolados no meio M-MXP.

Os meios MSSM e XCP1 foram os que apresentaram os melhores resultados em termos gerais. Ambos não diferiram estatisticamente do meio padrão quanto à repressividade. Embora a supressão de contaminantes nesses meios não tenha sido a melhor, eles mostraram-se bastante promissores para uso em rotina, numa avaliação conjunta.

Entretanto, para a validação de um ou mais desses meios é necessário que se proceda à detecção do patógeno em sementes e outros tecidos de feijoeiro naturalmente infectados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANGELES-RAMOS, R.; VIDAVER, A.K.; FLYNN, P. Characterization of epiphytic *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and pectolytic xanthomonads recovered from symptomless weeds in the Dominican Republic. **Phytopatology**, v.81, n.6, p.677-681, 1991.
- ARCILA, M.J.; TRUJILLO, G. Identificación de bacterias fitopatógenas en semillas de frijol (*Vigna unguiculata* (L) Walp subsp *unguiculata*). **Agronomía Tropical**, v.40, n.4-6, p.193-203, 1990.
- AUDY, P.; LAROCHE, A.; SAINDON, G.; HUANG, H.C.; GILBERTSON, R.L. Detection of the bean common blight bacteria, *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* and *X. c. phaseoli* var. *fuscans*, using the Polymerase Chain Reaction. **Phytopatology**, v.84, n.10, p.1185-1192, 1994.
- BAKER, F.J. **Manual de técnica bacteriológica**. Zaragoza: Acribia, 1970. 510p.
- BRADBURY, J.F. **Guide to plant pathogenic bacteria**. Ferry Lane, CAB Mycological International Institute. 1986. 332p.
- BURKHOLDER, W.H. The bacterial blight of the bean: a systemic disease. **Phytopatology**, v.11, n.2, p.61-69, 1921.
- CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K.; SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopatology**, v.77, n.5, p.730-734, 1987.

- COPELAND, L.O.; ADAMS, M.W.; BELL, D.C. An improved seed programme for maintaining disease-free seed of field beans (*Phaseolus vulgaris*). **Seed, Science and Technology**, v.3, p.719-724, 1975.
- DO VALE, F.X.R.; ZAMBOLIM, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas**. Vol. 1. Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 2v.: il.
- IRWIN, J.A.G. Recent advances in the detection of seedborne pathogens. **Seed, Science and Technology**, v.15, n.3, p.755-763, 1987.
- ISSP – International Society for Plant Pathology. Names for plant pathogenic bacteria 1864-1995. Disponível na Internet via WWW.URL: <http://www.isppweb.org/nppb.htm> Arquivo capturado em 30/09/2002
- JIAO, J.; GOODWIN, P.; GRODZINSKI, B. Photosynthesis and export during steady-state photosynthesis in bean leaves infected with the bacterium *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Canadian Journal of Botany**, v.74, p.1-9, 1996.
- KADO, C.I.; HESKETT, M.G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, v.60, p.969-976, 1970.
- KIRÁLY, Z.; KLEMENT, Z.; SOLYMOSSY, E.; VÖRÖS, J. **Methods in plant pathology**. Budapest: Akadémiai Kiadó, 1970. 509p.
- KURYLOWICZ, W. (ed.). **Antibióticos – uma revisão crítica**. Recife: Universitária/Universidade Federal de Pernambuco, 1981. 341p.
- LACAZ, C.S. ed. **Antibióticos**. São Paulo: EDUSP, 1975. 509p.
- LOPES, C.A.; QUEZADO-SOARES, A.M. **Doenças bacterianas das hortaliças – diagnose e controle**. Brasília: EMBRAPA-CNPq, 1997. 70p.
- MABAGALA, R.B. The effect of populations of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* in bean reproductive tissues on seed infection of resistant and susceptible bean genotypes. **European Journal of Plant Pathology**, v.103, n.2, p.175-181, 1997.
- MABAGALA, R.B.; SAETTLER, A.W. An improved semiselective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Disease** (St. Paul), v.76, 443-446, 1992.

- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROSZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Científica**, São Paulo, v.22, n.2, p.277-288, 1994.
- MARINGONI, A.C.; KIMATI, H.; KUROSZAWA, C. Variabilidade sorológica entre isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Summa Phytopatologica**, v.20, n.3-4, p.164-167, 1994.
- MOURA, A.B. **Detecção e quantificação de *Pseudomonas syringae* pv. *lachrymans* em lotes de sementes de pepino**. Viçosa-MG: UFV, 1992. 53p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1992.
- NAKAMURA, K.; KIMTAI, H. Crestamento fosco do feijão no Estado de São Paulo. **Rev. Soc. Bras. Fitopatologia**, v.1, p.40-48, 1967.
- NEERGAARD, P. **Seed pathology**. London and Basingstoke: The Macmillan Press LTD. 1977. vol I, 839p.
- OLIVEIRA, J.R. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* em sementes de tomateiro. Viçosa: UFV, 1995. 98p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 1995.
- OLIVEIRA, J.R.; SOUZA, R.M. Feijão Comum: Doenças Causadas por Bactérias. In: do Vale, F.X.R. & Zambolim, L. **Controle de doenças de plantas: grandes culturas** (vol. 1). Viçosa, MG: UFV, Departamento de Fitopatologia; Brasília, DF: Ministério da Agricultura e do Abastecimento, 1997. 2v.: il.
- PARADELA FILHO, O.; CARVALHO, A.M.B.; POMPEU, A.S. Ocorrência de *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burk.) Starr & Burk. nos feijões do Estado de São Paulo. **Bragantia**, v.26, n.I-IV, 1967. (Nota 1).
- POLUNIN, M. **Alimentos que curam**. Copyright © 1997 Dorling Kindersley Limited, London. Copyright do texto © 1997 Miriam Polunin. Editora Marco Zero, São Paulo, SP.
- PROSEN, D.; HATZILOUKAS, E.; SCHAAD, N.W.; PANOPOULOS, N.J. Specific detection of *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* DNA in bean seed by polymerase chain reaction-based amplification of a phaseolotoxin gene region. **Phytopatology**, v.83, n.9, p.965-970, 1993.

