

Volume 12 Número 3 Jul.-Set. 1981

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil

REVISTA DE
MICROBIOLOGIA
Sociedade Brasileira de Microbiologia
São Paulo — Brasil



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\$ 1.500,00 para o Brasil; US\$ 25.00 (via marítima) ou US\$ 30.00 (via aérea) para o Exterior. Números avulsos: Cr\$ 375,00 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 João S. Furtado Instituto de Botânica Caixa Postal 4005 01000 São Paulo SP	Secretário Geral Maria Therezinha Martins CETESB Av. Prof. Frederico Hermann Jr., 345 05459 São Paulo SP
	Vice-Presidente Paulo Pinto Gontijo Filho Instituto de Microbiologia UFRJ Centro de Ciências da Saúde Bloco I — Ilha do Fundão 20000 Rio de Janeiro RJ	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, a cada dois anos, 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 ($\mu\mu$), e Angstroms (A; 10^{-10}m). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu\text{g}/\text{ml}$) ou microlitros por litro ($\mu\text{lítros/litro}$). 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 "Berger'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 Berger 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 arábico 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 reticulais devem ser feitas em papel brilhante, com contrastes adequado para a reprodução na escala 1:1, observados os espaços máximos disponíveis na Revista e seus submúltiplos, reservando-se espaço suficiente para a legenda. Sempre que houver escala de aumento ou redução, esta deverá ser superposta ou desenhada diretamente na fotografia ou figura. Ver instruções sobre legendas, notas de rodapé, etc. sob **TABELAS**. Proteja as ilustrações durante o trânsito, com uma folha de papelão.

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

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

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

Volume 12 Julho-Setembro 1981 Número 3

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 12 (3)

CONTEÚDO

Maria Aparecida V. P. e Brito Maria Helena do C. Lagrota & Raimundo Diogo Machado	65	Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais	<i>Use of microtechnique for screening of antiviral substances</i>
Rosalvo Guidolin Flávio Zelante Reynaldo S. Furlanetto (in memoriam) & Raimundo R. Rosa	70	Vacinação anti-rábica experimental. Possível influência da replicação do vírus Flury HEP modificado, no sistema nervoso central, sobre a atividade cérebro-neutra- lizante	<i>Experimental anti-rabies vaccination. Possible influence of Flury HEP modified virus replication in the central nervous system on the brain-tissue neutralization activity</i>
Guillermo Calderon & Luis Inope	75	Accion del levamisole en la produccion de anticuerpos neutralizantes después de la vacunacion contra la enfermedad de Newcastle en pollos	<i>Influence of levamisole in the production of neutralizing antibodies after vaccination against Newcastle disease</i>
Leslie C. Benchetrit & Agnes M. Sá Figueiredo.	79	Isolamento de bacteriófagos a partir de <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Isolation of bacteriophages from <i>Streptococcus pyogenes</i></i>
Leslie C. Benchetrit Lewis W. Wannamaker & Ernest D. Gray	84	Propriedades imunológicas da atividade hialuronidásica associada a bacteriófagos viru- lentos de streptococos do grupo A	<i>Immunological properties of the hyaluronidase activity associated with a virulent group A streptococcal bacteriophage</i>
Marion Helena Feigl Eduardo do N. Mós Carlos Eduardo Larsson & Manoel A. A. dos Santos	88	Estudo microbiológico das otites externas em cães	<i>Microbiological study of otitis externa in dog</i>
Jocellem Mastrodi Salgado & Paulo Campos T. de Carvalho	92	Fungos toxicogênicos associados a cereais. 2 - Bioensaio com ratos albinos, com os isolados letais provenientes de milho, trigo e arroz	<i>Biological effects of lethal fungi, isolated from corn, wheat and rice seeds on white rats (var. albinus)</i>
Jocellem Mastrodi Salgado & Paulo Campos T. de Carvalho	96	Fungos toxicogênicos associados a cereais. 3 - Bioensaio com ratos albinos com isolados não letais do milho, trigo e arroz	<i>Biological effects of non lethal fungi isolated from corn, wheat and rice seed on white rats (var. albinus).</i>
Juan L. Carrau Rita M. Callegari-Basso & Daniel E. Basile	105	El periodo de latencia de <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>The latent period of <i>Schizosaccharomyces pombe</i></i>
Augusto F. da Eira Paulo de C. T. de Carvalho & Onaur Ruano	110	Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. III – Alternativas de controle	<i>Slime accumulations in fiberboard industries. III – Control ways</i>

CONTENTS

Revista de Microbiologia é publicada
com o apoio do CNPq e FINEP.

