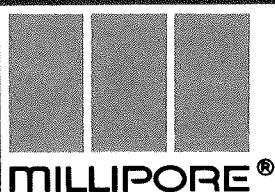


Volume 10 Número 2 Abril-Jun. 1979

Revista de Microbiologia

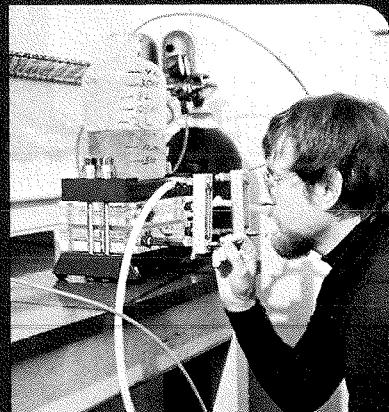
Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil



SE VOCÊ TEM PROBLEMAS COM:

- Rejeição por partículas
- Pirogênio - remoção e análise
- Esterilização e clarificação
- Água para injetáveis
- Análises bacteriológicas
- Ensaio de esterilidade
- Água ultrapura para laboratórios
(Excedendo padrões ASTM, USP, CAP)
- Concentração, separação e diálise
de macromoléculas

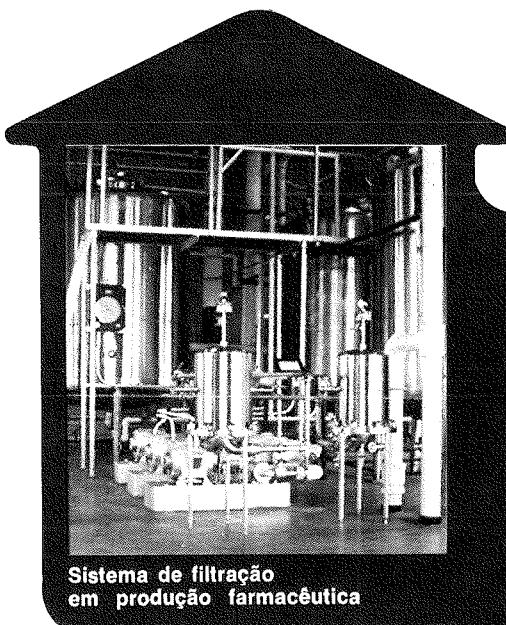
NÓS TEMOS A SOLUÇÃO,
APLICANDO NOSSA TECNOLOGIA,
ATRAVÉS DE TÉCNICOS DE NÍVEL
SUPERIOR, ESPECIALMENTE
TREINADOS.



Sistema Cassete de ultrafiltração



Sistema Milli-Q para purificação
de água



Sistema de filtração
em produção farmacêutica



Sistema para análise bacteriológica
e de esterilidade

Millipore Ind. e Com. Ltda. - Subsidiária da Millipore Corporation
Rua Guilherme Bannitz, 147 - CEP 04532 - São Paulo - Cx. Postal 19065
Tel. 531-4439 - Telex 1125078 Mily BR.



Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

Conselho Diretor Luiz Rachid Trabulsi, Italo Suassuna e Wilson Chagas de Araujo

Diretor Executivo João Salvador Furtado
Instituto de Botânica
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Diretores Associados Flávio Alterthum
Instituto de Química — USP
Caixa Postal 20780
01000 São Paulo SP

Assistente de Diretoria Leila Vasconcellos
Sociedade Brasileira de Microbiologia
Caixa Postal 4005
01000 São Paulo SP

Aquisição por não-membros Assinatura anual para quatro números: Cr\$ 400,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 100,00 para o Brasil e US\$ 7.00 (via aérea) ou US\$ 6.00 (via marítima) para o Exterior. Cheques em nome da Sociedade Brasileira de Microbiologia, para o endereço do Diretor Executivo da Revista de Microbiologia.

Acquisition by non-members Annual subscription for four numbers: US\$ 25.00 (surface mail) or US\$ 30.00 (air mail). Single copies: US\$ 7.00 (air mail) or US\$ 6.00 (surface mail). Checks for Sociedade Brasileira de Microbiologia, addressed to the Director's office.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

| | | |
|------------------|---|--|
| Diretoria | Presidente Wilson Chagas de Araujo Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências Médicas Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ | Secretário Geral Nelson Jeronymo Lourenço Faculdade de Ciências Médicas UERJ Departamento de Micro e Imunologia R. Teodoro da Silva, 48 20000 Rio de Janeiro RJ |
| | Vice-Presidente João Salvador Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP | Tesoureiro Milton Mangini 01000 São Paulo SP |

Objetivos A Sociedade Brasileira de Microbiologia, fundada em 28 de setembro de 1956, é sociedade civil, sem fins lucrativos, dedicada a agremiar microbiologistas brasileiros; a promover o desenvolvimento da microbiologia através do estímulo à pesquisa científica e suas aplicações, melhorar as qualificações profissionais dos microbiologistas; e manter intercâmbio e fazer aproximação com entidades que visem objetivos semelhantes. Organiza, anualmente, na última semana do mês de julho, o Congresso Brasileiro de Microbiologia e edita a Revista de Microbiologia, com distribuição trimestral. Para informações sobre a SBM, escrever para qualquer membro da Diretoria.

Instruções aos autores

A Revista de Microbiologia publica trabalhos originais em todos os campos da microbiologia e da protozoologia. Revisões e atualizações serão publicadas a convite do conselho diretor.

Os manuscritos devem ser enviados em duplicata (original e uma cópia) para o Diretor Executivo da Revista.

NORMAS GERAIS — Todo manuscrito submetido à Revista deve representar pesquisa original inédita e que não será publicada em outro órgão. Os trabalhos podem ser redigidos em português, espanhol ou inglês. Se aceitos pela Revista, não poderão ser reproduzidos, mesmo em partes, sem permissão oficial dos Diretores da Revista.

A Revista segue, essencialmente, o "Style Manual for Biological Journals" (2^a edição, AIBS, 1964). Os símbolos genéticos devem seguir, essencialmente, as recomendações de Demerec & col. (Genetics, 54:61, 1966). Abreviações bioquímicas devem seguir, essencialmente, as regras da IUPAC-IUB (J. Biol. Chem., 241:527, 1966). Atividade enzimática deve ser expressa em termos de unidades internacionais (Enzyme Nomenclature, Elsevier Publ. Co., 1965). Para pesos e volumes, devem ser usados os prefixos nano (n) e pico (p), ao invés de milímicro ($\mu\mu$) e micromico ($\mu\mu$). Comprimentos devem ser expressos em micrômetro (μm ; 10^{-6}m), ao invés de micro (μ); nanômetro (nm ; 10^{-9}m), ao invés de milímicro (μm); e Angstroms (\AA ; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ou microlitros por litro ($\mu\text{litos/litro}$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

NOMENCLATURA DE MICRORGANISMOS — A combinação binomial, nome do gênero seguido do da espécie, é adotada e a nomenclatura apresentada no "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" (7^a ed., 1957) obedecida. Se o Autor divergir dessa nomenclatura, seu julgamento será respeitado, mas a classificação correspondente ao Manual de Bergey deverá ser mencionada a seguir, entre parênteses, à primeira vez em que o nome figurar no texto e no resumo.

Quando um nome novo for proposto para um microrganismo, será solicitada a opinião de uma autoridade internacional em taxonomia.

FORMA DO MANUSCRITO — Os trabalhos devem ser datilografados em papel branco, comum, tamanho ofício, em espaço duplo ou triplo, deixando-se o mínimo de 3 cm de margens laterais, superior e inferior. Títulos de capítulos de primeira ordem devem ser centrados, incluídos essencialmente pela ordem: **Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos, Referências Bibliográficas**. Os de subcapítulos devem ser junto à margem esquerda.

A página-título deverá conter apenas e tão somente: (i) o título do artigo, centrado usando-se letras maiúsculas somente quando obrigatórias, (ii) o(s) nome(s) do(s) autor(es) com maiúsculas e minúsculas normalmente usadas e (iii) afiliação como nota de rodapé, indicada por asterisco.

O resumo não deverá ultrapassar 250 palavras. Os trabalhos redigidos em inglês devem ser acompanhados de um título e resumo em português; os redigidos em português e espanhol, de um título e resumo em inglês. O resumo na língua do trabalho e o título com resumo na outra língua devem ser datilografados em página separada do restante do texto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS — No texto, as referências devem ser citadas por número. Os sobrenomes, de dois autores devem ser separados por &; quando houver mais de dois autores, a separação é feita por ponto e vírgula e o último por &. Na secção **Referências Bibliográficas**, as citações devem ser por ordem alfabética de autor (ou da mesma combinação de autores) e, para um mesmo autor, em ordem cronológica, numeradas sequencialmente. Os artigos em periódicos devem ser citados na seguinte ordem: nome(s) do(s) autor(es) em maiúsculas e minúsculas, título do trabalho, nome do periódico (abreviado de acordo com o World Medical Periodicals), número do volume, número do fascículo (quando desejado; colocado entre parênteses), número da primeira e da última página do artigo, e ano da publicação.

Exemplo:

Weiser, O. L. & Emerson, J. S. — Selective screening for quantitative urine cultures.
Amer. J. clin. Path., 45:649-650, 1966.

Quando puder ocorrer confusão com o título do periódico, o local da publicação deverá ser mencionado entre parênteses, após a abreviação. Exemplo: Publ. Hlth Rep. (Wash.).

Citações de livros devem ter a seguinte ordem: autor(es), título, edição, local, editores e data. Exemplo:

Miller, S. E. — A textbook of clinical pathology. 6th ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1960.

Citações de "resumos", "dados não publicados", "comunicações pessoais" ou "no prelo" poderão ser adequadamente mencionadas no texto, mas não serão aceitas como referências bibliográficas.

TABELAS — Devem ser numeradas em árabe e datilografadas em páginas separadas. Os dados devem ser arranjados de maneira que colunas de material idêntico sejam lidas perpendicular e não transversalmente. Cabeçalhos e legendas devem ser suficientemente claros e compreensíveis, sem necessidade de consulta ao texto. São permitidas notas explanativas de rodapé indicadas por asteriscos, mas não descrições pormenorizadas dos experimentos. Materiais e métodos utilizados para a obtenção dos resultados devem ser incluídos na secção correspondente.

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com retículas devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob **TABELAS**. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

NOTAS BREVES — Não devem exceder a 500 palavras e o respectivo resumo não mais do que 25. O(s) autor(es) deve(m) consultar um número da Revista para familiarização com a forma e o estilo.

SEPARATAS — Serão fornecidas, gratuitamente 50 separatas por artigo. Para encomendas maiores, o(s) autor(es) deve(m) entrar em entendimento com o Diretor Executivo, correndo as despesas por conta dos interessados.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 10 Abril-Junho 1979 Número 2

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10(2)

CONTEÚDO

| | | | |
|---|----|---|---|
| Marcelo Magalhães & Adelma Véras | 43 | Plasmídios R de cepas hospitalares de <i>Salmonella typhimurium</i> | <i>R plasmids from nosocomial strains of Salmonella typhimurium</i> |
| Celso L. Cardoso & Paulo P. Gontijo Filho | 46 | Utilização de petróleo e hidrocarbonetos por micobactérias | <i>Petroleum and hydrocarbon degradation by mycobacteria</i> |
| S.M. Goyal & A.W. Hoadley | 50 | Salmonelas e plasmídios-R associados, em abatedouros de aves | <i>Salmonellas and their associated R-plasmids in poultry processing wastes</i> |
| Celso L. Cardoso & Paulo P. Gontijo Filho | 59 | Ocorrência de micobactérias em águas poluídas com resíduos industriais e domésticos | <i>Occurrence of mycobacteria in water polluted with industrial and domestic residues</i> |
| Luiz R. Trabulsi | 66 | Concentrações inibitórias do sulfato de cefoxitina para bactérias anaeróbias | <i>Susceptibility of anaerobic bacteria to cefoxitin</i> |
| A. Purchio C.R. Paula & W. Gambale | 69 | Isolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> de água do mar | <i>Isolation of Sporothrix schenckii from sea water</i> |
| György M. Oláh Louise Innes-Gaboury Otto Reisinger & Odette DesBiens | 72 | Polaridade bacteriana em substratos em via de biodegradação | <i>Polarité bactérienne observée dans différents milieux en voie de biodégradation</i> |

CONTENTS

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Interlabor – Importação e Exportação de Artigos para Laboratórios Ltda.

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Plasmídios R de cepas hospitalares de *Salmonella typhimurium*

Marcelo Magalhães*
 & Adelma Véras

Resumo

As linhagens multirresistentes de *Salmonella typhimurium*, atualmente predominando no Brasil, como agentes causais de infecções hospitalares infantis, transportam três diferentes classes de plasmídios R. O primeiro, pPE756 (ApSmSu), é conjugativo e pertence ao grupo Inc N. O segundo, pPE757 (CmKmTe), é plasmídio não auto-transferível, mas mobilizável pelos genes transferidores de pPE756. O terceiro plasmídio, pPE771 (Gm), governa resistência à gentamicina, canamicina e tobramicina, é conjugativo, pertence ao grupo Inc M e impede a fagotipagem da salmonela hospedeira.

Summary

R plasmids from nosocomial strains of Salmonella typhimurium

Multiresistant strains of *Salmonella typhimurium*, which are being recovered at a growing rate from pediatric nosocomial infections in Brazil, carry three different kinds of R plasmids. The first, pPE756 (ApSmSu), is conjugative and belongs to group Inc N. The second, pPE757 (CmKmTe), is a non self-transferable plasmid but can be mobilized by the transfer genes of pPE756. The last plasmid, pPE771 (Gm), controls the resistance against gentamicin, kanamycin, and tobramycin, is conjugative, belongs to group Inc M, and becomes the host salmonella untypable by phages.

Introdução

Nos últimos anos, linhagens multirresistentes de *Salmonella typhimurium* têm sido responsabilizadas pela maioria dos casos de infecção em berçários e hospitais infantis de São Paulo (4,7) e Recife (5). As gastroenterites produzidas são graves, geralmente complicadas por septicemias e meningites e as cepas bacterianas isoladas caracterizam-se por notável uniformidade de sorotipo (4,12:i:1,2), de fagotipo (193), e de antibiótipo (ApCmKmSmSuTeNx)**. Freqüentemente, este modelo R apresenta ainda o caráter Gm, responsável pela gentamicina-resistência.

Considerando a crescente importância de *S. typhimurium*, na etiologia das infecções hospitalares infantis, em nosso meio, decidiu-se caracterizar seus plasmídios R; os resultados são agora apresentados.

Material e Métodos

Duas amostras, recém-isoladas, de *S. typhimurium*, representativas dos dois modelos R mais freqüentemente encontrados no Instituto Materno Infantil de Pernambuco (IMIP), foram utilizadas como fontes doadoras de plasmídios R. A linhagem PE756, fagotipo 193, antibótipo ApCmKmSmSuTeNx e a linhagem PE771, não fagotipável, antibótipo ApCmKmSmSuTeNx-Gm.

As características das cepas padrão de *Escherichia coli* K12, F- ou transportando plasmídios pertencentes a diversos grupos referência, foram descritas anteriormente (6). Os meios de cultivo e os métodos usados nos estudos de conjugação, determinação do caráter Fi, e classificação dos plasmídios nos grupos de incompatibilidade foram aqueles relatados por Smith & col. (8). Na determinação dos grupos de in-

* Microbiologia Médica, Centro de Ciências da Saúde, Cidade Universitária, 50000 Recife, PE.

** Ampicilina, cloranfenicol, canamicina, estreptomicina, sulfametoxazol, tetraciclina e ácido nalidixico.

-compatibilidade, os plasmídios isolados das amostras tipo-selvagem de *S. typhimurium*, transferidos para *E. coli* K12 rif, foram os plasmídios residentes, enquanto os plasmídios de referência foram os superinfectantes.

Resultados e Discussão

Os resultados dos cruzamentos entre a cepa de *S. typhimurium* PE756 e *E. coli* K12 mostraram dois tipos de clones transconjugantes. Um deles, transportando os caracteres ApSmSu, foi encontrado à freqüência de 1×10^{-4} por célula doadora, enquanto o outro clone, transportando ApSmSuCmKmTe, foi isolado mais raramente (1×10^{-6}). Os estudos de retransferência e de segregação dos determinantes R, nas colônias transconjugantes, indicaram que a amostra doadora PE756 possui dois plasmídios R. O primeiro, pPE756 (ApSmSu), governando resistência à ampicilina, estreptomicina e sulfato, é um plasmídio conjugativo. O segundo, pPE757 (CmKmTe), codificando resistência ao cloranfenicol, canamicina e tetraciclina, é um plasmídio não auto-transferível, porém mobilizável pelos genes transferidores de pPE756 (ApSmSu). Os genes responsáveis pela resistência ao ácido nalidíxico, provavelmente tem localização cromossômica, desde que não puderam ser transferidos ou mobilizados, mesmo com a ajuda dos plasmídios Δ ou X.

A análise dos clones transconjugantes, derivados dos cruzamentos entre a amostra PE771 e *E. coli* K12, mostrou que PE771, além de possuir os mesmos tipos de plasmídios encontrados na cepa PE756, transporta um outro, mais. Es-

te, o plasmídio pPE771 (Gm), codifica resistência à gentamicina, é conjugativo e transfere-se para a *E. coli* K12 à freqüência de aproximadamente 1×10^{-3} por célula doadora. Embora não se tenha feito qualquer tentativa de caracterizar a enzima droga-inativadora, codificada por pPE771 (Gm), o fenótipo da bactéria hospedeira sugere fortemente tratar-se da 2' aminoglicosídeo adenililtransferase, enzima capaz de inativar, simultaneamente, gentamicina, sisomicina, canamicina e tobramicina (3). Em outras linhagens de *S. typhimurium*, isoladas no IMIP, mas não incluídas no presente estudo, o caráter Gm freqüentemente está ligado ao caráter Ap. Nestas linhagens, portanto, dois grupos de genes, localizados em diferentes plasmídios, controlam a inativação da ampicilina. Fato semelhante ocorre com referência à canamicina que, nestas amostras gentamicina-resistentes, é substrato tanto para a gentamicina adenililtransferase, como para outra enzima, controlada pelo próprio plasmídio Km. Esta enzima provavelmente é a 3' aminoglicosídeo fosfotransferase, desde que, além da canamicina, neomicina e paromimicina são também inativadas (3). A existência de um plasmídio conjugativo, codificando somente resistência à ampicilina, semelhante ao encontrado recentemente em certas cepas lactose-positivas de *S. typhimurium* (1), não pode ser evidenciada em nossas duas amostras. Talvez, se um maior número de culturas fossem incluídas no estudo, o plasmídio Ap poderia ter sido isolado.

Os testes de incompatibilidade mostraram que os plasmídios ApSmSu, independentemente da linhagem bacteriana doadora, pertencem ao grupo Inc N e inibem a fertilidade. Estes

Tabela 1 — Incompatibilidade de pPE771 (Gm)^a

| Plasmídio referência | Grupo Inc | Placa Matriz | Com pPE771 | Nº de colônias transconjugantes replicadas ^b | |
|----------------------|-----------|--------------|------------|---|----------------------|
| | | | | Com o plasmídio referência | Com ambos plasmídios |
| R386 | FI | 210 | 205 | 200 | 200 |
| R538 | FII | 190 | 180 | 190 | 190 |
| R124 | FIV | 160 | 150 | 150 | 140 |
| R144 | Ia | 190 | 180 | 170 | 170 |
| R621a | 1g | 200 | 200 | 190 | 180 |
| RP4 | P | 180 | 180 | 170 | 170 |
| R446b | M | 400 | 340 | 40 | 0 |
| RN3 | N | 180 | 180 | 180 | 180 |
| R27 | W | 190 | 180 | 190 | 170 |

^a pPE771 foi o plasmídio residente

^b resultante de 3 clones "duplos" purificados

plasmídios, diferentemente de outros plasmídios pertencentes ao grupo N, não tornam a bactéria hospedeira suscetível ao fago lke e produzem específica fago-restricção em *S. typhimurium* tipo 36 (2). Por outro lado, os plasmídios Gm ou ApGm são F⁻ e pertencem ao grupo Inc M (Tabela 1). Plasmídios Gm, com características semelhantes a esses, foram previamente isolados na França, de outras entero-bactérias e de *Pseudomonas* (9). A semelhança dos plasmídios ApSmSu e CmKmTe, encontrados nas duas cepas estudadas, sugere que as li-

nhagens gentamicina-resistentes de *S. typhimurium*, não fagotipáveis, cada vez mais comuns nos hospitais infantis do Recife, originalmente pertenceram ao fagotipo 193 e que se tornaram não fago-tipáveis ao adquirirem o plasmídio Gm.

Agradecimentos

Ao Prof. E.S. Anderson pela fagotipagem e srotipagem de nossas culturas.

Referências Bibliográficas

1. Affonso, M.H.T.; Toledo, M.F.R. & Trabulsi, L.R. — Natureza genética da fermentação da lactose em amostras de *Salmonella typhimurium*. Rev. Microbiol., 8:110-116, 1977.
2. Anderson, E.S.; Threlfall, J.E.; Carr, J.M. & Frost, J.A. — Transferable drug-resistance in *Salmonellae* in South and Central America. Proc. Soc. Gen. Microbiol., 1:66, 1974.
3. Benveniste, R. & Davies, J. — Mechanisms of antibiotic resistance in bacteria. Ann. Rev. Biochem., 42:471-506, 1973.
4. Falcão, D.P.; Trabulsi, L.R.; Hickman, F.W. & Farmer III, J.J. — Unusual *Enterobacteriaceae*: lactose positive *Salmonella typhimurium*, which is endemic in São Paulo, Brazil. J. Clin. Microbiol., 2:349-353, 1975.
5. Magalhães, M.; Véras, A. & Dámaso, A. — Resistência transmissível à gentamicina em estírpes multirresistentes de *Salmonella typhimurium*. Rev. Inst. Med. trop. São Paulo, 17:272-276, 1975.
6. Magalhães, M. & Véras, A. — Properties of pPE1572 (Hys-Raf), a plasmid governing hydrogen sulphide production and raffinose fermentation in *Escherichia coli*. J. Gen. Microbiol., 99:445-447, 1977.
7. Pessôa, G.V.A. — Sobre a ocorrência de uma variante de *Salmonella typhimurium* fermentadora da lactose. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 33:13-28, 1973.
8. Smith, H.R.; Grindley, N.D.F.; Humphreys, G.O. & Anderson, E.S. — Interactions of group H resistance factors with the F Factor. J. Bacteriol., 115:623-628, 1973.
9. Witchitz, J.L. & Chabbert, Y.A. — Résistance transférable à la gentamicine. II — Transmission et liaisons du caractère de résistance. Ann. Inst. Pasteur, 122:367-378, 1972.