- RAVA, C.A. Patogenicidade de isolados de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.19, p.445-448, 1984.
- RAVA, C.A.; SARTORATO, A. Crestamento bacteriano comum. In: Sartorato, A. & Rava, C.A. (Eds.) **Principais doenças do feijão comum e seu controle**. Brasília: EMBRAPA/SPI, 1994. P.217-242.
- ROMEIRO, R.S. **Métodos em bacteriologia de plantas**. Viçosa: UFV, 2001. 279p. : il.
- ROMEIRO, R. S. **Bactérias fitopatogênicas**. Viçosa: UFV, Imprensa Universitária, 1995. 283p. : il.
- ROMEIRO, R.S.; FUKUDA, C. Método simples para determinação de título de aglutinação e/ou precipitação do antissoro ou do antígeno. **Fitopatologia Brasileira**, v.8, n.1, p.93-95, 1983.
- ROMEIRO, R.S.; PEREZ, F.S.; OLIVEIRA, J.R.; DEL PELOSO, M.J. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.1, p.1-5, 1993.
- ROMEIRO, R.S.; MOURA, A.B.; OLIVEIRA, J.R.; SILVA, H.S.; BARBOSA, L.S.; SOARES, F.M.P.; PERES, F. Evidences of constitutive multiple resistance to antibiotics in some plant pathogenic bacteria. **Summa Phytopathologica**, v.24, p.220-225, 1998.
- SAETTLER, A.W.; SCHAAD, N.W.; ROTH, D.A. **Detection of bacteria in seed**. 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1989. 122p.
- SANTOS, J.B.; GAVILANES, M.L. Botânica. In: Vieira, C; Paula Jr., T. J de & Borém, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998.
- SANTOS, M.L.; BRAGA, M.J. Aspectos econômicos. In: Vieira, C; Paula Jr., T.J de & Borém, A. **Feijão: aspectos gerais e cultura no Estado de Minas**. Viçosa, MG: Editora UFV, 1998.
- SARTORATO, A. Manejo integrado de doenças do feijoeiro comum (1998). [on line]. Disponível na Internet via WWW.URL: <http://www.cnpaf.embrapa.br/homepage/pesquisa/projetos/04094061.htm> Arquivo capturado em 30/06/2000.
- SCHAAD, N.W. **Plant pathogenic bacteria**. 2.ed. St. Paul: American Phytopathological Society, 1988. 158p.

- SCHAAD, N.W.; JONES, J.B.; CHUN, W. **Laboratory guide for identification of plant pathogenic bacteria.** 3rd ed. American Phytopathological Society Press, St. Paul, 2001. 373p.
- SCHAAD, N.W.; VIDAVER, A.K.; LACY, G.H.; RUDOLPH, K.; JONES, J.B. Evaluation of proposed amended names of several pseudomonads and xanthomonads and recommendations. **Phytopathology**, v.90, p.208-21, 2000.
- SCHUSTER, M.L.; COYNE, D.P. Survival of plant parasitic bacteria of plants grown in tropics with emphasis on beans (*Phaseolus vulgaris*). **Fitopatologia Brasileira**, v.2, p.117-130, 1977.
- SIEGEL, M.R.; SISLER, H.D. (Eds.) **Antifungal compounds.** New York: Marcel Dekker, 1977. v.2. Interactions in biological and ecological systems. 674p.
- SOARES, F.M.P.; ROMEIRO, R.S.; OLIVEIRA, J.R.; VENTURA, J.A.; PEREZ, F. S. Desenvolvimento de um meio seletivo para *Pseudomonas marginalis*, agente etiológico da queima bacteriana do alho. **Fitopatologia Brasileira**, v.15, p.140, 1990. (Abstract).
- SUTTON, M.D.; WALLEN, V.R. Epidemiological and ecological relations of *Xanthomonas phaseoli* and *X. phaseoli* var. *fuscans* on beans in southwestern Ontario, 1961-1968. **Canadian Journal of Botany**, v.48, n.7, p.1329-1334, 1970.
- TAKATSU, A. Classificação atual de bactérias fitopatogênicas. **RAPP**, v.8, p.93-120, 2000.
- TOTH, I.K.; HYMAN, L.J.; TAYLOR, R.; BIRCH, P.R.J. PCR-based detection of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* var. *fuscans* in plant material and its differentiation from *X. campestris* pv. *phaseoli*. **Journal of Applied Microbiology**, v.85, p.327-333, 1998.
- TRUJILLO, G.E.; SAETTLER, A.W. A liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans*. Research rept. 411, Michigan State University Agricultural Experimental Station, East Lansing, 7pp. 1980.
- TUITE, J. **Plant pathological methods: fungi and bacteria.** Minneapolis: Burgess, 1969. 239p.