Sociedade Brasileira de Microbiologia

Sócios Patrocinadores

Eli Lily do Brasil Ltda.

Indústria Química e Farmacêutica Schering S.A.

Coca-Cola Indústrias Ltda.

Biolab-Mérieux Produtos para Laboratórios Ltda.

Merck, Sharp & Dohme Ind. Quím. Farmacêutica Ltda.

Companhia Industrial e Comercial Brasileira de Produtos Alimentares

Rhodia S.A.

Emprego de microtécnica na triagem de substâncias antivirais*

Maria Aparecida V.P. e Brito
CNPSA-EMBRAPA, Caixa Postal D-3
89700 Concórdia SC, Brasil

Maria Helena do Carmo Lagrota
& Raimundo Diogo Machado

Dept.^o de Virologia, Instituto de Microbiologia UFRJ,
Bloco I – Ilha do Fundão
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

A ação antiviral primária de substâncias naturais: ajmalina, extrato aquoso de *Zoanthidae*, extrato fluido de pau-d'arco e frações extraídas com metanol e com diclorometano de *Luidia senegalensis*; substâncias sintéticas: isoniazida, cloridrato de N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-aminopropil) piperazina e N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina e a substância semi-sintética: usnato de isoniazida foi testada em células cultivadas em microplacas descartáveis. A atividade foi determinada pela inibição dos efeitos citopáticos dos vírus pólio tipo 1, adeno tipo 5, herpes simples tipo 1 e vírus da estomatite vesicular Alagoas, VSA, após adição de diferentes concentrações das substâncias. Antes de proceder a avaliação da atividade antiviral, as substâncias foram testadas quanto à toxicidade para as células utilizadas. Este método mostrou ser simples, sensível, econômico, de rápida execução e permitiu detectar a ação de ajmalina e N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina sobre VSA.

Summary

Use of microtechnique for screening of antiviral substances

The primary antiviral action of natural substances: ajmaline, aqueous extract of *Zoanthidae*, fluid extract of "pau-d'arco", and fractions extracted with both methanol and dichloromethane from *Luidia senegalensis*; synthetic substances: isoniazid, piperazine N¹-(3-chlorophenyl)-N⁴-(3-aminopropyl) hydrochloride, and piperazine N¹-(3-chlorophenyl)-N⁴-(3-acetamidopropyl), as well as one semi-synthetic compound: isoniazid usnate was tested in cultivated cells in disposable microplates. The antiviral activity was determined based upon the inhibition of cytopathic effect of the virus herpes simplex type 1, adeno type 5, polio type 1, and vesicular stomatitis Alagoas, VSA, on the cells, after the addition of different concentrations of the substances. Prior to conducting the tests to measure the antiviral activity, various concentrations of the substances were tested for toxicity to the cells. This method showed advantages of being simple, sensitive, economical, rapidly executed, and demonstrated an inhibition of viral replication of VSA by ajmaline and piperazine N¹-(3-chlorophenyl)-N⁴-(3-acetamidopropyl).

Introdução

A pesquisa de substâncias com atividade antiviral está diretamente relacionada com o desenvolvimento de testes de triagem que propiciam a avaliação de uma série de compostos, permitindo a seleção daqueles com uma possível ação. Assim, uma substância

que apresentar uma atividade neste sistema pode ser posteriormente reexaminada, quanto a outros aspectos, a fim de se realizar um estudo mais aprofundado de sua ação antiviral.

Tentativas para aprimorar os testes de seleção de substâncias "in vitro" têm sido realizadas visando, principalmente, aumentar a

* Trabalho realizado no Dept.^o de Virologia, Instituto de Microbiologia UFRJ, com auxílio financeiro da CAPES e FINEP.

sensibilidade, simplicidade de execução, a rapidez e a reprodutibilidade. Miller & col. (16) descreveram um processo semi-automático em que procuraram medir diretamente a inibição do ácido nucleico viral, utilizando precursores marcados radioativamente. Finter (6) desenvolveu um método para mixovírus, onde o crescimento viral foi avaliado indiretamente, em termos do número de hemácias especificamente adsorvidas. O emprego de imunofluorescência, na contagem de células infectadas, depois de protegê-las com as substâncias-teste, foi realizado por Boyd & Sommerville (2). Outros métodos baseiam-se na formação de placas pela partícula viral. Neste caso, a substância a ser testada difunde-se através de um meio sólido (10, 13, 17).