Utilização de petróleo e hidrocarbonetos por micobactérias*

Celso Luiz Cardoso**
& Paulo Pinto Gontijo Filho***

Resumo

O estudo da capacidade de degradar os hidrocarbonetos hexadecano ou heptadecano, mostrou 22 cepas de crescimento rápido, com intenso crescimento na presença destas substâncias, após 14 dias de incubação, embora apenas quatro (18,3%) utilizassem o petróleo bruto. As 13 cepas de crescimento lento testadas, mostraram algum crescimento, na presença do hexadecano ou heptadecano.

Summary

Petroleum and hydrocarbon degradation by mycobacteria

All of the 22 fast growing mycobacteria tested utilized hexadecane or heptadecane but only four (18,3%) of them grew on raw petroleum after 14 days incubation. Slight growth in the presence of hexadecane or heptadecane was noted for 13 slow growing strains.

Introdução

Em vista da necessidade da exploração de petróleo e seus derivados, como fontes de energia, a atenção pública foi despertada para os efeitos poluentes de tais explorações, particularmente em relação ao meio ambiente. Considerando-se que a população microbiana que degrada os óleos e seus derivados constitui a defesa natural deste ecossistema, torna-se necessário o melhor conhecimento dos microrganismos quanto à potencialidade de atuarem como agentes antipoluentes ou como indicadores da poluição ambiental (7). A presença destas bactérias, em estuários marinhos, foi estudada por diversos autores (1, 4, 5).

Micobactérias, isoladas de águas poluídas com óleo e resíduos domésticos, foram avaliadas quanto à capacidade de crescerem na presença de petróleo e hidrocarbonetos.

Material e Métodos

Entre as 158 cepas de micobactérias isoladas por Cardoso & Gontijo (3), a partir de águas poluídas com resíduos industriais e domésticos, selecionou-se 18 amostras de crescimento rápido identificadas bioquimicamente e com os seguintes números: 65, 108, 473, 604, 606 (*M. fortuitum*); 673, 675, 716, 791, 793 (*M. smegmatis*); 157, 766, (*M. diernhoferi*); 180, 768 (*M. phlei*); 717, 747, 753, 772 (não identificadas); e 7 amostras de crescimento lento: 164 (*M. scrofulaceum*); 218 (*M. gordonaiae*); 85 (*M. flavescentis*); 88 (*M. avium-intracellulare*); 1022 (*M. terrae*); 144 (*M. triviale*); e 209 (*M. gastrii*). Paralelamente, foram testadas as respectivas amostras tipos dessas espécies, exceto para a cepa nº 144.

Desta forma, foram ensaiadas 13 amostras de micobactérias de crescimento lento e 22 de

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com recursos do CNPq (processo n° 22220162/77) e FINEP (Convênio 527/CT)

** Fundação Universidade Estadual de Maringá, 87100 Maringá, PR. Bolsista do CNPq.

*** Instituto de Microbiologia da UFRJ, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro, RJ. Bolsista do CNPq.

crescimento rápido, utilizando-se petróleo bruto (cedido pela Refinaria de Marinhos, Rio de Janeiro, e proveniente da Arábia Saudita) e hexadecano ou heptadecano ("Prairie Regional Laboratory National Research Council Saskatoon, Saskatchewan, Canada"), como única fonte de carbono incorporada no meio mineral, proposto por Mills, Breuil & Colwell (5), cuja fórmula é a seguinte: NaCl 20,0g; MgSO₄ · 7H₂O 1,0g; KCl 0,7g; KH₂PO₄ 2,0g; Na₂HPO₄ 3,0g; NH₄NO₃ 1,0g e água destilada, q.s.p. 1000,0ml.

Distribuem-se volumes de 5ml em tubos com tampa de rosca (12 × 150mm), adicionado 25μl do substrato com auxílio de pipeta calibrada (Cooke-Engineering C.O., n° 220-5), e autoclavado a 120°C, durante 10 minutos. O pH, antes e após a esterilização, foi de 7,2 e 7,0, respectivamente ("pH" meter model-10 Corning).

Os tubos foram semeados em duplicatas, com 0,1ml do inóculo e incubados em estufa a 37°C, durante 28 dias, com agitação de 100rpm (Laboratory rotator-model G2, New Brunswick Scientific Co., Inc., Brunswick, N.J.). A suspensão a ser utilizada como inóculo incubado, foi preparada a partir de crescimento na fase ativa, em meio de Loewenstein-Jensen, de modo a se obter suspensão levemente turva, em água destilada estéril, com turbidez visualmente comparável à de suspensão padrão de sulfato de bário, preparada pela adição de 0,5ml de uma solução de cloreto de bário 0,048 M a 99,5ml de solução de ácido sulfúrico 0,36 N.

As leituras foram realizadas com 14 e 28 dias de incubação, relacionando-se a degradação dos substratos com a presença de crescimento, registrada como: - = crescimento ausente; (+) = crescimento pobre; + = crescimento com pequenos grumos dispersos no meio; ++ = crescimento com muitos grumos; +++ = crescimento com numerosos grumos e formação de películas superficiais. O controle da pureza foi realizado após a leitura, com 28 dias, através da coloração de Ziehl-Neelsen.

Adicionalmente, preparou-se os seguintes controles: (a) meio mineral (5ml) + inóculo (0,1ml); (b) meio mineral (4,5ml) + solução de glicose a 5% (0,5ml) + inóculo (0,1ml); (c) meio mineral (5ml); (d) meio mineral (5ml) + substrato (25μl); e (e) meio mineral (4,5ml) + solução de glicose a 5% (0,5ml). Os controles a (negativo) e b (positivo) foram empregados para todas as amostras testadas, e os três últimos (c-e), em triplicata para cada experiência.

Resultados

Os resultados obtidos nas experiências de degradação de petróleo e hidrocarbonatos estão nas Tabelas 1 e 2. As 22 cepas de micobactérias de crescimento rápido ensaiadas apresentaram, sem exceção, a capacidade de crescer na presença de hexadecano ou heptadecano, embora apenas as de números 473, 716, 753 e ATCC-19.340 (amostra tipo de *M. dierhoferi*) tivessem utilizado o petróleo. As cepas de números 473, 673, 791, 19.340 mostraram crescimento mais intenso do que as demais, frente aos dois hidrocarbonetos, na leitura de 28 dias.

Ao contrário do observado para as micobactérias de crescimento rápido, as 13 de crescimento lento não mostraram nenhum crescimento, em 14 dias, no meio mineral com glicose (controle positivo) ou hexadecano ou heptadecano. A amostra padrão de *M. flavescentis* foi a única exceção (Tabela 2). No entanto, após o cultivo de quatro semanas, 12 das 13 cepas ensaiadas, apresentaram algum crescimento, nos tubos contendo os hidrocarbonetos. Nenhum destes microrganismos foi capaz de degradar o petróleo, nas condições de realização do teste.

Discussão

A presença de micobactérias em solos petrolíferos, capazes de crescer na presença de hidrocarbonetos alifáticos, foi evidenciado por Brown & Pabst (3). Esta propriedade parece estar intrinsecamente relacionada a estes microrganismos, embora muito pouco deste assunto seja conhecido (6).

No momento, a degradação de hidrocarbonetos, por microrganismos, reveste-se da mais alta importância, em face ao problema da poluição ambiental pelo petróleo. A presença de vários terminais petrolíferos, assim como a existência de duas refinarias na baía da Guanabara, colocam a poluição pelo óleo entre os principais desafios no trabalho de recuperação da água e praias da região. Algumas espécies de micobactérias não patogênicas, capazes de utilizar hidrocarbonetos, podem ser utilizadas para descontaminar ambientes poluídos, com subprodutos de petróleo.

Westlake & col. (9) demonstraram que a composição química dos diversos petróleos

Tabela 1 — Degradação de petróleo e hidrocarbonetos pelas amostras de crescimento rápido

| Amostra tipo, ou nº da amostra isolada | Controle positivo* | | Petróleo bruto | | Hexadecano | | Heptadecano | |
|--|--------------------|---------|----------------|---------|------------|---------|-------------|---------|
| | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias |
| <i>M. fortuitum</i> (ATCC 6.841) | +++ | +++ | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 65 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | + | ++ |
| 108 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | ++ | ++ |
| 473 | +++ | +++ | — | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 604 | +++ | + + | — | — | + | ++ | ++ | ++ |
| 606 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | ++ | + |
| <i>M. smegmatis</i> (ATCC 14.468) | +++ | +++ | — | — | + | ++ | + | ++ |
| 673 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | ++ | +++ |
| 675 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | + | ++ |
| 716 | +++ | +++ | — | + | + | ++ | ++ | ++ |
| 791 | ++ | +++ | — | — | ++ | ++ | ++ | +++ |
| 793 | +++ | +++ | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>M. diernhoferi</i> (ATCC 19.340) | +++ | +++ | — | + | + | ++ | ++ | +++ |
| 157 | ++ | +++ | — | — | + | + | ++ | ++ |
| 766 | +++ | +++ | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ |
| <i>M. phlei</i> (ATCC 10.142) | ++ | ++ | — | — | + | + | + | + |
| 180 | +++ | +++ | — | — | + | + | + | ++ |
| 768 | ++ | + | — | — | + | + | + | + |
| Não identificadas | | | | | | | | |
| 717 | + | + | — | — | + | + | + | + |
| 747 | +++ | +++ | — | — | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 753 | +++ | +++ | — | + | ++ | ++ | ++ | ++ |
| 772 | +++ | +++ | — | — | + | ++ | + | ++ |

* Meio mineral com 0,5% de glicose

Tabela 2 — Degradação de petróleo e hidrocarbonetos pelas amostras de crescimento lento

| Amostra tipo, ou nº da amostra isolada | Controle positivo* | | Petróleo bruto | | Hexadecano | | Heptadecano | |
|--|--------------------|---------|----------------|---------|------------|---------|-------------|---------|
| | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias | 14 dias | 28 dias |
| <i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19.981) | — | — | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 164 | — | — | — | — | — | (+) | — | (+) |
| <i>M. gordonaiae</i> (ATCC 14.470) | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 218 | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| <i>M. flavescens</i> (ATCC 14.474) | ++ | +++ | — | — | + | ++ | + | ++ |
| 85 | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| <i>M. avium</i> (ATCC 25.291) | — | — | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 88 | — | — | — | — | — | (+) | — | (+) |
| <i>M. terrae</i> (ATCC 19.755) | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 1022 | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 144 | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| <i>M. gastri</i> (ATCC 15.754) | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |
| 209 | — | (+) | — | — | — | (+) | — | (+) |

* Meio mineral com 0,5% de glicose

tem marcada influência na sua biodegradabilidade, acentuando que a fração parafínica é possivelmente o mais importante componente com relação a esta propriedade, sendo a primeira das frações a ser metabolizada pelos microrganismos. O hexadecano, por sua vez, é um dos compostos mais representativos da fração parafínica.

As cepas de crescimento rápido apresentaram crescimento em 14 dias, na presença dos hidrocarbonetos testados, mostrando leve tendência em degradar, de modo mais acentuado, o heptadecano. O crescimento obtido para as micobactérias de crescimento lento foi menos pronunciado, mas todas foram capazes de utilizar os hidrocarbonetos ensaiados, após 28 dias de cultivo.

Barksdale & Kim (2) mostraram que duas moléculas de ácido palmítico participam da biossíntese de uma de ácido micólico, ácido graxo que entra na constituição da parede celular de micobactérias, corinebactérias e nocár-

dias. É possível que parte do ácido palmítico, formado pela oxidação do hexadecano, seja utilizada na formação de ácido micólico.

A ausência de crescimento, na presença de petróleo bruto, excetuando-se 12% das cepas ensaiadas, pode ser atribuída à atividade bactericida ou bacteriostática de alguns componentes presentes nos petróleos, conforme sugerido por Zobell em 1969 (5).

Segundo Austin & col. (1), os grupos microbianos de maior capacidade de degradação de petróleo são representados por pseudomonas, seguindo-se os actinomicetos e microrganismos relacionados. No último grupo, os autores não fazem referências à presença de micobactérias, embora tenham encontrado nocárdias e corinebactérias. Entretanto, a utilização de metodologia adequada ao isolamento de micobactérias (3) demonstrou que estes microrganismos estão presentes, em grande quantidade em águas poluídas com óleo.

Referências Bibliográficas

1. Austin, B.; Calomiris, J.J.; Walker, J.D. & Colwell, R.R. — Numerical taxonomy and ecology of petroleum-degrading bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.*, 34:60-68, 1977.
2. Barksdale, L. & Kim, K. — *Mycobacterium*. *Bacteriol. Rev.*, 41:217-372, 1977.
3. Brown, L.R. & Pabst, G.S. — Petroliferous soil as possible source of pathogenic atypical mycobacteria. *Amer. Rev. Resp. Dis.*, 96:1076-1077, 1967.
4. Cardoso, C.L. & Gontijo Fº, P.P. — Ocorrência de micobactérias potencialmente patogênicas em águas poluídas com resíduos industriais e domésticos. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 10(2):59-65, 1979.
5. Mills, A.L.; Breuil, C. & Colwell, R.R. — Enumeration of petroleum-degrading marine and microorganisms by the most probable number method. *Can. J. Microbiol.*, 24:552-557, 1978.
6. Mulkins-Phillips, G.J. & Stewart, J.E. — Distribution of hydrocarbon-utilizing bacteria in Northwestern Atlantic waters and coastal sediments. *Can. J. Microbiol.*, 20: 955-962, 1974.
7. Ramakrishnanan, T.; Murthy, P.S. & Gopinathan, K.P. — Intermediary metabolism of mycobacteria. *Bacteriol. Rev.*, 36:65-108, 1972.
8. Walker, J.D. & Colwell, R.R. — Enumeration of petroleum-degrading microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.*, 31.
9. Westlake, D.W.S.; Jobson, A.; Phillippe, R. & Cook, F.D. — Biodegradability and crude oil composition. *Can. J. Microbiol.*, 20:915-928, 1974.

Salmonellae and their associated R-plasmids in poultry processing wastes

S.M. Goyal
& A.W. Hoadley

Summary

Investigations have been undertaken at two poultry processing plants in Georgia, U.S.A. to ascertain the extent to which wastes from these plants may serve as sources of salmonellae resistant to antibiotics and their associated R-plasmids. At each plant, close to 80,000 chickens were processed each day, and liquid wastes from these plants were treated in stabilization pond systems. Salmonellae generally were demonstrated without difficulty in wastes, being diminished by more than 90% through both lagoon systems. At one plant, the ratio of salmonellae to fecal coliforms was consistently about 1:500. At the other plant, with a pond system having a total retention time of approximately 44 days, the ratio decreased from 1:30,080 in the raw waste to 1:3,086 following treatment, suggesting that salmonellae survived better than did fecal coliforms through the pond system. *Salmonella* serotypes were found to shift with time in both waste treatment systems. Poultry processing wastes can act as reservoirs of transferable drug resistant salmonellae which are not reduced relative to fecal coliforms during treatment. Resistance to at least 1 of 12 antibiotics tested was demonstrated in 37.2% of isolates tested from plant A and 65.1% of isolates tested from plant B. Of resistant strains tested, 86% and 92%, respectively, were multiply resistant. Resistance to tetracycline, streptomycin, and colistin were most frequently encountered at each plant. Of 173 multiply resistant strains from plant B, 72.3% were able to transfer either all or part of their resistance determinants to *E. coli* ATCC 27622, *S. choleraesuis* var. *Kunzendorf* 460 S.I.-2, or both.

Resumo

Salmonelas e plasmídios-R associados, em abatedouros de aves

Investigação dos despejos de dois abatedouros de aves, em Georgia, E.U.A., para conhecimento de sua extensão, como reservatório de salmonelas resistentes a antibióticos e seus respectivos plasmídios R. Cerca de 80.000 aves são abatidas diariamente, em cada mata-douro, cujo despejo é tratado em lagoas de estabilização. Salmonelas são facilmente demonstráveis nos resíduos, com mais de 90% de redução, após tratamento nos sistemas de estabilização. Em uma das unidades abatedouras, a relação de salmonelas para coliformes fecais foi consistentemente 1:500. Na segunda, cujo sistema de lagoa de retenção dura 44 dias, a relação diminuiu para 1:30.800, no resíduo não tratado, para 1:3.086, sugerindo que as salmonelas sobrevivem mais do que os coliformes fecais, através do sistema de lagoas de tratamento. Os sorotipos de salmonelas variam de tempos em tempos, em ambos os sistemas de lagoas de tratamento. Os resíduos avícolas podem atuar como reservatórios de salmonelas resistentes a drogas, o que não reduz, em relação ao tratamento para coliformes fecais. Resistência, a pelo menos um, entre 12 antibióticos, foi demonstrada em 37.2% dos isolados, em um abatedouro; e em 65.1% na segunda unidade. Das linhagens resistentes testadas, respectivamente 86% e 92% exibiram resistência múltipla. O mais frequente foi encontrar resistência à tetraciclina, estreptomicina e colistina. Das 173 amostras com resistência múltipla, no segundo abatedouro, 72.3% foi capaz de transferir seus determinantes de resistência, no todo ou em parte, para *E. coli* ATCC 27622, *S. choleraesuis* var. *kunzendorf* 460 S.I.-2, ou para ambas linhagens.

Introduction

Domestic poultry constitute the largest reservoir of salmonellae in the animal kingdom (4,8) and the contamination of surface waters by wastes from chicken processing plants may represent a mechanism for the transmission of these organisms to man and other animals. Vanderpost & Bell (30) studied effluents from meat and poultry processing plants in Alberta, Canada and showed the presence of 21 different *Salmonella* serotypes in 7 out of 9 plants studied. Tenant & col. (29) isolated a total of 534 *Salmonella* strains from the effluents of 3 chicken processing plants in Ontario, Canada.

In many agriculturally advanced countries, antibiotics are used as feed additives in the diet of poultry and other animals to serve as non-specific growth promoting factors. Often these same antibiotics are used clinically to treat human and animal diseases. Populations of antibiotic resistant bacteria develop in association with animals fed rations containing antibiotics as a result of selection and may spread to the human population directly or indirectly from the environment. Different workers have reported the emergence of resistant organisms following the inclusion of antibiotics in diets (24, 25, 28) and the possible risks associated with their use have been discussed by Smith (23) and Watanabe (31).

The practice of including antibiotics in poultry feeds coupled with the role of poultry as the major reservoir of salmonellae, makes poultry potentially the largest single source of antibiotic resistant salmonellae. The present studies were undertaken to ascertain the extent of poultry processing wastes as sources of salmonellae carrying antibiotic resistance and to identify and control these bacteria and their associated drug resistance factors in the environment of chicken processing plants.

Material and Methods

Description of plants — Studies have been undertaken at two chicken processing plants in Georgia to determine the extent to which these plants served as reservoirs of salmonellae and their associated resistance transfer factors reaching the external environment. One of the plants (plant A) processed 75,000 to 80,000 birds per day. Approximately 725,000 gallons of liquid wastes per day passed directly into an aer-

ated stabilization pond with a mean residence time of 3.5 days. From the aerated pond, the wastes passed into a facultative pond in which it was retained for another 3.5 days. The effluent from the second pond passed over a weir and was discharged without further treatment to a receiving stream. After late 1971, however, raw wastes passed through a flotation unit prior to entering the aerated pond and the partially treated wastes leaving the aerated pond were passed through a settling tank prior to entering the unaerated pond. At least one further source of wastes existed upstream from the treated discharge. During daily clean-up of the plant and its associated receiving area, drainage entered the stream directly without passing through the treatment system.

The second plant (plant B) also handled approximately 80,000 birds per day. The chickens entering this plant were given feed containing low levels of chlortetracycline, neomycin, terramycin or furazolidone. Approximately 350,000 gallons of liquid wastes per day were treated in a stabilization pond system which consisted of an aerated pond having a detention time of seven days. It was followed by a small anaerobic holding pond and three facultative ponds in series; the first facultative pond having a retention time of about 30 days, and the last two ponds having a combined residence time of seven days. The effluent from the last pond was released without disinfection to a surface stream.

Sampling procedures — Samples of wastes from the first plant were obtained on 12 occasions between August 1970 and March 1973 and from the second plant on 10 occasions between September 1974 and July 1975. Grab samples were collected in sterile Mason jars from the raw waste streams and the effluents of each pond when available, and were returned on ice to the laboratory for immediate processing.

Isolation and enumeration of salmonellae — Salmonellae were isolated from chicken processing wastes and their receiving waters after enrichment in tetrathionate broth (TTB, Baltimore Biological Laboratory) to which was added 10ml of a 1:1000 aqueous solution of brilliant green dye per liter (9). The samples were either inoculated directly into five replicate tubes of TTB or were filtered through membrane filters (Type HA, 0.45 µm mean pore size, Milli-

pore Corp.), which in turn were added to TTB tubes. Tubes of TTB were incubated at 37C initially in the study at plant A but were later incubated at 41.5C as recommended by Spino (27). The enrichment broth was incubated for 24 and 48 hours after which one loopful of broth was streaked on plates of brilliant green agar containing 0.08g of sulphadiazine per liter of agar (BGS, BBL). Streaked plates were incubated at 37C for 24 hours before examination and colony selection. At least two typical colonies were picked from each plate and restreaked on McConkey agar for purification. Purified colonies were inoculated into slants of triple sugar iron agar (TSI) which in turn were incubated at 37C for 24 hours.

Strains exhibiting characteristic reactions on TSI agar were subjected to slide agglutination tests employing polyvalent O and 15 O group antisera (Difco Laboratories and Lee Laboratories) reacting with the serotypes most frequently isolated in the U.S. (16). Of 365 isolates assignable to a specific O group, flagellar antigens were determined on 88. H broth (BBL) was inoculated from TSI agar slants and incubated at 37C for 24 hours. Cultures were killed with an equal volume of 0.6% formalized saline, and H antigens were determined employing Spicer-Edwards pooled antisera (Difco Laboratories). Serotypes were confirmed employing single factor antisera (Difco Laboratories). The second phase was isolated in the semisolid medium of Edwards and Bruner (BBL) and tested in the same manner. Twenty cultures were sent to the Georgia Department of Public Health for identification and confirmation.

Most probable numbers of salmonellae were obtained employing MPN tables (1) or were approximated from the following formula:

$$\text{MPN/ml} = \left(\frac{\text{Number of positive tubes}}{\sqrt{\text{Number of ml in negative tubes}}} \right) \times \text{Number of ml in all tubes}$$

Enrichments were considered positive if they yielded isolates which could be assigned to a *Salmonella* O group. All such isolates, when their flagellar antigens were analysed, were found to be typable as salmonellae.

Antibiotic resistance — Ninety four *Salmonella* strains isolated during 1972 and 1973 were tested for their resistance to 14 antimicrobial agents by the single disc diffusion method of Bauer & col. (2) employing sensi-discs (BBL). The strains isolated in 1974 and 1975 were tested against 12 antibiotics only. The discs of antibiotics used and their concentrations were as

follows: Ampicillin (10 μ g), cephalothin (30 μ g), chloramphenicol (30 μ g), colistin (10 μ g), furoxone (100 μ g), gentamicin (10 μ g), kanamycin (30 μ g), nalidixic acid (30 μ g), neomycin (30 μ g), streptomycin (10 μ g), sulphathiazole (1 μ g), tetracycline (30 μ g), and triple supha (250 μ g). Zone sizes were interpreted according to the standard recommendations. For the statistical analysis of the data, the strains exhibiting "intermediate resistance" were considered resistant to the antibiotic in question. A multiply resistant strain of *Salmonella* obtained from John Bennett, Center for Disease Control, Atlanta, Georgia and a fully sensitive strain of *Escherichia coli* (ATCC 25922) were used as controls.

