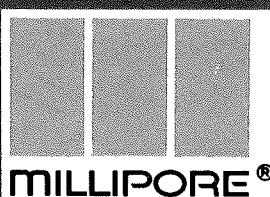


Volume 10 Número 4 Out.-Dez. 1979

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo - Brasil

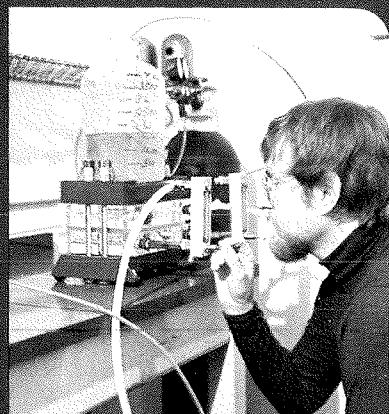
ESTAMOS PRECISOS PARA MAIS
QUE NÃO PODEMOS



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

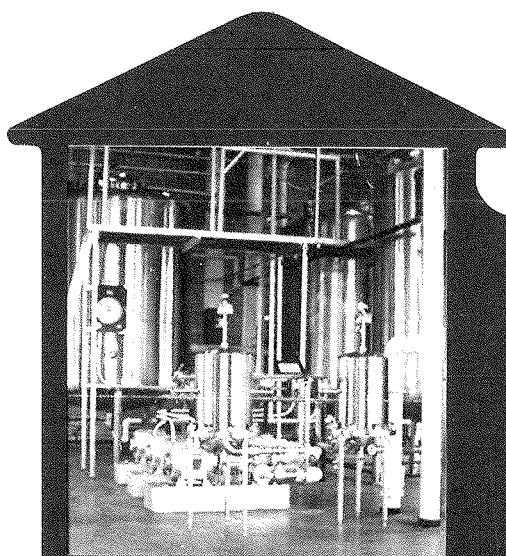
NÓS TEMOS A SOLUÇÃO,
APLICANDO NOSSA TECNOLOGIA,
ATRAVÉS DE TÉCNICOS DE NÍVEL
SUPERIOR, ESPECIALMENTE
TREINADOS.



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 contraste 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

Outubro-Dezembro 1979

Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 10 (4)

CONTEÚDO

CONTENTS

Tom Booth	123	<i>Estratégia para o estudo de fungos em ecossistemas marinhos e sob influência marinha</i>	<i>Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems</i>
Reynaldo S. Furlanetto Helio Emerson Belluomini Hideyo Iizuka & Raymundo Rolim Rosa	139	<i>Epizootia provocada por um bacilo difteróide em serpentes mantidas em biotério</i>	<i>Etiology and prophylaxis of a new epizooty in snakes maintained in captivity</i>
Carlos Gil Turnes João Carlos M.A. Pereira & Clóvis Moreira	144	<i>Avaliação imunogênica de vacina contra a influenza equína</i>	<i>Immunogenic evaluation of Influenza vaccine</i>
Cesar Wilson M. da Rocha & José Noronha Peres	148	<i>Remoção do vírus rábico fixo da corrente sanguínea de camundongos normais</i>	<i>Clearence of fixed rabies virus (CVS strain) from the blood of normal mice</i>
Dejanira de F. de Angelis Maria C.F.L. de Oliveira & Maria Eunice M. Furletti	153	<i>Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero Candida</i>	<i>Total carbohydrate and trehalose in ten yeasts species of Candida</i>
Kailash C. Srivastava & David G. Smith	157	<i>Isolamento e composição química de cápsulas extracelulares de leveduras</i>	<i>Isolation and chemical composition of yeast extracellular capsule</i>

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.

Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems

Tom Booth*

Summary

Current knowledge of marine fungi in Brazilian and South American waters is provided. Proposed areas of research, some of which are explored in this study are also extracted from literature. Detailed methods and materials are given so as to provide a clear starting point for future research on marine fungi in Brasil. The use of extensive washing of marine substrates is utilized for the first time in studies of the environments. Among the fungal groups described are: lignicolous fungi totalling 50; folicolous fungi, 21; rhizosphere fungi, 10; algicolous fungi, 17; chytrids and thraustochytrids, 18; and nematode trapping fungi, 2. Various ecological considerations of substrates, habitats and individual fungal species are undertaken.

Resumo

Estratégia para o estudo de fungos em ecossistemas marinhos e sob influência marinha

Situação do conhecimento sobre fungos marinhos no Brasil e América do Sul, com proposta de áreas para pesquisa, indicação de métodos e materiais que possam ser utilizados como ponto de partida para a pesquisa do grupo, no Brasil. Descrição de: 50 fungos lignicolos, 21 foliares, 10 da rizosfera, 17 algicolos, 18 quitridíaceos e traustoquitridíaceos e 2 captores de nematóides. As considerações ecológicas envolvem substratos, habitats e espécies fúngicas.

Introduction

Since the publication of "Fungi in Oceans and Estuaries" (35) there has been considerable activity in marine mycology. Hughes (31) reviews work done since appearance of the above pioneering treatise and he suggests that areas remaining fragmentary are: (a) environmental and substrate ecology, and (b) biogeography of fungi in tideless brackish tropical and southern hemisphere waters. Jones (41) amplifies these areas by proposing research in; (a) higher fungi in marine sediments; (b) predacious fungi in marine ecosystems; (c) enumeration of fungi in marine habitats; (d) fungal diseases of marine fishes and shell fishes; (e) production of fungal protein on hydrocarbons and waste products; (f) search for secondary meta-

bolites, and (g) aspects of spore liberation, settlement and germination. Another research topic is implied in one currently popular definition of marine fungi: those ... "capable of producing successive generations by sexual and asexual means in natural oceanic waters and oceans diluted by freshwater or on intertidal substrates" (39). This definition, derived from several pre-existing statements (45, 51, 54), implies that these fungi exist as 'active mycelia' (27) in the marine environment. Perhaps application of techniques which not only demonstrate sporulating structures but also active hyphae in substrates of the marine environment will clarify our understanding of marine fungi and their role in the ecosystem.

Several topics mentioned above represent in part aims of this study: (a) studies of substrate

* Visiting Research Professor, Instituto de Botânica, São Paulo, Brasil and Associate Professor of Biology, University of Manitoba, Winnipeg, Canada R3T 2N2.

ecology including those fungi active in leaves, wood and higher plant roots; (b) studies of predacious fungi, and (c) biogeography of fungi in subtropical southern hemisphere marine influenced waters and soils. Before continuing development of methods, results and discussions of this study, a resumé of knowledge of marine fungi in Brasil and South America follows.

With a marine mycota of 20 fungi from 8 stations, Brasil has a fraction of the world total of

about 300 species (34). General taxa of the 20 species are: 8 phycomycetes, 2 fungi imperfecti, 9 ascomycetes and 1 basidiomycete. Also 6 of the 8 collecting sites represent single finds at the generic level.

Although there are a total of 43 South American locations which have been successfully surveyed for marine fungi (Table 1), there are only 21 in which more than one fungus is reported (Figure 1). Of 20 publications referring to marine fungi in South America (18, 25, 26, 30-

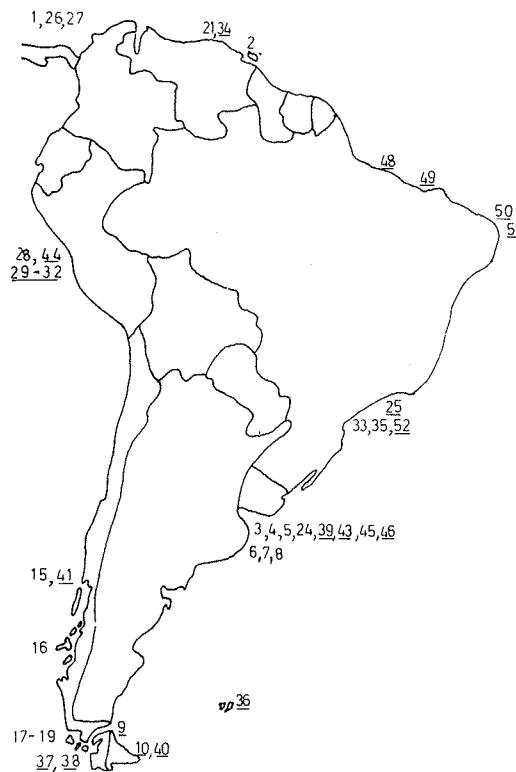
Table 1 — References to marine fungi from South American locations (* = collection site)

1. *Fell, J.W. and I.M. Master. 1975. Columbia.
2. *Fell, J.W. and I.M. Master. 1975. Trinidad.
3. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, Buenos Aires.
4. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, Mouth Rio Salado.
5. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, Cabo San Antonio.
6. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, near Puerto Ing. White.
7. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, Puerto Ing. White.
8. *Gessner, R.V. and J. Kohlmeyer. 1976. Argentina, near Bahia Blanca
9. *Hariot, P. 1887. Tierra del Fuego.
10. *Hariot, P. 1889. Cape Horn, 56°00'S, 67°15'W.
11. Hughes, G.C. 1974. Argentina.
12. Hughes, G.C. 1974. Brasil.
13. Hughes, G.C. 1974. Chile.
14. Hughes, G.C. 1974. Venezuela.
15. *Hughes, G.C. and P.S. Chamut. 1971. Chile, 43°02'S, 73°20'W.
16. *Hughes, G.C. and P.S. Chamut. 1971. Chile, 45°25'S, 73°44'W.
17. *Hughes, G.C. and P.S. Chamut. 1971. Chile, 54°50.5'S, 68°30.5'W.
18. *Hughes, G.C. and P.S. Chamut. 1971. Chile, 54°59'S, 68°22'W.
19. *Hughes, G.C. and P.S. Chamut. 1971. Chile, 55°36.5'S, 68°04.5'W.
20. Kohlmeyer, J. 1968. Brasil
21. *Kohlmeyer, J. 1968. Venezuela, ~10°00'N, 64°00'W.
22. Kohlmeyer, J. 1969a. Brasil.
23. Kohlmeyer, J. 1969b. Brasil.
24. *Kohlmeyer, J. 1976. Argentina, ~36°25'S, 56°35'W.
25. *Kohlmeyer, J. 1976. Brasil. ~22°30'S, 43°10'W.
26. *Kohlmeyer, J. 1976. Columbia, ~11°15'N, 75°04'W.
27. *Kohlmeyer, J. 1976. Columbia, ~11°00'N, 74°10'W.
28. *Kohlmeyer, J. 1976. Peru, ~13°10'S, 76°30'W.
29. *Kohlmeyer, J. 1976. Peru, ~14°20'S, 76°22'W.
30. *Kohlmeyer, J. 1976. Peru, ~12°05'S, 77°10'W.
31. *Kohlmeyer, J. 1976. Peru, ~12°15'S, 76°30'W.
32. *Kohlmeyer, J. 1976. Peru, ~13°40'S, 76°20'W.
33. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1964-1969. Brasil
34. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1964-1969. Venezuela.
35. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1971. Brasil, 23°57'S, 46°23'W.
36. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Falkland Is.
37. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Cape Horn.
38. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Magellan Strait.
39. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Argentina, Puerto Deseado.
40. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Argentina, Tierra del Fuego.
41. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1975. Chile, Rio Verde.
42. Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1977. Brasil.
43. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1977. Argentina
44. *Kohlmeyer, J. and E. Kohlmeyer. 1977. Peru.
45. *Malacalza, L. and A. Martinez. 1971. Argentina, 38°03'S, 57°33'W.
46. *Spegazzini, C. 1882. Argentina.
47. Ulken, A. 1966a. Brasil.
48. *Ulken, A. 1966b. Brasil, ~02°05'S, 42°05'W.
49. *Ulken, A. 1966b. Brasil, ~04°05'S, 37°15'W.
50. *Ulken, A. 1966b. Brasil, ~06°10'S, 35°00'W.
51. *Ulken, A. 1966b. Brasil, ~06°30'S, 34°58'W.
52. *Ulken, A. 1970. Brasil, ~25°02'S, 47°57'W.
53. Ulken, A. 1972. Brasil.

32, 47-49, 50, 53, 54, 56-58, 75, 80-83), 15 actually report collection sites (Table 1). In these 20 papers 62 taxa of marine fungi are reported (Table 2), including: 10 phycomycetes, 11 deuteromycetes, 39 ascomycetes and 1 basidiomycete. Seventeen are reported from tropical waters, 13 from subtropical sites, 38 from temperate locations and 1 from Antarctic sites.

Thus the number of Brazilian marine fungi reported is considerably less than that of the South American total and the actual collecting sites represent one quarter of the continent's entire number. Additions of fungi to the Brazilian marine mycota are important not only because of scarcity of data from South America but also Brasil, in contrast to all other countries in the world has the longest continuous coastline washed by tropical waters (30). And from Brazilian tropical waters only 5 generic level taxa are reported (Table 2).

Figure 1 — Locations by references (see Table 1) to marine fungi from South American waters. Underlined numbers refer to publications in which only one species is reported



Material and Methods

Technique descriptions following are purposely detailed so as to accomplish two major aims: a) to serve as a partial guide for Brazilian mycologists who may want to begin intensive

work in the marine environment and b) to briefly present, in their entirety and with required revisions, already developed techniques which have yet to be fully applied to substrates in marine ecosystems. It is the study of substrates which is a major thrust of my communication. This section is divided with subdivision as required, into four major parts: collections, isolations, study and preservation and identification.

a. *Collections* — A total of 12 collecting sites were sampled during this study (Table 3). Driftwood, sensu Hughes (29), was gathered from various microhabitats including: a) among rocks in the high intertidal; b) as above but in the low intertidal; c) a polluted site; d) fresh water outflows; e) in sands above the normal high tide mark; f) on intertidal sands of beaches; g) in sands of beach plains; h) in rudimentary dune sands; i) in waters of a high beach lagoon; j) in waters of a low beach lagoon; k) in the *Phloxerous portulacoides* St. Hil. zone; l) on berm depression surfaces; m) *Rhizophora mangle* L. prop roots; n) associated with the tubes of *Diopatra* sp. (polychaete); and o) in anoxic sands of a tide flat. Collections were directly observed for fungal infestations and subsequently transported to laboratories of Instituto de Botânica in São Paulo.

Leaves of *Rhizophora mangle* were collected from: *Rhizophora* strands; beach intertidal surfaces; exposed parts of *Diopatra* sp. tubes; and lagoon waters.

Collections of *Spartina ciliata* Kunth., at 2-5cm depths, came from: dune depression swale soils; beach plain sands; rudimentary dune crest sands; lagoon sands; and river bank sands. *Phloxerous portulacoides* roots were also gathered from rudimentary dune sands.

Thalli of *Porphyra* spp., *Padina* sp. and *Sargassum* sp. complex, along with leaf and root collections, were carried to laboratories of Instituto de Biologia Marinha (USP), São Sebastião, or Centro de Pesquisas Aplicadas de Recursos Naturais da Ilha do Cardoso, Base de Cananéia and/or Instituto de Botânica depending on their location of collection and the type of study required.

Sand and soil collections were from: dune sites; beach plain sites; intertidal sands; lagoon sands; stream bar sands; toques, leeward to windward faces; and forest edge sands. These were placed in small plastic bags and in every case transported to São Paulo.

Table 2 — Marine fungi reported from biogeographical zones (occ. Hughes, 1974, 1975) of South America

	Tropical	Subtropical	Temperate	Antarctic
Phycomycetes				
<i>Phylcocytrium mangrovii</i> Ulken		53*		
<i>Phytophthora spinosa</i> var. <i>spinosa</i> Fell et Master	1*,2*			
<i>P. vesicula</i> Anastasiou et Churchland	1*,2*			
<i>Schizochytrium aggregatum</i> Goldstein		52*		
<i>Schizochytrium</i> sp.	47(51)*			
<i>Thraustochytrium multirudimentale</i> Goldstein		52*		
<i>T. pachydermum</i> Scholz		52*		
<i>T. proliferum</i> Sparrow		52*		
<i>Thraustochytrium</i> sp. 1	47(49)*			
<i>Thraustochytrium</i> sp. 2	48*			
Fungi Imperfici				
<i>Cephalosporium</i> sp. 1	47(50)*			
<i>Cephalosporium</i> sp. 2		15*,16*		
<i>Dictyosporium pelagicum</i> (Linder) G.C. Hughes		16*		
<i>Monodictys pelogica</i> (Johnson) Jones		13,15*,16*		
<i>Periconia prolifica</i> Anastasiou		22(35)*,33*		
<i>Phoma</i> spp.	26*,27*		15*,16*,19*	
<i>Pseudorobillarda</i>			3*	
<i>Stagonospora</i>			5*	
<i>Zalerion maritimum</i> (Linder) Anastasiou			13,18*,19*	
<i>Zalerion varium</i> Anastasiou			18*,19*	
Mycelia Sterilia				
<i>Sclerotium clavus</i> D.C.		46*		
Ascomycetes				
<i>Amylocarpus encephaloides</i> Currey			19*	
<i>Anthostomella</i> sp.			5*	
<i>Buergerula spartinae</i> Kohlmeyer et Gessner			4*,6*	
<i>Ceriosporopsis calyptata</i> Kohlmeyer			45*	
<i>C. halim</i> Linder			11,32*,45*	
<i>Chadefaudia corallinaria</i> (Crouan et Crouan) Muller et von Arx	26*			
<i>Claviceps purpurea</i> (Fr.) Tul.			6*	
<i>Corollospora cristata</i> (Kohlmeyer) Kohlmeyer			18*	
<i>C. maritima</i> Werdermann	25*,26*,27*		24*,28*,30*,31*,32*	
<i>C. trifurcata</i> (Höhnk) Kohlmeyer			24*,29*	
<i>Didymosphaeria rhizophorae</i> Kohlmeyer et Kohlmeyer	26*,34*			
<i>Elliiodothis inquinans</i> (Ell. et Everh.) Theissen			5*	
<i>Gibberella</i> sp.			5*	
<i>Guignardia prasiae</i> Reed			9*	
<i>Halosphaeria fibrosa</i> Kohlmeyer		42(35)*		
<i>H. appendiculata</i> Linder			11,13,17*,18*,45*	
<i>H. cucullata</i> (Kohlmeyer) Kohlmeyer		12,22(35)*,23	13(18)*	
<i>H. hamata</i> (Höhnk) Kohlmeyer		5*,12,33*,35*		
<i>H. maritima</i> (Linder) Kohlmeyer			17*,18*,45*	
<i>H. quadricornuta</i> Cribb et Cribb	14,21*,26*,34*			
<i>H. quadriremis</i> (Höhnk) Kohlmeyer			11,45*	
<i>H. salina</i> (Meyers) Kohlmeyer				
<i>H. torquata</i> Kohlmeyer	26*			
<i>Halothia posidoniae</i> (Dur. et Mont.) Kohlmeyer			10*	
<i>Keissleriella blepharospora</i> Kohlmeyer et Kohlmeyer	26*			
<i>Leptosphaeria albopunctata</i> (Westend.) Sacc.			5*	
<i>L. australensis</i> (Cribb et Cribb) G.C. Hughes	14,21*,26*,34*,35*		13(19)*	
<i>L. obiones</i> (Crouan et Crouan) Sacc.			5*	
<i>L. typhicola</i> Karsten			5*	
<i>Lignincola laevis</i> Höhnk		35*		
<i>Lulworthia grandispora</i> Meyers		35*		
<i>L. medusa</i> (Ellis et Everhart) Cribb et Cribb			19*,45*	
<i>Lulworthia</i> spp.	21*,26*	20,33*,35*	6*,7*,28*	
<i>Mycosphaerella pneumatophorae</i> Kohlmeyer	26*			
<i>M. salicorniae</i> (Aners.) Petrak			43*,44*	
<i>Mycosphaerella</i> sp. 1			6*,7*,8*	
<i>Phaeosphaeria typharum</i> (Desmaz.) Holm			5*,6*	
<i>Pontoporeia biturbinata</i> (Dur. et Mont.) Kohlmeyer			10*	
* <i>Rhabdospora avicenniae</i> Kohlmeyer et Kohlmeyer	26*			
<i>Spathulospora antarctica</i> Kohlmeyer			39*,41*	36*,37*,38*,40*
Basidiomycetes				
<i>Nia vibrissa</i> Moore et Meyers		23,33*,35*		

¹ Numbers refer to references of Table 1

* Denotes a collection or collections of the particular fungus

() Signifies a collection site of a fungus without the species being reported in the paper referring to the collection site

Table 3 — Collecting sites, latitude and longitude of the sites, types of collections and numbers of single samples at each site

Name of Collecting Site	Lat and Long	Types of Collections				
		Wood	Leaves	Roots	Algae	Soil
Praia Marujá	25°12.4'S; 47°58.1'W	49	—	—	2	11
Praia de Fora (= P. Itacurúça)	25°04.1'S; 47°53.7'W	121	11	6	—	31
Praia Pereirinha	25°03.9'S; 47°54.7'W	23	15	—	—	—
Praia da Ponte	25°01.8'S; 47°52.7'W	12	—	—	—	—
Centro de Pesquisas-Base Cananéia	25°01.4'S; 47°55'W	16	1	—	—	—
Praia Curral	23°51.9'S; 45°25'W	45	—	—	—	4
Praia Grande	23°51.6'S; 45°20.9'W	8	—	—	1	—
Praia do Cabelo Gordo	23°49.5'S; 45°24.2'W	31	—	—	—	9
Praia de São Sebastião (= P. de Araçá)	23°48.8'S; 45°23.8'W	26	32	—	4	23
Praia do Pinto (= P. Sino)	23°44.5'S; 45°20.6'W	10	—	—	—	—
Praia Massaquassu (= P. Lagoinha)	23°40'S; 45°19.2'W	17	—	—	—	5
U.S.P. Base Oceanográfico Norte	23°25.8'S; 45°03.2'W	14	—	—	1	2

b. *Isolations — Incubation* — Wood pieces cut into 10-15cm lengths, were placed in bottles 8cm (diameter) × 15cm (length) on pieces of sea water (sterilized) soaked papel towel. Number of wood pieces in each incubator depended on sizes of individual pieces but no more than 1/4 of the space was occupied by wood.