A cultura de células em macro e microplacas foi também utilizada e a ação das substâncias sobre as células e sobre os vírus (10 e 100 TCD₅₀) foi avaliada microscopicamente (5, 19, 23).

O objetivo deste trabalho foi testar a ação antiviral primária de substâncias sintéticas e naturais, como contribuição à seleção de drogas potencialmente ativas. Para tanto, foram utilizadas células cultivadas em microplacas de plástico e a inibição viral foi avaliada pela redução do título do vírus frente a diferentes concentrações das substâncias.

Material e Métodos

Amostras de vírus — Herpes simples tipo 1 (isolado de uma lesão herpética labial); adenovírus tipo 5 (amostra recebida do National Institute for Medical Research, Mill Hill, Londres); vírus da estomatite vesicular Alagoas (VSA) (1) e poliovírus tipo 1 (isolado de um caso clínico de poliomielite).

Substâncias estudadas — Produtos naturais: ajmalina, extrato aquoso de *Zoanthidae*, frações 1 de *Luidia senegalensis*, obtidas com metanol e com diclorometano e extrato fluido de pau-d'arco; substâncias sintéticas: isoniazida, N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina e cloridrato de N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-aminopropil) piperazina; substância semi-sintética: usnato de isoniazida. Informações adicionais sobre a origem e obtenção das substâncias podem ser obtidas em Brito (3).

Células utilizadas — Para VSA e poliovírus tipo 1, foi utilizada a célula LLC-MK₂. A célula HeLa foi utilizada para herpes simples tipo 1 e a Hep-2 para adenovírus tipo 5.

Cultivo de células em microplacas — As linhagens de células foram tripsinizadas segundo Schmidt (22) e suspensas em meio Eagle mínimo, suplementado com soro bovino (10%), 100 µg/ml de estreptomicina, 25 µg/ml de fungizona e 100 U de penicilina por ml. Cada cavidade de uma microplaca foi inoculada com 0,1ml da suspensão de células contendo aproximadamente 1,8 × 10⁵ células/ml. Em seguida, foram incubadas a 37°C, durante 24-48 horas, em atmosfera de CO₂ (4). No momento do uso, apresentavam uma camada confluente de células.

Preparo das substâncias — As substâncias foram diluídas no meio de manutenção da camada de células (meio mínimo de Eagle, sem o soro). Com aquelas que se apresentavam em forma de cristais, foi preparado uma solução, de modo a conter 640 µg/ml. Com as demais, de consistência pastosa, preparou-se uma solução, com concentração aproximada a esta. Do extrato fluido de pau-d'arco foram preparadas várias diluições, ao dobro, partindo-se da diluição a 1/2.

Teste de toxicidade — Este teste permitiu determinar a maior concentração da droga que não afetou visivelmente a camada de células. Foi preparada uma série de diluições de cada substância, ao dobro, partindo-se da diluição a 1/2. Após 48 horas de incubação das microplacas, o meio de crescimento das células foi trocado pelo meio de manutenção com a substância diluída. Após incubação apropriada, de até o máximo de seis dias, as células foram observadas quanto ao efeito tóxico. Este, quando comparado à placa controle, foi demonstrado por granulações, vacúolos, retração, arredondamento e descolamento do tapete celular. As concentrações que produziram efeito tóxico não foram utilizadas para os testes.

Avaliação da atividade antiviral — Quatro concentrações de cada substância foram testadas quanto à ação antiviral. A primeira foi igual à maior concentração não tóxica e as outras corresponderam a 1/2, 1/4 e 1/8 desta. Microplacas, com monocamadas de células de 48 horas, tiveram o meio de cresci-

mento das células cuidadosamente vertido e, em cada uma, testou-se uma substância, tendo-se três fileiras verticais para cada concentração. A seguir, foram incubadas por duas horas, a 37°C, nas condições já citadas. Após este período, foi adicionado o vírus, do qual se preparou diluições, variando de 10^{-1} a 10^{-8} . Em cada cavidade foi inoculado, 0,01ml do vírus, de modo que cada fileira horizontal correspondeu a uma diluição do vírus. Controles das células e das diluições do vírus, sem as substâncias-teste, foram realizados em cada experiência.