Demonstration of resistance transfer — The strains of *Salmonella* isolated in 1974 and 1975 were tested for their ability to transfer resistance. Isolates exhibiting resistance to at least two drugs including streptomycin (S) or tetracycline (Te) (but excluding nalidixic acid, NA) were tested for their ability to transfer resistance to *E. coli* (ATCC 27622; NA resistant, lactose positive) and to the *S. choleraesuis* var. *kunzendorf* 460 S.I.-2 (NA resistant). Transfer was detected on McConkey agar plates containing NA (30 μ g/ml) and either S (10 μ g/ml) or Te (30 μ g/ml).

Both donor and recipient cultures were grown separately for 16-18 hours at 37C in Mueller-Hinton broth (MHB, BBL) after which 0.5ml of each culture was inoculated into a tube containing 4ml of sterile MHB. The mixture was incubated in a water bath at 37C for 2 hours. After this mating period, a swab of the mixture was streaked on the surface of two plates of McConkey agar; one containing NA and S and the other containing NA and Te. On this medium, only transconjugants that have acquired resistance to the drug incorporated into the agar grow. Colonies that appeared on these plates after incubation at 37C for 24 hours were picked and tested for patterns of antibiotic resistance.

Results

Studies have been undertaken to determine populations of salmonellae in the wastes of 2 chicken processing plants in the state of Georgia, U.S.A. (Tables 1 and 2). The geometric mean MPN of salmonellae in the raw waste at plant A was 238 organisms/100ml. At plant B a

Table 1 — Populations of salmonellae in the pond system of plant A

| Source | Number of samples | Geometric mean (MPN/100ml) | Per cent ^a reduction |
|---|-------------------|----------------------------|---------------------------------|
| Prior to installation of flotation unit and clarifier | | | |
| Raw waste | 5 | 238 | 69.8 |
| Effluent from aerated pond | 7 | 71.8 | 90.8 |
| Discharge to stream | 7 | 6.6 | |
| After installation of flotation unit and clarifier | | | |
| Raw waste | 0 | — | — |
| Effluent from aerated pond | 3 | 8.9 | 63.2 |
| Discharge to stream | 3 | 4.2 | |

^a Overall reduction was 97.2% prior to installation of flotation unit and clarifier

Table 2 — Populations of salmonellae in wastes of plant B

| Source | Number of samples | Salmonella (MPN/100ml) | | Ratio of salmonellae: fecal coliforms | Per cent Reduction ^b |
|-----------------------------------|-------------------|--------------------------|--------|---------------------------------------|---------------------------------|
| | | Range | Median | | |
| Raw waste | 10 | <2—1.6 × 10 ³ | 79 | 1:30,380 | 79.2 |
| Effluent from aerated pond | 9 | <2—1.6 × 10 ³ | 16.4 * | 1:12,857 | — |
| Effluent from facultative pond #1 | 5 | 4.9—49 | 17 | 1:3,030 | — |
| Effluent from facultative pond #2 | 3 | 7—33 | 10 | 1:788 | 58.8 |
| Discharge to stream | 9 | <2—16.2 | 6 | 1:3,086 | 40.0 |

^a Median

^b Overall reduction was 92.4%

median MPN of 79 salmonellae/100ml, varying from <2 to 1.6 × 10³ salmonellae/100ml in individual samples. Geometric means of populations in the treated effluent of plant A were 4.16 or 6.6 per 100ml depending upon whether the samples were obtained before or after the installation of a flotation unit and clarifier. The median MPN of salmonellae in the final effluent of plant B was similar, i.e., 6 per 100ml.

Limited investigations were undertaken of salmonellae isolated from receiving water samples at plant A inoculated directly into enrichment broth (Table 3). Geometric mean counts

upstream from the main discharge were 110 and 19.5 salmonellae/100ml before and after changes in the treatment system, respectively. Counts decreased downstream, but salmonellae were detected as far as 5km from the point of discharge. Drainage from the plant and its surroundings which entered the stream above the point of discharge was found to contain 94 salmonellae/100ml when sampled on one occasion.

Three hundred and sixty five strains of *Salmonella* were isolated from plant A and assigned to O groups. From plant B, 327 strains of

Table 3 — Population of salmonellae in drainage and the receiving stream of plant A

| Sampling location | MPN/100ml of salmonellae ^a | |
|--------------------------------------|---|--|
| | Prior to installation of flotation unit and clarifier | After installation of flotation unit and clarifier |
| Drainage | 94 | — |
| 50m upstream from main discharge | 110 | 19.5 |
| 300m downstream from main discharge | 4.7 | 13 ^b |
| 1km downstream from main discharge | — | 8.5 ^b |
| 3.5km downstream from main discharge | — | <1.8 |
| 5km downstream from main discharge | — | 0.2 |

^a Geometric mean^b Median

Salmonella were isolated, of which 204 were assigned to O groups (summarized in Table 4). Serotypes falling in O groups B, C₁, and E were common at both plants A and B. Isolates belonging to group G, representatives of which were identified as *S. enteriditidis* ser. *cubana*, occurred only at plant A, and were most frequently isolated between August and October, 1970. Isolates belonging to other O groups predominated generally in only a limited number of monthly samples. Groups B and E were predominant in plant B early in the study but later gave way to group C₁.

Table 4 — Distribution of O groups among *Salmonella* isolates

| | Salmonella O group | | | | | | |
|---------|--------------------|----------------|----------------|---|----|----|-----------------|
| | B | C ₁ | C ₂ | D | E | G | NT ^a |
| Plant A | 142 | 83 | 3 | — | 55 | 82 | — |
| Plant B | 84 | 70 | 2 | 1 | 47 | — | 58 |

^a NT = Not tested

Of a total of 172 *Salmonella* isolates from plant A and 326 isolates from plant B, 64 (37.2%) and 212 (65.1%), respectively, were resistant to at least 1 antibiotic tested (Table 5). The proportion of multiply resistant strains among resistant isolates of *Salmonella* were 86% and 92% respectively at plants A and B. Strains resistant to a maximum of 7 antibiotics were isolated at plant A and to 9 antibiotics at plant B.

Table 5 — Antibiotic resistance among *Salmonella* isolates from two plants

| Number of resistance determinants | Antibiotic resistant <i>Salmonella</i> isolates | |
|-----------------------------------|---|--------------------|
| | Plant A Number (%) | Plant B Number (%) |
| 9 | 0 (0.0) | 1 (0.3) |
| 8 | 0 (0.0) | 2 (0.6) |
| 7 | 1 (0.6) | 2 (0.6) |
| 6 | 1 (0.6) | 20 (6.1) |
| 5 | 0 (0.0) | 16 (4.9) |
| 4 | 4 (2.3) | 31 (9.5) |
| 3 | 23 (13.4) | 46 (14.1) |
| 2 | 26 (15.1) | 69 (21.2) |
| 1 | 9 (5.2) | 25 (7.7) |
| 0 | 108 (62.8) | 114 (34.9) |
| Total number of isolates tested | 172 | 326 |
| Number (%) resistant | 64 (37.2) | 212 (65.1) |
| Number (%) multiply resistant | 55 (32.0) | 195 (57.4) |

The most common resistance determinants among *Salmonella* isolates from plants A and B were for Te, S, and CL (Table 6). None of the isolates from either plant was resistant to gentamicin. Resistance to Fx was absent among isolates from plant A but occurred in 34.7% of all isolates from plant B. Resistance to CF was also more frequent among isolates obtained at plant B. A total of 19 different antibiograms were demonstrated among *Salmonella* isolates from plant A and 38 among isolates from plant B. Eight of these antibiograms were common to isolates from both plants.

The results of antibiotic resistance transfer experiments using isolates from plant B as donor strains are shown in Table 7. Of 173 mul-

Table 6 — Resistance of *Salmonella* isolates to individual antibiotics

| Antibiotic | PLANT A | PLANT B |
|--------------------------|----------------------|----------------------|
| | Number (%) resistant | Number (%) resistant |
| Te ^a | 51 (29.7) | 177 (54.3) |
| S | 31 (18.0) | 117 (36.0) |
| CL | 18 (10.5) | 107 (32.8) |
| K | 12 (7.0) | 16 (5.0) |
| N | 10 (5.8) | 12 (3.7) |
| NA | 10 (5.8) | 14 (4.3) |
| C | 3 (1.7) | 27 (8.3) |
| CF | 3 (1.7) | 63 (19.3) |
| Am | 2 (1.2) | 19 (5.8) |
| SSS | 2 (1.2) | Not Done |
| Fx | 0 (0.0) | 113 (34.7) |
| Gm | 0 (0.0) | 0 (0.0) |
| Total number of isolates | 172 | 326 |

^a Am = Ampicillin; CF = cephalothin; C = chloramphenicol; CL = colistin; Fx = furoxone; Gm = gentamicin; K = kanamycin; NA = nalidixic acid; N = neomycin; S = streptomycin; SSS = triple sulpha; and Te = tetracycline

tiply resistant strains tested, 125 (72.3%) were able to transfer either all or a part of their resistance pattern to one or both of the two recipient strains. About 69% of the R⁺ strains

transferred all the resistance determinants present. Of the 125 R⁺ isolates, 108 (86.4%) transferred only 5 patterns of resistance. The most commonly transferred resistance determinant was Te, which was transferred by 108 of 125 R⁺ strains. This was followed by S, Cl, and Fx which were transferred by 76, 45, and 45 strains, respectively. S and Te together were transferred by 63 strains.

Among *Salmonella* isolates from the waste treatment system at plant B, the frequency of resistance to at least one antibiotic increased steadily from 55.8% in the raw waste to 94.7% in the final effluent. Similarly, the frequency of multiple resistance increased from 49.3% in the raw waste to 80% in the final effluent (Table 7). Among multiply resistant strains isolated from the raw waste, 76.1% were able to transfer resistance. In the final effluent, 68.4% were able to transfer resistance. The proportions of strains from the effluents of the aerated pond and the first facultative pond transferring resistance were 76.1% and 80.8%, respectively, although among a limited number of strains from the effluent of the second pond, only 33.3% transferred resistance.

Table 7 — Numbers of *Salmonella* strains transferring resistance

| Source | Number (%) of strains multiply resistant | Number of strains tested | Number (%) transferring all or part of their resistance ^a |
|-----------------------------------|--|--------------------------|--|
| Raw waste | 68 (49.3) | 67 | 51 (76.1) |
| Effluent from aerated pond | 49 (57.7) | 46 | 35 (76.1) |
| Effluent from facultative pond #1 | 35 (71.5) | 26 | 21 (80.8) |
| Effluent from facultative pond #2 | 15 (78.9) | 15 | 5 (33.3) |
| Final Effluent | 28 (80) | 19 | 13 (68.4) |
| Total | 195 | 173 | 125 (72.3) |

^a Isolates transferring all or part of their resistance pattern to either *E. coli* and/or *Salmonella* receptor strain

Discussion

Although salmonellae generally were demonstrated without difficulty and without sophisticated isolation techniques, the populations detected at both plants (Tables 1 and 2) appear to be low in view of studies of municipal treatment facilities reported by Cheng & col. (5), but are not inconsistent with those reported by McCoy (15). Pre-enrichment, which may

enhance recoveries of salmonellae, was not employed in the present studies. Vanderpost and Bell (30) recovered salmonellae frequently from 10 and 1 ml samples of the effluent from 7 of 9 meat and poultry processing plants studied in Alberta, Canada. Similarly, Tenant & col. (29) isolated salmonellae from effluents of three poultry packing plants in Ontario, Canada. No comparison of populations can be made, however, because population densities were not de-

termined in their studies. The data obtained in the present studies suggest, furthermore, that populations of salmonellae may be reduced by more than 90% in pond systems.

Salmonellae were isolated from the receiving stream as far as 5km downstream from plant A (Table 3) which indicates that a poultry processing plant may indeed serve as a reservoir or salmonellae reaching surface waters and exert and influence upon them. These data are consistent with those reported by other investigators (5, 6, 7). The detection of high counts of salmonellae above the point of discharge probably reflects the effects of drainage from the processing plant, and suggests that drainage from the environment of such plants, as well as the process wastes themselves, can be an important source of salmonellae streams.

The relationship between fecal coliforms and salmonellae was investigated at both plants A and B. On the average, a ratio of 216 salmonellae per 100,000 fecal coliforms, or about 1 *Salmonella* per 500 fecal coliforms, was found to occur at plant A, suggesting that a constant relationship existed between the pathogens and indicators of fecal contamination at this plant, and that this relationship might be employed in conjunction with MPNs of fecal coliforms to estimate numbers of pathogens released to, and existing in, the environment. At plant B, median ratios of salmonellae to fecal coliforms decreased from a high of 1:30, 380 in the raw waste to a low of 1:788, suggesting that ratios of salmonellae to fecal coliforms at chicken processing plants may vary from plant to plant, and that they can vary considerably over long periods of time when exposed to environmental stress. Ratios were lower in wastes from plant B than from plant A (Table 2) which probably reflects greater care taken at the former plant to assure the quality of fish meal incorporated into feeds. Their decline through the sewage treatment plant suggests that salmonellae survived through the pond system better than did fecal coliforms.

A striking feature of populations of salmonellae in the external environment of chicken processing plants was their variable composition. Strains of group B often predominated in both the plants. The data suggest that serotypes occurring in the environment of a processing plant may not persist for as long as *S. enteritidis* ser. *paratyphi* B in sewers (12).

Another striking feature evident in Table 4 was the absence of group G *Salmonella* at plant

B whereas they were next in frequency only to group B in plant A. Group G isolates were probably all *S. enteritidis* ser. *cubana* and were predominant among *Salmonella* strains isolated between August, 1970 and January, 1971. The very high proportion of *S. enteritidis* ser. *cubana* in the chicken processing wastes of plant A immediately preceded and coincided with a sharp peak in the number of isolations of this rare serotype from human sources in most of the United States.

Individual serotypes isolated from both plants in general resembled those reported in similar wastes by Tenant & col. (29) except that these investigators did not isolate serotypes falling outside O groups B, C₁ and C₂. Differences in serotypes from plant to plant and shifts with time at individual plants are not surprising since shifts have been shown to occur even within a single plant from hour to hour as the source of poultry changes (9, 11, 13, 14, 17, 18, 32). Shifts in serotypes may occur within flocks as they grow to maturity and these shifts probably occur in relation to salmonellae present in feeds (17).

The most common resistance determinants detected at plants A and B were for Te, S, and Cl. Resistance to Fx was common among isolates obtained at plant B, but not plant A, probably reflecting the use of Fx for preventive and curative purposes at plant B. The frequencies of resistance to antibiotics among salmonellae isolated at plants A and B were higher than the 20.4% reported by Tenant & col. (29) from poultry packing plants in Ontario, Canada. Furthermore, the frequencies of 32.0% and 57.5% multiply resistant strains isolated from plants A and B, respectively, is considerably higher than 9.1% found by Tenant. Finally, the maximum number of resistance determinants among isolates from plants A and B far exceeded the 3 observed by Tenant. These observations may reflect greater use of antibiotics in feeds in the U.S., and particularly at plant B. Another reason for the apparently higher prevalence of drug resistant salmonellae in our studies might be that strains falling in the "intermediately resistant" category were considered as "resistant" in our studies. Te and S resistance were next in frequency to sulphafurazole among *Salmonella* isolates of Tenant & col. (29). Resistance to Te and S has been found to be most common *Salmonella* isolates from human and animal sources in the northeast U.S. (19, 22); from animal sources in England and Wales (26);

and from human sources in the state of California (3).

The survival of antibiotic resistant salmonellae and of salmonellae carrying transferrable resistance is of some interest as it relates to the ecology of resistance, its spread, and the potential for maintaining reservoirs of resistance outside the clinical environment. Richmond (20, 21) has argued that, while resistance transfer in patients may undermine therapy, resistant bacteria among the normal resident populations of the gut, many of which carry R plasmids, constitute the major source of resistant organisms in patients undergoing therapy. The environment may serve as a source of resistant organisms. The incidence of resistant bacteria in the environment, in turn, should reflect the selective pressure of antibiotic usage.

The steady increase in the frequency of salmonellae resistant to at least 1 antibiotic from 55.8% in the raw waste to 94.7% in the final effluent and of multiply resistant strains from 49.3% to 80% suggests that resistant organisms are at an advantage relative to non-resistant strains. It is notable that the frequency of multiply resistant isolates able to transfer all or part of their resistance determinants, while it varied somewhat, did not change appreciably through the treatment system, suggesting that transferrable and non-transferrable resistance

were of equal advantage. It is of interest, finally, the frequencies of multiply resistant isolates able to transfer resistance were entirely consistent with frequencies reported in the literature, which vary from 73 to 100% (3, 19, 22).

The presence of salmonellae in poultry processing wastes and in a receiving stream as far as 5km from the point of discharge suggests a potential public health problem associated with the discharge of such wastes to surface waters. Furthermore, poultry processing wastes can act as reservoirs of bacteria carrying transferrable drug resistance which are not cured in the pond system. The proportion of transferrable drug resistant salmonellae and the number of resistance determinants carried by them did not diminish as the wastes moved through the treatment system. There exists a possibility of transmission to animal or human populations from polluted waters which are accessible to children and animals which have contact with man, or which may contaminate food products. Also, apparently harmless indicator bacteria present in these wastes can transfer their resistance determinants to other bacteria associated with man which may become more threatening. Thus, it appears advisable to disinfect treated wastes from poultry processing plants before discharge to surface waters.

References

1. American Public Health Association — Standard methods for the examination of water and wastewater. 14th ed. American Public Health Association, New York, 1975.
2. Bauer, A.W.; Kirby, W.M.M.; Sherris, J.C. & Turck, M. — Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disc method. Amer. J. Clin. Pathol., 45:493-496, 1966.
3. Bissett, M.L., Abott, S.L. & Wood, R.M. — Antimicrobial resistance and R factors in *Salmonella* isolated in California (1971-1972). Antimicrob. Ag. Chemother., 5: 161-168, 1974.
4. Buxton, A. — Salmonellosis in animals: review. Commonwealth, Bucks, England, Agricultural Bureau, Farnham Royal, 1957.
5. Cheng, C.M.; Boyle, W.C. & Goepfert, J.M. — Rapid quantitative method for *Salmonella* detection in polluted waters. Appl. Microbiol., 21:662-667, 1974.
6. Cherry, W.B.; Hanks, J.B.; Thomason, B.M.; Murlin, A.M.; Biddle, J.W. & Croom, J.M. — *Salmonella* as an index of pollution of surface waters. Appl. Microbiol., 24:334-340, 1972.
7. Cladon, D.G.; Thompson, D.I.; Christenson, E.H.; Lawton, G.W. & Dick, E.C. — Prolonged *Salmonella* contamination of a recreational lake by runoff waters. Appl. Microbiol., 21:875-887, 1971.
8. Edwards, P.R. — Salmonellosis: observations on incidence and control. Ann. N. Y. Acad. Sci., 70:598-613, 1958.
9. Galton, M.M.; Mackel, D.C.; Lewis, A.L.; Haire, W.C. & Hardy, A.V. — Salmonellosis in poultry and poultry processing plants in Florida. Amer. J. vet. Res., 16:132-137, 1955.
10. Galton, M.M.; Morris, G.K. & Martin, W.T. — Salmonellae in foods and feeds: review of isolation methods and recommended procedures. Atlanta, Ga., U.S. Public Health Service, Center for Disease Control, 1968.
11. Glezen, W.P.; Hines, M.P.; Kerbaugh, M.; Green, M.E. & Koomen Jr., J. — *Salmonella* in two poultry processing plants. J. Amer. vet. med. Assn., 148:550-552, 1966.
12. Harvey, R.W.S. & Phillips, W.P. — An environmental survey of bakehouses and abattoirs for *Salmonella*. J. Hyg. Camb., 59:93, 1961.
13. Kaufmann, A.F. & Feely, J.C. — Culture survey of *Salmonella* at a broiler-raising plant. U.S. Public Health Rep., 83:417-422, 1968.
14. Kraft, D.J.; Olechowski-Gerhardt, C.; Berkowitz, L. & Finstein, M.S. — *Salmonella* in wastes produced at commercial poultry farms. Appl. Microbiol., 18:703-707, 1969.
15. McCoy, J.H. — Sewage pollution of natural waters. In: — G. Sykes & F.A. Skinner, eds. — Microbial aspects of pollution. New York, Academic Press, 1971.
16. Martin, W.J. & Ewing, W.H. — Prevalence of serotypes of *Salmonella*. Appl. Microbiol., 17:111-117, 1969.
17. Morris, G.K.; McMurray, B.L.; Galton, M.M. & Wells, J.G. — A study of the dissemination of salmonellosis in a commercial broiler chicken operation. Amer. J. vet. Res., 30:1413-1421, 1969.

18. Morris, G.K. & Wells, J.G. — *Salmonella* contamination in a poultry processing plant. *Appl. Microbiol.*, 19:795-799, 1970.
19. Neu, H.C.; Cherubin, C.; Longo, E.; Flouton, B. & Winter, J. — Antibiotic resistance and R-factor transfer among isolates of *Salmonella* in the Northeastern United States: a comparison of human and animal isolates. *J. Infect. Dis.*, 132:617-622, 1968.
20. Richmond, M.H. — Some environmental consequences of the use of antibiotics: or "What goes up must come down." *J. Appl. Bacteriol.*, 35:155-176, 1972.
21. Richmond, M.H. — Resistance factors and their ecological importance to bacteria and to man. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.*, 13:191-248, 1973.
22. Schroeder, S.A.; Terry, P.M. & Bennett, J.V. — Antibiotic resistance and transfer factors in *Salmonella*. *J. Amer. med. Assn.*, 205:903-906, 1968.
23. Smith, H.W. — Antimicrobial drugs in animal feeds. *Nature (London)*, 218:728-731, 1968.
24. Smith, H.W. — The effect of the continuous administration of diets containing tetracyclines and penicillin on the number of drug-resistant and drug-sensitive *Clostridium welchii* in the faeces of pigs and chickens. *J. Pathol. Bacteriol.*, 77:79-93, 1959.
25. Smith, H.W. & Crabb, W.E. — The effect of the continuous administration of diets containing low levels of tetracyclines on the incidence of drug-resistant *Bacterium coli* in the faeces of pigs and chickens: the sensitivity of *B. coli* to other therapeutic agents. *Vet. Rec.*, 69:24, 1957.
26. Sojka, W.J. & Hudson, E.B. — A survey of drug resistance in *Salmonella* isolated from animals in England and Wales during 1972. *Br. vet. J.*, 132:95-104, 1976.
27. Spino, D.F. — Elevated temperature technique for the isolation of *Salmonella* from streams. *Appl. Microbiol.*, 14:591-596, 1966.
28. Stephan, R. & Bullig, E. — Die Entwicklung der Antibiotikaresistenz von Salmonellabakterien tierischer Herkunft in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West). II — Jahresbericht 1971. *Zentralbl. Bakteriol.*, (Orig. A) 225:257-262, 1973.
29. Tenant, A.D.; Toxopeus, R.; Bastien, J.A.P.; Beauchamp, M. & Vandewint, J. — *Salmonella* in poultry packing plant effluents. *Technology Development Reports, EPS 4-OR-75-1*, Environment Canada, Ontario, 1975.
30. Vanderpost, J.M. & Bell, J.B. — A bacteriological investigation of meat packing plant effluents in the province of Alberta with particular emphasis on *Salmonella*. *Technology Development Report, 4-NW-75-1*, Canada, Environmental Protection Service, Department of the Environment, 1975.
31. Watanabe, T. — Infectious drug resistance in bacteria. In: Arber, W., ed. — *Current topics in microbiology and immunology*. Hamburg, Springer Verlag, 1971.
32. Wilder, A.N. & MacCready, R.A. — Isolation of *Salmonella* from poultry products, and poultry processing plants in Massachusetts. *New Engl. J. Med.*, 274: 1453-1460, 1960.