Single leaves of *Rhizophora mangle* were incubated in petri plates on sterile filter paper soaked with sterile sea water. These along with wood pieces were routinely observed for fungal infestation after 6 weeks incubation. Both wood and leaf incubators were maintained at room temperature.

Baiting — Soil samples, divided into three subsamples and placed in teaspoon amounts of petri plates, were flooded with sterile sea water at 10‰ and 5‰ salinity. The third subsample, at 0‰, was flooded with a 1:1 mixture of sterilized distilled water and spring water. Water salinities resulted from a mixture of sea water (34.5‰ Praia da Ponte) and distilled water. Following flooding each plate was baited with *Pitius sylvestris* L. pollen and cellulose film. Microscopic observations commenced 3 days after flooding and terminated 14 days later.

Digestion — Wood and leaves were deposited in plastic pipe digesters installed on wooden posts in the low intertidal at Centro de Pesquisas Base Cananéia. These digesters, 10cm (diameter) × 25cm (length), were partitioned into intervals of 4cm by drilling a ring of holes at each level and making a net of coarse monofilament line. The leaf digester, with freshly picked *Rhizophora* leaves, consisted of 6 levels each of which was a sandwich of monofilament line be-

low, next fine mesh household plastic screen, two leaves next, above fine mesh screen and finally a monofilament lime mesh. In the wood digester each level consisted of two pieces of each type: a) imbuia, *Ocotea porosa* (Nees & Mart.) Barroso; b) bambu (eng. bamboo); c) angico-vermelho, *Piptadenia macrocarpa* Benth.; d) pinheiro-do-Paraná, *Araucaria angustifolia* (Bert.) O. Ktze. and peroba-rosa, *Aspidosperma polyneuron* M. Arq. All types except bamboo were 2 × 2 × 4cm. Bamboo cut into 4cm lengths, was slivered into pieces no less than 1cm wide. There digesters were exposed to the air a maximum of 3 hrs/day during the experiment.

Other digesters, constructed of plastic alcohol bottles punched with holes and containing the same types of wood 15cm × 15cm × 15cm), were buried in sands of a mangrove strand at Praia Pereirinha. After six weeks exposure wood from these digesters, as well as wood and leaves from Cananéia, was recovered and examined for fungi.

Small quantities of algal thalli, placed in sterile sea water, were aerated with an aspirating pump. Thalli were removed from the vials after two weeks digestion at room temperature and cut into small pieces for further treatment.

Direct plating — Pieces of incubated wood, leaves, pollen grains and digested algal thalli were plated on one of the culture media: a) Tubaki's sea water medium (77), for marine ascomycetes from wood and leaves; b) Booth 1, designated B₁ (7), for phycomycetes and fungi imperfecti from agar thalli; c) modified Harder and Uebelmesser, designated MHU (8), for phycomycetes from algal thalli and soil samples

and d) Potato Dextrose Agar, designated PDA, for ascomycetes and fungi imperfecti from wood, leaves and algal thalli. Nematode isolation involved placing pieces of wood and leaves on full and 1/4 strength PDA and 2% Corn Meal Agar, designated CMA (60). All isolation media were provided with antibiotics: streptomycin sulphate (0.3gms/l) for all media; penicillin G (0.3gms/l, 10⁷ units) for B1 and MHU and rose bengal (0.05gms/l) for Tubaki and PDA. Maintained at room temperature all plates were examined daily. As fungi developed they were removed to plates without antibiotics.

Washing and plating — Leaf and wood collections were subjected to washing techniques (27) as modified subsequently (19). Root collections of *Spartina ciliata* and *Phylloxerus portulacoides* were treated as described in the original paper (27). Essentially the method consists of washing spores from substrate surface by repeated applications of sterile distilled water. Washed material is then placed on a culture medium.

In this study, within 2 hrs of collection, roots of each samples were cut into 2-3mm lengths until 30 pieces resulted. These were placed in lots of 10 in vials with 20ml sterile one half strength sea water and subsequently violently hand agitated for one minute. Following agitation water was decanted, 20ml more added and the shaking process repeated. Each lot of 10 root pieces was subjected to 20 washes. On two occasions first wash water was diluted to 10⁻⁷ and each of the 7 dilutions were plated in 1ml lots in molten agar. Washed roots were removed from wash vials and placed on sterile dry filter paper in a petri dish for 24 hrs. The air dried pieces were then plated on culture medium.

Leaf and wood collections were treated in exactly the same manner except that pieces for washing were produced by blending leaves for two minutes in 200ml sterile 1/2 strength sea water. Resulting fragments were passed through a 2mm mesh and collection on a 1mm mesh.

As with root samples, washed and dried leaf and wood fragments, were placed 5 pieces/plate, on cellulose medium (15), PDA, and modified (addition of 5gms yeast extract) czapek-dox and incubated at room temperature. Cellulose medium required modification of

use blended filter paper in 10gm lots/l. All media were provided with 0.3gms streptomycin sulphate and 0.05 rose bengal/l. Developing mycelium was removed from the isolation plates and placed on PDA for further study. Fungal identification, as much as possible was accomplished both on isolation, plates and PDA.

c. Study and preservation — Cultures — Isolated fungi were maintained on PDA in culture tubes and petri plates. These cultures were deposited in culture collections of Instituto de Botânica and Botany Department, University of Manitoba, Winnipeg, Manitoba, Canada.

Permanent mounts — Lignicolous fungi, preserved in lactophenol with cotton blue or acid fuchsin were prepared as squash mounts between two coverslips. This technique (55) is considerably more tedious than simply ringing a coverslip with nail polish but the results are far better in terms of preservation. Briefly, material placed on a large coverslip, 24 × 32mm, in lactophenol is surmounted by a small coverslip, 18 × 18mm. The small coverslip, after cleaning around its edges, is ringed with nail polish and a drop of Canada balsam is placed on it. Large and small coverslips, stuck together by nail polish, are then inverted with large coverslip above small coverslip configuration placed on a clean glass slide and the balsam flows between thereby providing a second seal for the fungal material. Resultant are 82 slides which are on deposition in the herbarium of the Instituto de Botânica.

Photographs — An indispensable aid to partial preservation of records of encountered fungi has been preparation of microphotographs. In many cases phase contrast microscopy served best to illustrate fungal structures. Accompanying the cultures and slides are 150 photographs of various observed fungi.

d. Identification — Although keys to species of various genera are ultimately required to study fungi in marine environments there are some general treatments (35, 52, 54) which allow identification of many marine fungi to the specific epithet. Of those fungi not found in the above treatments most difficult are fungi imperfecti. There are several starting points for this group, all of which are excellent to the generic level (1, 3, 4, 16, 17, 33).

Table 4 — Percent frequency of lignicolous marine fungi of Estado São Paulo

Types of collection sites													Nº of sites in which species occurs		
	Dune soils 10	Digester 8	Buried anoxic 70	Freshwater outflow 23	Beach Intertidal 45	Rocks — High Intertidal 35	Rocks — Low Intertidal 40	High Lagoon 10	Buried in Sand -High beach 17	Low Lagoon 10	Polluted 10	Berm 10	Rhizophora 10	Buried in Beach plane 10	
Lignicolous fungi															
<i>Arthrinium</i> sp.			1.4												1***
<i>Cephalosporium lecanii</i> Zimm			1.4												1**
<i>Ceriosporopsis cambrensis</i> Wilson						2.9	5.0								2**
<i>C. halima</i> * Linder				60.9	33.3	20	22.5	10							5**
<i>Imperfect of C. halima</i>				4.3	22.2										2**
<i>Cirrenalia macrocephala</i> (Kholm.) Meyers et Moore				8.7	6.7	5.7	10								4**
<i>C. pygmaea</i> Kohlm.						2.9	2.5								2**
<i>C. tropicalis</i> Kohlm.						2.9	10			5.9					3**
<i>Cladosporium</i> sp.		1.4													1**
<i>Clavariopsis bulbosa</i> Anastasiou		12.5				4.4	2.9			11.8					4**
<i>Corollospora lacerata</i> (Linder) Kohlm.						2.2									1**
<i>C. maritima</i> Wedermann						31.1	5.7	10	10	35.3	10	10	20		8**
<i>C. pulchella</i> Kohlm., Schmidt et Nair															1**
<i>C. trifurcata</i> (Höhnk) Kohlm.							2.9	5.0	10		41.2				4**
<i>C. tubulata</i> Kohlm.							2.2								1**
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot		2.8	4.3				5.7								2**
<i>Dictyosporium pelagicum</i> (Linder) G.C. Hughes						2.2		10			10				1*
<i>Didymosphaeria enalia</i> Kohlm.											10				3*
<i>D. rhizophorae</i> Kohlm. et Kohlm.											10				1**
<i>Epicoccum nigrum</i> Link			1.4												1**
<i>Haligena viscidula</i> Kohlm. et Kohlm.								10							1**
<i>Halosarpeia fibrosa</i> Kohlm. et Kohlm.					4.3	2.2	2.9	2.5	10						5
<i>Halosphaeria appendiculata</i> Linder							2.9	30							2*
<i>H. hamata</i> ** (Höhnk) Kohlm.						56.5	29.4	25.7	5.0	60					5
<i>H. maritima</i> * (Linder) Kohlm.						8.7	11.1	17.1	15						4*
<i>H. mediosettigera</i> Cribb et Cribb								5.7	12.5						2**
<i>H. quadricornuta</i> Cribb et Cribb		50				8.7	17.8	11.4	37.5						5*
<i>H. salina</i> (Meyers) Kohlm.						4.3		8.6			4.3				3*
<i>H. stellata</i> (Kohlm.) Kohlm.									2.5						1**
<i>H. trullifera</i> (Kohlm.) Kohlm.									2.5						1**
<i>Humicola alopallionella</i> Meyers et Moore						8.9	8.6		10			10			4**
<i>Lentescospora submarina</i> Linder						2.2	2.9								2**
<i>Leptosphaeria australiensis</i> (Cribb et Cribb) G.C. Hughes										11.8					1
<i>L. avicenniae</i> Kohlm. et Kohlm.											10				1**
<i>L. obionea</i> Sacc. et Ellis															1**
<i>L. halima</i> Johnson						6.7									1**
<i>L. oraemerica</i> Linder						6.7									1**
<i>Lignincola laevis</i> Höhnk	10	12.5	17.4			20	5.0	10		10	10	10	40		9
<i>Luhwirthia fucicola</i> Suth.						4.4		2.5		10					3**
<i>Nia vibrissa</i> ** Meyers et Meyers						26.1									1
<i>Papulospora halima</i> Anastasiou							4.4	2.9	2.5			10			4**
<i>Periconia prolifica</i> Anastasiou		12.5	17.4			6.7	2.9								4
<i>Pestalotiopsis</i> spp.							4.4								1**
<i>Phaeosphaeria ammophilae</i> (Lasch) Kohlm. et Kohlm.							2.2								1**
<i>Pyrenopeziza</i> sp.		1.4													2**
<i>Torpedospora radiata</i> Meyers								8.6			10				
<i>Trichocladium achrasporum</i> (Meyers et Moore) Shearer et Crane		12.5				2.2	2.9	10							1**
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai										42.5					1**
<i>Criniger maritima</i> Schmidt									7.5						3**
<i>Zalerion varium</i> * Anastasiou							2.9	20	10		10	10			1**
Nº of fungi in various sites	1	5	7	12	22	24	20	10	7	4	3	5	2	2	

³ = Reported for the first time in Brasil and South America⁴ = Reported for the first time in Brasil only

Results

1. *Lignicolous fungi — Drift collections* — Numbers of habitats in which each fungus occurs, collections for each micro-environment and different fungi found in each habitat are given in the last vertical column (Table 4), first horizontal line and last horizontal line respectively. Of the 50 fungi included 45 are actually from driftwood as 5 were isolated by another method (to be discussed below).

Most widely occurring fungi are *Corollospora maritima* and *Lignincola laevis* with *Ceriosporopsis halima*; *Halosarpeia fibrosa*; *Halosphaeria hamata* and *H. quadricornuta* also appearing in many of the sampled habitats. *Ceriosporopsis halima* and *H. hamata* are very frequent when present and others with high frequency include: *C. maritima*; *C. trifurcata*; *H. quadricornuta*; *L. laevis*; *Nia vibrissa*; *Periconia prolifica* and *Trichoderma harzianum*. Considering frequency in specific habitats, *C. halima* and *H.*

hamata are most frequent in fresh water outflow regions while *Trichocladium achrasporum*, *Halosphaeria appendiculata*, *H. mediosetigera*, *H. stellata*, *H. trullifera*, *Humicola alopallonella*, *Lentescospora submarina*, *Torpedospora radiata* and *Zalerion varium* seem confined to high salinity intertidal sites. *Corollospora maritima*, *C. trifurcata* and *T. harzianum* are common on wood buried in beach sand.

Habitats with greatest species diversity are: a) high intertidal rocks; b) beach intertidal; c) low intertidal rocks; d) freshwater outflow and e) high lagoon. All of these sites are high salinity sites at one time or another depending on differing temporal references. Interpretation of this diversity is subject to question as those with highest number of different species also have the higher number of collections.

Washed wood — Washed wood fragments, produced by blending wood buried in anoxic sands followed by washing, yielded: *Arthrinium* sp., *Cephalosporium leconii*, *Cladosporium* sp., *Dendryphiella arenaria*, *Epicoccum nigrum* and *Pyrenopeziza* sp. all of which were at low frequencies.

Digesters — *Halosphaeria quadricornuta* developed on peroba-rosa, imbuia and bambu after six weeks exposure. *Clavariopsis bulbosa*, *Lig-*

nincola laevis and *Periconia prolifica* appeared only on peroba-rosa. *Trichocladium achrasporum* (on Bambu) was the only fungus observed in the buried digesters. All wood was *Teredo* spp. infested and bamboo exhibited several nudibranch species.

2. Folioicolous fungi — Considering culture media (Table 5) greatest fungal species diversity was observed on Czapek (13 species) followed by cellulose (7 species) and PDA (6 species). *Curvularia* sp. (? *indica*) 212, ? *Dactylella* sp. 211 and *Pestalotia* spp. 217, 224 were isolated exclusively on Czapek. *Cylindrocladium* sp. 201, *Epicoccum nigrum*, *Pestalotia* sp. 218, *Trichoderma longibrachiatum* and *Volutella* sp. 223 occurred only on PDA and *Fusarium* sp. 228, *Periconia* sp. 220 and *Phomopsis obscurans* appeared only on cellulose.

On Tubaki's medium and PDA *Cirrenalia tropicalis*, *Curvularia* sp. (? *indica*) 212, *Cylindrocladium* sp. 201, ? *Dactylella* sp. 211, *Epicoccum nigrum*, *Phoma* spp. and *Stagonospora* spp. occurred only from leaves collected in intertidal sites while *Fusarium* sp. 228, *Periconia* sp. 220, *Pestalotia* spp. 217, 218, 224, *Phomopsis obscurans*, *Scytalidium terminale*, *Trichoderma longibrachiatum* and *Volutella* sp. 223 were gathered from low lagoon leaves.

Table 5 — Fungus frequency on Rhizophora mangle leaves collected from Praia de Fora and Praia de Araçá and macerated, washed and placed on various culture media: 1, PDA; 2, Czapek and 3, Cellulose

Fungus Name	Praia de Fora								Over Total	
	Beach Intertidal			Low Lagoon			Praia de Araçá			
	1	2	3	1	2	3	1	2		
<i>Alternaria</i> sp. 215				26.7			13.3	11.1	9.1	
<i>Arthrobotrys dactyloides</i> Drechsler	100	10			13.3				7.9	
<i>Cephalosporium acremonium</i> Cda.				46.7			24.4	15.6	15.2	
<i>Cirrenalia tropicalis</i> Kohlm.							2.2	2.2	1.2	
<i>Cladosporium</i> sp. 205	10				13.3		22.2	20.2	13.3	
<i>Curvularia</i> sp. (? <i>indica</i>) 212								2.2	0.6	
<i>Cylindrocladium</i> sp. 201	10								0.6	
? <i>Dactylella</i> sp. 211									0.6	
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot	10			33.3	6.7	26.7	20.0	28.9	20.0	
<i>Epicoccum nigrum</i> Link							11.1		2.4	
<i>Fusarium</i> sp. 228					6.7				0.6	
<i>Periconia</i> sp. 220					20.0				1.8	
<i>Pestalotia</i> sp. 217					6.7				0.6	
<i>Pestalotia</i> sp. 218				6.7					0.6	
<i>Pestalotia</i> sp. 224					6.7				0.6	
<i>Phoma</i> spp.								2.2	0.6	
<i>Phomopsis obscurans</i> (Ellis et Ev.) Sutton						6.7			0.6	
<i>Scytalidium terminale</i> Rao et de Hoog					13.3	20.0			3.0	
<i>Stagonospora</i> spp.							31.1	17.8	13.3	
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> Rifai			6.7						0.6	
<i>Volutella</i> sp. 223			6.7						0.6	

Dendryphiella arenaria demonstrated broadest occurrence over habitats and isolation media. This species was also most frequent (20%) (Table 5) over all sites followed by *Cephalosporium acremonium* (15.2%), *Stagonospora* spp. (13.3%), *Cladosporium* sp. 205 (13.3%), *Alternaria* sp. 215 (9.1%) and *Arthrobotrys dactyloides* (7.9%).

3. *Rhizosphere fungi* — *Dilution plates* — Both *Epicoccum nigrum* and *Fusarium solani* were isolated from dilution series of *Spartina ciliata* and *Phloxerous portulacoides*. Other species on *S. ciliata* were: *Alternaria* sp. 250, *Cephalosporium acremonium* and *Drechslera* sp. 242. *Alternaria* spp. 246, 248, *Dendryphiella arenaria*, *Fusarium roseum*, *Gliocladium roseum*, *Pestalotia* sp. 244 and *Trichoderma aureoviridae*.

Active fungi — Washed and plated roots of *S. ciliata* demonstrated activity of *Alternaria* spp. 269, 273, 274, *Cephalosporium acremonium*, *Coniothyrium obiones*, *Dendryphiella arenaria*, *Gliocladium roseum*, *Periconia* sp. 270, *Pestalotia* sp. 244 and *Trichoderma viridae*. *G. roseum* was isolated from all sites except the river bank (Table 6). In lagoon and swale collections it was the only fungus encountered. Its' highest frequency was in swale and beach plain collections. Aside from *G. roseum*, *Pestalotia* sp. 244 and *T. viridae* were isolated from beach plain roots. Dune crest root collections yielded *C. acremonium* in addition to *G. roseum*. Greatest species diversity was evidenced in the river bank collections with recovery of *Alternaria* spp. 269, 273, 274, *C. obiones*, *D. arenaria* and *Periconia* sp. 270. When recovered *D. arenaria* was the most frequent species from any habitat.