O efeito citopático foi observado diariamente, em microscópio invertido, até o máximo de dez dias. A avaliação do crescimento do vírus foi feita pelo método de Reed & Muench (18), através do cálculo da TCD₅₀, no controle do vírus e para cada concentração das substâncias.

Índice de inibição viral — Correspondeu à diferença entre o log da TCD₅₀ do controle do vírus e o log da TCD₅₀ do vírus em cada uma das concentrações das substâncias. Considerou-se positiva uma diferença igual ou maior que 1,70 log (8, 9, 14).

Resultados

Para testar a presença ou não de atividade antiviral, as substâncias foram avaliadas, inicialmente, quanto à toxicidade, obtendo-se a

maior concentração de cada uma que não causou efeito tóxico para as células utilizadas. A substância N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina apresentou toxicidade mais acentuada para as células HeLa e Hep-2. Para estas células a maior concentração não tóxica foi 85,3 µg/ml. Além desta, avaliou-se as concentrações: 42,65 µg/ml; 21,325 µg/ml e 10,6625 µg/ml. A toxicidade do extrato fluido de pau-d'arco foi avaliada por meio de diluições e 1/1.280 foi a menor diluição que não lesou as células (Tabela 1).

Os resultados dos testes de avaliação da ação antiviral permitiram detectar a ação de ajmalina e de N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina para VSA. Em ambos os casos, a inibição foi detectada na maior concentração testada de cada uma (80 µg/ml e 341,2 µg/ml, respectivamente). O índice de inibição viral obtido foi maior que 1,70 log. Para os outros vírus testados estas substâncias não apresentaram ação (Tabela 2). As demais substâncias não foram ativas sobre nenhum dos vírus testados.

Discussão e Conclusões

Com o método utilizado foi possível testar, em cada microplaca, até quatro concentrações de uma substância, com três repe-

Tabela 1 — Toxicidade das substâncias frente às células HeLa, Hep-2 e LLC-MK₂ e as concentrações utilizadas na avaliação antiviral

Substâncias	Concentração máxima não tóxica (µg/ml)	Concentrações avaliadas quanto à ação antiviral (µg/ml)			
		5,0	2,50	1,250	0,6250
Isoniazida	5,0	5,0	2,50	1,250	0,6250
Usnato de Isoniazida	2,5	2,5	1,25	0,625	0,3125
Clorofenilacetamidopropil-piperazina	341,2 *	341,2	170,60	85,300	42,6500
Clorofenilaminopropil-piperazina	9,0	9,0	4,50	2,250	1,1250
<i>L. senegalensis</i> /Metanol	145,0	145,0	72,50	36,250	18,1250
<i>L. senegalensis</i> /Diclorometano	148,3	148,3	74,15	37,075	18,5375
Zoanthidae	856,0	856,0	428,00	214,000	107,0000
Ajmalina	80,0	80,0	40,00	20,000	10,0000
Extrato de Pau-d'arco	1:1.280 **	1:1.280	1:2.560	1:5.120	1:10.240

* A maior concentração não tóxica para as células HeLa e Hep-2 foi 85,3 µg/ml

** Menor diluição não tóxica

Tabela 2 — Índice de inibição viral das substâncias testadas para VSA, Poliovírus tipo 1, Adenovírus tipo 5 e Herpesvírus tipo 1

Substâncias	Concentração (μ g/ml)	Índice de inibição viral			
		VSA	Pólio 1	Adeno 5	Herpes 1
Isoniazida	5,0	0,45	0,00	0,76	0,49
Usnato de Isoniazida	2,5	0,59	0,67	0,00	0,41
Clorofenilacetamidopropil-piperazina	341,2	2,25	0,16	*	*
Clorofenilaminopropil-piperazina	9,0	0,67	0,41	0,26	0,49
<i>L. senegalensis</i> /Metanol	145,0	0,17	0,00	0,75	0,24
<i>L. senegalensis</i> /Diclorometano	148,3	0,00	0,08	0,50	0,41
Zoanthidae	856,0	0,42	0,25	0,60	0,25
Ajmalina	80,0	1,84	0,08	0,87	0,74
Extrato de Pau-d'arco	1:1.280**	0,91	0,66	0,90	0,66