- VAKILI, N.G.; KAISER, W.J.; PEREZ, J.E.; CORTES-MONLLOR, A. Bacterial blight of beans caused by two *Xanthomonas* pathogenic types from Puerto Rico. **Phytopathology**, v.65, p.401-413, 1975.
- VALARINI, P.J. Método para Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em Sementes de Feijão. **Tese de Doutorado**, Piracicaba: ESALQ, 1990. 167p.
- VALARINI, J.P.; MENTEN, J.O.M.; LOLLATO, M.A. Incidência do cretamento bacteriano comum no campo e transporte de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* pelas sementes de feijão, obtidos por diferentes métodos. **Summa Phytopathologica**, v.18, p.160-166, 1992.
- VALARINI, P.J.; GALVÃO, J.A.H.; OLIVEIRA, D.A. *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*: importância do inóculo da semente na epidemiologia do cretamento bacteriano comum do feijoeiro. **Fitopatologia Brasileira**, v.21, n.2, p.261-267, 1996.
- VAUTERIN, L.; HOSTE, B.; KERSTERS, K.; SWINGS, J. Reclassification of *Xanthomonas*. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v.45, n.3, p.472-489, 1995.
- VELASQUEZ, N.C.; TRUJILLO, G. Comparación de metodologías para la detccion de la infeccion de semillas de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.) con la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* (Smith) Dye. **Agronomía Tropical**, v.34, n.1-3, p.29-39, 1984.
- VERNIERE, C.; PRUVOST, O.; DUBOIS, C. COUTEAU, A.; LUISETTI, J. Variations among the strains of *Xanthomonas* isolated from citrus in the sensibility to antibiotics. **Plant Pathogenic Bacteria**, p.247-251, 1992.
- WALKER, J.C.; PATEL, P.N. Splash dispersal and wind as factors in epidemiology of halo blight of bean. **Phytopatology**, v.54, p.140-141, 1964.
- WEBSTER, D.M.; ATKIN, J.D.; CROSS, J.E. Bacterial blights of snap beans and their control. **Plant Disease**, v.67, n.9, p.935-940, 1983.
- WRUCK, D.L.M. Análises bioquímica, patogênica, sorológica e molecular de isolados de *X. campestris* pv. *campestris*. Viçosa: UFV. 2001. 62p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Viçosa, 2001.

- WALLEN, V. R.; SUTTON, D. M. *Xanthomonas phaseoli* var. *fuscans* (Burkh.) Starr & Burkh. On field beans in Ontario. **Can. J. Bot.** 43: 437-446. 1965.
- WILSON, E. E.; ZEITOUN, F. M.; FREDRICKSON, D. L. Bacterial phloem canker, a new disease of Persian walnut trees. **Phytopathology** 57: 618-621. 1967.
- YOUNG, J.M.; SADDLER, G.S.; TAKIAWA, Y.; DE BOER, S.H.; VAUTERIN, L.; GARDAN, L.; GVOZDYAK, R.I.; STEAD, D.E. Names of plant pathogenic bacteria 1864-1995. **Review of Plant Pathology**, v.75, n.9, p.721-763, 1996.
- ZAUMEYER, W.J.; THOMAS, H.R. **A monographic study of bean diseases and methods for their control**. Washington, USDA. 1957. 225p. (USDA. Technical bulletin, 868).

APÊNDICES

APÊNDICE A

COMPOSIÇÃO DOS MEIOS SEMI-SELETIVOS

MXP

(CLAFLIN, L.E.; VIDAVER, A.K. & SASSER, M. MXP, a semi-selective medium for *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Phytopatology**, v.77, n.5, p.730-734, 1987)

K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
KBr	10,0 g
Extrato de Levedura	0,7 g
Amido Solúvel de Batata	8,0 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1.000 mL
Clorothalonil*	15,0 mg
Cefalexina*	20,0 mg
Kasugamicina*	20,0 mg
Gentamicina*	2,0 mg
Metil Violeta 2B*	30 µL
Metil Green*	60 µL

* Adicionados após a autoclavagem.

M-MXP (MXP modificado)

(ROMEIRO, R. da S.; PEREZ, F. da SILVEIRA; OLIVEIRA, J.R. de & PELOSO, M.J. Del. Detecção de *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli* em sementes de feijoeiro. **Revista Brasileira de Sementes**, v.15, n.1, p.1-5, 1993)

K ₂ HPO ₄	0,8 g
KH ₂ PO ₄	0,6 g
KBr	10,0 g
Extrato de Levedura	0,7 g
Amido Solúvel de Batata	8,0 g
Glucose	1,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1.000 mL
Metil Violeta 2B*	0,3 g
Metil Green*	0,6 g
Cefalexina *	50 ppm
Cefalotina*	100 ppm
Lincomicina*	50 ppm
Nitrofurantoína*	100 ppm
Kasugamicina*	100 ppm
Benlate*	150 ppm
Cicloheximida*	200 ppm

* Adicionados após a autoclavagem.