4. *Algicolous fungi* — During a survey of different algae for *Thraustochytrium* spp. several interesting deuteromycetes were isolated from rotted pieces of thalli placed on various culture media (Table 7). When considering types of algal substrates surveyed on a broad scale there are those fungi which occurred only on brown algae, i.e. *Padina* sp. and *Sargassum* sp. (inc. *Eladia* sp. 185, *Phialophora* sp. (? alba), *Stachybotrys echinatum* and those which were isolated only from red algae, i.e. *Porphyra* spp. (inc. *Alternaria*) sp. 213, *Cephalosporium acremonium*, *Geotrichum candidum*, *Scopulariopsis* sp. 194, *Trichoderma harzianum* and *T. aureo-*

viridae. Other fungi, notably *Asteromella* sp. 191, *Cladosporium* sp. 197 and *Epicoccum nigrum*, represented a group occurring on both types of algae. *Scopulariopsis* sp. 194 (on *P. sp. crispus* & *P. sp. spiralis* var. *amplifolia*), *Dendryphiella arenaria* (on *P. spiralis* sp. *amplifolia*) *Epicoccum nigrum* (on *P. sp. crispus*), *Cladosporium* sp. 197 (on *P. sp. acanthophora* var. *acanthophora* & *P. sp. crispus*) *Pestalotia* sp. 192 (on *P. sp. spiralis* var. *amplifolia*) and *Cephalosporium acremonium* var. *funiculosum*, *Gilmaniella humicola* and *Tritirachium* sp. (on *P. acanthophora* var. *brasiliensis*) were fungi with high frequencies of isolation. Although *Padina* sp. yielded greatest species diversity none of the frequencies were high.

5. *Chytrids and thraustochytrids* — Dune depressions (Table 8) with litter covered sands showed highest species diversity (8 species). Notable species in this habitat were: *Chytriomyces annulatus*, *C. poculatus*, *Nowakowskia ramosa*, *Phlyctochytrium furcatum* and *P. spectabile*. *C. poculatus* also occurred on dune crests and in forest sands. Other sites with high species diversity included: toque leeward soils (6 species), toque windward soils (4 species) and rudimentary dune sands (6 species). *Entophyscites* sp., *Phlyctochytrium mangrovii*, *P. punctatum*, *Rhizophydiumpphaerotheca* and *Thraustochytrium* spp. represented a toque soils group. *P. punctatum* occurred only in toque soils and *P. mangrovii* was also found in *Spartina ciliata* swale and river bottom sands. Among other species, *Chytriomyces hyalinus*, *Rhizophyctis rosea*, *R. sphaerotheca*, and *Thraustochytrium* spp. occurred in rudimentary dune sands. *R. rosea* was also found in berm depression sands without litter and dune crest sands.

Both *Rhizophydiumpphaerotheca* and *Rhizophyctis rosea* showed a marked ecological amplitude as they occurred in tide washed sites and spray influenced sites. On the other hand, notable species showing a narrow amplitude include: *Chytriomyces hyalinus*, *C. poculatus*, *Nowakowskia ramosa*, *Phlyctochytrium furcatum*, *P. reinboldiae*, *P. spectabile* and *P. mangrovii*.

6. *Nematode fungi* — Nematodes, isolated from driftwood on 1/4 PDA and 2% CMA with 0.3gms streptomycin sulphate and 0.05gms rose Bengal per liter, were inoculated along with various fungi (i.e. *Arthrobotrys dactyloides*,

Table 6 — Percent frequency of fungi from washed and plated roots of *Spartina ciliata* collected in different habitats. (% frequency = number of finds over no., 30, of plated root fragments)

Table 7 — Percent frequency of fungi recovered from plated pieces of various algal thalli

Name of fungus		Algal Substrates								
		<i>Padina</i> sp.	<i>Porphyra</i> sp. (<i>lacanthophora</i> var. <i>acanthophora</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>lacanthophora</i> var. <i>brasiliensis</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>cor de rosa</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>crispus</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>repicho-verde</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>spiralis</i> var. <i>amplifolia</i>)	<i>P.</i> sp. (<i>spiralis</i> var. <i>spiralis</i>)	<i>Sargassum</i> sp.
<i>Alternaria</i> sp. 213					66.6			13.2		
<i>Asteromyces</i> sp. 191	5.0					7.0		6.0	6.6	6.7
<i>Cephalosporium acremonium</i> Corda										
<i>C. acremonium</i> var. <i>funiculosum</i>										
Sukapure & Thirum.	2.5			9.1						
<i>Cladosporium</i> sp. 197	5.0	18.8	6.5		13.2	7.0	7.2			2.8
<i>Dendryphiella arenaria</i> Nicot								20.4		6.7
<i>Eladia</i> sp. 185	2.5									6.7
<i>Epicoccum nigrum</i> Link	5.0	1.3	1.3		19.8	1.4				
<i>Geotrichum candidum</i> Link								1.2		
<i>Gilmaniella humicola</i> Borrow	2.5			9.1						
<i>Pestalotiopsis</i> sp. 192			2.5					12.0		
<i>Phialophora</i> sp. (? <i>alba</i>)	5.0									
<i>Scopulariopsis</i> sp. 194			7.5		90		7.0			
<i>Stachybotrys echinatum</i> Corda	5.0									
<i>Trichoderma aureoviridae</i> Rifai	7.5							2.8		
<i>Trichoderma harzianum</i> Rifai								1.4		
<i>Tritirachium</i> sp.			1.3	9.1				2.8		
Number of pieces plated	40	80	75	10	15	70	85	15	40	

Table 8 — Occurrence of chytrids and thraustochytrids in beach and coastal habitats

	Low intertidal	High intertidal	First berm	Berm depression	Second berm	Low lagoon	High lagoon	Toque windward	Toque crest	Toque leeward	Beach plain	Rudimentary dunes	Primary dune crest	Dune depression (open sand)	Dune depression (litter covered)	Second dune crest	Third dune crest	Fourth dune crest	Back plain	<i>Spartina cynosuroides</i>	River bottom	A <i>recastum</i> <i>romoriz</i> — offianum — <i>Avicennia</i> sp. forest	
<i>Chytromyces annulatus</i> Dogma																							
<i>C. hyalinus</i> Karling													+	+	+								
<i>C. poculatus</i> Willoughby et Townley													+	+	+		+					+	
<i>Dendrospora</i> sp.													+										
<i>Entophysycis</i> sp.																							
<i>Karlingia spinosa</i> Karling													+	+	+								
<i>Nowakowskella ramosa</i> E.J. Butler																							
<i>Phlyctochytrium furcatum</i> Sparrow																							
<i>P. mangrovii</i> Ulken																							
<i>P. punctatum</i> Koch																							
<i>P. reinboldiae</i> Persiel																							
<i>P. spectabilis</i> Uebelmesser																							
<i>Ramularia</i> sp.																							
<i>Rhizophlyctis rosea</i> (de Bary and Woronin) Fischer																							
<i>Rhizophyllum coronum</i> Hanson																							
<i>R. sphaerotheca</i> Zopf																							
<i>Schizochytrium aggregatum</i> Goldstein and Belsky																							
<i>Septochytrium variabile</i> Berdan																							
<i>Sparowia subcruciformis</i> Dogma																							
<i>Thraustochytrium</i> spp.																							
Nº of fungi/habitat	2	2	2	2	0	1	1	4	3	6	1	6	1	2	8	3	2	2	1	1	1	1	1

Curvularia sp. 212 (? *indica*), *Cylindrocladum* sp. 201, ? *Dactylella* sp. 211 and *Dendryphiella arenaria*) on plates of PDA made with 1/2 strength sea water and without antibiotics. The fungi and nematodes were also inoculated into liquid PDA.

Of all the fungi *Cylindrocladum* sp. 201 seemed to be the best food source as there were a greater number of nematodes around the growing fringe of this fungus than around the fringes of the others. Also in the liquid medium there were a greater number of nematodes with *Cylindrocladum* than with the others. *Curvularia* seemed the next best food source. *Dendryphiella arenaria* was the worst food source as only a few nematodes developed in cultures of this fungus.

Interpretation of these fungi as food sources is subject to serious question because nematodes were also provided the same nutrients as the fungi.

When grown on PDA *Arthrobotrys dactyloides* produced an extracellular red substance which accumulated on hyphae and diffused into the culture medium. On PDA made with distilled water the substance was yellow and on the same medium "solventized" with sea water it was red. Irregardless of the medium solvent, pieces of the medium with fungi, medium pie-

ces scraped free of fungal hyphae only, were yellow in 5% HCl and red in 2% KOH. Treatment with lactophenol produced rhomboid crystal fascicles on the hyphae. The substance is soluble in water, acetone and alcohol and insoluble in benzene.

Inhibition of *Cladosporium* sp. 205, *Curvularia* sp. 212, *Cylindrocladum* sp. 201, *Dendryphiella arenaria* and *Trichoderma longibrachiatum* resulted when grown with *Arthrobotrys dactyloides* on sea water PDA. No clear inhibition was shown by *A. dactyloides* or *Scytalidium terminale* when grown together under similar conditions.

In liquid cultures with nematodes *Arthrobotrys dactyloides* formed rings from hyphae. Trapped nematodes were frequently observed with hyphae ramifying throughout. Nematode population levels were greatly reduced in cultures with this fungus.

Discussion

1. *Lignicolous fungi* — Fungi frequently found over a wide range of habitats are similarly reported from other parts of the world. For example, *Ceriosporopsis halima* is widely distributed (28, 71, 78) and frequent (11, 38, 42, 72, 74).

Although *Corollospora maritima* is encountered infrequently in English waters (38), it is frequent (53, 73) and widely distributed (71, 78) in other locations. *Corollospora trifurcata* develops principally in sandy microhabitats but is very frequent when it occurs (29, 53, 73). *Halosphaeria hamata* and *H. quadricornuta* are widely distributed and frequent where they are found (47, 78). *Lignicola laevis* (53, 71, 73, 78), *Nia vibrissa* (53) and *Periconia prolifica* (53, 73) are also widely found. *Trichoderma* is encountered in a wide range of habitats (28) and is very common in sea muds (78).

Schaumann (71) demonstrates, as in my study, that *Halosphaeria appendiculata*, *H. mediosetigera*, *H. stellata*, *H. trullifera* and *Zalecion varium* are intertidal, not supratidal, species. *Trichocladium achrasporum*, *Humicola alopallonella* and *Lentescospora submarina* are also intertidal species (11, 28, 73, 77). *Corollospora maritima* and *C. trifurcata* are considered arenicolous fungi (40, 46, 78) and perhaps the high frequencies from wood buried in sand indicates the same trend in this study.

A pattern of species diversity decrease in the supratidal (71) is evident in my results. Wood buried in anoxic sands seems to have lower species diversity than wood buried in well aerated sands. Major difficulty in this interpretation of the data rests in different methods applied to the two types of samples. Wood buried in high beach sands was incubated and observed directly while anoxic sands wood was macerated and washed and plated. *Cephalosporium* sp., *Cladosporium* sp., *Dendryphiella salina* and *Pyrenopeziza* sp. are reported (28, 38), by use of slightly different methods in an active state in wood. In addition to almost the same species I isolated *Arthrinium* sp. and *Epicoccum nigrum* from wood in an anoxic ambient. *Cladosporium* sp., *Dendryphiella arenaria* and *E. nigrum* were previously isolated from marine and brackish soils (76). Also, *Arthrinium* spp. is common in marine muds (78). It seems that some fungi reported as present in marine soils are also perhaps present in hyphal states in wood of anoxic intertidal sites.

Some fungi appear to be early colonizers of wood placed in marine environments while others are late colonists (11, 36, 38, 42). Although this point is disputed (10, 34), I believe some species appear early on the substrate regardless of submergence time. This is supported by simple analysis of existing data (11, 36-38, 42). Wood submerged in June, October

and March was first colonized by: *Ceriosporopsis halima*. *Corollospora maritima*, *Halosphaeria appendiculata*, *Monodictys pelagica* and *Zalecion maritimum*. Certainly, population differences exist at different times of the year but species composition is certainly a function of eurytolerance among other factors. One pre-requisite for an early colonizer is eurytolerance and many marine fungi demonstrate this ability (78) with respect to temperature and salinity. Fungi which appeared early in my study are not similar to English first colonizers. Particularly striking is that *C. halima* and *C. maritima* are frequent in Brazilian waters but neither are early colonizers. Thus to state a specific succession is an over-simplification because colonization sequence is dependent on genetic plasticity of individual species, physical location and time.

Of 50 lignicolous fungi reported there, 43 are new records for Brasil and 34 are new to South America. Some of those already reported from South America are shown in Figure 2. According to a proposed scheme of biogeographical zones (30, 32) *Leptosphaeria australiensis* is in tropical and subtropical waters, *Halosphaeria*

Figure 2 — Distribution of various marine ascomycetes in South American waters



cucullata (with its imperfect stage *Periconia prolifica*) and *H. hamata* are in subtropical waters and *Ceriosporopsis halina*, *H. appendiculata*, *H. quadriremis* and *Lulworthia medusa*, are in temperate waters. Of the fungi listed only *Halosphaeria hamata* fails to completely fit proposed (30, 32) biogeographical designations.

Occurrence of *Ceriosporopsis cambrensis*, *C. halima*, *Halosphaeria appendiculata*, *H. hamata* and *H. mediosetigera* in subtropical waters of São Paulo indicates occurrence of temperate elements in the state's marine mycota. Also, appearance of *Didymosphaeria enalia* and *Halosphaeria quadricornuta* in São Paulo littoral waters represents presence of tropical elements. That both temperate and tropical fungal species appear in São Paulo marine waters is not surprising when noted that benthic marine algae (13, 63) and copepods (Bjornberg pers. comm.) demonstrate both northern and southern elements.

2. *Foliicolous fungi* — All studies of fungi on leaves in marine ecosystems until 1973 (40) utilized direct observation on collection and/or incubation followed by direct observation. Of major studies not reported or published after the review (12, 21-24, 59, 61) only one (61) utilized a washing technique. These results, after three washings and/or surface sterilization are very similar to mine and perhaps represent the first report of fungi in a hyphal state in a substrate of the marine environment. To this extensive list of fungi, as well as from other studies, I can add: *Cylindrocladum* sp. 201, *Dactylella* sp. 211, *Stagonospora* sp. and *Volutella* sp. 223 at the generic level and *Arthrobotrys dactyloides*, *Cephalosporium acremonium*, *Cirrenalia tropicalis*, *Dendryphiella arenaria*, *Epicoccum ni-grum*, *Phomopsis obscurans*, *Scytalidium terminale* and *Trichoderma longibrachiatum* at the specific level.

3. *Rhizosphere fungi* — Fungi encountered on roots of *Spartina ciliata* and *Phloxerus portulacoides* are characteristic for the rhizosphere in general (64). This is especially true where beach and dune rhizospheres are considered (65-70). A larger group of sporulating fungi on *P. portulacoides* than on *S. ciliata* may be related to observations (65) that *Spartina* has a reduced rhizosphere mycota in contrast to other higher plants.

Several already established general trends are indicated in my results: 1) there are fewer

rhizosphere fungi in foredunes than higher on the beach (70). 2) there is an upshore increase in cellulose decomposers with maximum at high water line (68); 3) *Dendryphiella* shows an upshore increase in frequency (66, 67); 4) *Dendryphiella* drops out of the rhizosphere mycota when *Gliocladium roseum* is present (69) and 5) *Trichoderma* shows a down-shore increase in frequency (66, 67).

4. *Algicolous fungi* — *Dendryphiella salina* and *Alternaria* sp. (? *maritima*) are commonly reported as saprophytes on marine algae (40). *Cladosporium* spp., *Epicoccum* spp. and *Cephalosporium* spp. are common aerial contaminants in São Paulo City (20) and so my results must be interpreted with great caution as possibility of aerial contamination was not completely ruled out. Two results are interesting: a) *Gilmaniella humicola* is a rather rare fungus previously reported only from soil and b) different fungi are recovered from algal thalli of the same genus. Perhaps algal species within a genus represent different substrate types for fungi.

5. *Chytrids and thraustochytrids* — Autecological considerations of several species that I found are possible in light of already existing literature. Wide ecological amplitude of *Rhizophycis rosea* and *Rhizophydium sphaerotheca* is well known (6). Occurrence of *R. rosea* fits the model of a fungus in dry, high or low pH sites (6, 87). (Moisture and pH in my study are inferred from the habitat type and as such are relative). Presence of *R. sphaerotheca* in moist low pH sites is expected (6, 9). *Chytromyces annulatus* (14) and *C. poculatus* (24) were originally described from low pH sites and their Brazilian distribution is similar. Both are frequently encountered in leaf litter on sand (Booth, unpublished data) in Manitoba, Canada. *Phyctochytrium furcatum* (74) is a species of low pH and high organic matter sites with a drying and wetting cycle. Occurrence of *Nowakowskia ramosa* implies that at least a fraction of the environment is waterlogged and organic matter is high (9, 85, 88). *Phyctochytrium spectabile*, originally described from alkaline soils (79), is associated with organic matter in my study. Perhaps it is associated somehow with sand fractions of collections and is part of an ecological group, including *P. africanum* Gaertner, *P. reinboldiae* and *P. palustre* Gaertner among others, which is associated with organic matter

affected by high calcium and magnesium levels. *Chytriumyces hyalinus*, contrary to a previous designation, is a species of neutral pH and low or high pH sites (3) *Phlyctochytrium mangrovi* (83) is a fungus found in acid, low organic matter level, water logged freshwater influenced sites. *Thraustochytrium* species show similar distribution patterns as previously reported (6).

6. Nematode fungi — Perhaps washing techniques provide a partial solution to the question (41) as to why only a few predacious fungi have been reported from marine habitats. Washing certainly reduces competition from heavily sporulating forms and allows slower growing forms to develop. Thus far there are approximately 22 species of predacious fungi recorded from marine ecosystems (29, 41, 62).

Arthrobotrys superba Corda, reported from the marine environment (29), produces a salmon-pink color in culture. Therefore, the pigmented substance that I observed seems to exist in other nematodes trappers. Its solubility and action with acids and bases indicates a highly polar compound capable of functioning as an indicator such as bromophenol red. Whether or not it is inhibitory to fungal growth remains to be established but it is clear that my *Arthrobotrys* isolate which is slow growing, is inhibitory to other fungi which are common to the same substrate. Perhaps some nematophagous fungi have evolved inhibitor substances which act directly on competitors.

Scytalidium species produce substances antagonistic to other very active fungi (2, 44). In culture with *Arthrobotrys dactyloides* this inhibition was not evident and possibly the latter species has evolved yet another system for limiting its competitors. As a ring former *A.*

dactyloides is a poor saprophytic competitor for substrate (29) and limitation of other fungi is important.

An efficient nematode predator, as implied in my study, *Arthrobotrys dactyloides* possibly requires organic nitrogen as provided by nematodes. Although network nematophagous fungi are able to effectively utilize nitrites and nitrates, indicating a lack of dependence on nematode trapping for nitrogen (29), the nutrient is required and possibly at a high concentration. This may be implied from evolution of the nematophagous habit. Nitrogen levels in *Rhizophora mangle* leaves increase on a per gram basis during decomposition (19). Perhaps adaptation to a high nitrogen level provides yet another means of limitation of competition for substrate.

These interactions are certainly very interesting and the hypotheses offered are preliminary attempts to explain some substrate relationships.

Acknowledgments

I wish to thank Dr. A. I. Milanez for extensive use of laboratory facilities and technical assistance during this study. Dr. João Lunetta kindly provided space in São Sebastião laboratories of Instituto de Biologia Marinha. Ms. J. McKenzie and Miss Rosely Gomes da Silva provided invaluable technical assistance in the laboratories, Mrs. Sandra Farto Botelho Trufem willingly and freely commented on several aspects of this communication during preparation. Finally, this study was accomplished during sabbatical leave from the University of Manitoba and together with NRCC A6682, represented partial material support of the research.