Ocorrência de micobactérias em águas poluídas com resíduos industriais e domésticos*

Celso Luiz Cardoso**
 & Paulo Pinto Gontijo Filho***

Resumo

Foram isoladas 158 cepas de micobactérias a partir de amostras de água poluída, notadamente com resíduos de petróleo, após a depuração com hidróxido de sódio a 4% (111 cepas), ou cloreto de benzalcônio a 0,34% (47 cepas). A maioria das micobactérias isoladas comportou-se como pertencente ao grupo III de Runyon (78 cepas), seguindo-se as de crescimento rápido (61 cepas) e as escotocromogênicas, de crescimento lento (19 cepas). Aproximadamente 32% das cepas foi caracterizada como micobactérias potencialmente patogênicas, incluindo *M. avium-intracellulare* (3,8%), *M. scrofulaceum* (6,3%) e *M. fortuitum* (22,2%). Conclui-se que a água do Rio Jacaré está contaminada com micobactérias potencialmente patogênicas, podendo servir como fonte de doença humana.

Summary

Occurrence of mycobacteria in water polluted with industrial and domestic residues

From water polluted with petroleum residues 150 strains of mycobacteria were isolated by treatment with 4% sodium hydroxide (111 strains) or with 0,34% benzalkonium chloride (47 strains). Seventy-eight of the isolates were assigned to Runyon's group III. Another 61 were grouped and characterized as rapid growers and 19 into the scotochromogenic group. About 32% of the strains were characterized as potentially pathogenic mycobacteria, including *M. avium-intracellulare* (3,8%), *M. scrofulaceum* (6,3%) and *M. fortuitum* (22,2%). It is concluded that the water is contaminated with potentially pathogenic mycobacteria and thus serve as a source of human disease.

Introdução

As doenças causadas pelas bactérias do gênero *Mybocaterium* são denominadas micobacterioses (14, 25). As micobactérias patogênicas para o homem podem ser subdivididas em 3 grupos: I — estreitamento patogênico, cuja presença em material clínico implica necessariamente em doença, classicamente representado por *M. leprae*, *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. ulcerans*, *M. africanum*; 2 — potencialmente patogênico, no qual a patogenicidade está intimamente associada à diminuição de resistência orgânica geral ou local do hospedeiro, reunindo *M. kansasii*, *M. marinum*; *M. xenopi*, "complexo *M. avium*" e as espécies, recentemente descritas, *M. simiae*, *M. szulgai* e *M. haemophili-*

lum; e 3 — um último grupo formado por *M. scrofulaceum*, *M. fortuitum* e *M. chelonei*, geralmente isolados como contaminantes das secreções humanas, sendo muito raramente responsáveis pela etiologia do processo infeccioso (4, 26).

Muito pouco é conhecido sobre a epidemiologia das infecções causadas pelas micobactérias oportunistas (grupos 2 e 3 acima) (23, 25). De acordo com Fogar (6), não há evidência de transmissão, por contato direto destas micobacterioses. Uma exceção corresponde ao "granuloma de piscinas", causado pelo *M. marinum* (24). Neste caso, o reservatório natural, assim como a fonte de infecção e o modo de transmissão são conhecidos; ao contrário do que ocorre com as doenças causadas por *M.*

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com recursos do CNPq (processo n° 22220162/77), e FINEP (Convênio 527/CT).

** Fundação Universidade Estadual de Maringá. 87.100 Maringá, PR. Bolsista da CAPES.

*** Instituto de Microbiologia da UFRJ, Ilha do Fundão, 20000 Rio de Janeiro, RJ. Bolsista do CNPq.

xenopi, *M. kansasii* e *M. avium-intracellulare* (3, 23, 24, 25, 31).

Foram isoladas e identificadas bioquimicamente micobactérias de águas poluídas, notadamente com resíduos de refinaria de petróleo e domésticos, visando a detecção de micobactérias potencialmente patogênicas para o homem.

Material e Métodos

Colheita das amostras — Foram realizadas 12 colheitas de água, do Rio Jacaré, próximo a refinaria de Manguinhos, na cidade do Rio de Janeiro.

Foi obtido um total de 24 amostras de água, sendo 12 correspondentes à maré alta, incluindo 6 amostras de superfície e 6 de profundidade; e as restantes colhidas na maré baixa, compreendendo também 6 amostras de superfície e 6 de profundidade.

Para cada amostra, foram coletados aproximadamente volumes 400ml, utilizando-se um frasco esterilizado em autoclave, a 120°C, por 15 minutos, com a boca provida de gaze, procurando-se, para as águas de superfície, colher o óleo normalmente presente a este nível, enquanto que as de profundidade foram colhidas 30cm abaixo da superfície.

Métodos de tratamento das amostras — Tomou-se 60ml de cada amostra, divididos em quatro porções de 15ml, em tubos com tampa de rosca, e centrifugados a 2.500rpm, durante 30 minutos. Cada sedimento foi ressuspensão em 1,5ml de solução estéril de cloreto de sódio a 0,85% e tratado pelo método de Petroff (22) ou Krasnow & Wayne (15) modificado, utilizando-se dois tubos para cada técnica.

Técnica — Foram adicionados 1,5ml de solução estéril de hidróxido de sódio a 4% (método de Petroff) ou de solução estéril de cloreto de benzalcônio a 0,34% (método de Krasnow & Wayne, modificado), ao tubo com a suspensão de sedimento, agitando-se em "Vortex Jr. (Lab. Line Instruments., Melrose Park III USA)", durante 30 segundos e incubando-se em estufa a 37°C por 30 minutos, com agitação a cada 10 minutos. A seguir, os tubos foram centrifugados durante 30 minutos, a 2.500rpm, decantando-se o sobrenadante e neutralizando-se o sedimento com uma solução estéril de áci-

do clorídrico a 8,5%, contendo vermelho de ferol como indicador (método de Petroff), ou lavando-se o sedimento, por duas vezes, antes de ressuspender-lo, em solução salina 0,15M estéril (método de Krasnow & Wayne, modificado).

Semeadura e isolamento — Para cada suspensão do sedimento foram semeados quatro tubos com meio inclinado de Loewenstein-Jensen, inoculando-se 0,1ml por tubo. Estes foram incubados em estufa a 37°C, com leituras diárias até 7 dias e depois com 14, 21 e 28 dias. As colônias desenvolvidas foram registradas quanto ao tempo de crescimento, tamanho (em milímetros), aspecto da superfície (liso ou rugoso) e a produção de pigmento; para facilitar a seleção das amostras a serem repicadas. A seguir foram caracterizadas quanto a álcool-ácido resistência e repicada para meio de Loewenstein-Jensen.

Identificação bioquímica — As amostras foram identificadas previamente nos quatro grupos propostos por Runyon através das provas de velocidade de crescimento (27) e produção de pigmento (35).

Os microrganismos pertencentes aos grupos II e III de Runyon foram submetidos aos seguintes testes para identificação nas respectivas espécies: produção de niacina (13, 28), redução de nitrato (35), catalase semiquantitativa (18, 37) termoinativação da catalase a 68°C (18, 19), hidrólise do Tween 80 (40), tolerância ao cloreto de sódio a 5% (41) de redução do telurito de potássio (12).

As micobactérias de crescimento rápido (grupo IV) foram identificadas através dos seguintes testes: transformação do citrato férrico amonical (39), redução do nitrato (35), hidrólise do Tween 80 (40), tolerância ao cloreto de sódio a 5% (41), atividade aril-sulfatástica, em 3 dias (36) e crescimento em meio de ágar McConkey (11, 20).

Resultados

Os microrganismos isolados foram definidos quanto às características coloniais, velocidade de crescimento e álcool-ácido resistência, e repicados para os meios de 7H9 (Middlebrook) e Loewenstein-Jensen. Selecionou-se 158 cepas de micobactérias, das quais 97 (61,4%) foram

de crescimento lento e as restantes de crescimento rápido. A maioria dos isolamentos forne-

ceu colônias lisas (124/158) e destruídas de pigmentação (136/158), como indicado na Tabela 1.

Tabela 1 — Características coloniais e velocidade de crescimento das micobactérias isoladas

| Maré | Nível da água | Métodos de tratamento | Colonia | | Pigmento | | Tamanho (mm) | | | Crescimento em dias | | Total |
|-----------------------|---------------|------------------------|---------|--------|----------|---------|--------------|-------|----|---------------------|-------|-------|
| | | | Lisa | Rugosa | Presente | Ausente | <1 | = 1-2 | >2 | 7 | 14-21 | |
| A l t a | Superfície | Hidróxido de sódio | 39 | 8 | 11 | 36 | 11 | 12 | 24 | 12 | 35 | 47 |
| | | Cloreto de benzalcônio | 6 | 1 | 2 | 5 | — | 5 | 2 | 2 | 5 | 7 |
| | Profundidade | Hidróxido de sódio | 21 | 5 | 2 | 24 | 9 | 9 | 8 | 8 | 18 | 26 |
| | | Cloreto de benzalcônio | 9 | 5 | 2 | 12 | — | 1 | 13 | 9 | 5 | 14 |
| B a i x a | Superfície | Hidróxido de sódio | 9 | 4 | 2 | 11 | 2 | 8 | 3 | 3 | 10 | 13 |
| | | Cloreto de benzalcônio | 13 | 8 | — | 21 | 2 | 4 | 15 | 20 | 1 | 21 |
| | Profundidade | Hidróxido de sódio | 24 | 1 | 3 | 22 | 3 | 15 | 7 | 2 | 23 | 25 |
| | | Cloreto de benzalcônio | 3 | 2 | — | 5 | — | 3 | 2 | 5 | — | 5 |
| | | TOTAL | 124 | 34 | 22 | 136 | 27 | 57 | 74 | 61 | 97 | 158 |

Tabela 2 — Identificação das micobactérias de crescimento lento (grupos II e III do Runyon)

| Espécie ou amostra isolada | Cresc. em menos que 7 dias | Pigmento no escuro | Pigmento fotovativo | Produção de niacina | Redução de nitrato | Ativ. catalásica | | Hidrólise do Tween 80 em 5 dias | Redução do telurito potássio | Tolerância do cloreto de sódio a 5% |
|---|----------------------------|--------------------|---------------------|---------------------|--------------------|------------------|------|---------------------------------|------------------------------|-------------------------------------|
| | | | | | | semiquantitativo | 68°C | | | |
| <i>M. scrofulaceum</i> (ATCC 19.981) | | | | | | | | | | |
| 10 amostras | — | + | — | — | — | + | + | — | — | — |
| <i>M. gordonaiae</i> (ATCC 14.470) | | | | | | | | | | |
| 5 amostras | — | + | — | — | — | + | + | + | — | — |
| <i>M. flavescentis</i> (ATCC 14.474) | | | | | | | | | | |
| 2 amostras | ± | + | — | — | + | + | + | + | — | ± |
| 1 amostra | + | + | — | — | + | + | + | + | — | — |
| 1 amostra | — | + | — | — | + | + | + | + | — | + |
| <i>M. avium-intra-cellulare</i> (ATCC 25.291) | | | | | | | | | | |
| (ATCC 15.985) | — | — | — | — | — | — | + | — | ± | — |
| 1 amostra | — | — | — | — | — | — | + | — | + | — |
| 5 amostras | — | — | — | — | — | + | + | — | + | — |
| <i>M. terrae</i> (ATCC 19.755) | | | | | | | | | | |
| 35 amostras | — | — | — | — | + | + | + | + | — | — |
| 20 amostras | — | — | — | — | — | + | + | + | — | — |
| <i>M. gastri</i> (ATCC 15.754) | | | | | | | | | | |
| 1 amostra | — | — | — | — | — | — | — | + | — | — |
| 6 amostras | — | — | — | — | + | — | — | + | — | — |
| <i>M. triviale</i> (ATCC 23.292) | | | | | | | | | | |
| 3 amostras | — | — | — | — | + | + | + | + | — | + |
| Não identificados | — | V | — | — | V | + | + | V | V | V |
| 7 amostras | — | V | — | — | V | + | + | V | V | V |

+ = Acima de 84% de positividade

— = Abaixo de 16% de positividade

± = Entre 50—84% de positividade

± = Entre 16—49% de positividade

V = Variável

A identificação das amostras de crescimento lento e de crescimento rápido foi realizada pelos testes relacionados em material e métodos. As provas foram efetuadas em duplicatas, considerando-se, numa determinada espécie, o microrganismo que apresentou o comportamento esperado, em relação ao da amostra tipo testada, ou que divergiu em uma única propriedade.

A caracterização das amostras escotocromogênicas está representada na Tabela 2, mostrando a presença de *M. scrofulaceum* (10 cepas), *M. gordonaë* (5 cepas) e *M. flavesiens* (4 cepas). Entre as micobactérias do grupo III de Runyon, a maioria (55/78) foi identificada como *M. terrae*, sendo que vinte destas não apresentaram atividade nitro-redutásica (Tabela 2). Seis comportaram-se como *M. avium-intracellulare*, embora cinco apresentassem forte atividade catalásica à temperatura ambiente. Entre os sete isolamentos, caracterizados como *M. gastri*, somente um não divergiu em nenhuma das características apresentadas pela amostra padrão (ATCC-15.574). As culturas identificadas como *M. triviale* não diferiram do comportamento esperado nos testes realizados. No entanto, não foi possível a identificação de sete cepas, através dos testes utilizados.

Com relação às de crescimento rápido, *M. fortuitum* foi a espécie mais freqüentemente isolada (Tabela 3). Adicionalmente, foram encontradas micobactérias identificadas como *M. smegmatis* (5), *M. diernhoferi* (3) e *M. phlei* (2), sendo que 16 cepas deste grupo não puderam ser identificadas através dos testes empregados.

As amostras de água, colhidas na preamar, forneceram 34% e 25% dos isolamentos, quando tomados na superfície e profundidade, respectivamente. Os valores correspondentes para as amostras de baixamar foram 21% (superfície) e 19% (profundidade). A maioria das micobactérias de crescimento lento (89/97) foram obtidas quando do tratamento pelo hidróxido de sódio, enquanto o emprego do cloreto de benzalcônio forneceu um maior número das cepas de crescimento rápido (36/61), conforme evidenciado na Tabela 4.

A distribuição das cepas nas respectivas espécies, representadas na Tabela 4, mostra que o total isolado foram identificadas 55 cepas de *M. terrae*, 35 de *M. fortuitum*, 10 de *M. scrofulaceum*, 7 de *M. gastri*, 6 de *M. avium-intracellulare*, 5 de *M. smegmatis*, 5 de *M. gordonaë*, 4 de *M. flavesiens*, 3 de *M. triviale*, 3 de *M. diernhoferi* e 2 de *M. phlei*.

Tabela 3 — Identificação das micobactérias de crescimento rápido (Grupo IV de Runyon)

| Espécie ou amostra isolada | Cresc. em menos que 7 dias | Transformação do citrato férrico amoniacal | Pigmento no escuro | Pigmento foto-ativo | Atividade aril-sulfatásica | Cresc. em ágar MacConkey | Redução de nitrato | Hidrólise do Tween 80 em 5 dias | Tolerância ao cloreto de sódio 5% |
|--|----------------------------|--|--------------------|---------------------|----------------------------|--------------------------|--------------------|---------------------------------|-----------------------------------|
| <i>M. fortuitum</i> (ATCC 6.841) | + | + | - | - | + | + | + | ± | + |
| 35 amostras | + | + | - | - | + | + | + | ± | + |
| <i>M. smegmatis</i> (ATCC 14.468) | + | + | - | - | - | - | + | + | + |
| 5 amostras | + | + | - | - | - | - | + | - | + |
| <i>M. diernhoferi</i> (ATCC 19.340) | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| 3 amostras | + | + | - | - | - | - | + | + | - |
| <i>M. phlei</i> (ATCC 10.142) | + | + | + | - | - | - | + | + | + |
| 2 amostras | + | + | + | - | - | - | + | + | + |
| Não identificadas | | | V | V | V | V | V | V | V |
| 16 amostras | + | + | V | V | V | V | V | V | V |

+ = Acima de 84% de positividade

- = Abaixo de 16% de positividade

± = Entre 50—84% de positividade

V = Variável

Tabela 4 — Distribuição das micobactérias isoladas de acordo com as espécies

| Grupo de Runyon | Espécie | Maré Alta | | | | Maré Baixa | | | | Total | |
|-----------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|--------------------|------------------------|-------|--|
| | | Superfície | | Profundidade | | Superfície | | Profundidade | | | |
| | | Hidróxido de sódio | Cloreto de benzalcônio | | |
| II | <i>M. scrofulaceum</i> | 7 | 1 | — | — | — | — | 2 | — | 10 | |
| | <i>M. gordonaë</i> | 1 | — | 1 | — | 2 | — | 1 | — | 5 | |
| | <i>M. flavescentis</i> | 2 | 1 | — | 1 | — | — | — | — | 4 | |
| III | <i>M. avium</i> | 1 | — | 3 | 1 | — | — | 1 | — | 6 | |
| | <i>M. terrae</i> | 19 | 1 | 10 | 2 | 8 | 1 | 14 | — | 55 | |
| | <i>M. gastri</i> | 3 | 1 | 1 | — | — | — | 2 | — | 7 | |
| | <i>M. triviale</i> | 1 | — | 1 | — | — | — | 1 | — | 3 | |
| | Não identificadas | 1 | 1 | 2 | 1 | — | — | 2 | — | 7 | |
| IV | <i>M. fortuitum</i> | 5 | 1 | 3 | 9 | 2 | 14 | — | 1 | 35 | |
| | <i>M. smegmatis</i> | — | — | 2 | — | — | — | — | 3 | 5 | |
| | <i>M. diernhoferi</i> | 1 | 1 | — | — | — | 1 | — | — | 3 | |
| | <i>M. phlei</i> | 1 | — | 1 | — | — | — | — | — | 2 | |
| | Não identificadas | 5 | — | 2 | — | 1 | 5 | 2 | 1 | 16 | |
| Total | (Percentagem) | 47 (29,1%) | 7 (4,4%) | 26 (16,4%) | 14 (8,8%) | 13 (8,2%) | 21 (13,2%) | 25 (15,7%) | 5 (3,1%) | 158 | |

Discussão

As diversas coleções de água contêm micobactérias, funcionando como reservatórios de *M. gordonaë* e *M. marinum* (5, 25, 38). Segundo Singer & Rodda (30) e Goslees & Wolinsky (10), a água estagnada e aquela em contato com animais são as fontes mais ricas em micobactérias. A presença destes microrganismos em água salgada (5, 10, 30) é pouco conhecida, não havendo nenhum trabalho sistemático sobre o assunto.

Sob certas circunstâncias, a água pode ser a fonte de micobacterioses humanas (5, 10, 32). Desta forma, os casos de infecção hospitalar, por *M. xenopi* e *M. kansasii*, observados por McSwiggan & Collins (21), foram atribuídos à presença destes microrganismos na rede de abastecimento de água; no entanto, as evidências são de que a água não é o reservatório de micobactérias potencialmente patogênicas, excetuando-se *M. marinum*. A presença de *M. fortuitum* (35 cepas), *M. avium-intracellulare* (6 cepas) e, sobretudo, *M. scrofulaceum* (10 cepas), observado em nosso trabalho, deve decorrer da acentuada poluição do Rio Jacaré, principalmente por matéria orgânica originária das favelas localizadas às suas margens. Esta água, contaminada, pode servir como fonte de infecção de doença humana.

A presença de outras micobactérias, em co-

leções de água, foi descrita por vários autores (1, 2, 7, 8, 9, 10, 17, 27, 30, 33). Microrganismos pertencentes às espécies *M. gordonaë*, *M. flavescentis*, *M. terrae*, *M. gastri*, *M. triviale*, *M. smegmatis*, *M. diernhoferi* e *M. phlei* foram encontrados nas amostras de água estudadas.

Apenas 14,5% dos isolamentos não pode ser caracterizado pelos testes utilizados, sendo, na sua maioria, micobactérias de crescimento rápido (16/23). Os microrganismos deste grupo (IV de Runyon) são os de identificação mais difícil, embora as espécies *M. fortuitum* e *M. chelonei* (4,26) possam ser reconhecidos através do uso de poucos testes bacteriológicos e bioquímicos (35). O estudo das demais espécies requer a utilização de uma variedade de provas, destacando-se a atividade fermentativa, utilização de substâncias orgânicas como fontes de carbono e/ou nitrogênio, atividade amidásica, etc. (16, 29, 34).

A suposição inicial, que as amostras colhidas na superfície fossem mais ricas em micobactérias, do que aquelas obtidas em profundidade, com base nas exigências respiratórias destes microrganismos e/ou numa possível solubilização pela película de óleo presente no rio, foi confirmada em parte pois, os materiais provenientes da superfície (preamar e baixamar) representaram 58% dos isolamentos.

O emprego dos dois métodos de tratamento, em paralelo, mostrou o hidróxido de sódio for-

necendo a grande maioria das cepas de crescimento lento (87,9%) e o cloreto benzalcônio a maior parte das de crescimento rápido (59,0%). Entretanto, é preciso salientar que, aproximadamente, 60% (preamar e baixamar) dos tubos

de cultura, inoculados com o material tratado pelo segundo método, se apresentaram contaminados ao fim da primeira semana de incubação, contra apenas 10% correspondentes ao método de Petroff.