SSM

(TRUJILLO, G.E. & SAETTLER, A.W. A liquid semi-selective medium for *Xanthomonas phaseoli* and *Xanthomonas phaseoli* var *fuscans*. **Research rept** . 411, Michigan Sate University Agricultural Experimental Station, East Lansing, 7p. 1980.)

Extrato de Levedura	1,0 g
Cicloheximida*	25 mg
Nitrofurantoína*	2 mg
Ácido Nalídixico*	1,0 mg
Gentamicina*	0,5 mg
Tampão Fosfato 0,01M pH 7,2	1.000 mL

* Adicionados após a autoclavagem.

M-SSM (SSM modificado)

(MABAGALA, R.B. & SAETTLER, A.W. An improved semi-selective medium for recovery of *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Plant Disease** (St. Paul), v.76, p.443-446, 1992)

Extrato de Levedura	1,0 g
Amido Solúvel de Batata	8,0 g
Ágar	15,0 g
Metil Green*	6 µL
Metil Violeta 2B*	3 µL
Tampão Fosfato	970 mL
Cicloheximida*	25 µL/ mL
Nitrofurantoína*	2 µL/ mL
Ácido Nalidíxico*	1 µL/ mL
Sulfato de Gentamicina*	0,5 µL/ mL

* Adicionados após a autoclavagem.

XCP 1

Peptona (oxid special peptone)	10,0 g
KBr	10,0 g
CaCl	0,25 g
Agar	15,0 g
Amido Solúvel	10,0 g
Cristal Violeta	0,15 mL
Tween 80*	10,0 mL
Cefalexina (40 mg/ mL)*	50,0 mg (1,25 mL)
5-Fluorouracil (10 mg/ mL)*	0,4 mg (0,5 mL)
Tobramicina (0,8 mg/ mL)*	0,4 mg (0,5 mL)
Cicloheximida (100 mg/ mL)*	50 mg (0,5 mL)
Água destilada	1.000 mL

* Adicionados após a autoclavagem.

Milk-Tween (MT)

CaCl ₂	0,25 g
Proteose de Peptona n° 03	10,0 g
Agar	15,0 g
Tirosina	0,5 g
Skim milk powder	10,0 g
Tween 80*	10,0 mL
Cefalexina (40 mg/ mL)*	80 mg (2 mL)
Cicloheximida (100 mg/ mL)*	200 mg (2 mL)
Vancomicina (10 mg/ mL)*	10 mg (1 mL)
Água destilada	1.000 mL

* Adicionados após a autoclavagem.

Meio de Maringoni (MA)

(MARINGONI, A.C; KIMATI, H. & KUROZAWA, C. Desenvolvimento de meio de cultura semi-seletivo para *Xanthomonas campestris* pv. *phaseoli*. **Científica**, São Paulo, v.22, n.2, p.277-288, 1994.)

Extrato de Carne	3,0 g
Peptona	5,0 g
Amido solúvel	2,0 g
Sacarose	10,0 g
Agar	15,0 g
Água destilada	1000 mL
Clorothalonil*	20 Íg/ mL
Benomil*	20 Íg/ mL
Cefalexina Monohidratada*	30 Íg/ mL
Ácido Nalidíxico*	1 Íg/ mL
Nitrofurantoína*	2 Íg/ mL

APÊNDICE B

Quadro 1B – Substâncias antimicrobianas utilizadas no antibiograma qualitativo, suas respectivas concentrações por disco, atividade microbiana e diâmetro dos halos (em centímetros) formados durante o crescimento dos isolados