References

1. Arx, J.A. von — Genera of fungi sporulating in pure culture. Vaduz, J. Cramer, 1974.
2. Aufsess, H.V. — The effect of several antagonists on the growth of the mycelium of some wood destroying fungi. Mater. und Org., 11:183-196, 1976.
3. Barnett, H.L. & Hunter, B.B. — Illustrated genera of imperfect fungi. Minneapolis, Minn. (U.S.A.). Burgess Publ., 1972.
4. Barron, G.L. — Genera of hyphomycetes from soil. Baltimore, Williams and Wilkins Company, 1968.
5. Booth, T. — Distribution of certain soil inhabiting chytrid and chytridiaceous species related to some physical and chemical factors. Can. J. Bot., 49:1743-1755, 1971.
6. Booth, T. — Marine fungi from British Columbia: monocentric chytrids and chytridiaceous species from coastal and interior halomorphic soils. Sysis, 2:141-161, 1969.
7. Booth, T. & Barrett, P. — Occurrence and distribution of zoosporic fungi from Devon Island, Canadian Eastern Arctic. Can. J. Bot., 49:359-369, 1971.

8. Booth, T. & Barret, P. — Taxonomic and ecologic observations of zoosporic fungi in soils of a high-arctic ecosystem. *Can. J. Bot.*, 54:533-538, 1976.
9. Booth, T. & Miller, C.E. — Comparative morphologic and taxonomic studies in the genus *Thraustochytrium*. *Mycologia*, 60:480-495, 1968.
10. Brooks, R.D. — Effect os salinity and season on sequence of occurrence of marine lignicolous fungi on uncolonized wood bits. *Abs. Sec. Int. Myc. Cong.*, p. 71, 1977.
11. Byrne, P.J. & Jones, E.B.G. — Lignicolous marine fungi. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. (Suppl.)*, 5:301-320, 1974.
12. Churchland, L.M. & McClaren, M. — Marine fungi isolated from a kraft pulp mill outfall area. *Can. J. Bot.*, 51:1703-1710.
13. Curillera Coll, J.F. — Algas marinhas bentônicas do Uruguai. São Paulo, U.S.P., 1976. (Tese PhD.).
14. Dogma, I.J. — Additions to the phycomycete flora of the Douglas Lake region. VIII — *Chytriumyces annulatus* sp. nov. and notes on other zoosporic fungi. *Nova Hedwigia*, 18:349-365, 1969.
15. Eggin, H.O.D. & Pugh, G.J.F. — Isolation of cellulose decomposing fungi from the soil. *Nature*, 193:94-95, 1962.
16. Ellis, M.B. — Dematiaceous hyphomycetes. Kew, Surrey Commonwealth Mycological Institute, 1971.
17. Ellis, M.B. — More dematiaceous hyphomycetes. Kew, Surrey Commonwealth Mycological Institute, 1976.
18. Fell, J.W. & Master, I.M. — Phycomycetes (*Phytophthora* spp. nov. and *Pythium* sp. nov.) associated with degrading mangrove (*Rhizophora mangle*) leaves. *Can. J. Bot.*, 53:2908-2922, 1975.
19. Fell, J.W.; Master, I.J.; Newell, S.Y. & Tallman, A.S. — The role of fungi in the red mangrove (*Rhizophora mangle*) detrital system. *Abs. Sec. Int. Myc. Cong.*, p. 192, 1977.
20. Gambale, W.; Purchio, A. & Croce, J. — Flora fúngica anemófila da grande São Paulo. *Rev. Microbiol. (São Paulo)*, 8:74-79, 1977.
21. Gessner, R.V. — Seasonal occurrence and distribution of fungi associated with *Spartina alterniflora* from a Rhode Island estuary. *Mycologia*, 69:477-491, 1977.
22. Gessner, R.V. & Goos, R.D. — Fungi from decomposing *Spartina*. *Can. J. Bot.*, 51:51-55.
23. Gessner, R.V. & Goos, R.D. — Fungi from *Spartina alterniflora* in Rhode Island. *Mycologia*, 65:1296-1301, 1973.
24. Gessner, R.V. & Kohlmeyer, J. — Geographical distribution and taxonomy of fungi from salt marsh *Spartina*. *Can. J. Bot.*, 54:2023-2037, 1976.
25. Hariot, P. — Note sur le genre *Mastodia*. *J. Bot. (Moorot)*, 1:231-234, 1889.
26. Hariot, P.A. — Champignons. In: — Mission scientifique du Cap Horn, 1882-1883. *Botanique*, p. 1-109, 173-200, 1889.
27. Harley, J.R. & Waid, J.S. — A method of studying active mycelia on living roots and other surfaces in the soil. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 38:104-118, 1955.
28. Henningsson, M. — Aquatic lignicolous fungi in the Baltic and along the west coast of Sweden. *Svensk. Bot. Tidskr.*, 68:401-425, 1974.
29. Hughes, G.C. — Geographical distribution of the higher marine fungi. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. (Suppl.)*, 5:419-441, 1974.
30. Hughes, G.C. — Intertidal lignicolous fungi from Newfoundland. *Can. J. Bot.*, 46:1409-1417, 1968.
31. Hughes, G.C. — Studies of fungi in oceans and estuaries since 1961. I — Lignicolous, caulicolous and foliicolous species. *Oceanogr. Mar. Biol. Ann. Rev.*, 13:69-180, 1975.
32. Hughes, G.C. & Chamut, P.S. — Lignicolous marine fungi from southern Chile, including a review of distribution in the southern hemisphere. *Can. J. Bot.*, 49:1-11, 1971.
33. Hughes, S.J. — Conidia, conidiophores and classification. *Can. J. Bot.*, 31:577-659, 1953.
34. Johnson, T.W. — The estuarine mycoflora. In: — Estuaries. Washington, D.C., Amer. Assoc. Adv. Sci., p. 303-305, 1967.
35. Johnson, T.W. & Sparrow, F.K. — Fungi in oceans and estuaries. Weinheim, J. Cramer Company, 1961.
36. Jones, E.G.B. — Aquatic fungi: freshwater and marine. In: — Biology of plant litter decomposition. New York, Academic Press, 1974.
37. Jones, E.G.B. — The decay of timber in aquatic environments. *Brit. Wood Preserv. Assoc. Ann. Conv.*, p. 1-18, 1972.
38. Jones, E.G.B. — The distribution of marine fungi on wood submerged in the sea. In: — Biodeterioration of Materials. Proc. 1st Int. Biodeterioration Symp. New York, Elsevier Publ., 1968.
39. Jones, E.G.B. — The ecology and rotting ability of marine fungi. In: — Marine borers, fungi and fouling organisms of wood. Paris, O.E.C.D., 1971.
40. Jones, E.G.B. — Lignicolous and algicolous fungi. In: — Recent advances in aquatic mycology. London, Paul Elek, 1976.
41. Jones, E.G.B. — Topics of further interest. In: — Recent advances in aquatic mycology. London, Paul Elek, 1976.
42. Jones, E.G.B. & Irvine, J. — The role of fungi in the deterioration of wood in the sea. *Jour. Inst. Wood Sci.*, 5:31-40, 1971.
43. Kendrick, W.B. & Carichael, J.W. — Hyphomycetes. In: — The fungi and advanced treatise, a taxonomic review with keys: ascomycetes and fungi imperfecti. New York, Academic Press.
44. Klingstrom, A. & Beyer, L. — Two new species of *Scytalidium* with antagonistic properties to *Fomes annosus*. *Svensk. bot. Tidskr.*, 59:30-36, 1965.
45. Kohlmeyer, J. — Ecological notes on fungi in mangrove forests. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 53:237-250, 1969.
46. Kohlmeyer, J. — Ecological observations on arenicolous marine fungi. *Z. allg. Mikrobiol.*, 6:95-106, 1966.
47. Kohlmeyer, J. — The importance of fungi in the sea. In: — Symposium on marine microbiology. Springfield, C.C. Thomas Company, 1963.
48. Kohlmeyer, J. — Marine fungi of Hawaii including the new genus *Helicascus*. *Can. J. Bot.*, 47:1469-1487, 1969.
49. Kohlmeyer, J. — Marine fungi from South America. *Mitt. Inst. Colombo-Aleman Invest. Cient.*, 8:33-39, 1976.
50. Kohlmeyer, J. — Marine fungi from the tropics. *Mycologia*, 60:252-270, 1968.

51. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Bermuda marine fungi. *Trans. Br. Myc. Soc.*, 68:207-219, 1977.
52. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Biology and geographical distribution of *Spathylospora* species. *Mycologia*, 67:629-637, 1975.
53. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — *Icones fungorum maris*. Lehre, J. Cramer, 1964.
54. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Marine fungi from tropical America and Africa. *Mycologia*, 63:831-861, 1971.
55. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Permanent microscopic mounts. *Mycologia*, 64:666-669, 1972.
56. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Synoptic plates of higher marine fungi. Weinheim, J. Cramer, 1964.
57. Kohlmeyer, J. & Kohlmeyer, E. — Synoptic plates of higher marine fungi: an identification guide for the marine environment. Lehre, J. Cramer, 1971.
58. Malacalza, L. & Martinez, A. — Ascomycetes marinos de Argentina. *Bol. Soc. argent. Bot.*, 14:58-72, 1971.
59. Meyers, S.P. — Contribution of fungi to biodegradation of *Spartina* and other brachish marshland vegetation. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl.*, 5:357-375, 1974.
60. Monoson, H.L. — Trapping effectiveness of five species of nematophagous fungi cultured with mycophagous nematodes. *Mycologia*, 60:688-801.
61. Newell, S.Y. — Mangrove fungi: succession in the mycoflora of red mangrove (*Rhizophora mangle* L.) seedlings. In: — Recent advances in aquatic mycology. London, Paul Elek, 1976.
62. Newell, S.Y.; Cefalu, R. & Fell, J.W. — *Myzochytrium*, *Haptoglossa* and *Gonimochaete* (fungi) in littoral marine nematodes. *Bull. Mar. Sci.*, 27:177-207, 1977.
63. Oliveira Filho, E.C. — Algas marinhas bentônicas do Brasil. São Paulo, U.S.P., 1969. (Tese Ph.D.).
64. Parkinson, D. — Soil micro-organisms and plant roots. In: — Soil biology. London, Academic Press, 1967.
65. Pugh, G.J.F. — Fungal colonization of a developing salt marsh. *Nature*, 190:1032-1033, 1961.
66. Pugh, G.J.F. — Studies on fungi in coastal soils. I — *Cercospora salina* Sutherland. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 45:255-260, 1962.
67. Pugh, G.J.F. — Studies on fungi in coastal soils. II — Fungal ecology in a developing salt marsh. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 45:560-566, 1962.
68. Pugh, G.J.F. & Dickinson, C.H. — The mycoflora associated with *Halimione portulacoides*. I — The establishment of the root surface flora of mature plants. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 48:381-390, 1965.
69. Pugh, G.J.F. & Williams, G.M. — Fungi associated with *Salsola kali*. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 51:389-396, 1968.
70. Pugh, G. J. F.; Blakeman, J. P.; Morgan-Jones & Egging, H.O.W. — Studies on fungi in coastal soils. IV — Cellulose decomposing species in sand dunes. *Trans. Brit. Myc. Soc.* 46:465-571, 1963.
71. Schauman, K. — Comparative study of the fungal flora of driftwood and intertidal wood in the sea at Helgoland (German Bight). *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, 15:13-26, 1975.
72. Schauman, K. — Okologische untersuchungen über höhere Pilze im meer — und brackwasser de Deutschen bucht unter besonderer berücksichtigung der halzbesiedelnden arten. Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh., 15:79-182, 1975.
73. Shearer, C.A. — Fungi of the Chesapeake Bay and its tributaries. III — The distribution of wood inhabiting ascomycetes and fungi imperfecti of the Patuxent River. *Amer. J. Bot.*, 59:961-969, 1972.
74. Sparrow, F.K. — A new bog chytrid. *Arch. f. Microbiol.*, 3:178-180, 1966.
75. Spegazzini, C. — Fungi Argentini additis nonnullis Brasiliensibus Montevideensisbusque. *An. Soc. Cient. Argent.* 13:256-260, 1882.
76. Subramanian, C.V. & Raghu Kumar, S. — Ecology of higher fungi in soils of marine and brackish environments in and around Madras. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh. Suppl.*, 5:377-402, 1974.
77. Tubaki, K. — Marine fungi from Japan. *Lignicolous I — Trans. Myc. Soc. Japan*, 7:73-87, 1966.
78. Tubaki, K. — Studies on the Japanese marine fungi, lignicolous group (III), algicolous group and a general consideration. *Ann. Rep. Inst. Ferment. (Osaka)*, 4:12-41, 1969.
79. Uebelmesser, E. — Über einige neue Chytridinene aus Erbdöden (*Olpidium*, *Rhizophidium*, *Phlyctochytrium* und *Rhizophlyctis*). *Arch. f. Mikrobiol.*, 25:307-324, 1956.
80. Ulken, A. — Phycomyceten aus der Mangrove bei Cananéia (São Paulo, Brasilien). *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* 12:313-319, 1970.
81. Ulken, A. — Physiological studies on a phycomycete from a mangrove swamp at Cananéia, São Paulo, Brazil. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, 13:217-230, 1972.
82. Ulken, A. — Sobre a ocorrência de fungos em amostras do Atlântico equatorial. Rio de Janeiro, Ministério da Marinha, Instituto de Pesquisas da Marinha. Nota técnica no. 28-66, 1966.
83. Ulken, A. — Untersuchungen über marine Pilze im äquatorialen Atlantik vor der Küste Brasiliens. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.*, 10:107-115, 1966.
84. Visser, S. & Parkinson, D. — Fungal succession on aspen poplar leaf litter. *Can. J. Bot.*, 53:1640-1651, 1975.
85. Willoughby, L. — The ecology of some lower fungi at Esthwaite water. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 44:305-332, 1961.
86. Willoughby, L.G. — Ecological work on the lower fungi in freshwater substrate relationships. *Veröff. Inst. Meeresforsch. Bremerh.* 3:125-132, 1968.
87. Willoughby, L.G. — The ecology of some lower fungi in the English Lake District. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 45:121-136, 1962.
88. Willoughby, L.G. — A study of Chytridiales from Victoria and other Australian soils. *Arch. f. Microbiol.*, 52:101-131, 1965.
89. Willoughby, L.G. & Townley, P.J. — Two new saprophytic chytrids from the lake district. *Trans. Brit. Myc. Soc.*, 44:177-184, 1961.

Epizootia provocada por um bacilo difteróide em serpentes mantidas em biotério

Reynaldo Schwindt Furlanetto*
 Helio Emerson Belluomini**
 Hideyo Iizuka**
 & Raymundo Rolim Rosa**

Resumo

No presente informe, é descrito o isolamento de bacilo difteróide de uma moléstia infecto-contagiosa, até então não descrita, de caráter epizoótico, que acometia cerca de 70% das serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* produtores de venenos destinados ao preparo de soros antiofídicos. A prevenção da moléstia somente foi conseguida através da imunoprofilaxia, com o emprego de vacina tipo Wright, inativada pelo formol. A sua eficiência foi avaliada pela redução da incidência da infecção que, de 70%, caiu para 0,40%.

Summary

Etiology and prophylaxis of a new epizooty in snakes maintained in captivity

Isolation of an etiological agent of a new infecto-contagious disease, of epizootic character, affecting approximately 70% of the snakes of the genera *Bothrops* and *Crotalus*, maintained in captivity to obtain the venoms for anti-ophidic serum production. Prophylaxis against the disease was achieved through a vaccine, prepared in liquid medium, inactivated by formol, whose effectiveness could be evaluated by the reduction from 70% to 0.4% in the indice of infection.

Introdução

O estabelecimento de um padrão para a microbiota bucal de serpentes tem sido objeto de pesquisa por diversos autores, por ser indispensável para o estudo dos processos infecciosos que acometem esses animais (1, 5, 8, 10). Entre estes, "Mouth rot" (6, 13, 14), causado por *Pseudomonas fluorescens* e *Pseudomonas fluorescens liquefaciens*, foi descrito por Burstscher (4). Outras ocorrências desta natureza foram também relatadas por Reinhard, em coleções de répteis mantidos cativos em zoológico (9). Page, em 1961, estudando casos de "Mouth rot", isolou *Bacillus fluorescens liquefaciens* Flugge, 1886, e experimentalmente, reproduziu o quadro ulcerativo (7). Associadas a esta infecção, foram também encontradas bac-

térias dos gêneros *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Proteus* e *Haemophilus* (7).

Em 1962, Soerensen & cols. descreveram uma afecção manifestada em serpentes de biotério, no Instituto Butantan, denominada "gota úrica visceral". Os sinais clínicos foram eliminados pela manutenção dos animais em temperatura ambiental entre 28 a 32°C (12).

Recentemente, um surto de uma nova moléstia infecto-contagiosa, de caráter epizoótico, até então não descrita, acometeu cerca de 70% das serpentes dos gêneros *Bothrops* Linnaeus, 1758 e *Crotalus* Wagler, 1824, mantidas no mesmo biotério. Esta doença, se traduzia pela formação de u'a massa caseosa, de coloração branco-amarelada, de odor fétido, e que invadia

* Departamento de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas da USP, Serviço de Imunoterapia do Instituto Butantan (in memoriam).

** Instituto Butantan, Caixa Postal 65, 01000 São Paulo, SP.

pre lesando as glândulas veneríferas, resultando na morte de 25% dos ofídeos comprometidos.

No presente informe, são descritos o isolamento do agente etiológico da estomatite caseosa, e o tratamento profilático então adotado.

Material e Métodos

Coleta das amostras e preparação do material para exame — Os animais pertencentes aos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* portadores da estomatite caseosa procediam do Biotério de Serpentes do Instituto Butantan, onde eram mantidos em cativeiro em gaiolas individuais. O material era colhido com auxílio de espátula esterilizada, diretamente da cavidade bucal e recolhido em tubos de ensaio, 16 × 160mm, também esterilizados. Em seguida, eram homogeneizados e emulsionados em solução fisiológica estéril a 0,85% de NaCl, para o exame bacterioscópico e a cultura.

Cultura do material e isolamento do agente etiológico — A semeadura era imediatamente feita em meios de cultura básicos, meio de Zaissler modificado (agar sangue desfibrinado de carneiro, a 10%) e meio de Loeffler (2). As placas eram incubadas em estufa, à temperatura de 37°C, durante o período de 48 horas, sendo observadas a cada 24 horas. Das colônias desenvolvidas e isoladas eram feitos esfregamentos, corados pelos métodos de Gram e de Ziehl-Nielsen. O isolamento foi feito a partir da cultura procedente das amostras desenvolvidas em agar sangue e no meio de Loeffler. Os germens isolados foram mantidos em meio de Lignières, com camada de óleo mineral previamente esterilizado.

Reprodução experimental da moléstia e reisolamento do agente etiológico — Suspensões do microrganismo isolado, bem como os filtrados estéreis de suas culturas eram inoculados, via submucosa bucal em serpentes do gênero *Crotalus* com o objetivo de se verificar a reproduzibilidade do quadro clínico, típico da estomatite caseosa, inclusive a morte do animal. O mesmo material era inoculado em cobaias e camundongos normais, para se determinar a patogenicidade do microrganismo.

Teste de sensibilidade aos antibióticos e qui-

mioterápicos — Estas provas foram feitas de acordo com o método de Kirby-Bauer, seguindo as observações constantes nos trabalhos de Rocha & col. (11) e realizada frente aos seguintes agentes: Penicilina, Estreptomicina, Tetraciclina, Eritromicina, Furacin, Bacitracina, Cloranfenicol, Kanamicina, Novobiocina, Neomicina, Oleoandomicina e Sulfatiazol.

Preparo da vacina — A vacina utilizada — tipo Wright — era constituída por uma suspensão de germes cultivados em caldo simples e inativados através de uma solução de formol a 0,4% e incubada em estufa bacteriológica, a 37°C, durante 7 dias, com agitação freqüente. Em seguida, eram realizadas as provas de inocuidade e de esterilidade, pelos métodos convencionais e, então, distribuídas em ampolas brancas, em volume de 10ml.