Referências Bibliográficas

1. Beerwerth, W. & Schurmann, J. — Contribution to the ecology of mycobacteria. Zbl. Bakt. I. Abt. Orig., 211:58-68, 1969.
2. Bullin, C.H.; Tanner, E.I. & Collins, C.H. — Isolation of *Mycobacterium xenopi* from water taps. J. Hyg., 68:97-100, 1970.
3. Chapman, J.S. — The ecology of the atypical mycobacteria. Arch. Environ. Hlth., 22:41-46, 1971.
4. David, H.L. — Bacteriology of the mycobacteriosis. Atlanta, U.S. Department of Health Education and Welfare, 1976.
5. Eilertsen, E. — Atypical mycobacteria and reservoir in water. Scand. J. Resp. Dis., 50 (Suppl. 69):85-88, 1969.
6. Fogar, L. — Atypical mycobacteria. Medicine, 49:243-255, 1970.
7. Gangadharan, P.R.J.; Lockhart, J.A.; Awe, R.J. & Jenkins, D.E. — Mycobacterial contamination through tap water. Amer. Rev. Resp. Dis., 113:894, 1976.
8. Gontijo Filho, P.P. — Estudo preliminar da flora micobacteriana da água. São Paulo, Resumos do IIº Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1970.
9. Gontijo Filho, P.P. — Micobactérias escotocromogênicas isoladas de água de piscina. Identificação bioquímica. São Paulo, Resumos do IIº Congresso Brasileiro de Microbiologia, 1970.
10. Goslee, S. & Wolinsky, E. — Water as a source of potentially pathogenic mycobacteria. Amer. Rev. Resp. Dis., 113:287-292, 1976.
11. Jones Jr.; W.D. & Kubica, G.P. — The use of MacConkey's agar for the differential typing of *Mycobacterium fortuitum*. Amer. J. Med. Technol., 30:187-190, 1964.
12. Kilburn, J.O.; Silcox, V.A. & Kubica, G.P. — Differential identification of mycobacteria. V — The tellurite reduction test. Amer. Rev. Resp. Dis., 99:94-100, 1969.
13. Konno, K. — New chemical method to differentiate humantype tubercle bacilli from other mycobacteria. Science, 124:124, 1956.
14. Kovacs, N. — New bacteriological, epidemiological and clinical aspects of anonymous mycobacteria. Bull. Int. Un. Tuberc., 37:351-360, 1966.
15. Krasnow, I. & Wayne, L.G. — Sputum digestion. I — The mortality rate of tubercle bacilli in various digestion systems. Ann. J. Clin. Pathol., 45:352-355, 1966.
16. Kubica, G.P.; Baess, I.; Gordon, R.E.; Jenkins, P.A.; Kwapiński, J.B.G.; McDurmott, C.; Pattyn, S.R.; Saito, H.; Silcox, V.; Stanford, J.L.; Takeya, K. & Tsukamura, M. — A co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria. J. Gen. Microbiol., 73:55-70, 1972.
17. Kubica, G.P.; Beam, R.E.; Palmer, J.W. & Rigdon, A.L. — The isolation of unclassified (atypical) acid-fast bacilli from soil and water samples collected in the state of Georgia. Amer. Rev. Resp. Dis., 84:135-136, 1961.
18. Kubica, G.P.; Jones, Jr., W.D.; Abbott, V.D.; Beam, R.E.; Kilburn, J.O. & Cater, J.C. — Differential identification of mycobacterial. I — Tests on catalase activity. Amer. Rev. Resp. Dis., 94:400-405, 1966.
19. Kubica, G.P. & Pool, G.L. — Studies on the catalase activity of acid-fast bacilli. I — An attempt to subgroup these organisms on the basis of their catalase activities at different temperatures and pH. Amer. Rev. Resp. Dis., 81:387-391, 1960.
20. Kubica, G.P. & Vitvitsky, J. — Comparison of two commercial of the McConkey agar test for mycobacteria. Appl. Microbiol., 27:917-919, 1974.
21. McSwiggan, D.A. & Collins — The isolation of *M. kansassii* and *M. xenopi* from water systems. Tubercle, 55:291-297, 1974.
22. Petroff, S.A. — Some cultural studies on the tubercle bacillus. Bull. Johns Hopkins Hosp., 26:276-279, 1915.
23. Potts, W.E. — The importance of atypical mycobacteria disease in children. Lancet, 86:136-143, 1966.
24. Runyon, E.H. — Pathogenic mycobacteria. Advan. Tuberc. Res., 14:235-287, 1965.
25. Runyon, E.H. — Whence mycobacteria and mycobacterioses? Ann. Int. Med., 75:467-468, 1971.
26. Runyon, E.H. — Ten mycobacterial pathogens. Tubercle, 55:235-240, 1974.
27. Runyon, E.H.; Karlson, A.G.; Kubica, G.P. & Wayne, L.G. — *Mycobacterium*. In: — Manual of clinical microbiology. 2 ed. Washington, D.C., American Society for Microbiology, 1974.
28. Runyon, E.H.; Selin, M.J. & Harris, H.W. — Distinguishing mycobacteria by the niacin test: a modified procedure. Amer. Rev. Tuberc., 79:663-665, 1959.
29. Saito, H.; Gordon, R.E.; Juhlim, I.; Kappler, W.; Kwapiński, J.B.G.; McDurmott, C.; Pattyn, S.R.; Runyon, E.H.; Standford, J.L.; Tarnok, I.; Tasaka, H.; Tsukamura, M. & Weiszfeiler, J. — Co-operative numerical analysis of rapidly growing mycobacteria: 2nd report. Int. J. Syst. Bact., 27:75-85, 1977.
30. Singer, E. & Rodda, G.M.J. — Non-specific sensitization to old tuberculin: mycobacteria in water. Tubercle (London), 46:209-213, 1965.
31. Stergus, I. — Relation of atypical acid-fast bacteria to disease. Pub. Hlth. Lab., 24:100-106, 1966.
32. Tison, F.; Devulder, B. & Tacquet, A. — Recherches sur la présence de mycobactéries dans la nature. Rev. Tuberc. Pneumol., 32:893-902, 1968.
33. Tison, F.; Tacquet, A. & Devulder, B. — Recherches des mycobactéries dans eaux de piscines et les eaux usées de la région du nord: techniques-résultats. Ann. Inst. Pasteur (Lille), 18:167-176, 1967.
34. Tsukamura, M. — Identification of mycobacteria. Obu,

- Aichi-ken, Japan, Research Laboratory of the National Sanatorium Chubu Chest Hospital, 1975.
- 35. Vestal, A.L. — Procedures for the isolation and identification of mycobacteria. Atlanta, Department of Health, Education and Welfare, U.S. Public Health Service, 1976.
 - 36. Wayne, L.G. — Recognition of *Mycobacterium fortuitum* by means of a three-day phenolphthalein sulfatase test. Amer. J. Clin. Pathol., 36:185-187, 1961.
 - 37. Wayne, L.G. — Two varieties of *Mycobacterium kansasii* with different clinical significance. Amer. Rev. Resp. Dis. 86:651-656, 1962.
 - 38. Wayne, L.G. — On the identity of *Mycobacterium gordonae* Bogalii and the so-called tap water scotochromogenes inst. J. Sys. Bacteriol., 20:149-153, 1970.
 - 39. Wayne, L.G. & Doubek, J.R. — Diagnostic key to mycobacteria encountered in clinical laboratories. Appl. Microbiol., 16:925-931, 1968.
 - 40. Wayne, L.G.; Doubek, J.R.; Russel, R.L. — Classification and identification of mycobacteria. I — Tests employing tween 80 as substrate. Amer. Rev. Resp. Dis., 90:588-597, 1964.
 - 41. Wayne, L.G.; Engbaek, H.C.; Engel, H.W.B.; Froman, S.; Gross, W.; Hawkins, J.; Kappler, W.; Karlson, A.G.; Kleeberg, H.H.; Krasnow, I.; Kubica, G.P.; McDurmont, C.; Nel, E.E.; Pattyn, S.R.; Schroder, K.H.; Showalter, S.; Tarnok, I.; Tsukamura, M.; Vergmann, B. & Wolinsky, E. — Highly reproducible techniques for use in systematic bacteriology in the genus *Mycobacterium*: tests for pigment, urease, resistance to sodium chloride, hydrolysis of tween 80, and B-galactosidase. Int. J. Syst. Bacteriol., 24:412-419, 1974.

Concentrações inibitórias do sulfato de cefoxitina para bactérias anaeróbias

Luiz R. Trabulsi*

Resumo

Foram determinadas as concentrações bacteriostáticas e bactericidas, respectivamente para 120 e para 34 amostras de bactérias anaeróbias de importância clínica. A concentração de 16 µg/ml foi bacteriostática para todas as amostras com exceção de oito de *Bacteroides fragilis*. As concentrações bacteriostáticas e bactericidas foram praticamente idênticas, com relação às 34 amostras, com exceção de algumas de *Bacteroides fragilis* e *Peptostreptococcus* sp.

Summary

Susceptibility of anaerobic bacteria to cefoxitin

The bacteriostatic and bactericidal concentrations of cefoxitin respectively for 120 and 34 strains of anaerobic bacteria of clinical importance were determined. The concentration of 16µg/ml was bacteriostatic for all strains with exception of eight of *Bacteroides fragilis*. The bacteriostatic and bactericidal concentrations were practically the same for the 34 strains with exception of some strains of *Bacteroides fragilis* and *Peptostreptococcus* sp.

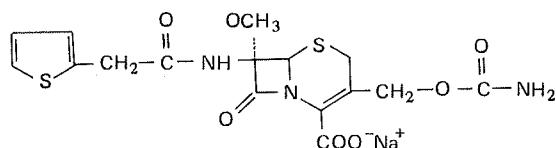
Introdução

As cefamicinas são cefalosporinas metoxiladas no carbono 7, com elevada resistência às beta-lactamasas, produzidas por bactérias gram-positivas e gram-negativas. Uma delas, a cefamicina C, apresenta ampla atividade contra bactérias gram-negativas, porém baixa contra bactérias gram-positivas. Estudos dirigidos no sentido de ampliar a atividade da cefamicina C, resultaram na obtenção da cefoxitina (Figura 1), que é mais ativa contra bactérias gram-positivas e mantém a atividade da cefamicina C contra gram-negativas, bem como sua resistência às beta-lactamasas (5, 10). O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar as concentrações bacteriostáticas e bactericidas da cefoxitina, para bactérias anaeróbias de importância clínica.

Material e Métodos

Amostras — Foram estudadas 120 amostras de bactérias anaeróbias, isoladas recentemente

Figura 1 — Cefoxitina
(ácido 3 - carbomoiloximetil-7-2-metoxi-7-[2-(2-tiemil acetamido) cefen-4-caboxílico



em São Paulo, principalmente de infecções pós-cirúrgicas. A identificação das amostras teve por base as características das colônias, morfologia e coloração das células, prova de sensibilidade e antibióticos e os testes bioquímicos indicados em rotina.

As seguintes amostras foram incluídas: 46 de *Bacteroides fragilis*, 18 de *Bacteroides melanogenicus*, 10 de *Fusobacterium* sp., 15 de *Peptococcus* sp., 20 de *Peptostreptococcus* sp., oito de *Clostridium perfringens* e três de *Clostridium* sp.

* Disciplina de Microbiologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia. Escola Paulista de Medicina, Rua Botucatu, 862, 3º andar, 01000; São Paulo SP.

Determinação das concentrações bacteriostáticas e bactericidas — As amostras foram cultivadas em tioglicolato enriquecido, até atingirem turvação semelhante a do tubo nº 1 da escala de MacFarland. Em seguida, 10^{-5} e 10^{-6} bactérias foram semeadas nos meios contendo sulfato de cefoxitina. A concentração inibitória foi determinada pelo método da diluição em placa e, a bactericida, pelo método de diluição em tubo, com repique para placa de agar sanguineo. As técnicas utilizadas, bem como os meios de cultura encontram-se em Sutter & Finegold (7, 8). As concentrações de sulfato de cefoxitina variaram entre 1 e 128 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quando da determinação da concentração inibitória e entre 4 e 32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, quando da determinação da concentração bactericida.

Resultados

A concentração de 16 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do sulfato de cefoxitina foi inibitória para 114 (95%) das 120 amostras de bactérias investigadas. As únicas amostras que proliferaram nesta concentração do antibiótico foram as oito de *Bacteroides fragilis*. Os resultados obtidos, para cada uma das espécies ou gêneros estudados, encontram-se na Tabela 1. Na Tabela 2, encontram-se as concentrações bactericidas para as 30 amostras estudadas, por espécie ou gênero. Verifica-se que as concentrações bacteriostáticas e bactericidas foram praticamente idênticas para as amostras de *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp., e *Clostridium* sp. Com relação às amostras de *Bacteroides fragilis* e de *Peptostreptococcus* sp., a concentração

Tabela 1 — Concentrações inibitórias do sulfato de cefoxitina para 120 amostras de bactérias anaeróbias

| Bactérias | Nº de amostras | Nº amostras inibidas às diferentes concentrações ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | | | |
|------------------------------------|----------------|--|-----|-----|-----|------|----|----|-----|
| | | 1.0 | 2.0 | 4.0 | 8.0 | 16.0 | 32 | 64 | 128 |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 46 | 2 | 3 | 4 | 10 | 38 | 40 | 45 | 46 |
| <i>Bacteroides melaninogenicus</i> | 18 | 16 | 17 | 18 | | | | | |
| <i>Fusobacterium</i> sp. | 10 | 5 | 6 | 8 | 10 | | | | |
| <i>Peptococcus</i> sp. | 15 | 10 | 13 | 15 | | | | | |
| <i>Peptostreptococcus</i> sp. | 20 | 4 | 10 | 13 | 18 | 20 | | | |
| <i>Clostridium perfringens</i> | 8 | 4 | 6 | 8 | | | | | |
| <i>Clostridium</i> sp. | 3 | 2 | 3 | | | | | | |

Tabela 2 — Concentrações bactericidas do sulfato de cefoxitina para bactérias anaeróbias

| Bactérias | Nº de amostras | Nº de amostras inibidas (Concentrações em $\mu\text{g}/\text{ml}$) | | | | | |
|------------------------------------|----------------|--|--------|--------|---------|---------|--|
| | | 4 | 8 | 16 | 32 | 32 | |
| <i>Bacteroides fragilis</i> | 10 | Bacteriostática Bactericida | 2 1 | 3 1 | 10 6 | 8 10 | |
| <i>Bacteroides melaninogenicus</i> | 4 | Bacteriostática Bactericida | 4 4 | | | | |
| <i>Fusobacterium</i> | 4 | Bacteriostática Bactericida | 4 4 | | | | |
| <i>Peptococcus</i> | 6 | Bacteriostática Bactericida | 4 4 | | | | |
| <i>Peptostreptococcus</i> | 6 | Bacteriostática Bactericida | 4 2 | 6 4 | 5 | 6 | |
| <i>Clostridium</i> | 4 | Bacteriostática Bactericida | 4 3 | 4 | | | |

Bs = atividade bacteriostática

Bc = atividade bactericida

bactericida foi nitidamente mais elevada do que a bacteriostática para várias amostras, conforme pode ser visto na Tabela 2.

Discussão

Os resultados obtidos neste trabalho assemelham-se aos relatados por outros autores, com relação às concentrações inibitórias da cefoxitina para germes anaeróbios. Brumfitt & col. (2) estudaram 26 amostras de *Bacteroides fragilis*, verificando que 23 tinham o crescimento inibido por 40 μ g/ml ou mais de cefoxitina. As três amostras restantes exigiram concentrações superiores a 40 μ g/ml. Tally & col. (9) investigaram a sensibilidade de 155 amostras de bactérias anaeróbias à cefoxitina e a várias cefalosporinas, verificando que a concentração de 16 μ g/ml de cefoxitina era inibitória para 82 a 96% das amostras de *Bacteroides fragilis*, *Bacteroides* sp., *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp. e *Peptostreptococcus* sp. Sutter & Finegold

(8) demonstraram que a concentração de 32 μ g/ml de cefoxitina era inibitória para 100% de 124 amostras de *Bacteroides fragilis*, e a de 8 μ g/ml para todas as amostras de *Bacteroides melaninogenicus*, *Fusobacterium* sp., *Peptococcus* sp. e *Peptostreptococcus* sp., investigadas. Resultados semelhantes são relatados pelos mesmos autores, em trabalho mais recente (7), por Bach & col. (1) e outros (3, 6). Quanto às concentrações bactericidas de cefoxitina, para bactérias anaeróbias, encontramos apenas o trabalho de Sutter & Finegold (8), que obtiveram resultados semelhantes aos nossos.

Os resultados do presente trabalho, bem como os dos autores mencionados, mostram que a cefoxitina possui bastante atividade "in vitro", contra as bactérias anaeróbias mais importantes em clínica. Considerando-se que o antibiótico atinge concentrações séricas de 16 a 32 μ g/ml ou mesmo mais (2, 4, 9), conclui-se que a cefoxitina pode ser um bom antimicrobiano para o tratamento de infecções por bactérias anaeróbias.

Referências Bibliográficas

1. Bach, V.T.; Roy, I. & Thadepalli, H. — Susceptibility of anaerobic bacteria to cefoxitin and related compounds. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10:912-913, 1977.
2. Brumfitt, W.; Kosmidis, J.; Hamilton-Miller, J.M.T. & Gilchrist, J.N.G. — Cefoxitin and cephalothin: Antimicrobial activity, human pharmacokinetics, and toxicology. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6:290-299, 1974.
3. Busch, D.F.; Kureshi, L.A.; Sutter, V.L. & Finegold, S.M. — Susceptibility of respiratory tract anaerobes to orally administered penicillins and cephalosporins. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10:713-720, 1976.
4. Miller, A.K.; Celozzi, E.; Kong, Y.; Pelak, B.A.; Hendlin, D. & Stapley, E.O. — Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: in vivo evaluation. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 5:33-37, 1974.
5. Onishi, H.R.; Daoust, D.R.; Zimmerman, S.B.; Hendlin, D. & Stapley, E.O. — Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: resistance to Beta-lactamase inactivation. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 5:38-48, 1974.
6. Staneck, J.L. & Washington II, J.A. — Antimicrobial susceptibilities of anaerobic bacteria: recent clinical isolates. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 6:311-315, 1974.
7. Sutter, V.L. & Finegold, S.M. — Susceptibility of anaerobic bacteria to 23 antimicrobial agents. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 10:736-752, 1976.
8. Sutler, V.L. & Finegold, S.M. — Susceptibility of anaerobic bacteria to carbenicillin, cefoxitin, and related drugs. *J. Infect. Dis.*, 131:417-422, 1975.
9. Tally, F.P.; Jacobus, N.V.; Bartlett, J.G. & Gorbach, S.L. — Susceptibility of anaerobes to cefoxitin and other cephalosporins. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 7:128-132, 1975.
10. Wallick, H. & Hedlin, D. — Cefoxitin, a semisynthetic cephamycin antibiotic: susceptibility studies. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 5:25-32, 1974.

Isolation of *Sporothrix schenckii* from sea water

A. Purchio*
C.R. Paula*
& W. Gambale*

Summary

A *Sporothrix schenckii* sample was isolated from the sea water in Santos, State of São Paulo, Brazil, in a beach much visited by local inhabitants and tourists. This conclusion was taken through the usual mycological methodology that consisted of isolation in Agar-Sabouraud added with chloranfenicol, study of macroscopic and microscopic characters of the colony in Corn-meal Agar, study of thermal dimorphism, intratesticular inoculation in adults rats, back-culture and histopathological test of the infected organ.

Resumo

Isolamento de Sporothrix schenckii de água do mar

Uma amostra de *Sporothrix schenckii* foi isolada de água do mar em Santos, Estado de São Paulo, Brasil, numa praia muito frequentada pelos habitantes locais e turistas. Essa amostra foi identificada segundo metodologia micológica usual que consistiu de isolamento em Agar-Sabouraud adicionado de cloranfenicol, estudo das características macroscópicas e microscópicas da colônia em Corn-meal Agar, estudo do dimorfismo térmico, inoculação intratesticular em ratos adultos, retro-cultivo e exame histopatológico do órgão infectado.

Introduction

The soil and the plants compose the usual habitat of *Sporothrix schenckii* (3). Many authors describe its viability in other substracts where it is less frequently found, for example, straw for packages, rodent's nests, particles of metal, horse-hair, flies and ants, etc.

Althoug the plants are more intensely cited as depositaries of these fungi, it doesn't seen that they prefer a determined kind of plant. It is understood, also, that *S. schenckii*, when in the soil, supports large variations of temperaturre (0°C-55°C) mantaining the pathogenic power for long periods (1).

Human beings are generally infected through wounds caused by thorns of contaminated plants and sometimes by direct contact with animals through bites or handling, injuries by particles of metal and others traumatisms (7, 8, 10).

In the epidemic that attacked of gold mines in South Africa, it was reported the isolation of

the fungus from the beams of wood that supported the tunnels as well as from the pools of water accumulated in the place. Its dissemination in nature may occur through atmospherical air, insects (2), or rivers as noted Meyer (in: Belliboni) (1).

In the present work the authors had the opportunity to isolate *S. schenckii* from the sea water from a beach intensively frequented by the population, at the time of an investigation about the incidence of fungi in marine ecosystems of Santos seaside, State of São Paulo, Brazil.

Material and Methods

Collection — The samples of water (200ml) were collected in sterilized bottles on July, 1975, from a beach named "José Menino", by Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico do Estado de São Paulo (CETESB), in front of Channel n° 1. The collecting technicist penetrated into the sea till the depth of one me-

* Mycology Section, Department of Microbiology and Immunology, Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, Edifício de Didática-Biomédicas II, Cidade Universitária, 05568 São Paulo, Brasil

ter and collected the sample 30cm down from the surface, approximately.

The water temperature in the chosen place was recorded as 20°C and the ambiental temperature as 16°C, and the samples presented pH = 8,0.

Technics of isolation and identification: The aliquot of 0,2ml of the original volume was disseminated on Petri's plate containing Sabouraud-Glycose Agar with chloranphenicol (100 μ g/ml) and maintained in incubator at 25°C for 15 days.

The identification of the colony was realized in Corn-meal Agar through the macroscopic and microscopic characteristics (Riddel's technique), by the thermal dimorphism of the culture in Agar Sabouraud-Glycose (S.A.) at 25°C and Brain-Heart Infusion Agar (B.H.I.) at 37°C, by the tests of virulence (inoculation of 0,1ml of suspension of the leveduriform variant in testicle of adult white rats), back culture of the infected organ, examination of sections of testicles stained by P.A.S. (Periodic Acid of Schiff).

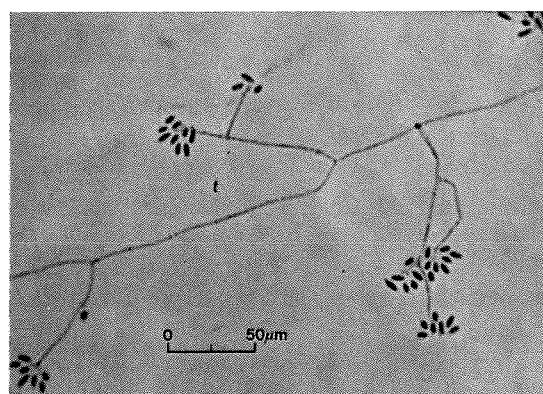
Results

The macroscopic characteristics were studied in the culture media described.