Substância Antimicrobiana	mg/Disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
			RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS
Ácido bórico	30	AB, AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ácido nalidíxico	30	AB	0,7	3,6	2,7	4,2	3,3	3,3	2,2	4,0	3,0	0,0	1,3	3,6	3,2	3,2	2,9	3,0
Ac. pipemídico	20	AB	1,9	1,7	2,1	3,5	1,9	0,0	1,6	3,4	2,8	2,1	0,0	0,0	2,1	3,8	0,0	1,5
Amicacina	30	AB	2,8	3,2	3,2	4,2	4,2	3,4	3,8	4,2	3,2	3,5	3,9	3,1	3,2	3,1	4,5	3,8
Amoxicilina	10	AB	0,0	0,0	1,1	0,0	5,0	0,0	1,1	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0
Ampicilina	10	AB	2,9	2,4	0,0	2,0	3,9	0,0	2,9	1,6	2,6	0,0	3,8	1,3	0,0	1,1	4,1	0,0
Aztreonam	30	AB	3,5	4,6	4,2	6,8	5,8	4,3	4,4	5,7	4,1	4,5	4,2	3,6	4,1	3,9	5,6	5,1
Carbenicilina	100	AB	1,0	0,0	0,0	0,0	2,8	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cefadroxil	30	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cefalexina	30	AB	1,2	1,8	1,2	1,8	2,1	1,6	2,2	1,5	1,7	0,8	0,0	0,0	1,7	0,0	0,0	1,1
Cefalotina	30	AB	0,8	1,3	1,3	2,0	3,4	0,0	1,5	1,5	1,2	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0
Cefepime	30	AB	3,2	4,6	3,6	5,6	5,2	4,4	4,2	5,1	3,7	4,0	5,3	4,3	3,7	4,8	5,6	4,8
Cefoperazona	75	AB	3,4	4,2	3,8	6,3	5,3	5,3	3,8	3,6	3,5	3,8	5,0	4,5	4,0	4,5	6,4	4,6
Cefotaxima	30	AB	2,6	4,1	3,1	5,2	5,0	4,7	3,5	4,0	4,3	3,1	3,4	4,2	4,3	4,6	2,1	4,2
Cefoxitina	30	AB	2,9	3,6	3,1	5,0	4,7	4,0	3,3	4,2	3,3	3,8	3,8	3,3	4,2	4,3	2,8	4,0
Ceftazidima	30	AB	3,5	4,8	4,4	6,0	6,0	5,8	4,8	4,5	4,6	4,2	4,5	4,8	4,6	4,2	7,0	5,0
Ceftriaxona	30	AB	2,3	2,9	2,5	4,5	5,1	3,8	3,2	3,9	3,3	2,1	3,5	3,0	3,3	4,0	4,8	3,4
Cicloheximida	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacina	5	AB	1,9	4,4	4,4	5,3	3,7	3,5	3,1	4,0	4,0	3,5	3,0	4,0	4,0	3,6	4,6	5,0
Clindamicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cloranfenicol	30	AB	2,8	4,8	3,6	3,1	4,9	5,0	4,3	4,2	3,5	3,5	1,1	3,0	3,0	4,6	2,4	3,0
Clorotalonil	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cotrimoxazol	25	AB	0,0	2,8	2,0	3,5	1,0	2,7	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	2,7	2,8	0,0	0,0	3,2
Eritromicina	15	AB	3,0	3,7	2,8	5,0	4,2	4,7	3,3	3,5	3,5	2,5	3,7	3,5	3,4	4,5	3,9	4,1

Continua...

Quadro 1B, Cont.

Substância Antimicrobiana	mg/Disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			01	02	03	04	05	06	07	08	09	10	11	12	13	14	15	16
			RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS	RS
Estreptomicina	10	AB	3,2	3,7	4,0	4,6	4,3	4,0	3,7	4,2	3,5	3,7	3,8	3,2	3,5	3,9	4,6	4,0
Gentamicina	10	AB	2,1	2,3	2,3	3,6	3,1	2,3	2,4	2,6	2,1	2,5	2,5	2,0	2,1	2,2	2,1	2,5
Imipenem	10	AB	2,6	3,6	2,8	4,7	3,2	3,7	3,7	4,5	4,2	1,5	3,6	4,6	2,7	4,9	3,5	4,2
Kasugamicina	30	AB, AF	1,3	0,9	1,2	0,0	1,1	0,0	1,1	0,8	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Lincomicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neomicina	30	AB	1,6	2,0	2,6	1,9	2,4	1,9	2,3	2,5	1,7	1,9	1,8	2,1	1,7	1,8	2,8	2,1
Netilmicina	30	AB	2,6	2,6	3,9	3,2	3,1	3,5	3,0	3,1	2,7	2,5	3,1	2,4	2,7	3,0	3,2	2,3
Nitrofurantoína	300	AB	0,0	1,3	0,0	1,1	0,0	0,8	0,0	1,0	1,1	0,0	0,0	1,0	1,1	0,0	0,0	0,0
Norfloxacin	5	AB	3,9	3,2	3,4	4,2	4,1	3,1	3,7	4,2	2,9	2,2	2,9	2,9	2,8	3,5	2,5	2,3
Oxacilina	1	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pefloxacin	5	AB	2,4	3,6	3,3	4,5	3,7	2,0	2,8	4,1	3,6	2,8	2,9	3,6	4,0	4,1	4,7	3,4
Penicilina G	10	AB	2,3	1,5	0,0	1,7	4,0	0,0	2,6	1,5	2,6	0,0	2,3	0,0	2,6	0,0	3,1	1,6
Rifamicina B	30	AB	2,9	3,2	3,1	5,4	4,3	4,6	3,4	4,2	3,1	3,4	4,1	4,0	3,1	3,3	4,5	3,5
Rifampicina	30	AB	4,4	5,6	4,5	7,1	5,6	6,3	4,6	4,8	5,0	5,0	5,1	5,3	5,1	6,3	7,2	6,0
Sulfazotrim	25	AB	0,0	0,0	0,0	3,9	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	2,4	0,0	0,0	2,2
Sulfonamida	300	AB	0,0	4,6	2,7	6,0	2,0	4,6	2,8	0,0	5,0	0,0	5,2	2,8	4,2	4,8	5,5	4,2
Tetraciclina	30	AB	3,9	5,0	4,5	5,9	5,2	5,9	4,3	4,3	4,0	4,5	5,5	5,0	4,0	4,8	6,3	5,6
Tobramicina	10	AB	1,9	2,0	3,1	2,7	2,5	2,3	3,0	2,7	2,0	2,2	2,4	2,1	2,0	2,3	2,6	2,6
Vancomicina	30	AB	3,0	3,3	3,2	3,8	4,0	3,8	3,5	2,8	2,8	0,0	2,9	3,0	3,0	3,2	4,2	3,2

¹ Atividade da substância antimicrobiana utilizada: AB (antibacteriana) e AF (antifúngica).