Profilaxia da infecção — A vacinação foi feita em duas doses de 0,5ml pela via intramuscular, em todas as serpentes hígidas existentes no biotério, bem como em todas aquelas que passaram a ser recebidas pelo Instituto Butantan.

Resultados e Discussão

Dentre as bactérias isoladas do material caseoso, uma delas apresentava uma colônia de cerca de 2mm de diâmetro que, com o envelhecimento das culturas, atingia um diâmetro de até 5mm, e desenvolvia halo de hemólise em agar sangue de carneiro.

O exame bacterioscópico revelou a presença de bacilos Gram positivos, sem granulações e sem esporos, cujo tamanho e disposição em paliçada e, também numerosas formas em "V", "L" ou "Y", além da hemólise em meio de Zeissler modificado, nos possibilitaram aventar da possibilidade de tratar-se de bacilos difteróides. Por esta razão, os designamos de Difteróide B.

Este germe, quando inoculado pela via submucosa bucal em serpentes hígidas dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops*, se apresentava altamente virulento reproduzindo, sistematicamente, a doença. Os dados constantes da Tabela 1, permitem o acompanhamento da evolução da doença, experimentalmente induzida em serpentes do gênero *Crotalus*. Ela se iniciava com o aparecimento de intensa hiperemia da mucosa gengival, acompanhada de acentuado edema, que provocava espessamento da membra-

Tabela 1 — Reprodução experimental da estomatite caseosa em *Crotalus*

Serpente nº	dose ml	Observação em dias						
		1	2	3	6	15	30	37
11	0,25	H	+					
12	0,25	+						
13	0,25	H	E	E	MC	MC	MC	MC
14	0,10	H	H	E	MC	MC	MC	+
15	0,10	H	E	E	+			
16	0,10	H	E	E	MC	MC	MC	MC

H = Hiperemia

E = Edema

MC = Massa caseosa

+ = Morte

* = Os animais com sobrevida acima de 45 dias, recuperaram-se da doença

na mucosa que reveste as presas. Após o período de 6 a 15 dias, desenvolvia-se u'a massa caseosa aderente, de aspecto branco-amarelado, dotada de odor fétido, característico. Esta massa, muitas vezes, invadia completamente a cavidade bucal que ficava permanentemente entebreta. Em conseqüência, o animal não se alimentava (Fig. 1). Geralmente observava-se concomitantemente, lesões das glândulas venéferas.

Com a evolução do edema, toda a cabeça ficava comprometida, assumindo aspecto arre-

Figura 1 — Estomatite caseosa experimental. Observar a aderência na mucosa gengival

dondado perdendo, conseqüentemente, o seu formato triangular, característico destas espécies.

Os dados constantes da Tabela 1 permitem constatar que a inoculação de 0,25ml da suspensão da cultura de 24 horas, pela via submucosa bucal, provocava a morte prematura dos animais. Reduzindo-se a dose para 0,10ml, reproduzimos a doença, que apresentava todo o seu quadro evolutivo característico, culminando com o desenvolvimento de massa caseosa e, finalmente, a morte do animal.

Das lesões experimentalmente induzidas, o agente bacteriano sempre foi isolado.

A atividade toxigênica do bacilo em questão, foi constatada em lotes de 10 serpentes do gênero *Crotalus*, inoculadas com filtrado estéril de cultura em caldo. Através dos informes da Tabela 2 constata-se que, embora ocorram manifestações precoces individuais, os primeiros sintomas iniciam-se ao redor de um mês após a inoculação e, o quadro aparentemente sutil em seu início, geralmente culmina com a morte do réptil, na dose de 1ml de exotoxina, por animal.

Doses variadas da suspensão do microrganismo por nós isolado, inoculadas por via submucosa ou intravenosa nos animais experimentais, revelou a sua patogenicidade para cobaios e camundongos. Estes, demonstraram serem altamente sensíveis, inclusive quando inoculados pelas vias intraperitoneal e submucosa bucal.

Os sintomas mais comumente observados nos cobaios foram: paralisia dos membros, contraturas musculares, afrouxamento da mus-

Tabela 2 — Inoculação intramuscular do filtrado estéril da cultura de difteróide B, em serpentes do gênero *Crotalus*

Serpentes nº	Dose ml	Diluição	Observação em dias					
			1	2	27	33	35	45*
21	1	1/8	SS	SS	SS	SS	SS	SS
22	1	1/8	SS	SS	+			
23	1	1/4	SS	SS	SS	SS	SS	SS
24	1	1/4	SS	SS	SS	SS	SS	SS
25	1	1/2	+					
26	1	1/2	SS	SS	SS	SS	SS	SS
27	1	1/1	SS	SS	SM	+		
28	1	1/1	SS	SS	SS	SG	+	
29	1	1/1	SS	SS	SM	+		
30	1	1/1	SS	SS	SS	SM	+	

SS = Sem sintoma

SM = Sintoma médio

SG = Sintoma grave

+ = Morte

* = Após 45 dias, os animais que sobreviveram, permaneceram sem sintomas

culatura abdominal e a morte. No local da inoculação, foram observadas formações de nódulos salientes, que podiam evoluir para a necrose lembrando o quadro das manifestações locais quando da inoculação de toxina diftérica.

As provas bioquímicas não possibilitaram correlacionar o microrganismo em questão com nenhum outro, anteriormente descrito. As nossas suposições de se tratar de bacilos do grupo dos difteróides (3), basearam-se em seus aspectos morfológico e cultural.

Em virtude do caráter epidêmico que a afecção assumiu no biotério, provavelmente a transmissão do agente, de um animal para outro, seja devida ao processo empregado na extração de veneno quando a boca de uma serpente é apoiada e comprimida sobre o mesmo recipiente que serviu a outra extrações (Fig. 2).

Apesar de Kauffeld (6) ter obtido êxito no tratamento de "mouth rot" com o emprego de sulfaderivados, o resultado de antibiograma revelou ser este fármaco ineficaz ao Difteróide B (Tabela 3).

Face aos resultados verificados no teste de sensibilidade aos antibióticos, foram inoculados em serpentes (que pertenciam a diferentes lotes de animais que se encontravam nas mais diversas fases da evolução da doença) cloranfenicol na dose de 20mg por kilograma de peso do animal, pela via intramuscular, durante três dias sucessivos, perfazendo um total de 60mg de fármaco (Tabela 3). Apesar da alta sensibili-

dade apresentada "in vitro" os resultados terapêuticos não foram satisfatórios na posologia por nós utilizada. Por esta razão, resolvemos prosseguir as nossas observações no tratamento da doença, utilizando recursos de imunoterapia.

Desta forma, foi realizada a tentativa de prevenir a infecção das serpentes normais, recém introduzidas no biotério do Instituto Butantan, através de uma vacina específica, constituída

Tabela 3 — Resultados de antibiograma

Agente	Resultado	Agente	Resultado
Penicilina	-	Cloranfenicol	+
Estreptomicina	±	Kanamicina	±
Tetraciclina	-	Novobiocina	-
Eritromicina	-	Neomicina	-
Furacin	-	Oleandomicina	-
Bacitracina	-	Sulfatiazol	-

- = Resistente

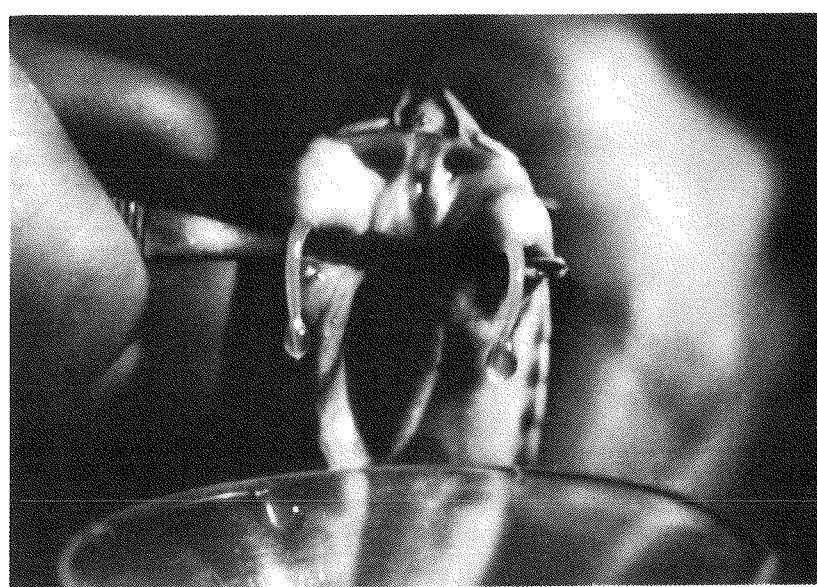
± = Moderadamente sensível

+= Sensível

Tabela 4 — Serpentes examinadas

Discriminação	Nº de animais	Percentual
Doentes	1.269	69,92%
Hígidas	546	30,08%
Total	1.815	100%

Figura 2 — Extração e coleta de veneno



de suspensão de cultura formolizada a 0,4%, e aplicada em duas doses sucessivas, por via intramuscular, no terço médio do corpo do ofídeo, abaixo da região dorsal.

Esta vacina apresentou ser altamente eficiente, pois previu, quase por completo, a estomatite caseosa das serpentes, provocada pelo microrganismo, reduzindo o índice de mortalidade desses ofídeos de 25% para 0,4% (Tabela 5 e 6).

A eficiência desta medida também pode ser avaliada pela redução a 0,40% (Tabela 6) da incidência anterior, da moléstia, na ordem de 70% (Tabela 4).

Desta forma, graças à medidas imunoprofiláticas e imunoterápicas introduzidas, obtivemos a erradicação da epizootia, permitindo a normalização da produção de venenos ofídicos, indispensáveis para a produção do soro curativo anti-ofídico.

Tabela 5 — Número e percentual de serpentes mortas e sobreviventes à epizootia

Discriminação	Nº de animais	Percentual
Mortos	543	24,96%
Sobreviventes	1.272	75,04%
Total	1.815	100%

Tabela 6 — Resultado da vacinação de serpentes dos gêneros *Crotalus* e *Bothrops* (x)

Serpentes	Imunizados	Mortos	Percentual
<i>Crotalus</i>	87	0	0%
<i>Bothrops</i>	655	3	0,46%
Total	742	3	0,40%

(x) = Período de observação de 4 (quatro) meses

Referências Bibliográficas

1. Aronson, J.D. — Spontaneous tuberculosis in snakes. Arch. Path., 8:159, 1929.
2. Bier, O.G. — Bacteriologia e Imunologia. 18. ed. São Paulo, Melhoramentos, 1977.
3. Breed, R.S.; Murray, E.G.D. & Smith, N.R. — Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 7th. ed. Baltimore, Williams & Wilkins, 1957.
4. Burstscher, J. — Ueber die Mundfäule des Schlangen. Zool. Garten, 4:235-244, 1931.
5. Jaksztien, K.P. & Petzold, H.G. — Durch Salmonella Infektion bedingte Schwierigkeiten bei der Aufzucht Schlangen und ihre Behandlung. Bl. Aqu. Terrk., 6:79-80, 1959.
6. Kauffeld, C.F. — Newer treatment of mouth rot in snakes. Herpetologica, 9:132, 1953.
7. Page, L.A. — Experimental ulcerative stomatitis in king snakes. Cornell Vet., 51:259-266, 1960.
8. Patrick, R. & Werkman, C.H. — Notes on the bacterial flora of the snakes. Proc. Iowa Acad. Sci., 37:330, 1930.
9. Reinhard, W. — Ueber die Mundfäule der Schlangen. Bl. Aqu. Terrk., 318-321, 1927.
10. Reichenback-Klinke, H. & Elkan, E. — The principal diseases of lower vertebrates. Academic Press, London / New York, 1965.
11. Rocha, H.; Zuliani, M.E. & Trabulsi, L.R. — Antibograma. Rev. Microbiologia (S. Paulo), 3:51-60, 1972.
12. Soerensen, B.; Planet do Amaral, J.; Belluomini, H. E.; Saliba, M.A.; Correa, H.S. & Hoge, A.R. — Gôta úrica visceral em serpentes — *Crotalus durissus terrificus* (Laurenti, 1768). Arq. Instituto Biológico, 29:271-275, 1962.
13. Wagner, C.E. — Mouth rot, a common disease of snakes. Bull. Nat. Hist. Soc. Maryland, 5:20-23, 1934.
14. Williams, F.E.; Freeman, M. & Kennedy, E. — The bacterial flora of the mouth of Australian venomous snakes in captivity. Med. J. Australia, 11:190, 1934.

Avaliação imunogênica de vacina contra a Influenza eqüina*

Carlos Gil Turnes

João Carlos M. Alves Pereira

& Clóvis Moreira

Resumo

Vacina bivalente, inativada contra a Influenza eqüina, elaborada no Brasil, foi aplicada em 10 potros, mantidos em condições de campo. Outros quatro, do mesmo rebanho, foram mantidos como testemunhos. Todos os potros tinham títulos de anticorpos IHA inferiores a 5 UIHA/ml, para os dois vírus, no começo da experiência. 100% dos potros vacinados apresentou títulos superiores a 40 UIHA de vírus A eqüi 1 e os 87,5% a 80 UIHA de vírus A eqüi 2, até os 104 dias post vacinação. A resposta antigênica, induzida pela vacina brasileira e vacinas européias, é discutida.

Summary

Immunogenic evaluation of equine Influenza vaccine

Ten one year old horses without clinical history of respiratory diseases, were vaccinated with a bivalent Equine Influenza vaccine. This vaccine was elaborated with concentrated virus, replicated in embrionated hen eggs, inactivated with formol and using Aluminum hydroxide as an adjuvant. The animals were vaccinated twice at 21 days interval. Blood samples were collected at 0,21, 41, 75, 104 and 131 days. Four unvaccinated horses were used as controls. Sera were inactivated at 56°C/30min., Kaolin treated and diluted twofold in saline. The dilutions were tested with 4HAU of A equi 1 and A equi 2 viruses, respectively, incubated at room temperature for 30min, and using 0,5% chicken red blood cells. All vaccinated animals had less than 5 HAIU at 0 day. Mean titre of antibodies against A equi 1 virus of sera collected at day 21 was 97,5 HAIU, at day 41 was 360 HAIU, at day 75 was 516 HAIU, at 104 days was 320 HAIU and at day 130 was 16 HAIU. Mean titre of antibodies against A equi 2 virus were: 53,3 HAIU at 21 days, 220 HAIU at 41 days, 608 HAIU at 75 days, 105 HAIU at 104 days and 10 HAIU at 131 days. Control horses had no detectable antibody titres (titre < 5 HAIU) during the experiment. All the vaccinated horses had antibody titres against A equi 1 virus higher than 40 HAIU and 87,5% of them higher than 80 HAIU of A equi 2 virus until 104 days, falling to 20 and 0% respectively at 131 days.

Introdução

A gripe eqüina (Influenza eqüina) apresenta-se esporadicamente nos rebanhos eqüinos brasileiros, afetando tanto cavalos de esporte (corrida ou polo), como de trabalho. O curso da doença é de, aproximadamente, uma semana, caracterizando-se as manifestações patológicas por necrose do epitélio de condutos aéreos, as que permitem a colonização, multiplicação e penetração de bactérias que complicam o qua-

dro de Influenza, levando até a produção de pneumonias exudativas, purulentas e a morte.

Dois vírus, antigenicamente diferentes, foram isolados de casos de Influenza eqüina. O denominado A/eqüino/Praga/1/56 (Heq 1 Neq 1) e o denominado A/eqüino/Miami/2 (Heq 2 Neq 2) (10). Os dois vírus foram isolados no Brasil, o A eqüi 2, em 1963 (9) e 1969 (4) e o A eqüi 1, em 1976 (5, 11).

Bryans & col. e Delagneau & col. (2, 6) demonstraram a possibilidade de prevenir a In-

* Departamento de Pesquisas de Leivas Leite S.A. Indústrias Químicas e Biológicas, Rua Benjamin Constant 1637, 96100 Pelotas, RS, Brasil.

fluenza equina, mediante a utilização de vacinas inativadas bivalentes, porém Bryans & col. (2) comunicam que a qualidade antigênica do vírus A equi 2 é significativamente mais baixa que A equi 1.

Hobson, Curry & Beare (8) demonstraram estreita correlação entre o nível de proteção à infecção humana e o título de anticorpos inibidores da hemoaglutinação.

Bryans & col. (2) demonstraram que cavalos com títulos de vírus A equi 1 de 40 UIHA ou mais elevados não contraíram a doença, no curso de uma epizootia. Estas comprovações permitem avaliar o comportamento imunogênico de uma vacina, dentro de uma população, determinando a capacidade indutora de formação de anticorpos inibidores da hemoaglutinação.

Avaliação de vacinas contra a Influenza equina já foi realizada, vacinando-se potros de seis meses de idade (7) e cavalos adultos (2, 6, 7).

A finalidade deste trabalho foi avaliar o comportamento imunogênico de uma vacina contra a Influenza equina, elaborada no Brasil, em potros mantidos em condições de campo, isto é, sujeitos às variações climáticas e nutricionais, como ocorre com o rebanho equino gaúcho.

Material e Métodos

Foram vacinados 10 potros crioulos, com um ano de idade, mantidos em condições de campo, sem antecedentes clínicos de doenças respiratórias: quatro potros, integrantes do mesmo rebanho, serviram como testemunhos, ao longo da experiência.

Uma vacina comercial*, que possui vírus A equi 1 e A equi 2 replicados em cavidade alantóidea de ovos de galinha embrionados, concentrados e inativados, e hidróxido de alumínio, como adjuvante, foi aplicada por via intramuscular profunda, em duas doses de 2ml com 21 dias de intervalo. Amostras de sangue foram coletadas a 0, 21, 41, 75, 104 e 131 dias.

Os soros foram inativados a 56°C por 30min., e tratados por caolim (3), para eliminar os inibidores inespecíficos da hemoaglutinação. Diluições base logarítmica 2 em salina foram enfrentadas a 4 UHA de vírus A equi 1 e A equi 2 respectivamente e, após 30min., à temperatura de laboratório, adicionou-se suspensão de he-

mácias de galinha a 0,5%. As leituras dos títulos inibidores da hemaglutinação foram feitas uma hora após. Os títulos foram expressados em unidades inibidoras da hemaglutinação (UIHA). As médias dos títulos foram submetidas à análise de variança e a significância estatística de suas diferenças estimada.

Resultados e Discussão

Todos os soros coletados no dia 0 da experiência tiveram título inferior a 5 UIHA. A média de anticorpos contra vírus A equi 1 dos soros coletados dia 21 pós vacinação foi 97,5 UIHA, ao dia 41 foi de 360 UIHA, ao dia 75 foi 516 UIHA, aos 104 dias 320 UIHA e ao dia 130, 16 UIHA. As variações individuais dos títulos de anticorpos são expressas na Tabela 1.

As médias de títulos de anticorpos contra vírus A equi 2 foram: 53,3 UIHA no dia 21, 220 UIHA no dia 41, 608 UIHA aos 75 dias, 105 UIHA aos 104 dias e 10 UIHA aos 131 dias (Tabela 2).

A percentagem de potros com títulos de anticorpos anti A equi 1 maiores de 40 UIHA e de anticorpos anti A equi 2 maiores de 80 UIHA nas distintas datas de coleta de sangue são expressadas na Tabela 3.