The colonies isolated were, at first, small and white, without visible aerial mycelial, becoming later humid, wrinkled, membranous and with a more evident aerial mycelia and with a dark hue next to black.

The culture on plate showed ramified hyphae, septated and thin, pyriform conidia, ovoid, distributed along of the hyphae, forming tipical peduncular or sessile arrangements with "daisy" shape (Fig. 1).

Figure 1 — *Sporothrix schenckii* in culture. Conidia distributed along of the hyphae, forming tipical arrangements with "daisy" shape



In BHI at 37°C cream coloured cerebriform colonies were developed, whose microscopic examination showed the yeast cells.

After 10 days of inoculation into research animals, a process of orchitis was verified (Fig. 2) and it was possible to back-isolate the fungi from the infected testicles, inoculating the material collected through in S.A. followed by the incubation at 25°C for 5 days.

Through the histopathological examination the fungus was observed as gemulate yeast cells "cigar-shaped".

Figure 2 — Experimental Sporotrichosis in white rat. Orchitis obtained after 10 days of inoculation, with a suspension of yeast like form



Discussion

For a through of the ecosystem of a certain microrganism it is necessary to know its habitat, the way of dissemination, the entry site, the host, etc. With regard to the *S. schenckii*, the aspects mentioned are well studied, and the steps of its biological cicle known in a general sense.

According to Meyer the rivers have to play an important role on the dissemination of the spores because he observed that the sporotrichosis showed more frequent occurrence along the Mississippi and Missouri rivers, the number of cases diminished gradually from the river-head till its mouth.

We must make it clear however, that it is necessary to make a careful distinction between the aphyte genus (*Sporotrichum*) and the pathogenic one (*Sporothrix*). Through the thermal dimorphism test, virulence, back-culture and of the histopathological examination of the material from the lesion, it was clear that the

characteristics of the sample were those of *Sporothrix schenckii*.

Other factors that have decisively influence on the growth of these fungi are the temperature and the ambiental humidity (5).

Through the isolation made directly from sea water, one more connecting link is added to the epidemiological chain of the sporotrichosis agent. This fact was already previsible because Dabrowa & col. (4), reported its isolation from sea-washed soil in south California.

Referências Bibliográficas

1. Belliboni, N. — Esporotricose: contribuição para o estudo epidemiológico, clínico, histopatológico e terapêutico. São Paulo, — Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, 1960. (Tese Livre-Docência).
2. Brown, R.; Weintraub, S. & Simpson, M.W. — Timber as a source of Sporotrichosis infection. In: — Sporotrichosis infection on mines of the Witwatersrand. Johannesburg, Transvaal Chamber of Mines, 1947.
3. Conant, N.F.; Smith, S.T.; Baker, R.G. & Callaway, J.L. — Micología. 3^a ed. México, Interamericana, 1971.
4. Dabrowa, N.; Landau, J.W.; Newcomer, V.D. & Plunkett, O.A. — A survey of tide washed coastal areas of Southern California for fungi potentially pathogenic to man. Mycopathol. et Mycol. Appl., 24:137-150, 1967.
5. Mackinnon, J.E. — Las condiciones metereológicas, causa determinante de la frecuencia de la esporotricosis. An. Inst. Hig. Montevideo, 2: 50-68, 1948.
6. Mackinnon, J.E.; Conti-Diaz, I.A.; Gezuele, E.; Civila, E. & Luz, S.D. — Isolation of *Sporotrichum schenckii* from nature and consideration on its pathogenicity and ecology. Sabouraudia, 7:38-45, 1969.
7. Madden, J.F. — Sporotrichosis in Minnesota. Minnesota Med., 30:845-855, 1947.
8. Magalhães, O. — Ensaios de micología. Contribuição ao conhecimento dos cogumelos patogênicos em Minas Gerais. Mem. Inst. O. Cruz., 42:41-55, 1955.
9. Pupo, J.A. — Sporotrichosis no Brasil. An. Paul. Med. Cir., 11:200-207, 1920.
10. Rippon, J.W. — Medical Mycology: the pathogenic fungi and the pathogenic actinomycetes. Philadelphia, W.B. Saunders, 1974.

There is thus a possibility of human infection in this place, being considered obviously, the predisponent factors of that mycosis.

Acknowledgements

The authors thank to Dr. Maria Terezinha Martins from the Companhia Estadual de Tecnologia e Saneamento Básico do Estado de São Paulo, for the valuable colaboration to the present work.

Polarité bactérienne observée dans différents milieux en voie de biodégradation

György M. Oláh*
 Louise Innes-Gaboury*
 Otto Reisinger**
 & Odette DesBiens*

Résumé

La position spatiale des bactéries dans différents milieux d'origine végétale en voie de décomposition est étudiée. Grâce aux microscopes électroniques à balayage et à transmission, l'effet de l'activité lytique microbienne est mis en évidence. La position verticale des bactéries par rapport au substrat semble être plus favorable à la perforation de la cellule-hôte. La prise de contact et l'adhésion des bactéries se réalisent par l'intermédiaire des fibrilles originaires de la structure pariétale de la bactérie et le mucilage entourant la cellule-hôte. L'existence d'une corrélation entre les fibrilles, leur emplacement et la position verticale des bactéries pénétrant est étudiée.

Resumo

Polaridade bacteriana em substratos em via de biodegradação

O posicionamento espacial de bactérias, sobre os diferentes meios de origem vegetal, que estão sofrendo decomposição, é facilmente demonstrável com a microscopia eletrônica de varredura e de transmissão. A posição vertical das bactérias, em relação aos substratos, parece favorecer a perfuração da célula hospedeira. O contato e adesão da bactéria são mediados por fibrilas originárias de estruturas parietais das bactérias e do material mucilaginoso que envolve a célula atacada. A existência de correlação entre as fibrilas, sua localização e o posicionamento espacial das bactérias em penetração é estudada.

Introduction

L'étude des processus de biodégradation et humification d'un microécosystème donné, réalisée à l'aide des microscopes électroniques, tout particulièrement par le microscope électronique à balayage permet de visualiser la position spatiale des organismes impliqués.

Notre attention fut attirée par une particularité spécifique: l'emplacement des bactéries par rapport aux cellules-hôtes de matériel végétal divers en voie de décomposition. Aussi bien sur la surface de racines de luzerne que sur du matériel fongique enfoui dans le sol ou étudié *in vivo*, on trouve des bactéries en bâtonnets et en spirilles placées à la verticale par rapport au substrat. L'adhérence de la bactérie et son point d'adhésion paraît jouer un rôle important

en première étape, suivie par la perforation de la cellule-hôte et la pénétration des bactéries dans la matière par l'ouverture créée par elles-mêmes.

Nombreux chercheurs se sont penchés sur l'étude du mécanisme de la pénétration microbienne dans le substrat (1), décrivent les caractéristiques des agents responsables de la perforation de chlamydospores de *Thielaviopsis basicola* (Berk. et Br.) Ferraris dans le sol humide non stérile et ils concluent que fréquemment ce sont les bactéries qui sont en cause. Reisinger & Kilbertus (17, 18), mettent en évidence les stades de décomposition de la matière végétale et discutent du rôle des microorganismes présents.

A l'aide de la microscopie électronique et des techniques cytochimiques ils démontrent

* Département de Phytologie, Laboratoire de Mycologie et de Microscopie électronique, Faculté des Sciences de L' Agriculture et de L'Alimentation, Université Laval, Québec, G1K 7P4, Canada.

** Université de Nancy-I, Laboratoire de Microbiologie, Centre de 2^e Cycle, Case officielle n° 104, 54037 Nancy-Cedex, France.

que les microorganismes sont capables de participer directement à la lyse d'un produit déterminé.

Old & Wong (15), étudient les processus de la perforation des conidies de *Cochliobolus sativus*, champignon du sol à paroi mélénisée. Marshall (11), suppose que l'attachement bactérien résulterait d'une attraction physico-chimique et d'une sécrétion de polymères. Il préconise en outre l'existence d'enzymes lytiques. On admet que les polysaccharides ou des substances de nature polysaccharidique présents dans le micro-écosystème sont en très grande partie d'origine microbienne et jouent en même temps un rôle certain dans l'adhésion des microorganismes et l'aggrégation du substrat (17, 18). Costerton & col. (2), croient que l'adhérence s'effectue en fonction de l'affinité chimique des polysaccharides bactériens pour ceux de la cellule-hôte. Ils admettent aussi que ce phénomène peut être fondamental dans la pathogénicité des bactéries.

Des observations récentes nous ont permis de constater la régularité de la position spatiale des bactéries indépendamment du substrat et la formation de trous dans ce dernier. La position verticale des bactéries par rapport à la surface du milieu démontre une activité polaire accrue, tandis que la position bactérienne horizontale laisse par contre prévoir une activité réduite.

Matériel et Méthodes

Matériel fongique: 1 — *Pyrenophaeta lycopersici* Schneider & Gerlach; 2 — *Pyrenophaeta terrestris* (Hans.) Gorenz, J.C. Walker & Larson; 3 — *Cookeina sulcipes* (Berk.) Kuntze; 4 — *Coprinus ephemerus* ss. Locq. ont été utilisés pour cette étude. L'échantillon 1 est originaire d'un dispositif expérimental (5, 6). Le second a été prélevé sur un bulbe d'oignon (*Allium cepa* L.) dans la zone de pourriture rose. Les échantillons 3 et 4 ont été récoltés au Brésil à Belém, Pará en 1978, préfixés au moment de la récolte et identifiés par Olah.

Matériel d'algue — 5 — *Enteromorpha salina* Kütz a été prélevée dans un cours d'eau salée et fixée au tétr oxyde d'osmium; 6 — *Tolypothrix* sp. échantillon provenant d'un milieu aquatique et fixé au tétr oxyde d'osmium.

Matériel végétal défini — 7 — Racines de luzerne, *Medicago sativa* L., amoindries par une mi-

croflore tellurique. Les plants sont cultivés en plein champ ou dans des bacs aux serres. Des fines racines d'un mm de diamètre sont prélevées, coupées en fragments d'un centimètre, stérilisées durant 1 1/2 minute dans une solution de bichlorure de mercure à 0,01% et placées ensuite dans un Erlenmeyer 250ml préalablement stérilisé, contenant 10ml d'eau bidistillée déminéralisée et stérilisée. On y incorpore, d'une façon aseptique, une quantité de mycélium 0,236 — 0,339g (matière sèche) soit de *Verticillium albo-atrum* Reinke et Berth (N° FSAA-376, Lab. de Mycologie), soit de *Trichoderma viride* Pers. ex Fries (N° FSAA-265, Lab. de Mycologie) ou les deux.

Les bactéries non éliminées par la brève stérilisation des racines croissent aux dépens du matériel fongique et des débris végétaux provenant des racines de luzerne.

Les prélèvements sont effectués dans des cultures agitées ou non à des intervalles variant de 12 à 55 jours (7).

Matériel végétal en voie de décomposition — Prélèvements effectués dans une forêt tropicale mixte, au niveau supérieur de la litière de la région immédiate de Belém Para, Brésil. Les échantillons ont été préfixés aussitôt.

Préparation des échantillons — Le mycélium du matériel fongique: *P. lycopersici* (agent pathogène des racines de tomate) fut entouré dans le sol d'une culture de tomate par la technique de piège (Reisinger et Kilbertus 1974; Mourey 1973) pour une période d'un mois. Le matériel est ensuite préparé selon les protocoles habituels pour l'observation par le microscope électronique à balayage (MEB) et par le microscope électronique à transmission (MET).

Les autres matériaux provenant du prélèvement direct, préfixés ou non, sont préparés pour l'observation en MEB et MET.

Protocole de préparation du matériel pour la microscopie électronique à transmission (MET) — Les échantillons ont été fixés durant 16 heures à 4°C par la glutaraldéhyde, 3% dans le tampon phosphate de Sörensen ajusté à pH 7,3. La postfixation est pratiquée à l'aide du tétr oxyde d'osmium 1%. Un gradient d'alcool éthylique assure la déshydratation suivie d'un passage dans l'oxyde de propylène. Après imprégnation dans un mélange de résine et d'oxyde de propylène, les spécimens ont été enrobés dans l'Epon 812 et les coupes minces obtenues sur un ultron

tome III de LKB. Une double coloration à l'acétylate d'uranyl et au citrate de plomb est ensuite effectuée pendant une période de 20 minutes. Des microscopes électroniques AEI 801 et Siemens Elmiskop 102 ont été utilisés pour les observations et la prise de clichés.

Protocole de préparation du matériel pour la microscopie électronique à balayage (MEB) (DesBiens, 1978) — Au moment de l'échantillonnage, le matériel biodégradable est préfixé et conservé dans l'alcool éthylique à 65%. Des prélèvements de cinq à huit millimètres carrés d'une épaisseur de deux à cinq millimètres sont fixés par immersion dans une solution de glutaraldéhyde, tel que pratiqué pour la MET. Les spécimens sont déshydratés dans des gradients croissants d'alcool éthylique et séchés au point critique (SPC). Le gaz utilisé est le CO₂. [Les étapes de séchage sont: les suivantes: — remplacement du liquide intermédiaire par le gaz CO₂; — remplissage de la chambre avec du CO₂; — chauffage de la chambre au-dessus de la température critique, où le liquide se transforme en gaz; — échappement isothermique du gaz] (à cette fin un appareil *Critical Point Dryer Ladd* a été utilisé).

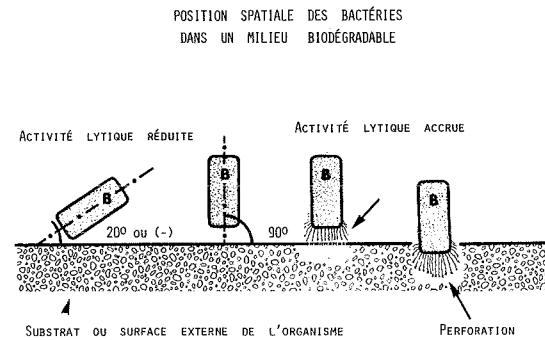
Métaillisation — les spécimens préalablement séchés sont ensuite montés sur des porte-objets et vaporisés d'une pellicule d'or d'épaisseur variant de 20 à 30nm, à l'aide d'un appareil Nanotech, muni d'une cible d'or. [La vaporisation est faite sous vide à 1 200V, à 20mA et le vide est régularisé par l'entrée d'un gaz (Argon) à l'intérieur de la cloche.]

Les observations sont réalisées au microscope électronique à balayage Cambridge S-150, sous une tension d'accélération de 15 à 20KV. La prise de clichés est effectuée sur films NB, Kodak Panatomic-X, 32 ASA.

Résultats et Discussion

Une position spatiale spécifique des bactéries (bâtonnets et spirilles) a été observée dans le cas de la biodégradation des substrats végétaux de localisation géographique et de nature différentes. La surface des cellules externes des substrats mise en contact avec la flore tellurique d'un microécosystème est assitôt colonisée par de nombreuses bactéries; des bâtonnets et des bactéries hélicoïdales sont souvent dominants par rapport aux autres formes bactérien-

Tableau 1 — La lyse microbienne peut être réduite ou accrue en fonction de la position spatiale des bactéries par rapport au substrat



nes. La grande majorité de ces bactéries n'est en contact avec le milieu que par une extrémité, c'est-à-dire que l'axe longitudinal des bâtonnets forme un angle droit avec le substrat. L'étude des échantillons d'origines très diverses corrobore cette observation: la surface externe de la racine de luzerne (Fig. 1, 2 et 5); bactéries se développant sur du matériel fongique isolé d'un bulbe d'oignon (Fig. 3 et 4); l'ascospore *Cookeina sulcipes* (Fig. 8, 9 et 10); ou encore des bactéries sur la surface sporale d'un coprin tropical (Fig. 11 et 12).

Des études spécifiques réalisées au microscope électronique à balayage ont permis de constater qu'il s'agit beaucoup plus d'une position préférentielle que d'un simple hasard de circonstance. D'autre part, ce sont les bactéries *debout* qui se trouvent associées à un début de perforation du substrat. Les travaux de Old & Wong (15), font état de la possibilité de la perforation et la lyse des spores fongiques dans le sol. Dans le processus de la biodégradation naturelle, Olah & col. (16), présentent des observations concernant la position spatiale des bactéries. En ce qui a trait à l'activité lytique des bactéries, les opinions des auteurs concordent: — les lysées enzymatiques produites par des bactéries sont nombreuses; — agissent avec une efficacité variable sur le substrat; — il en résulte dans la plupart des cas une perforation dans les cellules externes protectrices du substrat.

Bien que l'origine de la perforation peut être de nature différente tel que: l'autolyse préconisée par Lloyd et Lockwood (9), les blessures mécaniques ou les piqûres d'insectes rapportée par Reisinger & Kilbertus (17), c'est la lyse microbienne qui paraît être la plus importante (14). La survie des bactéries dépend de leur agressivité vis-à-vis leur milieu. La prise de contact

avec le substrat qui, en l'occurrence leur fournira les substances nutritives, est donc primordiale à leur existence. L'envahissement d'une matière vivante ou morte en voie de décomposition est importante. S'il n'existe pas d'ouverture naturelle ou accidentelle, la bactérie est appelée à procéder par ses propres moyens pour en créer une. Dans le cas des divers échantillons étudiés, le mécanisme régissant la création de l'ouverture dans le substrat paraît homogène. Les bactéries en forme de bâtonnet ou d'une spirale, (spirilles), en contact avec le substrat épousent une position verticale (Fig. 1, 2, 3 et 9). Aussitôt que le point d'adhésion est engendré on observe une légère dépression (Fig. 3, 4 et 5) dans la proximité de celui-ci. Certaines matières d'origine végétale sont plus facilement pénétrables que d'autres. La structure pariétale des spores de Basidiomycètes-mélanosporés ou d'Ascomycètes en sont des exemples (Fig. 9, 10 et 13). Dans le cas de résistance particulière, les bactéries optent pour la réalisation d'une ouverture dans une zone de faiblesse, tel que le pore germinatif, ou son emplacement comme chez le coprin (Fig. 13) ou encore la zone équatoriale d'une ascospore (Fig. 10), est attaquée par des bactéries. Dans ce dernier cas, il n'est pas rare d'observer le détachement complet du tégument externe de la paroi, comme s'il s'agissait d'une coquille d'oeuf. Une fois la perforation de la structure réalisée, l'activité enzymatique lysante n'est pas arrêtée. Les ouvertures initiales créées par les bactéries atteignent à peine la largeur de ces dernières, mais très tôt, ces trous s'élargissent, les bactéries s'y multiplient et y passent aisément (Fig. 6 et 7). Il est à remarquer que le diamètre des ouvertures engendrées par les bactéries est sensiblement identique et limité à une grandeur quasi égale, or l'origine et la nature des échantillons sont différentes. Dans des matières où la biodégradation est avancée, on peut observer une faible zone de lyse autour des microorganismes qui sont couchés sur le substrat (Fig. 12). Le mécanisme de la pénétration microbienne dans des substrats déterminés fut également suivi en microscopie électronique à transmission (MET). Les bactéries *non pénétrantes* à proximité de la paroi sont situées parallèlement à cette dernière (Fig. 16). Par contre, quand la position spatiale de la bactérie est entre 20° — 90° par rapport à la paroi de la cellule-hôte (Fig. 17), l'activité lytique est grande et la perforation est engendrée. La structure pariétale de l'hôte dans cette zone devient désor-

ganisée et la lyse assure la formation des ouvertures. La progression de la zone lysée dans le substrat est rapide (Fig. 18). Le diamètre de la perforation augmente et par cette ouverture les bactéries trouvent accès au niveau inférieur du milieu (Fig. 15). Un agrandissement plus important d'une bactérie isolée de matériel fongique en voie de biodégradation démontre une polarité remarquable. Un réseau de fibres orientées et structurées à l'extrémité du bâtonnet tandis que, dans la partie latérale de la bactérie, cette structure perd de l'importance (Fig. 14). Ces fibres bactériennes sont de nature polysaccharidique (6, 19) et jouent un rôle important dans l'adhésion de la bactérie sur une surface donnée.

La position verticale des bactéries fut également observée dans des cultures bactériennes sur milieu synthétique (culture sur gelose agar) (7). L'adhérence entre la bactérie et son milieu jouerait même dans ces conditions un rôle très important.

ABREVIATIONS

| | |
|------|--|
| b | Bactéries |
| Ba | Baside |
| Sp | Spirille |
| my | Mycélium |
| S | Substrat |
| pa | Point d'adhésion |
| P | Perforation |
| As | Ascospore |
| bs | Basidiospore |
| sh | Surface hyméniale |
| ze | Zone équatoriale |
| zl | Zone de lyse |
| Mn | Matériel nucléaire |
| pf | Paroi fongique |
| pb | Paroi bactérienne |
| Pal | Paroi d'algue |
| MEB | Microscope électronique à balayage |
| MET | Microscope électronique à transmission |
| Tech | Technique |
| SPC | Point critique de séchage |

Conclusions

L'ensemble des observations réalisées au MEB et au MET consacrées à l'étude de la position spatiale des bactéries sur des matières végétales d'origines diverses, démontre l'importance toute particulière de ce phénomène.