* Não testado nesta concentração porque causou toxicidade para as células empregadas para o desenvolvimento deste vírus

** Diluição do extrato aquoso utilizado

tições de cada uma. A proximidade das 96 cavidades em um só dispositivo reduziu o número de manipulações e diminuiu o risco de contaminação do material. A observação do CPE ao microscópio também foi facilitada. Devido ao pequeno tamanho da cavidade, a camada de células pode ser completamente observada. Desta maneira, foi possível detectar qualquer foco de CPE existente, pois uma substância só foi considerada ativa quando inibiu completamente o CPE viral.

Considerando que cada cavidade de uma microplaca corresponde a um microtubo de cultura (21), destaca-se a vantagem de utilizar este método àqueles que empregam a cultura de células em tubo (8, 9) necessitando, assim, de grande quantidade de material, o que nem sempre é disponível. A concentração a ser testada devia estar presente em 7,2ml do meio de cultura. Esta quantidade foi suficiente para testar oito diluições de um vírus, frente a uma substância, em três provas, havendo três repetições por prova.

Além da simplicidade de execução, a acuidade e a economia de material, todos os materiais e aparelhos envolvidos na triagem são comuns a um laboratório de virologia, pois são os mesmos usados para o cultivo celular de rotina. Este é um dos pontos que limita a aplicação prática de outros métodos de triagem, como os relatados por Miller & col. (16) e Boyd & Sommerville (2).

Os resultados da triagem realizada indicaram uma substância sintética ativa: N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-acetamidopropil) piperazina. O composto cloridrato de N¹-(3-clorofenil)-N⁴-(3-aminopropil) piperazina, estruturalmente muito relacionado a este não foi ativo. Possivelmente, a presença do radical acetato, ligado por uma ligação amídica ao grupamento aminopropil da piperazina, determina um arranjo espacial, responsável pela ação do primeiro composto.

Entre as substâncias de origem vegetal e marinha testadas foi possível detectar a ação de ajmalina sobre VSA. O extrato fluido de pau-d'arco não causou inibição, apesar de ser relatada a presença do lapachol no cerne destas plantas e a ação antiviral do lapachol ser conhecida (14, 20). A ação antiviral de substâncias de origem marinha ou extraídas de plantas tem sido relatada. São conhecidas proteínas, toxinas, polissacarídeos, substâncias flavonóides ou outras não identificadas quimicamente, ativas sobre uma série de vírus (7, 11, 12, 14, 15, 24, 25).

Os produtos naturais testados, à exceção de ajmalina, se apresentavam na forma de extrato. Embora um extrato possa conter uma grande variedade de estruturas e compostos, estes podem estar presentes em baixas concentrações. Esta baixa concentração pode ter impedido que uma substância ativa, se presente, tenha sido revelada.