Quadro 1B, Cont.

Substância Antimicrobiana	mg/Disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
			RS	RS	RS	RS	ES	SP	SP	PR	SP	MG	MG	MS	MS	DF	MG	MG
Ácido bórico	30	AB, AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ácido nalidíxico	30	AB	2,6	4,4	2,9	2,1	1,9	3,0	0,0	2,1	3,0	2,2	2,9	1,9	3,0	2,1	1,5	3,2
Ac. pipemídico	20	AB	1,1	0,0	3,3	1,3	1,2	3,7	0,0	0,9	3,2	1,4	2,0	2,5	3,5	1,3	1,8	1,3
Amicacina	30	AB	2,9	4,2	3,4	2,9	2,6	2,9	3,9	4,0	3,9	3,2	3,3	3,5	3,4	2,6	3,2	2,9
Amoxicilina	10	AB	2,7	0,0	0,0	0,0	5,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,3	1,3	0,0	0,0	4,6
Ampicilina	10	AB	3,5	0,0	3,8	1,7	4,5	0,0	0,0	3,4	2,9	3,4	4,4	1,6	2,2	1,5	1,0	4,2
Aztreonam	30	AB	4,0	5,1	5,5	4,3	3,8	4,1	5,2	5,8	4,3	3,6	3,7	4,4	4,3	4,3	4,0	3,8
Carbenicilina	100	AB	1,3	0,0	0,0	0,0	0,0	2,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	2,9	1,8	0,0
Cefadroxil	30	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	1,5	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,9
Cefalexina	30	AB	0,9	1,0	0,0	1,0	1,6	1,4	0,0	0,0	1,2	1,5	1,1	1,5	1,5	1,4	1,5	1,4
Cefalotina	30	AB	0,8	1,8	0,0	0,0	3,2	0,0	1,0	1,9	0,0	0,9	2,2	1,8	2,1	1,1	1,0	2,9
Cefepime	30	AB	4,2	4,8	5,8	4,0	3,7	4,1	3,5	5,8	3,1	3,6	3,5	4,9	4,4	4,0	4,8	4,8
Cefoperazona	75	AB	4,2	5,7	6,2	4,0	4,1	3,1	4,3	6,0	3,8	3,7	3,4	4,2	4,7	3,7	4,5	4,8
Cefotaxima	30	AB	3,0	5,6	5,8	2,9	3,4	2,2	3,3	5,2	3,6	3,1	2,8	4,4	4,7	3,6	4,8	4,7
Cefoxitina	30	AB	3,4	3,6	3,8	3,0	3,1	3,5	1,1	4,4	3,2	3,3	3,0	4,1	4,2	3,8	4,0	3,4
Ceftazidima	30	AB	4,5	5,9	6,1	5,2	3,8	4,4	4,4	5,5	4,4	4,0	3,5	4,5	4,4	3,8	4,9	3,9
Ceftriaxona	30	AB	2,9	5,2	4,6	2,3	3,8	2,1	1,0	4,1	2,7	2,7	1,8	3,2	3,5	3,1	3,2	4,3
Cicloheximida	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacina	5	AB	2,4	4,2	3,9	3,4	3,3	4,4	2,9	3,0	4,8	3,6	2,6	4,6	3,1	2,0	2,8	3,4
Clindamicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cloranfenicol	30	AB	3,1	4,6	3,3	3,9	2,5	4,2	2,4	4,0	1,0	3,8	3,8	1,5	3,6	3,2	4,7	3,3
Clorotalonil	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cotrimoxazol	25	AB	1,8	4,6	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	1,2	0,0	2,4	2,0	0,0	0,0	0,0
Eritromicina	15	AB	2,4	5,0	5,0	2,5	3,1	2,8	3,1	3,9	3,5	2,7	2,6	3,3	4,0	3,5	3,8	3,0
Estreptomicina	10	AB	4,1	5,4	4,2	3,4	3,1	3,1	4,0	4,2	3,9	3,5	3,4	3,6	3,4	3,0	3,5	2,9
Gentamicina	10	AB	2,9	3,6	2,4	2,0	1,9	2,3	3,4	2,7	2,3	2,2	2,5	2,9	2,3	2,6	2,3	2,2
Imipenem	10	AB	3,1	3,4	4,0	2,8	4,6	2,4	1,0	4,1	3,1	3,4	2,2	4,1	4,3	3,6	3,5	4,8

Continua...

Quadro 1B, Cont.