Un prolongement de la structure pariétale bactérienne de nature polysaccharidique, sous forme de microfibrilles est mis en évidence. L'organisation de ces dernières est bien structurée dans la partie polaire des bactéries. A cet-

Figure 1 — Distribution des bactéries sur la surface mycélienne et sur les débris végétaux de racines de luzerne en voie de décomposition. Les bactéries y sont situées pour la plupart dans une position verticale (matériel végétal n° 7)
Observations: MEB, tech, SPC, X5 000

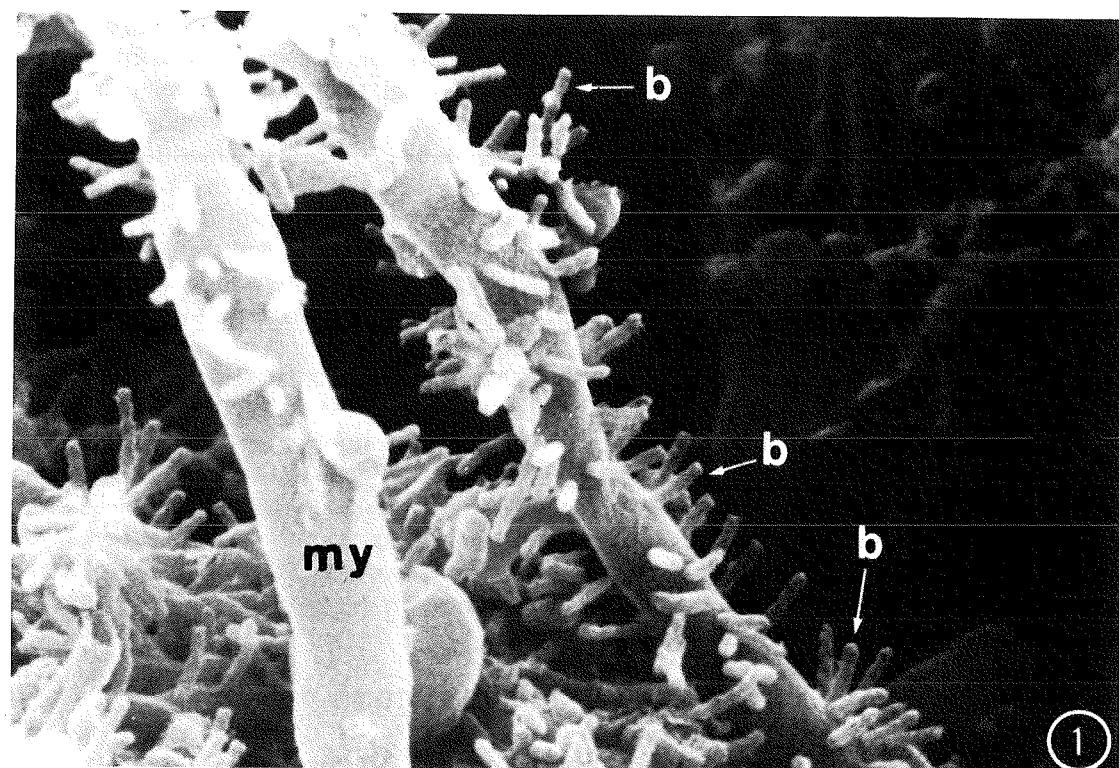


Figure 2 — La surface externe du substrat en occurrence la racine de luzerne est envahie par une population bactérienne importante (bâtonnets, spirilles). Le point d'adhésion des bactéries est polaire (matériel végétal n° 7)
Observations: MEB, tech, SPC, X10 000

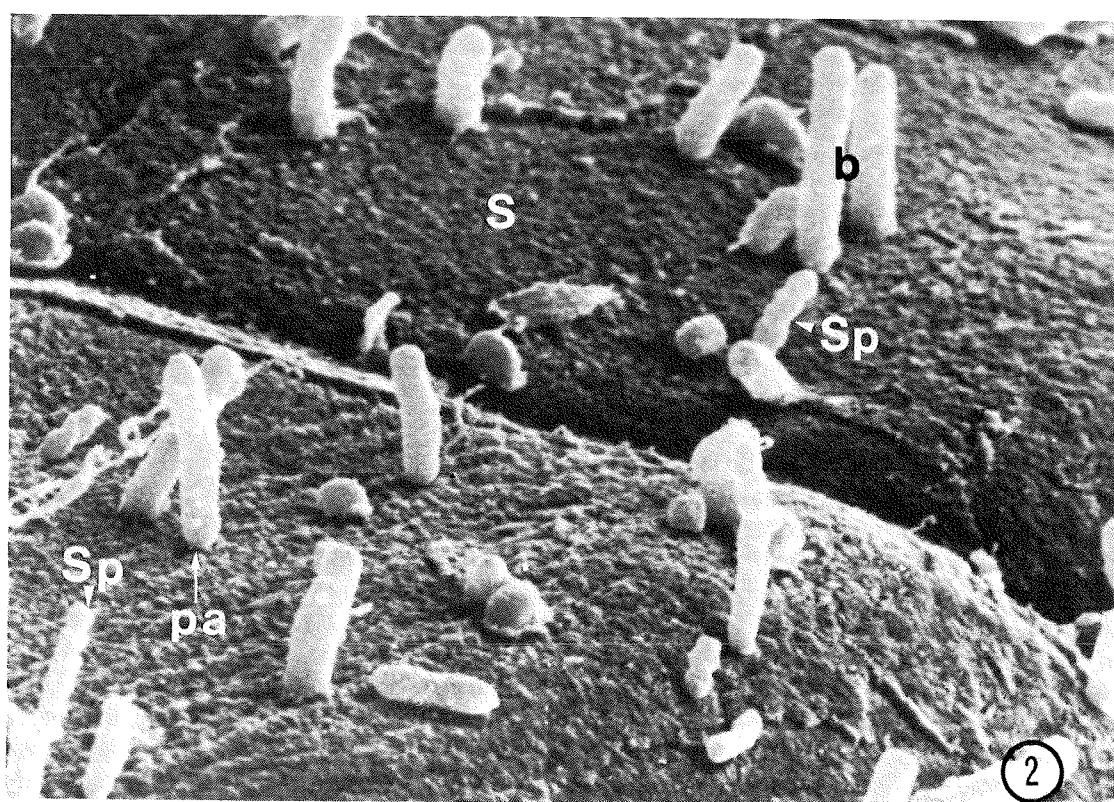


Figure 3 — Mycélium isolé d'un bulbe d'oignon (tache rose, *Pyrenophaeta terrestris* (Hans) Gorenz, J.C. Walker et Larson) démontre la position verticale des bactéries
Observations: MEB, tech, SPC, X10 000

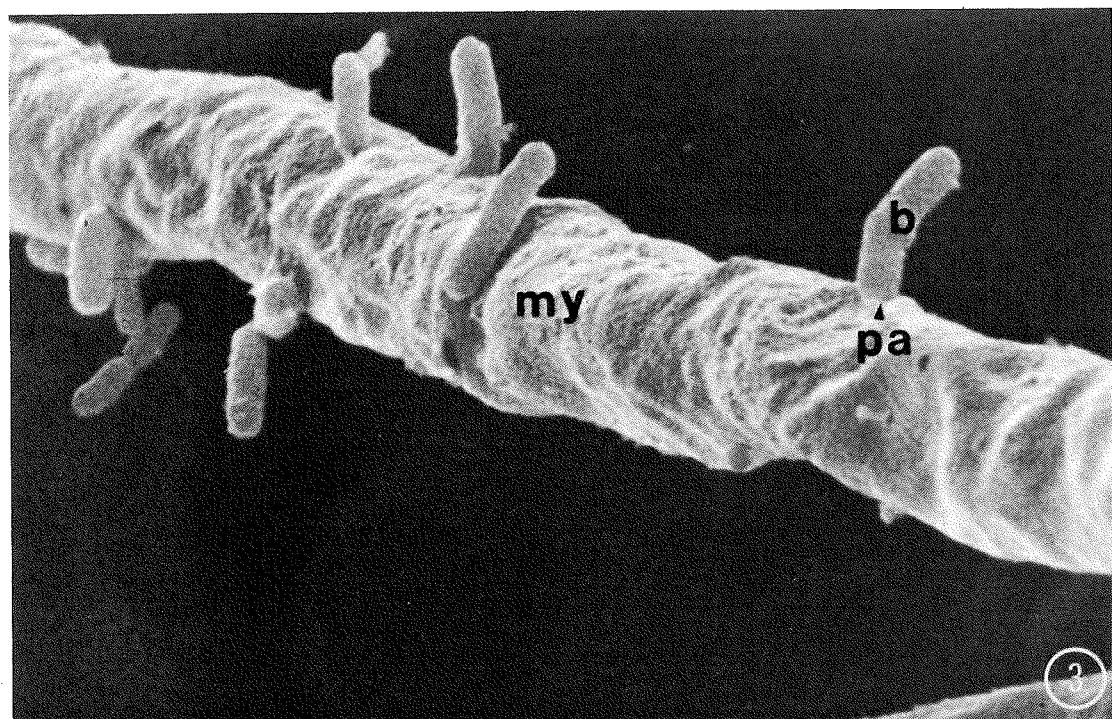


Figure 4 — Un plus fort agrandissement du même matériel que la figure 3 précise davantage l'angle droit de l'axe longitudinal de la bactérie par rapport au substrat (mycélium) et une zone annulaire au point d'adhésion.
Observations: MEB, tech, SPC, X20 000

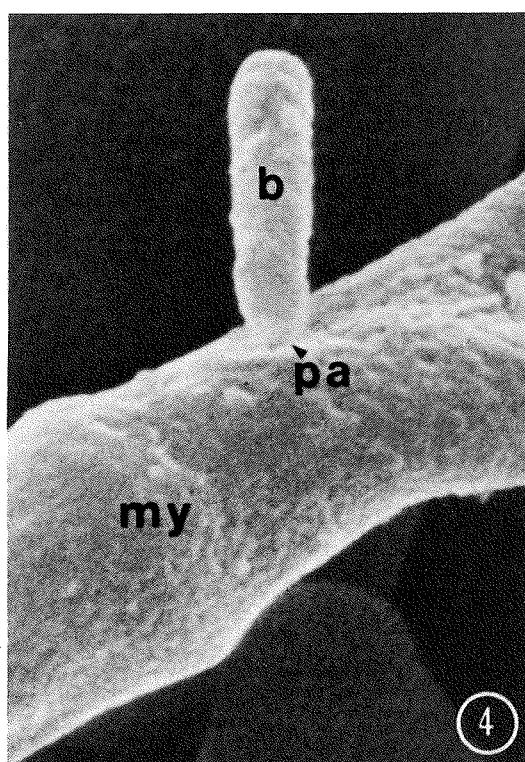


Figure 5 — Sur des substrats de nature et d'origine différentes des bactéries de morphologie variable (B) et (Sp) démontrent la même position spatiale (matériel végétal n° 7)
Observations: MEB, tech, SPC, X20 000

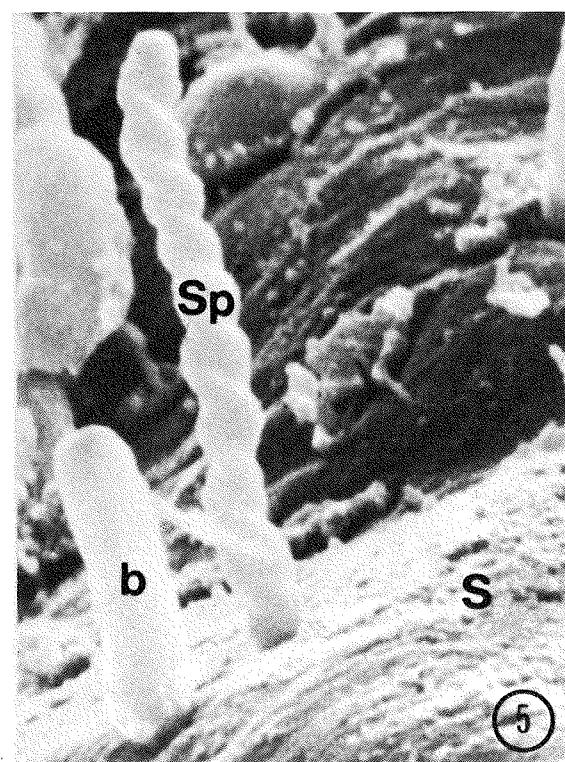


Figure 6 — Les perforations initialement engendrées sous l'effet d'activités enzymatiques bactériennes s'élargissent de plus en plus, créant ainsi l'accès aux autres bactéries. Il n'est pas rare d'observer la multiplication de ces organismes en ces lieux. Racine de luzerne en voie de dégradation (matériel végétal n° 7)
Observations: MEB, tech, SPC, X10 000

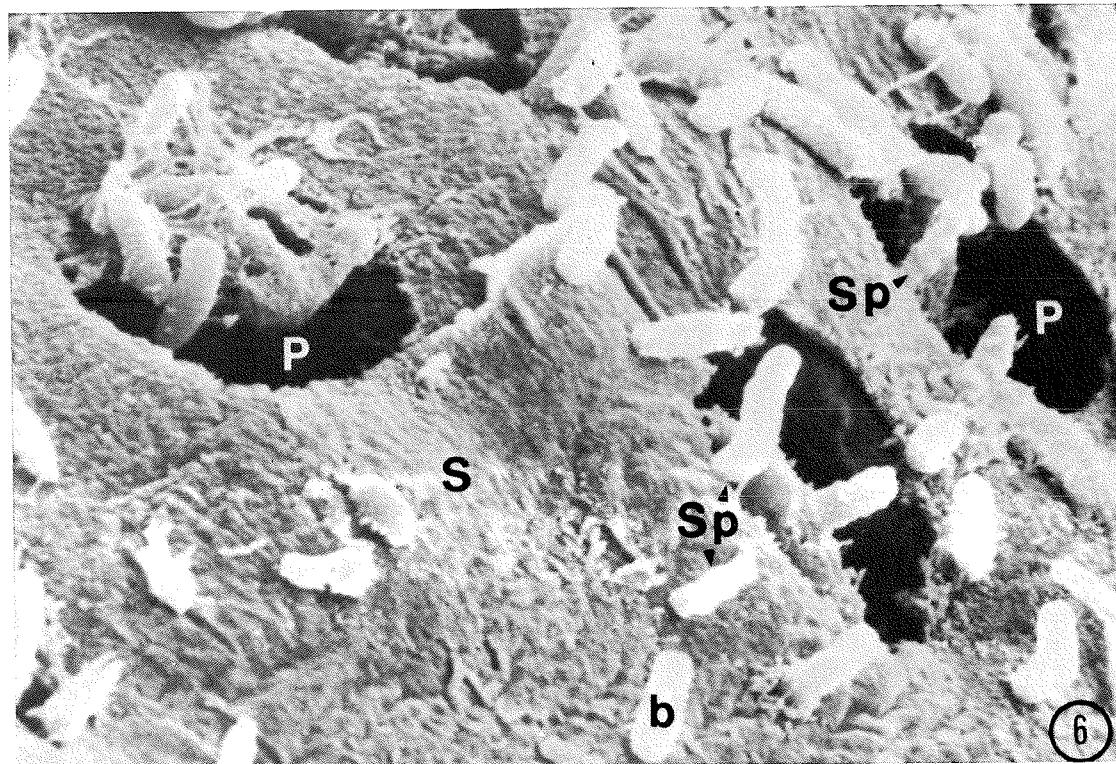


Figure 7 — Des phénomènes similaires sont rapportés dans le cas de l'échantillon récolté dans la forêt tropicale près de Belém. Biodégradation de la matière végétale niveau 1.
Observations: MEB, tech, préfixation à l'alcool 65%, SPC, X5 000

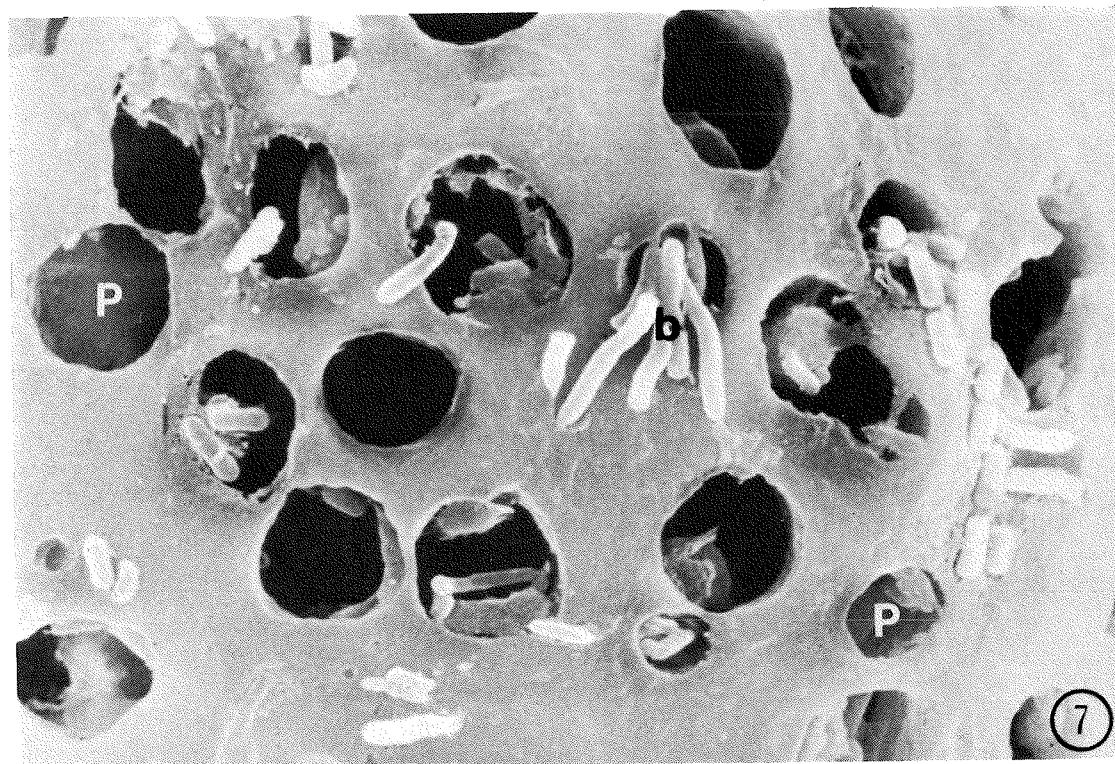
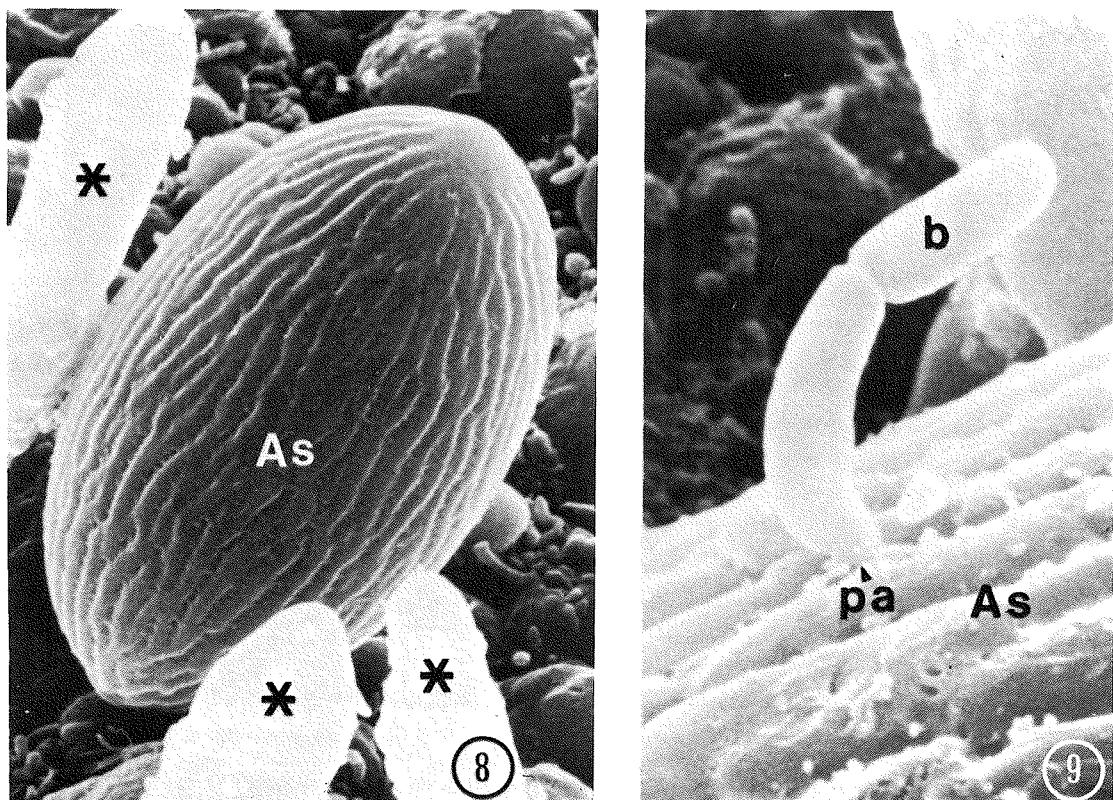


Figure 8 — Ascospore (As) et paraphyses (*) de *Cookeina sulcipes* (Berk.) Kuntze, avant la biodégradation.
Observations: MEB, tech, SPC, X2 000



Figures 9 et 10 — Les spores du même champignon sont envahies par une population bactérienne qui se situe dans la zone équatoriale de l'ascospore.