Referências Bibliográficas

1. Andrade, C.M.; Rosas, C.E.E.; Amorin, L.M.; Mota, S.P.; Teixeira, E.N. & Santos, N.F. — Estomatite vesicular no Brasil: isolamento do vírus Alagoas. Anais VII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Porto Alegre, 1976.
2. Boyd, J.E. & Sommerville, R.G. — A rapid, simple, and reliable method for screening of potential antiviral compounds "in vitro". *Arch. Ges. Virusforsch.*, 45:254-258, 1974.
3. Brito, M.A.V.P. — Emprego da microtécnica na triagem de substâncias antivirais. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1979. (Tese de Mestrado).
4. Caceres, M.; Figueiroza, M.S. & Troches, M. — Anticuerpos contra la poliomielitis in niños del Valle de Comayagua, Honduras. *Bol. Ofic. Sanit. Panamer.*, 75:424-429, 1973.
5. Ehrlich, J.; Sloan, B.J.; Miller, F.A. & Machamer, H.E. — Searching for antiviral materials from microbial fermentations. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130:5-16, 1965.
6. Finter, N.B. — Methods for screening "in vitro" and "in vivo" for agents active against myxovirus. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173:131-138, 1970.
7. Furusawa, E. & Cutting, W. — The higher plants with antilethal activity on virus infections in mice. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 170:668-679, 1970.
8. Grunberg, E. & Prince, H.N. — The antiviral activity of 3,4-dihydro-1-isoquinolineacetamide hydrochloride "in vitro", "in ovo" and in small laboratory animals (33335). *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 129:422-430, 1968.
9. Grunberg, E. & Prince, H.N. — Experimental methodology and the search for effective antiviral agents. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173:122-130, 1970.
10. Herrmann Jr., E.C.; Gabliks, J.; Engle, C. & Perlman, P.L. — Agar diffusion method for detection and bioassay of antiviral antibiotics. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 103:625-628, 1960.
11. Kathan, R.H. — Kelp extracts as antiviral substances. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130:390-397, 1965.
12. Kucera, L.S.; Cohen, R.A. & Herrmann Jr., E.C. — Antiviral activities of extracts of the lemon balm plant. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130:474-481, 1965.
13. Kucera, L.S. & Herrmann Jr., E.C. — Gradient plate technique applied to the study of antiviral substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 122:258-262, 1966.
14. Lagrota, M.H. — Atividade antiviral "in vitro" de substâncias sintéticas e naturais. Rio de Janeiro, Universidade Federal do Rio de Janeiro, 1978. (Tese de Mestrado).
15. Li, C.P.; Prescott, B.; Eddy, B.; Caldes, G.; Green, W.R.; Martino, E.C. & Young, A.M. — Antiviral activity of paolins from clams. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130:374-382, 1965.
16. Miller, P.A.; Lindsay, H.L.; Carmier, M.; Mayberry, B.R. & Trown, P.W. — Rapid semi-automated procedures for assaying antiviral activity. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 173:151-159, 1970.
17. Rada, D.; Blaskovic, D.; Sorm, F. & Skoda, J. — The inhibitory effect of 6-azauracil riboside on the multiplication of vaccinia virus. *Experientia*, 16:487-488, 1960.
18. Reed, L.J. & Muench, H. — A simple method of estimating fifty per cent endpoints. *Amer. J. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
19. Rightsel, W.A. & Dice, J.R. — Applications of tissue culture to chemotherapy trials. *Univ. Mich. Med. Bull.*, 24:222-234, 1958.
20. Rizzini, C.T. & Mors, W.B. — Botânica econômica brasileira. São Paulo, Editora da Universidade de São Paulo, p. 71-87, 1976.
21. Rosenbaum, M.J.; Phillips, I.A.; Sullivan, E.J.; Edwards, E.A. & Miller, P.A. — A simplified method for virus-tissue culture procedures in microtitration plates. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 113:224-229, 1963.
22. Schmidt, N.J. — Tissue culture methods for diagnostic virology. In: — Lennette, E.H. & Schmidt, N.J. — Diagnostic procedures for viral and rickettsial infections. 4ed. New York, American Public Health Association, p. 78-170, 1969.
23. Sidwell, R.W. & Huffman, J.H. — Use of disposable micro tissue culture plate for antiviral and interferon induction studies. *Appl. Microbiol.*, 22:797-801, 1971.
24. Takemoto, K.K. & Spicer, S. — Effects of natural and synthetic sulfated polysaccharides on viruses and cells. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 130:365-373, 1965.
25. Ussery, M.; Irvin, J.D. & Hardesty, B. — Inhibition of poliovirus replication by a plant antiviral peptide. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, 284:431-440, 1977.

**Vacinação anti-rábica experimental.
Possível influência da
replicação do vírus Flury HEP
modificado, no sistema nervoso
central, sobre a atividade
cérebro-neutralizante***

Rosalvo Guidolin
Flávio Zelante

Reynaldo Schwindt Furlanetto (in memorian)
& Raymundo Rolim Rosa

*Dept.^o de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP,
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP, Brasil*

Resumo

Instalação e replicação do vírus vacinante Flury HEP no tecido cerebral de animais inoculados. Inoculações intracerebrais (IC) e intramusculares (IM) das vacinas Flury HEP vírus modificado, Flury HEP vírus inativado e tipo Fuenzalida & Palacios, em lotes de 20 camundongos, comprovaram indução de maior atividade cérebro-neutralizante pelo primeiro tipo de vacina. Demonstraram também ser viável a replicação viral no sistema nervoso central (SNC), aparentemente sem danos ao animal. As inoculações via IC e via IM induziram ao aparecimento de corpúsculos fluorescentes no SNC, em maior intensidade ao redor do 8º dia.