A reprodução experimental da Influenza por instilação nasal de vírus ativo não é sempre bem sucedida; daí, a avaliação da capacidade imunogênica das vacinas faz-se determinando a dinâmica dos títulos inibidores da hemoaglutinação. Hobson, Curry & Beare (8) demonstraram que, no homem o nível de anticorpos inibidores da hemoaglutinação é estreitamente cor-

Tabela 1 — Títulos de anticorpos inibidores da hemoaglutinação de vírus A equi 1

Potro	Dias de vacinado						
	0	21	41	75	104	131	
1	<5	80	640	320	320	20	
2	<5	—	—	160	320	0	
3	<5	160	—	1280	160	20	
4	<5	20	160	160	320	0	
5	<5	40	160	40	—	0	
6	<5	80	160	320	320	0	
7	<5	160	640	1280	160	0	
8	<5	80	160	640	—	0	
9	<5	160	640	640	640	80	
10	<5	—	320	320	320	40	
\bar{x}	<5	97,5	360	516	320	16	
Desvio padrão	52	222	423	138	25		
Intervalo	{ 20	160	40	160	0		
	{ 160	640	1280	640	80		

— = não realizado

* Vacina contra a Influenza Equina LEIVAS LEITE

Tabela 2 — Títulos de anticorpos inibidores da hemoaglutinação de vírus A eqüí 2

Potro	Dias de vacinado					
	0	21	41	75	104	131
1	<5	80	320	160	40	0
2	<5	—	—	160	160	0
3	<5	80	—	320	160	20
4	<5	20	80	320	80	0
5	<5	20	160	320	—	0
6	<5	80	160	320	80	0
7	<5	80	320	640	80	0
8	<5	40	80	1280	—	0
9	<5	40	320	1280	80	40
10	<5	40	320	1280	160	40
\bar{x}	<5	53,3	220	608	105	10
Desvio padrão		25	104	457	44	16
Intervalo		{ 20	80	160	40	0
		{ 80	320	1280	160	40

— = não realizado

Tabela 3 — Percentagem de potros com título de 40 UIHA/ml de vírus A eqüí 1 e 80 UIHA/ml de vírus A eqüí 2

Vírus	Dias de vacinados					
	0	21	41	75	104	131
A eqüí 1	0	87,5	100	100	100	20
A eqüí 2	0	44,4	100	100	87,5	0

relacionado com a proteção à infecção. Em referência à Influenza eqüína, comprovou-se que, em condições de campo, cavalos com títulos de 40 UIHA de vírus A eqüí 1 (2) ou 80 UIHA, de vírus A eqüí 2 (12) não apresentaram sinais clínicos da doença, nem alterações dos títulos de anticorpos durante epizootias, pelos respectivos vírus, considerando esses títulos limiares de proteção.

Utilizando este critério, pode-se observar diferente resposta dos animais vacinados frente ao antígeno A eqüí 1 e A eqüí 2, constituintes da vacina. Frente ao primeiro, 87,5% dos animais possuía título superior a 40 UIHA, três semanas após a aplicação da primeira dose, entretanto 44,4% dos animais tinha título superior a 80 UIHA de A eqüí 2, sendo a diferença das médias dos títulos significativa ($p < 0,05$). A resposta à segunda dose de antígeno, aplicada três semanas após a primovacinação, permitiu obter títulos superiores a 40 UIHA, frente a A eqüí 1, em 100% dos animais e superiores a 80 UIHA, de A eqüí 2, em 87,5%, até 104 dias da primovacinação, decrescendo rapidamente, para ficarem todos os animais com títulos inferiores ao limiar de proteção, aos 130 dias da primovacinação.

Os títulos frente aos dois vírus não se diferenciam significativamente ($p > 0,05$), durante a fase intermediária do experimento, mas só aos 104 dias observa-se uma diferença significativa ($p < 0,01$) a favor de A eqüí 1, concordando com os dados de Bryans & col. (2). Porém, a resposta antigênica frente ao vírus A eqüí 2, obtida com a vacina por nós elaborada, foi substancialmente mais elevada que a obtida por esses autores.

Da comparação das médias dos títulos de anticorpos produzidos em potros vacinados com a vacina por nós elaborada e de cavalos vacinados com vacinas européias (1,6), observa-se que as médias obtidas 21 dias após a primovacinação não diferem significativamente ($p > 0,05$). No entanto, se forem observados nos cavalos uma resposta mais elevada, quando se comparam as médias de anticorpos três semanas após a revacinação ($p < 0,05$). Quando se comparam as médias de anticorpos dos potros 54 dias após a revacinação, com a dos cavalos três semanas após a revacinação, as diferenças deixam de ser significativas ($p > 0,05$), o que indicaria mais lenta capacidade de resposta imunitária dos potros, com relação a cavalos, mesmo sendo ambos carentes de prévia sensibilização ao antígeno.

Deve-se salientar a boa resposta imunitária induzida pelo antígeno de A eqüí 2, utilizado na vacina testada, comprovando-se a média de anticorpos IHA significativamente ($p < 0,05$) mais alta que as obtidas com as vacinas europeias após a primovacinação.

Deve-se revacinar os potros entre os 110 e 120 dias após a primovacinação, devido ao desaparecimento dos títulos de anticorpos nesse período. Ackerman & Tiefembach (1) recomendam aplicar, em cavalos, a terceira dose da vacina, entre 6 a 9 meses da primovacinação.

A vacina foi adequadamente tolerada pelos potros vacinados, não observando-se reações adversas após a primovacinação nem a revacinação.

Agradecimentos

Agradece-se à acadêmica de veterinária Carmem Lúcia Valente Garcez, por sua colaboração na execução das provas de inibição da hemoaglutinação. A colaboração do Médico Veterinário Carlos Eduardo Moura e do pessoal da Estância Ipiranga, Santa Vitória do Palmar, RS, também é agradecida.

Referências Bibliográficas

1. Ackerman, O. & Tiefembach, B. — Experiencias con el uso de Prevacun para la inmunización de caballos contra la Influenza equina. *Gac. Vet. (Bs. Aires)*, 259:33-44, 1972.
2. Bryans, S.T.; Doll, E.R.; Wilson, J.C. & Mc Collum, W.H. — Immunization for equine influenza. *J. Am. Vet. Med. Ass.*, 148:413-417, 1966.
3. Clarke, D.H. & Casals, J. In: — R. Sohier-Diagnostic des maladies a virus. *Amer. J. Trop. Med.*, 7:561, 1958.
4. Cunha, R.G. — Isolamento de amostras do vírus da Influenza equina A eqüi 2 no Estado da Guanabara. *Rev. Brasil. Biol.*, 30:491-498, 1970.
5. Cunha, R.G.; Passos, W.S. & Dovalle, M.C.C. — Surto de gripe equina produzido por vírus de Influenza A eqüi 1 no Estado do Rio de Janeiro, Brasil. *Rev. Brasil. Biol.*, 38:549-554, 1978.
6. Delagneau, J.F.; Loquerie, R. & Demoliere, C. — La grippe équine: progrès récents dans la connaissance du virus influenzae, implication pour le contrôle de la maladie, perspectives de contrôle. Roger Bellon (França), 3:37-43, 1975.
7. Frerichs, G.N.; Burrows, R. & Frerichs, C.C. — Serologic response of horses and laboratory animals to equine Influenza vaccines. In: — J.T. Bryans & H. Gerber, eds. — *Equine infectious diseases III*. Basilea, S. Karger, 1973.
8. Hobson, D.; Curry, R.L. & Beare, A.S. — The role of serum haemagglutination inhibiting antibody in protection against challenge infection with Influenza A₂ and B viruses. *J. Hyg.*, 70:767-777, 1972.
9. Mc Queen, J.L.; Steele, J.H. & Robinson, R.G. — Influenza in animals. *Adv. Vet. Sci.*, 12:285-336, 1968.
10. Piegas, N.S.; Takimoto, S.; Barbosa, H.C.; Lacerda, J.P.; Guarniere, R. & Ishimaru, T. — Isolamento de vírus Influenza de surto de gripe equina em São Paulo. 15º Congresso Bras. Med. Vet., Rio de Janeiro, 25-30 Outubro, 1976.
11. Rouse, B.T. & Ditchfield, J.B. — The response of ponies to Myxovirus influenzae A Equi 2. III — The protective effect of serum and nasal antibody against experimental challenge. *Res. Vet. Sci.*, 11:503-507, 1970.
12. Who Expert Committee: a revised system of nomenclature for influenza virus. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 45:119-124, 1971

Remoção do vírus rábico fixo da corrente sanguínea de camundongos normais*

Cesar Wilson Martins da Rocha**
 & José Noronha Peres***

Resumo

Remoção do vírus rábico fixo (amostra CVS) da corrente sanguínea de camundongos normais, inoculados por via endovenosa e estudo do papel de fatores humorais existentes no soro. Os estoques de vírus rábico (amostra CVS) foram preparados em cérebros de camundongos neonatos e titulados em animais adultos pelas vias intracerebral e intravenosa obtendo-se, respectivamente, os seguintes resultados: $10^{7.5}/0,1\text{ml}$ e $10^{1.4}/0,1\text{ml}\text{ DL}_{50}$. Foram usadas técnicas de determinação do poder infectante pela inoculação intracerebral em camundongos e imunofluorescência para se avaliar a remoção do vírus rábico. Quando doses elevadas ($3 \times 10^6 \text{ DL}_{50}$) foram inoculadas intravenosamente, o vírus foi rapidamente removido da circulação (30min.) e sua permanência no fígado e baço foi menor (10min.), sendo mais prolongada no pulmão (60min.). Pesquisou-se a participação do soro normal, do C₃ e da properdina, na inativação "in vitro" do vírus rábico, sendo que o C₃ exerceu maior atividade.

Summary

Clearance of fixed rabies virus (CVS strain) from the blood of normal mice

Study of the role of the serum humoral factors. Stocks of rabies virus (CVS strain) were prepared in baby mice brains and titrated in adult animals inoculated by intracerebral and intravenous routes yielding titers of $10^{7.5}/0.1\text{ml}$; $10^{1.4}/0.1\text{ml}$ respectively. The determination of the virus clearance was done by infectivity (as measured by intracerebral inoculation of adult mice) and immunofluorescence. When $3 \times 10^6 \text{ LD}_{50}$ of virus were inoculated intravenously, the virus was rapidly cleared from the circulation (30min) and it was detected in spleen and liver up to 10min after inoculation; in the lung this time extended to 60min. The role of normal serum, C₃ and properdin in the "in vitro" virus inactivation was investigated, C₃ being more active.

Introdução

Os primeiros estudos sobre a patogenia da raiva foram realizados por Pasteur & col. (13) e Pasteur, Chamberland & Roux (12). A fim de reduzir o longo período de incubação da doença, após trepanação, inocularam o vírus diretamente no cérebro de animais. Interessados em obter técnica mais simplificada, utilizaram a via sanguínea para a inoculação, conseguindo a reprodução experimental da doença apenas com

grandes doses de vírus; a suspensão de tecido nervoso diluído a 1:200, não era mais infectante para o cão.

A hipótese de disseminação do vírus da porta de entrada ao sistema nervoso central (SNC) por via neural, vem recebendo conclusivo apoio experimental (1, 2, 4, 16, 18). Por outro lado, a disseminação do vírus pela corrente sanguínea, ou sua presença nesta (viremia) na doença natural ou experimental, é assunto controvertido, segundo Dohmen (5).

* Trabalho do Departamento de Microbiologia do ICB/UFMG, realizado com auxílio financeiro da FUNTEC-132, CAPES e CPq da UFMG.

** Dekalb Agrícola do Brasil, 13100 Campinas, SP.

*** Instituto de Ciências Biológicas, UFMG, Caixa Postal 2486, 30000 Belo Horizonte MG.

Segundo Mims (11), a remoção de um vírus da corrente sanguínea é feita principalmente pelas células do sistema retículo endotelial.

O vírus rábico tem muita oportunidade de atingir a corrente sanguínea, pois em geral penetra no hospedeiro através de ferimento produzido pela mordedura de um animal raivoso. No entanto, tanto na doença natural como na experimental, a viremia constitui evento raro e excepcional. Isso sugere a existência de um mecanismo ou mecanismos eficientes na sua remoção ou destruição que atua(m) antes do mesmo atingir o SNC (8).

As inoculações do vírus rábico por via endovenosa têm sido realizadas, principalmente com o objetivo de verificar o mecanismo de propagação ao SNC. Na literatura consultada, não encontramos estudos sobre a remoção do vírus rábico da corrente sanguínea. Para isso, grandes doses de vírus rábico foram inoculadas por via venosa. Em seguida, procurou-se detectar sua presença no sangue e vísceras, após intervalos de tempo.

Material e Métodos

Vírus — Foi utilizada a amostra CVS, mantida por inoculações sucessivas via intracerebral (IC) em camundongos neonatos, sendo a suspensão 20% de cérebros infectados conservada em congelador a -70°C.

Diluente — Água destilada estéril, adicionada de 2% de soro de cavalo inativado a 56°C por 30min. e de antibióticos (penicilina e estreptomicina).

Camundongos — Foram usados em todos os experimentos camundongos suíços, albinos, cuja idade variou conforme o objetivo dos experimentos.

Titulação do vírus — a) *Via intracerebral (IC)* — A partir da suspensão a 20% de tecido nervoso infectado, obtinha-se a diluição a 10⁻¹ e as sucessivas até 10⁻⁸. De cada diluição, grupos de 6 a 8 camundongos jovens (21 a 30 dias) eram inoculados por IC, com 0,03ml. Os animais eram observados diariamente, durante 21 dias. A DL₅₀ foi determinada pelo método de Reed & Muench (14). b) *Via intravenosa (IV)* — Foram usados camundongos adultos (16 a 18g), em lotes de 6 a 8 animais para cada diluição. O vírus era diluído nas condições mencionadas an-

teriormente, sendo que à diluição 10⁻¹ adicionava-se cerca de 500 UI de heparina por ml (4). As inoculações eram feitas na veia da cauda.

Remoção do vírus rábico inoculado pela via IV. **Poder infectante do sangue** — Camundongos adultos eram inoculados pela via IV com 3 × 10⁶ DL₅₀ preparadas a partir de estoque viral com o título 10⁷ (0,03ml/IC). Após a inoculação, procedia-se à colheita de sangue dos animais inoculados, em tempos diferentes (5, 10, 15, 20, 30 e 60 minutos), mediante punção cardíaca, usando-se seringa estéril, lavada em solução de heparina. Imediatamente após a colheita, adicionava-se 0,05ml de sangue em 0,45ml do diluente. Sempre em banho de gelo, preparavam-se diluições 10⁻² e 10⁻³. De cada colheita, nos diferentes intervalos de tempo, procedia-se à diluição do sangue como foi descrito. Em seguida, grupos de 6 a 8 camundongos recém-nascidos (2 a 5 dias) eram inoculados por via IC, com 0,02ml de cada diluição e de cada colheita.

Poder infectante dos órgãos (pulmão, baço e fígado) — Camundongos adultos inoculados por via IV com 3 × 10⁶ DL₅₀ de vírus rábico, após 10, 20, 30, 60, 90 e 120min. eram sacrificados, seccionando-se os vasos da região cervical a fim de se eliminar a maior quantidade possível de sangue. Feita a necrópsia, profundiam-se os órgãos, colhiam-se pulmão, baço e fígado, que eram colocados individualmente em frascos de vidro, lavados várias vezes em salina e em seguida triturados isoladamente em gral, preparando-se suspensões a 10%. Estas foram centrifugadas a 1000 rotações durante 10min. à temperatura de 4°C. O sobrenadante de cada material era inoculado em grupos de 6 a 8 camundongos neonatos (2 a 5 dias), por via IC.

Imunofluorescência — De animais inoculados (IV) nas condições descritas e nos intervalos de tempo mencionados, foram feitos esfregaços de sangue para imunofluorescência (7). A presença do vírus e/ou antígeno viral do pulmão, baço e fígado foi pesquisada em cortes de 4 a 8µ em micrótomo de congelação, segundo técnica de Kundin & col. (10).

Ação do soro de camundongos normais — a) **Soro normal** — Procedia-se à colheita de sangue de numerosos camundongos adultos e machos. A seguir, em centrífuga refrigerada, obtinha-se o soro límpido que era distribuído em alíquotas de 1,0ml em tubos e conservados

a -70°C até o momento de uso b) *Soro isento de componente C₃ do complemento (R-3) e sem properdian (RP)* — Para o preparo dos soro R-3 e RP, seguiu-se a técnica descrita por Pillermer & col. (14), utilizando-se uma preparação de Zimozan.

Técnica — A três séries de frascos, adicionava-se, a cada um, 0,15ml, respectivamente, de soro normal, de soro R-3 e de soro RP. Aos frascos de cada série, adicionava-se 0,15ml das diluições 10^{-5} a 10^{-7} do vírus rábico. Incubação em banho-maria a 37°C por 60min. e, após trazer a mistura à temperatura ambiente, era inoculada, em grupos de 6 a 8 camundongos jovens, por via IC.

Em outras quatro séries de frascos, colocou-se, em cada um, 0,9ml respectivamente, de soro normal, soro R-3, soro RP e salina. Aos frascos de cada série, foi feita adição de 0,1ml das diluições 10^{-4} a 10^{-6} do vírus rábico, passando assim às diluições 10^{-5} a 10^{-7} . Incubou-se em banho-maria, a 37°C por 60min. e, em seguida, foram inoculadas em grupos de 6 a 8 camundongos jovens, por via IC. Os cálculos da DL_{50} e percentual de mortalidade foram feitos pelo método de Reed & Muench(15).

Resultados

Das diversas partidas de estoque de vírus, preparadas e submetidas à titulação por via IC, só foram usadas aquelas que alcançaram título satisfatório: $10^{7.0}/0,03\text{ml } \text{DL}_{50}$. As mesmas partidas estoque, quando tituladas por via endovenosa, forneceram os seguintes títulos que variavam de $10^{1.1}$ a $10^{1.5}/0,1\text{ml } \text{DL}_{50}$.

Nos animais inoculados intravenosamente, com $3 \times 10^6 \text{ DL}_{50}$ de vírus rábico, só foi possível detectar o vírus no sangue aos 5, 10, 15, 20 e 30min. (Tabela 1). Verifica-se que, após 30min., a diluição de 10^{-1} contém vírus suficiente para matar 100% dos animais inoculados. Na diluição 10^{-2} ao fim desse tempo, não se conseguiu revelar vírus e, nos intervalos menores de tempo, o percentual de mortalidade foi 81,8%, 62,5%, 57,1%, respectivamente aos 5, 10, 15 e 20min. Na diluição a 10^{-3} , só foi possível revelar o vírus aos 5 e 10min. após a inoculação, em concentração suficiente para matar apenas 66,6% e 22,2% respectivamente.

Tabela 1 — Remoção do vírus rábico inoculado por via intravenosa ($3 \times 10^6 \text{ DL}_{50}$) em camundongos adultos. Avaliação do poder infectante do sangue, nas diluições de 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3}

Tempo em minutos	% de mortes de camundongos		
	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}
5	100,0	81,8	66,6
10	100,0	62,5	22,2
15	100,0	57,1	0,0
20	100,0	12,5	0,0
30	100,0	0,0	0,0
60	0,0	0,0	0,0

Quanto à presença do vírus nas vísceras, limitou-se o presente estudo a ensaios qualitativos, sendo possível detectar o vírus no fígado e baço, apenas aos 10min. após inoculação, enquanto que, no pulmão, o mesmo ainda estava presente ao fim de 60min., sendo comprovado tanto pela prova do poder infectante, como pela imunofluorescência (Tabela 2).

Tabela 2 — Remoção do vírus rábico amostra CVS inoculado pela via intravenosa $3 \times 10^6 \text{ DL}_{50}$ em camundongos adultos, avaliada pela imunofluorescência

Material	Tempo em minutos									
	10		20		30		60		90	
	PI	IF	PI	IF	PI	IF	PI	IF	PI	IF
Sangue	+	...	+	...	+	+	—	—
Fígado	+	+	—	—	—	—	—	—
Baço	+	+	—	—	—	—	—	—
Pulmão	+	+	+	...	+	+	+	+	—	—

PI = poder infectante

IF = imunofluorescência

+ = positivo

— = negativo

... = não realizado

Ação do soro em camundongos não imunes — Os dados da Tabela 3 mostram que o soro normal inativou cerca de 14 DL₅₀ do vírus, tomando-se como base o mesmo soro desprovido da fração C₃ do complemento. Por outro lado, quando se compara a ação neutralizante do soro normal com o soro RP (desprovido de properdina), verifica-se que apenas 3 DL₅₀ de vírus foram inativadas.

Tabela 3 — Titulação do vírus rábico adicionado a igual volume de soro normal (N), de soro isento da fração C₃ do complemento (R-3) e de soro isento de properdina (RP). Incubação 37°C, 60 min. Inoculação via intracerebral, em camundongos jovens

Inóculo	DL ₅₀
Vírus + soro N	10 ^{5,59}
Vírus + soro R-3	10 ^{6,74}
Vírus + soro RP	10 ^{6,11}

A ação neutralizante do soro normal e do soro destituído de C₃ ao complemento sobre o vírus rábico é mostrada na Tabela 4, onde se encontram os percentuais de morte das diferentes diluições do vírus.