Substância Antimicrobiana	mg/Disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32
			RS	RS	RS	RS	ES	SP	SP	PR	SP	MG	MG	MS	MS	DF	MG	MG
Kasugamicina	30	AB, AF	1,1	0,0	0,0	1,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,9	1,6	1,1	0,0	0,0	0,0	0,0	0,7
Lincomicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neomicina	30	AB	2,0	1,4	2,3	2,2	1,6	2,0	1,9	1,9	2,5	2,1	1,9	2,0	1,9	1,9	1,7	1,8
Netilmicina	30	AB	2,2	2,9	3,7	2,2	2,7	2,7	3,1	3,2	3,3	2,8	2,5	3,0	2,8	2,8	2,7	2,5
Nitrofurantoína	300	AB	0,0	1,3	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	0,0	0,0	1,2	1,9	1,2	0,9	0,0
Norfloxacin	5	AB	2,5	3,2	3,2	3,2	2,3	3,7	3,1	0,9	3,9	3,0	2,1	4,1	2,8	3,4	3,4	3,0
Oxacilina	1	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Pefloxacin	5	AB	2,5	5,0	4,5	3,4	3,3	3,5	1,9	3,3	3,4	2,8	2,6	2,7	4,2	2,9	2,7	3,1
Penicilina G	10	AB	2,4	3,8	3,4	2,2	3,3	0,0	0,0	2,8	2,3	2,7	0,0	0,0	1,8	1,4	1,5	4,3
Rifamicina B	30	AB	2,8	4,6	5,2	3,0	3,5	2,9	4,0	4,8	3,2	3,1	3,1	3,7	3,4	3,7	3,5	3,2
Rifampicina	30	AB	4,2	6,3	7,5	4,6	4,6	4,1	5,5	6,5	4,9	4,4	4,6	5,4	5,0	5,1	5,5	4,4
Sulfazotrim	25	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	3,2	0,0	0,0	0,0
Sulfonamida	300	AB	3,0	7,0	6,0	3,2	0,0	3,2	4,0	4,6	0,0	2,7	3,3	4,2	4,0	2,8	3,1	3,4
Tetraciclina	30	AB	4,4	5,6	6,4	4,3	4,5	4,2	5,8	6,6	4,6	4,5	4,3	5,0	4,8	4,5	4,5	5,0
Tobramicina	10	AB	2,2	3,5	3,2	2,2	2,1	2,0	2,5	2,2	2,6	2,6	2,0	2,2	2,0	2,5	1,8	2,2
Vancomicina	30	AB	3,0	3,6	4,0	2,9	2,9	2,9	2,8	3,7	3,3	3,1	3,5	3,0	3,0	3,1	3,3	2,8

¹ Atividade da substância antimicrobiana utilizada: AB (antibacteriana) e AF (antifúngica).

Quadro 1B, Cont.

Substância Antimicrobiana	mg/disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
			MG	DF	DF	DF	DF	GO	DF	GO	PR	PR	PR	PR	PR	MG	MG	MG
Ácido bórico	30	AB, AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ácido nalidíxico	30	AB	2,5	1,9	1,6	2,5	2,0	2,8	2,2	2,9	1,7	2,0	1,8	1,2	2,2	2,3	1,0	0,0
Ac. pipemídico	20	AB	1,5	0,8	1,9	1,9	2,7	1,9	1,5	2,7	1,2	1,6	1,8	2,0	1,9	3,3	3,2	1,0
Amicacina	30	AB	3,5	2,8	3,2	3,0	2,5	3,2	3,0	2,4	3,1	3,4	3,0	3,9	2,8	3,1	2,7	2,9
Amoxicilina	10	AB	4,8	4,2	0,0	0,0	3,2	1,3	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	3,4	0,0	3,8	0,0	0,0
Ampicilina	10	AB	3,9	4,0	0,0	3,4	3,4	2,2	2,6	0,0	0,0	1,5	0,0	3,7	1,1	4,5	0,0	1,6
Aztreonam	30	AB	3,7	3,6	3,8	4,4	3,4	3,9	4,2	2,9	3,9	4,0	2,9	5,0	4,3	4,7	2,9	3,5
Carbenicilina	100	AB	0,0	1,2	0,0	3,3	1,3	0,0	0,0	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	2,3	1,0	0,0
Cefadroxil	30	AB	1,0	0,0	0,0	0,0	2,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,0	0,0	1,8	0,0	0,0
Cefalexina	30	AB	1,2	1,9	1,0	1,9	1,2	1,3	1,9	0,9	1,3	1,1	0,9	1,2	1,8	3,0	0,9	0,9
Cefalotina	30	AB	2,4	3,0	0,0	1,3	0,9	1,3	1,6	0,0	0,0	0,0	0,0	1,2	1,2	2,9	0,0	0,8
Cefepime	30	AB	4,3	3,5	3,3	4,2	3,8	4,5	3,9	3,0	3,5	3,7	3,0	4,1	3,9	4,8	2,5	3,3
Cefoperazona	75	AB	4,5	4,3	3,7	4,3	4,1	4,6	3,9	3,5	3,5	3,8	3,4	4,5	3,7	5,5	3,9	3,6
Cefotaxima	30	AB	4,4	4,5	2,7	3,7	4,3	3,7	4,4	3,4	2,5	3,1	2,1	3,8	3,2	4,8	2,5	3,0
Cefoxitina	30	AB	4,0	3,4	3,3	4,0	3,8	3,9	4,1	3,3	3,1	2,7	2,5	4,1	3,7	5,2	2,5	2,7
Ceftazidima	30	AB	4,5	3,8	4,4	4,3	3,7	4,5	3,5	3,0	3,8	4,5	2,5	5,2	3,6	4,5	3,6	4,0
Ceftriaxona	30	AB	4,0	4,1	1,9	3,5	3,5	3,6	3,4	2,3	2,0	2,2	2,0	3,7	2,2	4,5	1,9	2,2
Cicloheximida	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Ciprofloxacina	5	AB	2,5	2,5	3,7	3,3	3,5	3,4	3,6	3,0	2,9	2,6	2,2	3,1	2,9	4,5	2,8	3,0
Clindamicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cloranfenicol	30	AB	2,5	2,0	2,7	4,4	3,2	3,5	4,0	3,0	2,1	2,5	2,5	3,3	3,1	4,2	2,7	3,3
Clorotalonil	100	AF	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Cotrimoxazol	25	AB	0,0	0,0	0,0	2,5	3,5	3,2	3,2	0,0	1,5	0,0	0,0	2,4	2,0	3,5	0,0	0,0
Eritromicina	15	AB	2,9	2,8	2,1	3,2	2,2	4,3	4,0	1,8	2,3	2,2	2,1	3,2	2,7	3,1	2,3	2,9
Estreptomicina	10	AB	3,6	3,2	3,2	3,9	2,9	3,4	3,0	2,8	3,1	3,4	2,9	4,1	3,5	3,7	3,1	3,0
Gentamicina	10	AB	2,0	2,3	1,9	2,3	2,0	2,4	1,9	2,0	2,1	2,5	2,0	1,9	2,5	2,4	1,9	2,2
Imipenem	10	AB	4,9	4,4	2,0	3,9	4,2	3,9	3,8	2,5	2,0	1,2	2,4	3,3	2,6	4,4	2,8	1,5