Summary

Experimental anti-rabies vaccination. Possible influence of Flury HEP modified virus replication in the central nervous system on the brain-tissue neutralization activity

In a previous paper the authors confirmed the better protection conferred by the Flury HEP modified virus vaccine than the others rabies vaccines tested. They proposed now to verify the possibility of the installation and replication of this virus (HEP) in the brain tissues of the inoculated animals. Through intracerebral (IC) and intramuscular (IM) inoculations of Flury HEP modified virus, Flury HEP inactivated virus and Fuenzalida & Palacios vaccines, in groups of 20 mice, they confirmed induction of better brain-tissue neutralization activity by the former type of vaccine. The authors demonstrated also to be viable the viral replication in the Central Nervous System (CNS) apparently without damages to the animals. The IC and IM inoculations induced to the appearance of specific fluorescent bodies in the CNS that were greater around of the 8th day after the inoculations.

Introdução

Guidolin (6) e Guidolin & col. (7), trabalhando com vacinas tipos Flury HEP, Flury HEP inativada e Fuenzalida & Palacios inoculadas intracerebralmente em cobaias, camundongos e hamsters, demonstraram o desencadeamento de um estado protetor nos animais inoculados, não estreitamente rela-

cionado com o nível de anticorpos circulantes e nem com outros fatores, então pesquisados, tais como o interferon.

Estas verificações suscitaram a possibilidade de ocorrência, no tecido nervoso central, da replicação viral sem que ocorra, aparentemente, dano às células deste tecido. Vários autores admitem esta possibilidade principalmente em se tratando do vírus rabi-co modificado (6).

* Parte da Tese de Doutoramento apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP.

A possibilidade de uma proteção local à infecção vírica tem sido considerada, quer devida a um tipo de anticorpo ou outro fator celular altamente específico (12) principalmente durante a ocorrência de uma infecção ativa e não somente devida à presença do vírus no sistema nervoso central. Nas meninges e tecido nervoso dos animais infectados são encontrados plasmócitos e, principalmente, linfócitos (2).

Assim, os indícios parecem favorecer a possibilidade de que a imunidade do tipo celular seja relevante para a proteção na vacinação anti-rábica (10). Trabalhos neste sentido têm sido desenvolvidos principalmente na vacinação anti-rábica humana. Santos & col. (13) demonstraram-no em vacinados, através de reação cutânea e de testes de inibição da migração de linfócitos (MIF).

Com base nestas considerações, nos propusemos a demonstrar a possibilidade de ocorrer a replicação viral rágica no sistema nervoso central (SNC) de animais vacinados com a vacina Flury HEP e a relação dessa replicação com a indução de uma imunidade local.

Material e Métodos

Animais utilizados e vias de inoculação — Os experimentos foram realizados em lotes de 20 camundongos brancos, machos jovens, com peso de 14 ± 1 g, inoculados através das vias intracerebral (IC) e intramuscular (IM).

Suspensões virais e volumes inoculados — Foram utilizadas as suspensões virais: vírus HEP (8), vírus HEP inativado (6) e vírus fixo inativado (Fuenzalida & Palacios). Em geral, cada inóculo continha 10.000 partículas virais. O volume do inóculo era de 0,03ml quando da inoculação IC. Em algumas oportunidades, variações foram introduzidas nestes critérios, objetivando a uma análise mais precisa na condução do experimento em questão.

Período de observação dos animais inoculados — Os animais foram observados, na dependência da prova a que se destinavam, por um período de 21 dias (prova de cérebro-neutralização). Os cérebros foram extraídos no 4º, 8º e 12º dia após a inoculação, para a prova de imunofluorescência.

Provas realizadas — Cérebro-neutralização

— Foi realizada de conformidade com a técnica original de Kubes & Gallia (12). Os cérebros dos animais, logo após a sua retirada, eram lavados três vezes em solução salina fosfatada e conservados a -70°C . Quando de sua utilização, eram descongelados à temperatura ambiente, reunidos e pesados. Após a Trituração em triturador Bellico, procedia-se à diluição em solução fisiológica estéril, na proporção de 1:2 p/v. A suspensão assim obtida foi centrifugada durante 5 minutos a 500rpm com a finalidade de serem eliminados os restos celulares. Do sobrenadante, (diluição 1:2), foram preparadas as diluições 1:20, 1:200 e 1:2000. Adaptamos o esquema de Kaplan & Koprowski (8) para a prova de soroneutralização, substituindo-se o soro pela suspensão de tecido cerebral diluída. Como controle, foram utilizados cérebros normais, processados de forma idêntica.