Observations: MEB, tech, SPC

Figure 9: X10 000

Figure 10: X3 000

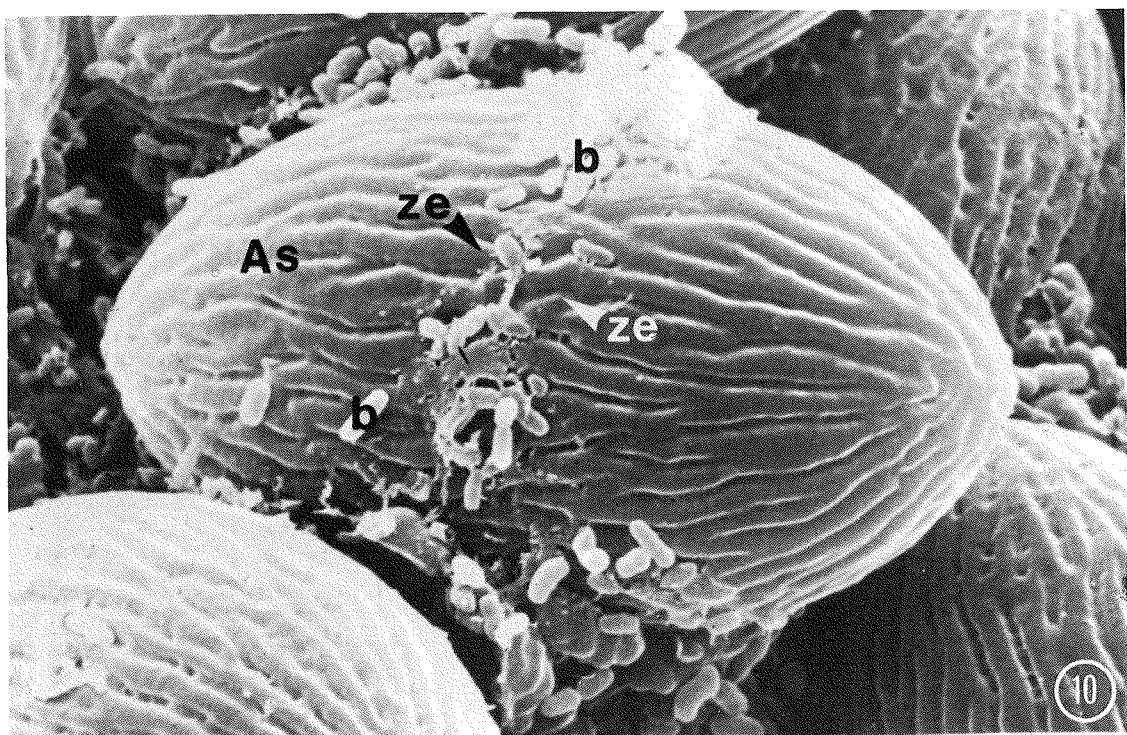


Figure 11 — La surface hyméniale de *Coprinus ephemerus* ss Locq. est couverte de basides et basidiospores. Ces dernières, à cause de leur paroi mélânisée, sont difficilement biodégradables.
Observations: MEB, tech, préfixation à l'alcool 65%, SPC, X1 000

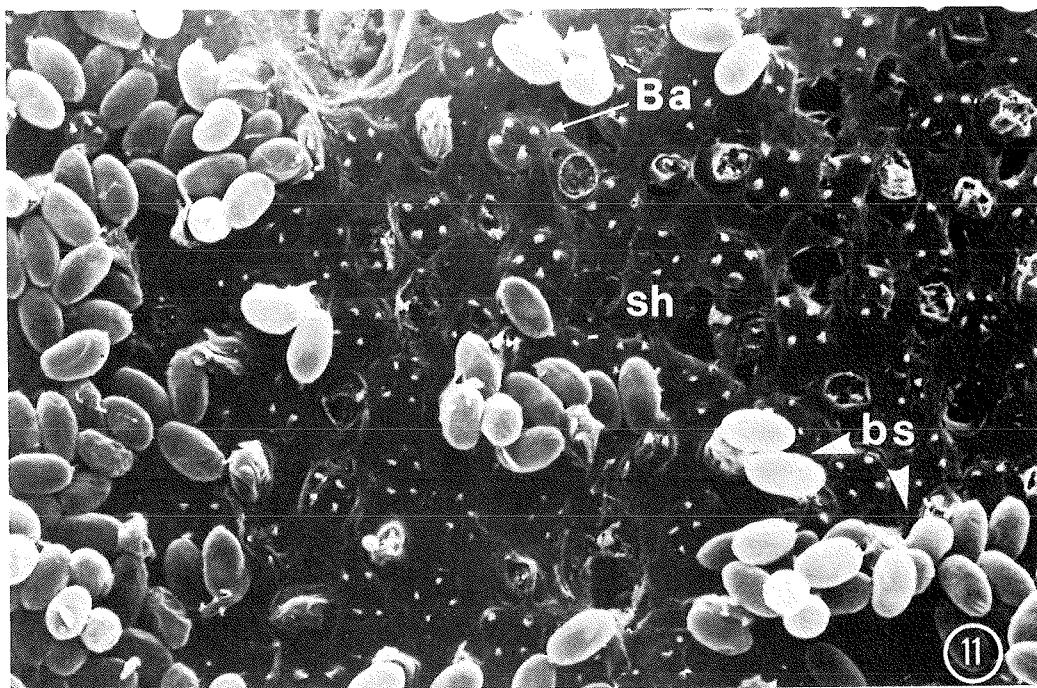


Figure 12 — Les résidus d'origine végétale accumulés à la surface du sol (niveau 1) sont aussitôt pris en charge par la microflore et la chaîne trophique. La biodégradation débute.
Observations: MEB, tech, préfixation à l'alcool 65%, SPC, X5 000

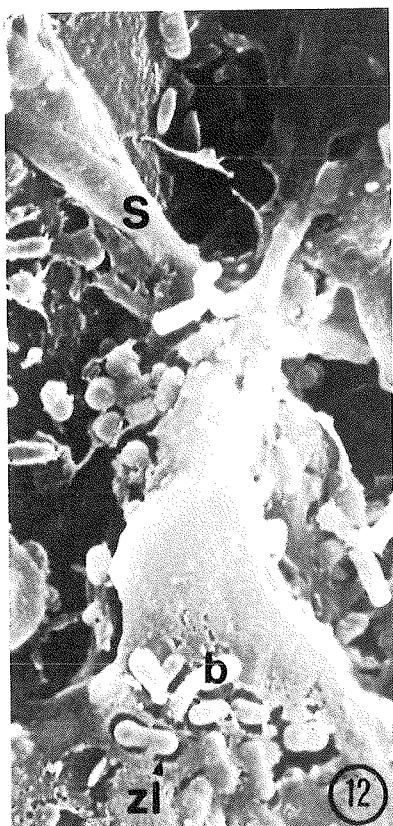


Figure 13 — Une bactérie démontrant une position spatiale caractéristique est située sur une zone de faiblesses pariétale d'une spore de *Coprinus ephemerus* ss. Locq. (emplacement du pore germinatif). Observations: MEB, tech, préfixation à l'alcool 65%, SPC, X10 000

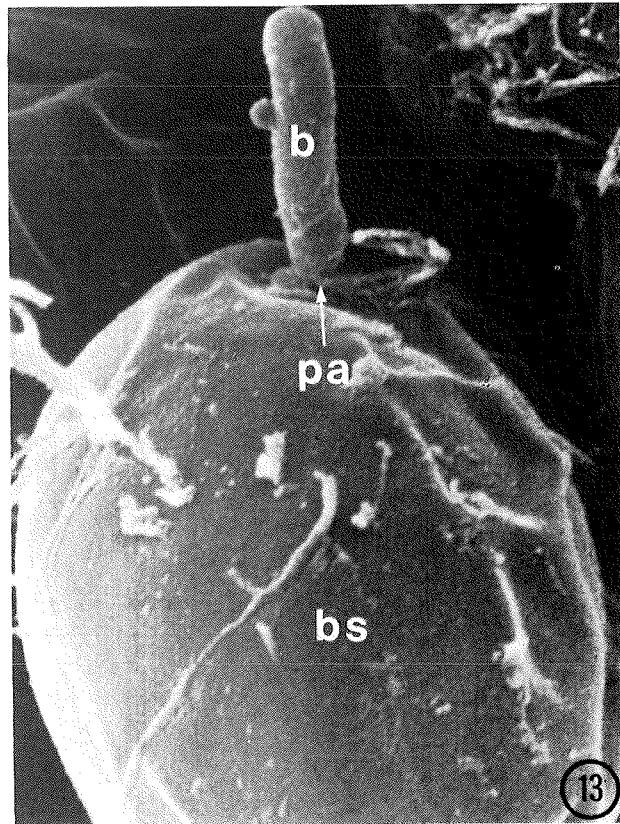


Figure 14 — Formation de l'endospore bactérienne. Bactérie isolée du matériel fongique *Pyrenophaeta lycopersici* Schneider et Gerlach après une période d'incubation d'un mois. Un réseau de fibres bien orientées se trouve à l'extrémité du bâtonnet (voir flèches) tandis que sur la partie latérale, cette structure paraît moins bien organisée. Observation MET, fixation tétr oxyde d'osmium, contraste au citrate de plomb, X40 000

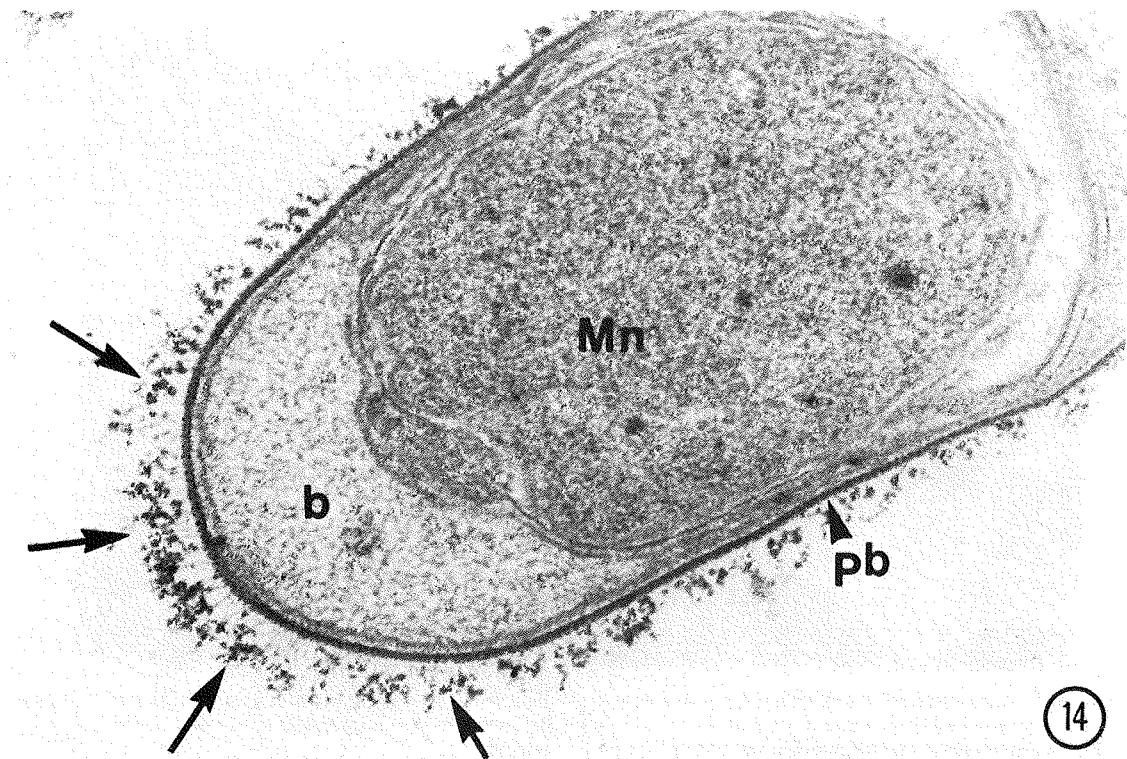


Figure 15 — Dans la paroi du matériel fongique *P. lycopersici*, la bactérie a créé une ouverture à la suite d'une lyse microbienne (vue de la bactérie en coup transversal).
Observations: MET, fixation tétr oxyde d'osmium, contraste au citrate de plumb, X40 000

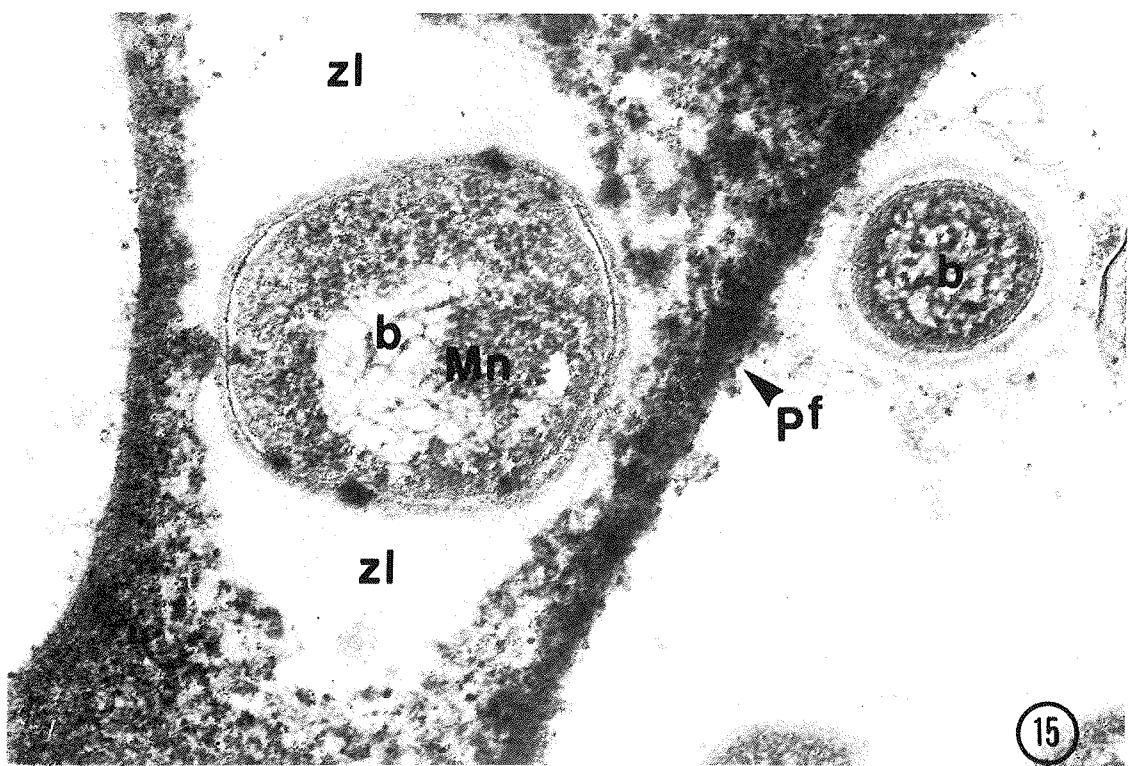


Figure 16 — Dans la zone externe de la paroi de l'algue *Enteromorpha salina* Kütz., on observe la présence de bactéries. L'axe longitudinal du bâtonnet est parallèle à la structure pariétale de l'algue

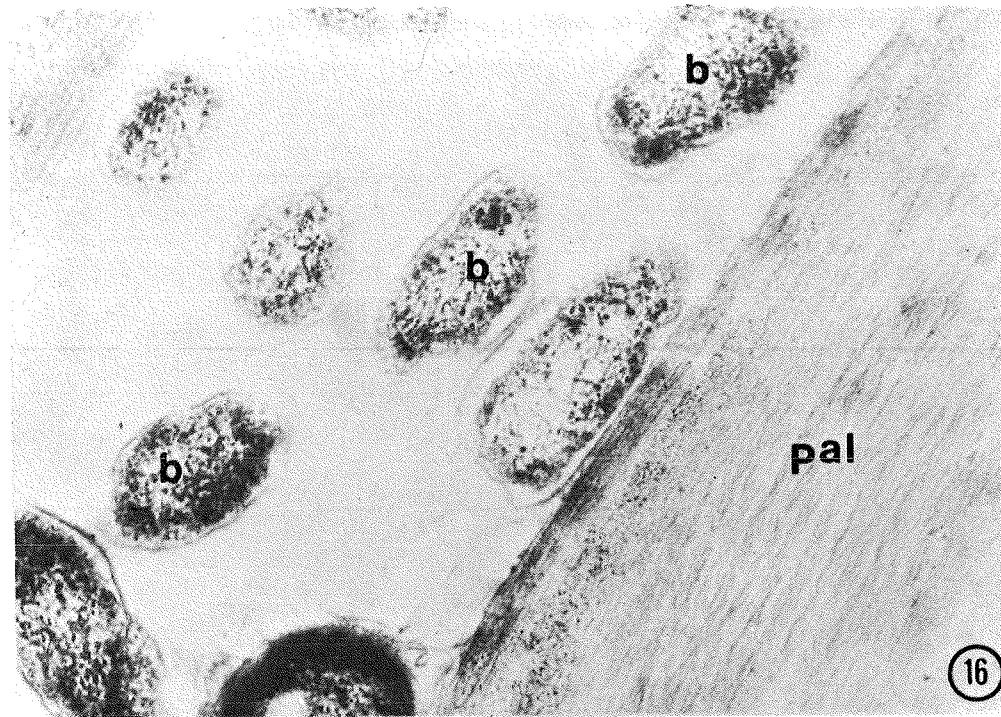


Figure 17 — Chez l'algue *Tolyphothrix sp.* la position spatiale de la bactérie est à 90° par rapport à la paroi et dans la zone de point d'adhésion, le relâchement de la structure pariétale des deux organismes est visible.
Observations: MET, fixation tétr oxyde d'osmium, contraste au citrate de plomb, X35 000

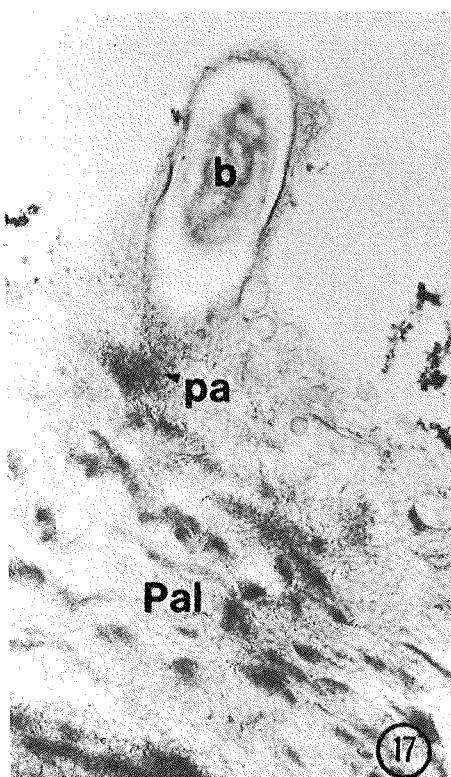
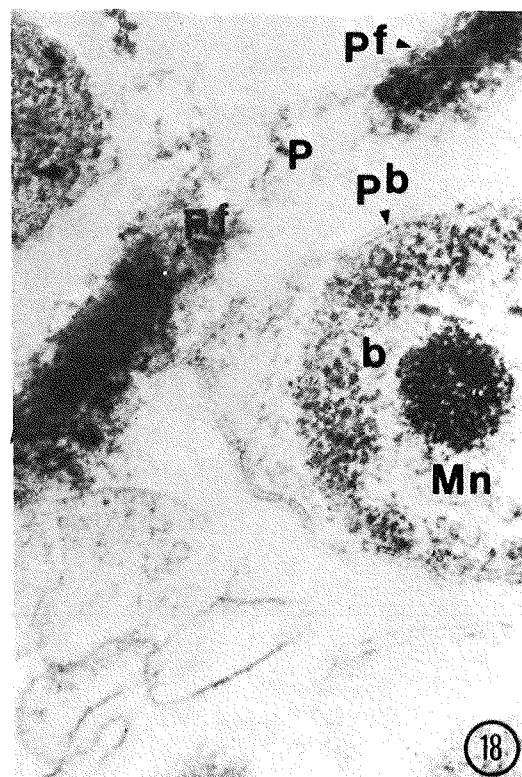


Figure 18 — La structure de la paroi fongique *P. lycopersici* est perforée et désorganisée sous l'effet de la lyse microbienne.
Observations: MET, fixation tétr oxyde d'osmium, contraste au citrate de plomb, X40 000



te particularité s'ajoute en même temps la position verticale de la bactérie et l'activité de la lyse microbienne aboutissant à la perforation du substrat. Les résultats obtenus démontrent que la position verticale des bactéries n'est pas due au hasard, mais bien au contraire il s'agirait d'une concentration de l'activité lytique dans la partie polaire près du substrat. Dans un milieu de biodégradation donné, un nombre élevé des bactéries présentes se placent dans cette position. Ce phénomène existe également, mais beaucoup moins prononcé sur des milieux synthétiques et dans des mono-cultures bactériennes (travaux en cours Innes-Gaboury (7). Une fois la perforation de la cellule-hôte complétée durant une certaine période, l'activité lytique continue et l'ouverture engendrée s'agrandit encore. Les modèles de biodégradation expérimentale et contrôlée, en opposition avec des échantillons récoltés directement dans la nature nous ont permis de mettre en évidence que ce

phénomène paraît être général dans la biodégradation de la matière végétale.

Etant donné que la vitesse de décomposition d'une matière est très intimement liée au nombre de bactéries et à la virulence avec laquelle elles peuvent pénétrer la cellule-hôte, la connaissance de ce mécanisme et son contrôle, peuvent jouer dans l'avenir un rôle-clef dans l'accélération du processus de la biodégradation dirigée et contrôlée. Dans le domaine de l'agriculture moderne, ces notions peuvent favoriser le développement des moyens de lutte contre les agents pathogènes situés dans le sol. Les constituants polysaccharidiques de la zone polaire bactérienne et l'étendue de leur pouvoir lytique sont encore des points à élucider. Il faudrait favoriser la formation de sites récepteurs pour faciliter et accélérer la lyse. La spécificité de certaines bactéries vis-à-vis une matière pourrait jouer un rôle sélectif dans un micro-écosystème.

References Bibliographiques

1. Clough, K.S. & Patrick, Z.A. — Characteristics of the perforating agent of chlamydospores of *Thielaviopsis basicola* (Berk. & Br.) Ferraris. Soil Biol. Biochem., 8:473-478, 1976.
2. Costerton, J.W.; Geesey, G.G. & Cheng, K.J. — How bacteria stich. Sci. Am., 5:86-96, 1978.
3. DesBiens, O. — Processus de transformation et visualisations des chaînes trophiques dans le substrat de culture du champignon de couche. Université de Nancy, Mémoire Dip. Etude Sup., 1, 1978.
4. Dommergues, Y. & Mangenot, F. — Ecologie microbienne du sol. Paris, Masson, 1970.
5. Fargues, J.; Kilbertus, G.; Reisinger, O. & Olah, G.M. — Chitinolytic activity in soils. Soil biology and conservation of the Biosphere. Akadémiai Kiado Budapest Publishing House of the Hungarian Academy of Sciences, 1977.
6. Harranger, M.F.; Olah, G.M. & Reisinger, O. — Biodégradation du mycélium de *Pyrenophaeta lycopersici* Schneider et Gerlach dans le sol. Etude ultrastructurale. Zbl. Bakt. Abt., 132:423-433, 1977.
7. Innes-Gaboury, L. — Biodégradation des racines de luzernes *Medicago sativa* L. Canada, Université Laval, 1979. (Thèse de M. ès Sc. en préparation).
8. Kühner, R. & Romagnesi, H. — Flore analytique des champignons supérieurs. Paris, Masson, 1953.
9. Lloyd, A.B. & Lockwood, J.L. — Lysis of fungal hyphae in soil and its possible relation to autolysis. Phytopathology, 56:595-602, 1966.
10. Lockwood, J.L. — The fungal environment of soil bacteria. In: — Gray, T.R.G. & Parkinson, D., eds. — Ecology of soil bacteria. Liverpool University Press, 1968.
11. Marshall, K.C. — Mechanism of adhesion of marine bacteria to surfaces. 3rd. Int. Cong. Marine Corrosion and Fouling: Proceedings. Gaithersburg MD, 1972.
12. Mourey, A. — Etude de la lipolyse dans quelques sols forestiers et caractères d'une préparation enzymatique d'origine bactérienne. France, Université de Nancy, 1973. (Thèse de doctorat de spécialité en biologie végétale).
13. Old, K.M. — Effects of natural soil on survival of *Cochliobolus sativus*. Trans. Br. mycol. Soc., 50:615-624, 1967.
14. Old, K.M. — Perforation of conidia of *Cochliobolus sativus* by natural soil. Trans. Br. mycol. Soc., 53:207-216, 1969.
15. Old, K.M. & Wong, J.N.F. — Perforation and lysis of fungal spores in nature soil. Soil Biol. Biochem., 8:285-292, 1976.
16. Oláh, G.M.; Reisinger, O. & Kilbertus, G. — Biodégradations et humification: atlas structural. Canada, Université Laval Press, 1978.
17. Reisinger, O. & Kilbertus, G. — Biodégradation et humification. I — Biologie de la production de granules noirs par *Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. Bull. Acad. Soc. Lorr. Sci., 11:265-275, 1972.
18. Reisinger, O. & Kilbertus, G. — Biodégradation et humification. IV — Microorganismes intervenant dans la décomposition des cellules d'*Aureobasidium pullulans* (De Bary) Arnaud. Can. J. Microbiol., 20:299-306, 1974.
19. Reisinger, O.; Kiffer, E.; Mangenot, F. & Olah, G.M. — Ultrastructure, cytochimie et microdissection de la paroi des hyphes et des propagules exogènes des ascomycètes et basidiomycètes. Rev. Micol., 41:91-117, 1977.
20. Seaver, F.J. — The north american cup-fungi. New York, Hefner Publ. Com., 1928.