Discussão

Para a obtenção de estoque de vírus rábico de títulos elevados, com a amostra CVS, usamos camundongos recém-nascidos. O título médio, obtido (DL₅₀) por via IC, foi de 10^{7,0}/0,03ml, considerado o ideal para os experimentos realizados, tendo em vista que a infecção letal, pela via endovenosa, exige grandes quantidades de vírus.

Fazendo-se a inoculação do vírus por via venosa, após 30min., este já pode ser detectado no sangue, quer pelo poder infectante, quer pela imunofluorescência, nas condições descritas neste trabalho. Os dados da Tabela 1 mostram que o agente vai sendo removido gradativamente. Keller & Zatman (9) e Brunner & col. (3), verificaram o mesmo fato, quando injetaram bacteriófago, vírus da estomatite vesicular e vírus da doença de Newcastle, por via venosa em camundongos. Resultados semelhantes aos dos autores acima foram obtidos por Mims (11), que estudou a remoção do vírus da vacinínia e da febre do Vale do Rift, do sangue.

A Tabela 2 mostra que, nas vísceras em que o vírus foi pesquisado, ele só pode ser demonstrado no fígado e baço até 10min. após inoculação, enquanto que no pulmão foi detectado até 60min.

A maior permanência do vírus no pulmão poderia ser devida ao fato de o mesmo ser inoculado na veia da cauda e passar primeiro naquele órgão que retém, assim, maior quantidade de vírus, o que demandaria mais tempo para o mesmo ser destruído. Outra hipótese seria a de que o mecanismo de eliminação do vírus é menos eficiente, ao nível dos pulmões do que no baço e fígado. Schweinburg, citado por Schneider (18), mostrou que a maior parte do inóculo de vírus, aplicado por via IV, é retida nos pulmões.

Os dados do presente trabalho diferem dos obtidos por Schneider (18), quanto ao achado do vírus no sangue, fígado, baço e pulmão. Porém, vale salientar que o citado autor detectou *antígeno vírico* no sangue, fígado, baço e pulmão, nas primeiras cinco horas de infecção, pela técnica de imunofluorescência.

Tabela 4 — Ação do soro normal (N) e do soro destituído da fração C₃ do complemento (R-3) sobre o vírus rábico, após incubação a 37°C, 60 min. Inoculação via intracerebral, em camundongos jovens

Inóculo	% de mortos por diluição		
	10 ^{-5,3}	10 ^{-6,3}	10 ^{-7,3}
Vírus + soro N	71,4	12,5	0,0
Vírus + soro R-3	92,3	63,6	40,0

O papel do soro normal de camundongos, sobre o vírus rábico, foi estudado em alguns experimentos e verifica-se, pelo exame das Tabelas 3 e 4, que sua participação, no mecanismo de remoção do vírus, é insuficiente para neutralizar a quantidade de partículas injetadas por via venosa. O que Ergegovac & Costogliou (6) chamaram de "corps antirábics", presentes no soro normal, trata-se, muito provavelmente, da ação conjunta de fatores humorais e celulares, pois, pelos resultados obtidos, o primeiro mecanismo não é suficiente para remover o vírus injetado na corrente circulatória. A ação dos fatores humorais, presentes no soro normal de camundongos, sobre o vírus rábico, examinando-se os dados da Tabela 4, parece ser devida principalmente à fração C₃ do complemento.

Referências Bibliográficas

1. Baer, G.M.; Shanthaveerappa, R.T. & Bourne, G.H. — The pathogenesis of streets rabies virus in rats. Bull. WHO, 38:119-125, 1968.
2. Baer, G.M.; Shanthaveerappa, R.T. & Bourne, G.H. — Studies on the pathogenesis of fixed rabies virus in rats. Bull. WHO, 33:783-794, 1965.
3. Brunner, K.T.; Hurez, D.; Mc Cluskey, R.T. & Benacerraf, B. — Blood clearance of P_{32} labeled vesicular stomatitis and Newcastle diseases viruses by the reticuloendothelial systems in mice. J. Immunol., 85:99-105, 1960.
4. Dean, D.J.; Evans, W.M. & Mc Clure, R.C. — Pathogenesis of rabies. Bull. WHO, 29:803-811, 1963.
5. Dohmen, G. — Pathogenesis de la rabia. In: — Centro Panamericano de Zoonosis — Primeiro Seminário International sobre Rabia para las Americas. Washington, Organización Panamericana de la Salud, 1967.
6. Ercegovac, D. & Costogliou, M. — Contribution à la connaissance des corps antirabiques naturels. Rec. Med. Vet., 144:1215-1220, 1968.
7. Goldwasser, R.A. & Kissling, R.E. — Fluorescent antibody staining of street and rabies virus antigens. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 98:211-213, 1958.
8. Johnson, R.R. — The pathogenesis of experimental rabies. In: — Nagano, Y. & Davenport, F.M. — Rabies. Baltimore, Park Press University, 1971.
9. Keller, R. & Zatman, M. — Studies on the factors concerned in the disappearance of bacteriophage particles from the animal body. J. Immunol., 83:167-172, 1959.
10. Kundin, W.D.; Liu, C. & Rodina, P. — Pathogenesis of Venezuelan equine encephalomyelitis virus. J. Immunol., 96:39-48, 1966.
11. Mims, C.A. — Aspects of the pathogenesis of virus diseases. Bact. Rev., 28:30-71, 1964.
12. Pasteur, L.; Chamberland, C. & Roux, E. — Nouvelle communication sur la rage. C.R. Acad. Sci., 98:457-463, 1884.
13. Pasteur, L.; Chamberland, C.; Roux, E. & Thuillier — Nouveaux faits pour servir à la connaissance de la rage. C.R. Acad. Sci., 95:1187-1192, 1882.
14. Pillemer, L.; Blum, L.; Lepow, I.H.; Wurtz, L. & Todd, E. W. — The properdin system and immunity. III — The zymosan assay of properdin. J. Exp. Med., 103:1-13, 1956.
15. Reed, L.T. & Muench, H. — A sample method of estimating fifth percent endpoints. Am. J. Hyg., 27:493-497, 1938.
16. Schindler, R. — Studies on the pathogenesis of rabies. Bull. WHO, 25:119-126, 1961.
17. Schweinburg, F. (1932b) In: — Schneider, L.G. — Die pathogenese der tollwut der maus. I — Die virusausbreitung von infektionsart zum zentral-nevensystem. Zbl. Bakt. (orig.), 211:281-308, 1969.
18. Schneider, L.G. — Die pathogenese der tollwut der maus. I — Die virusausbreitung von infektionsart zum zentral-nevensystem. Zbl. Bact. (orig.), 211:281-308, 1969.

Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero Candida

Dejanira de Franceschi de Angelis*
 Maria Cecília de Faveri Leite de Oliveira*
 & Maria Eunice Monaco Furletti*

Resumo

A produtividade em biomassa, o teor em glicídios totais e a trealose são comparados em 10 espécies de leveduras do gênero *Candida* cultivadas em meio completo para leveduras. Encontrou-se variação de glicídios totais, em análise de matéria seca, de 16,40 a 27,33% e de 20,20 a 36,30% nas análises da matéria úmida. A análise de trealose indicou variação de 0,84 a 5,75% do peso seco.

Summary

Total carbohydrate and trehalose in ten yeasts species of Candida

The production in biomass, trehalose and total carbohydrate contents in 10 yeasts species of *Candida* were determined. The yeasts were grown in broth of peptone (10.0g), yeast-extract (10.0g), phosphate (0.5g), glucose (20.0g), water (1000ml). pH = 5.7. The total carbohydrate content measured in dry cells in all ten species varied from 16.40 to 27.33% and, in washed cells, from 20.20 to 36.30%. The levels of trehalose varied from 0.84 to 5.75% of dry weight.

Introdução

Alguns parâmetros em leveduras têm sido constantemente revisados por vários autores, notadamente no que se refere a proteínas. Entretanto, outros materiais celulares, como glicídios e lipídeos, têm sido investigados com menor intensidade, principalmente quando leveduras são cultivadas em meios complexos. Considerando o pequeno volume de informações disponíveis sobre glicídios totais e matéria de reserva para muitas leveduras, cultivadas em meios ricos, investigamos quantitativamente estes valores, para 10 espécies do gênero *Candida*.

Dos glicídios de reserva, enfocamos a trealose por se distinguir dos demais, estando a sua utilização condicionada à etapa do ciclo vital, de acordo com Künzli & Fiechter (1). Panek (7, 8, 9, 10) postula a trealose como reserva de

energia, a ser usada durante a "lag" fase, quando as células prepararam-se para a divisão.

Procuramos estabelecer se, por outro lado, também haveria variação apreciável entre as espécies, quando submetidas às mesmas condições de cultivo e na mesma etapa do ciclo vital.

Material e Métodos

Material — Meios de cultivo

- a) Meio de preservação de cultura de Agar malte seg. Lodder (2).
- b) Meio completo para levedura (M.C.L.) peptona (Merck)..... 10,0g; extrato de levedura (Merck)..... 10,0g; K_2HPO_4 (Carlo Erba)..... 0,5g; glicose (Merck)..... 20,0g; H_2O destilada q.s.p..... 1000ml; pH..... 5,7.

* Departamento de Bioquímica, Instituto de Biociências UNESP, "Campus" de Rio Claro, Caixa Postal 178, 13500 Rio Claro, SP.

Esterilizado 10 minutos a 1 atmosfera de pressão e 120°C, exceto a glicose, esterilizada separadamente, e adicionada ao meio, antes de serem inoculadas as leveduras.

Leveduras do gênero Candida utilizadas: *C. melibiosa* nº 1, *C. guilliermondi* nº 2, *C. robusta* nº 3, *C. stellatoidea* nº 4, *C. solani* nº 5, *C. brumpti* nº 6, *C. pseudotropicalis* IOC nº 7, *C. pseudotropicalis* ATCC nº 8, *C. vartiovaarai* nº 9, *C. lipolytica* (nº 71) nº 10.

Da 1ª à 9ª levedura, das relacionadas, todas são provenientes do Instituto Zimotécnico "Prof. Jayme Rocha de Almeida" ESALQ Piracicaba (S.P.). A última levedura é do Instituto de Microbiologia da U.F. Rio de Janeiro.

Reagente: foi usada a antrona, preparada segundo Martelli & Panek (4), modificado:

Solução 1: ácido sulfúrico — Merck p.a.

d - 1,86, 186ml. Água destilada 30ml.

Dissolver 0,3g de Antrona, em 150ml da solução 1.

Método — As leveduras foram preservadas em meio de agar malte a 2% e transferidas para tubos de cultura, contendo 10ml de M.L.C., para desenvolvimento do pré-inóculo e colocadas em estufa a 27° ± 1°C. Após 24 horas, as leveduras contidas nos tubos foram transferidas para frasco de Erlenmeyer de 250ml, contendo 50ml de M.L.C. e cultivadas sob a agitação durante 24h a 150 rotações por minuto, à mesma temperatura. Após esse tempo, 20ml de cultura agitada foram transferidos para 2 frascos de Erlenmeyer de 500 ml, contendo 200ml de meio e cultivadas nas mesmas condições, por mais 24h.

Em seguida, os conteúdos dos dois frascos de Erlenmeyer foram reunidos e homogeneizados, retirando-se duas alíquotas de 25ml, para as dosagens de trealose e glicídio total na matéria fresca.

O volume restante do material foi medido e centrifugado a 5000 r.p.m.; a biomassa obtida foi secada a 100°C, até peso constante e o sobrenadante foi reservado para determinação do consumo de açúcares redutores pelo método de Nelson (5) e Somogyi (14). Os açúcares redutores, inicialmente presentes no meio, foram dosados em controle do meio não inoculado.

As dosagens de glicídio total e de trealose foram feitas segundo Trevelyan & Harrison (15). Para dosagem de glicídio total na biomassa fresca, células centrifugadas e lavadas, obti-

das de 25ml de cultura, foram transferidas com auxílio de 4ml de ácido tricloroacético (TCA) 0,5M, para frasco de Erlenmeyer, adicionando-se, exatamente antes da dosagem, água até 200ml. Após homogeneizar, são tomadas alíquotas, para dosagem com antrona.

O glicídio total na matéria seca foi determinado em 30mg de biomassa seca, homogeneizados no homogeneizador de Potter, com 4ml de TCA 0,5M e transferidos para frascos de Erlenmeyer de 500ml, completando o volume para 200ml, com água destilada.

A determinação da quantidade de trealose, na biomassa fresca obtida de 25ml de cultura, e expressa como o equivalente em glicose (% da matéria seca), foi feita transferindo-se as células com auxílio de 4ml de TCA 0,5M, para um tubo de ensaio colocado a zero graus e sob agitação constante, durante uma hora. Em seguida, o conteúdo do tubo foi centrifugado e o sobrenadante, contendo a trealose, reservado. O resíduo celular foi lavado com 4ml de água destilada, centrifugado e o sobrenadante foi juntado ao anterior. O volume dos extratos foi completado a 25ml.

Resultados

As 10 espécies de leveduras *Candida*, cultivadas em M.L.C., permitiram obter os dados na Tabela 1, onde se observa variação na produção de biomassa (g/l), assim como o consumo de glicose em g por litro de cultura, em g/g de biomassa produzida, e a porcentagem da eficiência de transformação da glicose em biomassa.

A Tabela 2 mostra que, entre as 10 espécies de leveduras, o teor de glicídio total, na matéria fresca, variou de 20,20 a 35,30% do material seco, e na matéria seca, de 16,40 a 27,33%.

Os valores de trealose variaram entre 0,84 a 5,75% da matéria seca.

Discussão

Dados do cultivo das leveduras, indicados na Tabela 1, revelam que a conversão em biomassa, para as leveduras 1, 2, 3, 4, 7, 9 e 10, correspondem aos dados obtidos por Serzedello & col. (13), utilizando *Torula utilis*. As espécies estudadas em aerobiose não atingiram a conversão de 50% da glicose para biomassa (Tabela 1), comumente citada em literatura (12).

Tabela 1 — Parâmetros do desenvolvimento das leveduras cultivadas em M.L.C.

nº levedura	assimilação de trealose	biomassa g/l	R = açúcares redutores residuais no meio g/l	consumo glicose (controle - R) g/l	consumo glicose g/g biomassa	eficiência da transformação da glicose em biomassa (%)
1	+	7,5450	0,9637	25,03	3,31	30,14
2	+	7,1215	1,0187	24,98	3,50	28,50
3	±	6,5826	0,9837	25,01	3,80	26,31
4	+	9,1902	1,0425	24,95	2,71	36,83
5	+	3,9730	1,0712	24,92	6,27	15,94
6	-	3,5955	1,0892	24,90	6,93	14,43
7	-	6,6722	0,9837	25,01	3,74	26,67
8	-	4,0672	1,2525	24,74	6,09	16,43
9	-	9,5130	1,1106	24,88	2,61	38,23
10	-	6,5725	3,7500	22,25	3,38	39,53

Tabela 2 — Teores de glicídio total e trealose em leveduras cultivadas em M.C.L.

Levedura nº	Glicídio Total		a - b	Trealose (c) % da matéria seca	Glicídios totais exceto trealose (a - c) % da matéria seca
	Matéria fresca (a) % da matéria seca	Matéria seca (b) % da matéria seca			
1	23,54	19,33	4,21	2,86	20,68
2	32,34	24,00	8,34	4,37	27,97
3	24,92	22,93	1,99	5,75	19,17
4	31,51	26,00	5,51	1,22	30,29
5	33,03	27,33	5,70	4,04	28,99
6	36,30	25,73	10,57	3,22	33,08
7	26,49	19,33	7,16	0,96	25,53
8	34,12	24,66	9,46	3,48	30,64
9	33,97	24,80	9,17	0,84	33,13
10	20,20	16,40	3,80	1,57	18,63

As espécies mais produtivas em biomassa consumiram menos glicose para produzir a mesma quantidade de biomassa, como indica a Tabela 1 (consumo em g/g de biomassa), sob agitação. Quanto ao conteúdo de glicídios totais das leveduras, pesquisadores (11), analisando *Candida utilis*, cultivada em licor sulfítico e *Saccharomyces cerevisiae*, cultivada em melado, verificaram variação de 22 a 34%. Outros autores (3) consideram que os glicídios totais das leveduras possam atingir até 40% do peso seco.

O método de determinação de glicídios totais (15), empregado, refere-se a matéria úmida. Considerando a maior facilidade de manipulação com matéria seca, aplicamos a mesma técnica para este material.

Verificamos que a dosagem de glicídios totais, quando realizada na matéria fresca e na matéria seca, apresenta diferença para cada espécie que pode ir de 10,57%, para a levedura número 7 a 1,99%, para a número 3, indicando possível perda quando o material é secado a 100°C.

De acordo com o método de antrona, empregado para análise dos glicídios totais, em amostras de matéria seca das 10 espécies de leveduras, obtidas após 24 horas de desenvolvimento, verificamos que houve variação de 16,40 a 27,33%, onde as leveduras 10, 7, 1 e 3 apresentaram-se com os menores valores. Quando as análises foram efetuadas na matéria celular fresca, os resultados, também expressos como percentagem de matéria seca, variaram entre 20,20 a 36,30%. Os menores valores correspondem às espécies 10, 1, 3 e 7.

O teor de trealose, que variou de 0,84 até 5,75%, nas diferentes espécies, assume maior significado quando comparado aos valores obtidos por outros autores (6), para *Saccharomyces cerevisiae*: 2% durante a fase diáuxica, de crescimento em glicose e 12%, ao ser transferida para condições não proliferativas.

As leveduras 2 e 3, que apresentaram maior teor em trealose, são trealose positivas e as leveduras 7 e 9, que apresentaram os menores teores, são trealose negativas, como indicam as Tabelas 1 e 2.

Embora a enzima implicada na biossíntese da trealose, UDPG-glicose-6-fosfato transglicosidase, seja bem distinta da que permite a assimilação de trealose exógena (3), entendemos que essa coincidência necessita ser melhor pesquisada.

Conquanto as condições de glicose, no meio

de cultivo (Tabela 1), no momento da amostragem para a análise, fossem praticamente as mesmas, para todas as espécies, com exceção para a levedura 10, houve variação considerável em trealose, que parece refletir as características peculiares das diferentes espécies.

Referências Bibliográficas

- Künzi, M.T. & Fiechter, A. — Changes in carbohydrate composition and trehalase activity during the budding cycle. *Arch. Mikrobiol.*, 64:396-407, 1969.
- Lodder, J. — The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, North-Holland Publishing, 1970.
- Manners, D.J. — The structure and biosynthesis of storage carbohydrates in yeasts. In: — Rose & Harrison, eds. — The yeasts. Vol. II. London, Academic Press, 1969.
- Martelli, H.L. & Panek, A.D. — Bioquímica experimental. Ed. Ao Livro Técnico, 1968.
- Nelson, N. — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375, 1944.
- Oestreicher, E.G. & Panek, A.D. — Algumas propriedades da trealose — 6 fosfato sintetase de levedura. Soc. Brasileira Bioquímica, VII Reunião Anual. Caxambu, 1978.
- Panek, A. — Function of trehalose in Baker's yeasts (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 100:422-425, 1963.
- Panek, A. — Storage carbohydrates during starvation of yeast. *An. Acad. Brasil. Cienc.*, 46:329-332, 1974.
- Panek, A. — Synthesis of trehalose by Baker's yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Arch. Biochem. Biophys.*, 98:349-353, 1962.
- Panek, A. — Trehalose metabolism in yeast cells. Vienna, Austria, Fourth International Symposium on Yeasts: Proceedings, 1974.
- Peppier, H.J. - Food Yeasts. In: — Rose & Harrison, eds. — The yeasts. Vol. III. London, Academic Press, 1970.
- Prescott, S.C. & Dunn, C.G. — Industrial microbiology. New York, Mc Graw-Hill, 1949.
- Serzedello, A.; Miguel, A.P.P.N.; Camargo, I.J.B. & Barbieri, G. — Estudos sobre obtenção de levedura alimentar em substratos de vinhaça. *Rev. da Agricultura*, 45:22-27, 1970.
- Somogyi, M. — Method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 160:62, 1941.
- Trevelyan, W.H. & Harrison, J.S. — Studies on yeast metabolism. 7 — Yeast Carbohydrate Fractions: separations from nucleic acid, analysis and behavior during anaerobic fermentation. *Biochem. J.*, 63:23-33, 1956.