Continua...

Quadro 1B, Cont.

Substância Antimicrobiana	mg/disco	Atividade ¹	Nº do Isolado/Estado de Origem															
			33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48
			MG	DF	DF	DF	DF	GO	DF	GO	PR	PR	PR	PR	PR	MG	MG	MG
Kasugamicina	30	AB, AF	0,0	0,0	1,2	1,2	0,7	0,0	0,0	0,9	1,1	1,1	1,0	1,3	1,3	1,8	1,2	1,2
Lincomicina	2	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Neomicina	30	AB	2,0	1,7	1,7	1,8	1,9	1,9	1,8	1,8	1,8	2,0	1,8	2,1	1,9	2,0	1,9	1,8
Netilmicina	30	AB	2,4	2,5	2,6	3,1	2,6	2,9	2,1	2,1	2,1	2,5	2,3	2,5	2,3	2,1	3,0	2,2
Nitrofurantoína	300	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,4	1,2	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
Norfloxacin	5	AB	3,0	2,2	3,0	3,0	3,5	3,7	1,9	2,7	2,1	2,0	2,4	2,2	2,4	3,6	2,5	3,0
Oxacilina	1	AB	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,1	0,0	0,0
Pefloxacin	5	AB	2,8	2,5	3,4	2,8	3,6	3,5	4,0	3,5	2,2	2,1	1,6	3,0	2,9	4,0	2,5	3,5
Penicilina G	10	AB	3,7	3,5	0,0	2,3	3,1	2,2	2,0	0,0	1,4	1,5	1,2	3,2	1,7	5,0	1,5	1,9
Rifamicina B	30	AB	3,7	2,9	3,0	4,1	2,8	4,0	3,8	2,5	3,3	3,2	2,6	3,5	3,5	4,7	3,0	3,2
Rifampicina	30	AB	5,4	4,6	4,4	4,1	3,5	5,8	4,8	3,2	4,2	4,0	3,1	4,3	4,2	5,0	3,8	3,6
Sulfazotrim	25	AB	0,0	0,0	0,0	2,0	3,1	3,5	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0	1,9	2,0	3,7	0,0	0,0
Sulfonamida	300	AB	3,0	0,0	2,5	4,4	4,3	5,2	5,8	2,1	3,2	3,3	2,3	4,3	4,2	5,5	2,5	2,6
Tetraciclina	30	AB	4,5	4,3	4,5	4,8	3,8	5,3	4,5	3,8	4,4	4,5	4,1	4,9	5,0	5,8	4,1	3,8
Tobramicina	10	AB	2,2	2,9	2,4	2,0	1,6	2,2	2,0	1,7	2,1	2,5	2,1	2,2	2,1	2,3	1,8	2,0
Vancomicina	30	AB	3,2	2,8	2,8	3,1	2,8	3,4	3,0	2,1	3,1	3,1	2,1	3,0	3,2	4,1	2,3	2,7

¹ Atividade da substância antimicrobiana utilizada: AB (antibacteriana) e AF (antifúngica).