Isolation and chemical composition of yeast extracellular capsule

Kailash C. Srivastava*
 & David G. Smith**

Summary

Using paper chromatography, the composition of extracellular polysaccharide of psychrophilic yeasts belonging to four genera determined by growing them in glucose genera of containing and glucose free media. The composition was different in each of the media. Besides the psychrophily, the constituents of the incubation medium also affected the composition of the capsular polysaccharide.

Resumo

Isolamento e composição química de cápsulas extracelulares de leveduras

A composição dos polissacarídeos extracelulares de leveduras psicrófilas de quatro gêneros foi determinada pelo método da cromatografia em papel. As leveduras foram cultivadas em meios de cultura com e sem glicose. A composição dos polissacarídeos era diferente em cada meio. Além da própria psicrofilia, os constituintes dos meios de crescimento também afetavam a composição dos polissacarídeos capsulares.

Introduction

In the electron micrographs the extracellular capsule of yeast looks to be granular or fibrous (9, 10). It has been shown to be a polysaccharide upon chemical analysis. While further studies on the extracellular capsule of five *Candida* species have shown them to be composed of fructose, galactose, glucose, mannose and rhamnose (1), the capsule of *Cryptococcus neoformans* and five other *Cryptococcus* species has been shown to have fructose, galactose, glucose, ribose and xylose as its major components (3,6). In *Rhodotorula glutinis* the major components of the capsular polysaccharide have been identified as fucose, galactose and mannose (5).

The present study was undertaken to determine the qualitative differences in the composition of extracellular polysaccharide as a result of psychrophily.

Material and Methods

Organisms — The psychrophiles used were *Candida gelida* YS 66, *Cryptococcus albidus* YS 5, *Rhodotorula rubra* YS 80, and *Trichosporon pullulans* YS 17. The mesophilic counterparts of the latter three yeasts, included for comparative purposes, were NCYC 446, NCYC 142 and NCYC 477 respectively.

Media — Using a log-phase inoculum, the organisms were grown for 48 hours on: (i) Dextrose Agar (DA) containing (g/l) dextrose, 15; Yeast extract (Oxoid), 1; NaNO₃, 2; KH₂PO₄, 1; MgSO₄, 0.5; KCl, 0.5; mycological peptone (oxoid), 2; and agar (Difco), 20; (ii) Nutrient Agar (NA) containing nutrient broth (Oxoid) supplemented with 2% agar; and (iii) Glycerol Agar (GA) of the same composition as DA but dextrose replaced by 25ml of glycerol. The pH of the media was adjusted to the optimum pH

* Departamento de Tecnologia de Alimentos e de Medicamentos, Centro de Ciências Rurais e de Tecnologia, Fundação Universidade Estadual de Londrina, Caixa Postal 2111, 86100 Londrina PR, Brasil.

** Department of Botany and Microbiology, University College London, Gower Street, London WC1E 6BT, U.K.

Table 1 — Optimum pHs for the growth of different organisms tested

Organism	Medium ¹	
	DA and GA	NA
<i>Candida gelida</i> YS 66	B 5.6	UB 5.0
<i>Cryptococcus albidus</i> YS 5	UB 5.6	UB 5.0
<i>Cryptococcus albidus</i> NCYC 446	UB 5.6	UB 6.0
<i>Rhodotorula rubra</i> YS 80	UB 5.6	UB 5.0
<i>Rhodotorula rubra</i> NCYC 142	B 6.0	UB 5.6
<i>Trichosporon pullulans</i> YS 17	UB 6.0	UB 5.6
<i>Trichosporon pullulans</i> NCYC 477	UB 5.6	UB 5.0

1. DA = Dextrose yeast extract peptone agar
 NA = Nutriente agar (nutrient broth at the optimum pH of the organisms supplemented with 2% agar)
 GA = Glycerol yeast extract peptone agar
 B = The medium was prepared in the citrate phosphate buffer of that pH
 UB = The medium was prepared in distilled water and the pH adjusted

of the individual organism (Table 1), before adding the agar. Four plates of the each of the above media were used for each organism. Thus a total of 12 plates to each organism were used. The psychrophiles were incubated at 10°C and the mesophiles at 25°C.

Isolation and characterization of the capsule — After 48 hr, the organisms were scraped off the surface of agar, taking care that no agar was dug, washed four times by centrifuging and re-suspension in sterile distilled water to remove any adhering agar, and then various methods were tried to separate the capsule (2, 3, 4). The best isolation, however, was obtained by shaking the above described washed culture in 200ml of sterile distilled water in flasks of 500ml capacity for 72 to 96 hrs. Then 1% phenol was added to kill the cells, flasks shaken subsequently for 1 hr after which the suspension was centrifuged under refrigeration to remove the cells. Thus obtained supernate was made cell free by filtering through Whatman number 43 filter paper. The clear cell free supernate was reduced to 1/10 volume, pH adjusted to 7.0, 1% sodium acetate added to it and the capsular material (CM) precipitated by slowly adding six volumes of cold absolute ethanol with constant stirring. The CM was concentrated by repeated centrifuging and precipitation. Finally a 10% soln of CM in distilled water was hydrolyzed with 6N HCl for 18 hrs at 100°C, washed 10 times with sterile distilled water and thereafter redissolved in sterile distilled water to give original concentration. Descending chromatograms were run using butanol: acetic acid: water

(70:20:10) solvent (7) for 42 hrs, dried at 70°C and developed using AgNO₃-acetone (8) and NaOH-ethanol developer (11). Rf values and composition of CM were noted for each organism and medium.

Results & Discussion

The unhydrolyzed CM gave a positive thymol test indicating it to be a polysaccharide. The qualitative composition of individual monosaccharide constituents of this polysaccharide for each organism and medium has been presented in Table 2.

A very prominent observation made was the complete absence or presence of one or more of the monosaccharides in all the organisms grown in a particular medium. For example, in all the organisms grown on NA, arabinose and fucose were absent, but when grown on GA, galactose, glucose and ribose were present. This is perhaps related to the metabolism of the organism on a particular carbohydrate or carbon source.

Furthermore it was observed that although certain monosaccharides were common in both meso and psychrophiles, differences did exist in the composition of the polysaccharide of each of the organism. The best example of this phenomenon is presented by the mesophilic and psychophilic strains of *Cry. albidus*. (i) On one hand was observed the complete absence of arabinose and fucose in all the media but absence of only fructose, galactose and xylose in the cells grown on DA, on the other the latter three monosaccharides were present in the cells grown on GA. (ii) In cells grown on NA, whereas fructose was present but ribose was absent in case of psychophilic *Cry. albidus* (YS 5), in mesophilic *Cry. albidus* (NCYC 446) just the opposite was true. Similarly absence of galactose and glucose was observed in the cells of *Rhodotorula rubra* YS 80 grown on NA, but the same monosaccharides were present in mesophile (NCYC 142). Many similar instances of the effect of psychrophily on the qualitative composition of the monosaccharides within the same genus can be seen in the data presented in Table 2. Based on the observations presented (in Table 2), we conclude that although psychrophily also shows some influence on the quality of the monosaccharide composition of the polysaccharide of the yeasts investigated in the present communication, the degree of af-

Table 2 — Monosaccharide composition¹ of the extracellular capsule of the organisms tested

Organisms	Medium ²	Monosaccharides ¹							
		Arabinose	Fructose	Fucose	Galactose	Glucose	Raffinose	Ribose	
<i>Candida gelisa</i> YS 66	DA	-	+	-	-	-	+	+	-
	NA	-	+	-	-	+	-	+	+
	GA	+	+	-	+	+	-	+	-
<i>Cryptococcus albidus</i> YS 5	DA	-	-	-	-	-	+	+	-
	NA	-	+	-	+	+	+	-	+
	GA	-	+	-	+	+	+	+	+
<i>Cryptococcus albidus</i> NCYC 446	DA	-	-	-	-	+	+	-	-
	NA	-	-	-	+	+	+	+	+
	GA	-	+	-	+	+	-	+	+
<i>Rhodotorula rubra</i> YS 80	DA	-	-	-	-	+	+	-	-
	NA	-	+	-	-	-	+	+	+
	GA	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Rhodotorula rubra</i> NCYC 142	DA	-	-	-	-	+	-	+	-
	NA	-	+	-	+	+	-	+	+
	GA	-	+	-	+	+	+	+	-
<i>Trichosporon pullulans</i> YS 17	DA	-	-	-	-	+	-	-	+
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	GA	-	+	-	+	+	-	+	-
<i>Trichosporon pullulans</i> NCYC 477	DA	+	+	+	+	+	+	+	-
	NA	-	+	-	+	+	+	+	+
	GA	+	+	-	+	+	+	+	+

¹. + = Present

- = absent

² DA = Dextrose yeast extract peptone agar at the optimum pH of the organism

NA = Nutrient broth at the optimum pH of the organism supplemented with 2% agar

GA = Glycerol yeast extract peptone agar at the optimum pH of the organism

fect is almost negligible as compared to that of the carbohydrate constituent of the medium.

Results reported here on the presence of galactose and glucose in *Candida*; fructose, galactose, glucose, ribose and xylose in *Cry. albidus* and presence of galactose but absence of fucose in *Rh. rubra* were in agreement with earlier reports (1, 3, 5, 6). The differences however, can be attributed to the use of different species.

Acknowledgements

We are thankful to Dr. J.H. Baker, Fresh Water Biological Association, Wareham, Dorset, England for providing the psychrophiles and to Profs. C.S. Rao, G. Wosciacki, and I.O.P. Popper of F.U.E.L., for going through the manuscript and making helpful suggestions.

References

1. Carmo-Souza, L. & Barroso-Lopes, C. — A comparative study of the extracellular and cell wall polysaccharides of some *Candida* species. Antonie van Leeuwenhoek J. Immunol. Serol., 36:209-216, 1970.
2. Evans, E.E. & Kessel, J.F. — The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. II — Serologic studies with the capsular polysaccharide. J. Immunol., 67:109-114, 1951.

3. Evans, E.E. & Mehl, J.W. — A qualitative analysis of capsular polysaccharides from *Cryptococcus neoformans* by filter paper chromatography. *Science*, 114:10-11, 1951.
4. Evans, E.E. & Theriault, R.J. — The antigenic composition of *Cryptococcus neoformans*. IV — The use of paper chromatography following purification of the capsular polysaccharide. *J. Bacteriol.*, 65:571-577, 1953.
5. Fukagawa, K.; Yamaguchi, H.; Yonezawa, D. & Moscio, S. — Isolation and characterization of polysaccharide produced by *Rhodotorula glutinis* K-24. *Agr. Biol. Chem.*, 38:29-35, 1974.
6. Golubev, V.I. & Vdovina, N.V. — Monosaccharide composition of extracellular polysaccharides of some *Cryptococcus* Species. *Mikrobiologiya*, 43:154-156, 1974.
7. Humphrey, B.A. — Occurrence of 4.0-methyl glucuronic acid in *Rhizobium* genus. *Nature (London)*, 184:1802, 1959.
8. Partridge, S.M. — Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. *Nature (London)*, 164:443, 1949.
9. Srivastava, K.C. & Smith, D.G. — Electron microscopy of a psychrophilic yeast: *Candida gelida*. *Micron*, 5:191-199, 1974.
10. Srivastava, K.C. & Smith, D.G. — The Ultrastructure of psychrophilic strains of *Cryptococcus albidus*. *Micobios Letters*, 3:175-178, 1976.
11. Trevelyn, W.E.; Procter, D.P. & Harrison, J.S. — Detection of sugars on paper chromatograms. *Nature (London)*, 166:444-445, 1954.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

CONTEÚDO

CONTENTS

Volume 10

Janeiro-Março 1979

Número 1

Laurinda A. Soares & Luiz R. Trabulsi	1	Atividade antibacteriana "in vitro" de Gentamicina, Tobramicina e Sisomicina	"In vitro" antibacterial activity of gentamycin tobramycin and sisomicin
Edison P.T. de Oliveira Hisako Gondo Higashi & Hideyo Izuka	6	Algumas modificações na técnica de titulação das toxinas e anatoxinas tetânicas "in vitro"	A few modifications in the titration technique "in vitro" of tetanus toxins and anatoxins
Eliana P. de Carvalho & Luiz C.G. Costa	10	Diferentes temperaturas e meios de cultura para o isolamento de <i>Salmonella</i> sp. e outras bactérias, em rações iniciais para frangos de corte	Different temperatures and culture media for isolation of <i>Salmonella</i> sp. and other microorganisms in broiler starter rations
Mário T. Shimizu & Flávio Alterthum	14	Estudo comparativo entre o conteúdo de esteróis e resistência a polienos em diferentes espécies de leveduras.	Sterol amounts in cell membrane and resistance of yeasts to poliene antibiotics
Jocellem M. Salgado & José Renato Sarruge	19	Influência de compostos nitrogenados e da relação C/N na obtenção do concentrado protéico de microrganismos	Influence of nitrogen compounds and C/N ratio on proteic concentrate of microorganisms
Pedro M. Lacava	22	Comportamento "in vitro" do fungo <i>Aspergillus nidulans</i> em resposta ao fungicida Plantvax	Behavior "in vitro" of the fungus <i>Aspergillus nidulans</i> in response to the fungicide plantvax
Pedro M. Lacava	26	Resistência genética do <i>Aspergillus nidulans</i> ao fungicida Benomil	Genetical resistance of <i>Aspergillus nidulans</i> to benomil
Allen N. Hagler & L.C. Mendonça-Hagler	30	Tolerância ao cloreto de sódio em leveduras isoladas de água do mar poluída no Rio de Janeiro	Sodium chloride tolerance of yeasts isolated from a polluted estuary in Rio de Janeiro
Lusinete Aciole de Queiroz & Adhemar Purchio	34	<i>Filobasidiella neoformans</i> obtido pelo cruzamento de amostras de <i>Cryptococcus neoformans</i> sorotípo D com AD	<i>Filobasidiella neoformans</i> obtained from strains of <i>Cryptococcus neoformans</i> D and AD serotypes
Allen N. Hagler Selma S. Santos & L.C. Mendonça-Hagler	36	Leveduras de um estuário brasileiro poluído	Yeasts of a polluted Brasilian Estuary

Volume 10

Abril-Junho 1979

Número 2

Marcelo Magalhães & Adelma Véras	43	Plasmídios R de cepas hospitalares de <i>Salmonella typhimurium</i>	R plasmids from nosocomial strains of <i>Salmonella typhimurium</i>
Celso L. Cardoso & Paulo P. Gontijo Filho	46	Utilização de petróleo e hidrocarbonetos por micobactérias	Petroleum and hydrocarbon degradation by mycobacteria
S.M. Goyal & A.W. Hoadley	50	Salmonelas e plasmídios-R associados, em abatedouros de aves	Salmonellas and their associated R-plasmids in poultry processing wastes
Celso L. Cardoso & Paulo P. Gontijo Filho	59	Ocorrência de micobactérias em águas poluídas com resíduos industriais e domésticos	Occurrence of mycobacteria in water polluted with industrial and domestic residues

Luiz R. Trabulsi	66	Concentrações inibitórias do sulfato de cefoxitina para bactérias anaeróbias	Susceptibility of anaerobic bacteria to cefoxitin
A. Purchio C.R. Paula & W. Gambale	69	Isolamento do <i>Sporothrix schenckii</i> de água do mar	Isolation of <i>Sporothrix schenckii</i> from sea water
György M. Oláh Louise Innes-Gaboury Otto Reisinger & Odette DesBiens	72	Polaridade bacteriana em substratos em via de biodegradação	Polarité bactérienne observée dans différents milieux en voie de biodégradation

Volume 10

Julho-Setembro 1979

Número 3

Luiz R. Trabulsi	85	Níveis séricos da bacampicilina em voluntários saudáveis	Bacampicillin plasma levels healthy volunteers
Allen N. Hagler & L.C. Mendonça-Hagler	88	Exigências vitamínicas de leveduras de estuário marinho poluído no Rio de Janeiro	Vitamin requirements of yeasts isolated from polluted seawater of Rio de Janeiro
N. Kaufmann Robbs & P. Guimarães Robbs	92	Condições microbiológicas de produtos cárneos comercializados no Rio de Janeiro	Microbiological condition of meat products in Rio de Janeiro market
José Ximenes Wilson Fry Claudio K. Hirai & Igor Mimica	97	Comparação a resistência a drogas de organismos Gram-negativos aeróbios isolados nos E.U.A. e no Brasil	Comparison between the resistance to drugs shown by Gram-negative aerobic organisms isolated in Brasil and in the United States
S. R. de Andrade Leite Hidetake Iimasato & Paulo Anna Bobbio	100	Inibição do crescimento do <i>Staphylococcus aureus</i> S6 por uma melanoidina obtida da reação entre glicose e glicina	Inhibition of <i>Staphylococcus aureus</i> S6 growth by a melanoidin obtained from a reaction between glucose and glycine
M.R. Fernandes de Toledo M. H. Lemos dos Reis Jayme Murahovschii Roberto Cury S.R.T. da Silva Ramos Eraldo Samogin Fiore Eric Yehuda Schussel & Luiz Rachid Trabulsi	103	Ocorrência de uma variante de <i>Salmonella typhimurium</i> que fermenta a lactose lentamente	Occurrence of a <i>Salmonella typhimurium</i> variant, which ferments lactose slowly, in São Paulo, Brazil
C.F. Tachibana Yoshida Ana Maria C. Gaspar K.B. Feldman Marzochi & Hermann G. Schatzmayer	106	Antígeno HBs, subtipos e anticorpo anti-HBs em populações brancas e asiáticas de comunidades urbana e rural	HBsAg, subtypes and HBsAb in white and asiatic populations from urban and rural communities in the south of Brazil
João R.C. Andrade & Y.C.M. Macedo Soares	111	Emprego do método de coaglutinação para identificação presuntiva de <i>Vibrio cholerae</i>	Coagglutination method for identification of <i>Vibrio cholerae</i>
Rosana E. Gregori Cláudio C. Lombardi Eloisa F. Ferreira Luiz C. Raphaelli & Susan Berthold	121	Estudo da população bacteriana de amostras de lodo colhidas no digestor da Estação de Tratamento de Esgotos de Pinheiros (SABESP) — Contagem de bactérias anaeróbias e facultativas do lodo em digestão anaeróbia	Study of bacterial population in sludge samples obtained from the Sewage Treatment Plant of Pinheiros, (SABESP). Counting of anaerobic and facultative bacteria in anaerobic digesters

Volume 10

Outubro-Dezembro 1979

Número 4

Tom Booth	123	Estratégia para o estudo de fungos em ecossistemas marinhos e sob influência marinha	Strategies for study of fungi in marine and marine influenced ecosystems
-----------	-----	--	--

Reynaldo S. Furlanetto Helio Emerson Belluomini Hideyo Izuka & Raymundo Rolim Rosa	139	<i>Epizootia provocada por um bacte- rio difteróide em serpentes mantidas em biotério</i>	<i>Etiology and prophylaxis of a new epizooty in snakes maintained in captivity</i>
Carlos Gil Turnes João Carlos M.A. Pereira & Clóvis Moreira	144	<i>Avaliação imunogênica de vacina contra a influenza eqüína</i>	<i>Immunogenic evaluation of Influenza vaccine</i>
Cesar Wilson M. da Rocha & José Noronha Peres	148	<i>Remoção do vírus rágico fixo da corrente sanguínea de camundongos normais</i>	<i>Clearence of fixed rabies virus (CVS strain) from the blood of normal mice</i>
Dejanira de F. de Angelis Maria C.F.L. de Oliveira & Maria Eunice M. Furletti	153	<i>Teor de glicídios totais e trealose em algumas espécies do gênero <i>Candida</i></i>	<i>Total carbohydrate and trehalose in ten yeasts species of <i>Candida</i></i>
Kailash C. Srivastava & David G. Smith	157	<i>Isolamento e composição química de cápsulas extracelulares de leveduras</i>	<i>Isolation and chemical composition of yeast extracellular capsule</i>