Prova de imunofluorescência (IF) — A verificação do antígeno rágico no SNC dos animais inoculados, obedeceu a técnica descrita por Cherry & col. (3), realizando-se decalques do tecido cerebral em lâminas de microscopia. As observações foram realizadas em campo escuro, com microscópio Leitz modelo 250, lâmpada C3-150W, filtros primários BG-12 e secundário Leitz K530 e examinadas em 400 aumentos. Adaptamos as recomendações de Koprowski (10) que preconiza a detecção de agregados "corpusculares", o que seria o indício de positividade da prova e que corresponderiam a corpúsculos de inclusão. Não foi considerada a fluorescência granular ou da membrana celular.

Controles — Para os necessários controles, em todas as provas realizadas, lotes de animais sofriam o mesmo traumatismo físico que os inoculados com as partículas virais.

Resultados e Discussão

A inoculação dos três tipos de vacinas anti-rábicas em camundongos, possibilitou-nos acompanhar o desenvolvimento de alterações junto às células do SNC, tendo sido possível detectar a ocorrência de replicação das partículas virais, nesse tecido.

A Tabela 1 apresenta os resultados observados quanto à prova de cérebro-neutralização.

zação, na qual foi estabelecida uma comparação entre os níveis cérebro-neutralizantes, obtidos pela inoculação IC e IM, em grupos de 20 camundongos, das vacinas Flury HEP vírus modificado, Flury HEP vírus inativado e Fuenzalida & Palacios, com doses contendo a mesma concentração viral (10.000 partículas infectantes).

Tabela 1 — Resultados das provas de cérebro-neutralização, em 20 camundongos, inoculados com os três tipos de vacinas contendo todas 10.000 partículas infectantes

Vacina	Via	Volume (em ml)	N.º de DL ₅₀	Diluições do tecido cerebral				
				N.º de mortos/N.º total inoculado				
				1:2	1:20	1:200	1:2000	
HEP vírus modificado	IC	0,03	25	2/5	3/5	4/5	5/5	
HEP vírus modificado	IM	0,3	25	3/5	4/5	5/5	5/5	
Fuenzalida	IM	0,3	25	5/5	5/5	5/5	5/5	
Fuenzalida	IC	0,03	25	5/5	5/5	5/5	5/5	
HEP inativada	IC	0,03	25	5/5	5/5	5/5	5/5	
HEP inativada	IM	0,3	25	5/5	5/5	5/5	5/5	

IC = intracerebral

IM = intramuscular

Os informes da Tabela 1, parecem demonstrar que apenas o vírus Flury HEP ativo foi capaz de induzir a uma atividade cérebro-neutralizante, apesar de fracamente evidenciável, principalmente quando introduzido por via IC. Este fato parece concordar com Eisen (4) quando este autor afirma que o po-

der imunogênico de uma substância está diretamente relacionado com a sua inoculação em locais próximos às células antígeno-sensíveis.

Assim, quer nos parecer que condições semelhantes às mencionadas por Eisen ocorrem quando se inocula a vacina Flury HEP vírus modificado diretamente no SNC pois, neste tecido, o vírus encontra as células eletrivas para a sua implantação e replicação (14).

O aparecimento de anticorpos no líquido cérebro-espinhal de animais inoculados, descrito por Baer & col. (1), teria um mecanismo diverso no desenvolvimento da atividade cérebro-neutralizante.

Koprowski & Black (11), não evidenciaram anticorpos no tecido cerebral de cobaias vacinados por via IM com o vírus Flury de baixa passagem (LEP), apesar de estar presente o anticorpo sérico neutralizante. Ao contrário, Koprowski (9) verificou que quando o vírus Flury HEP era introduzido por via IC, induzia a uma resistência à posterior inoculação do vírus das ruas, quatro semanas após, havendo uma estreita ligação entre o nível de anticorpos circulantes e a resistência à infecção.

O processo pelo qual ocorre a liberação das partículas virais das células do SNC e a conseqüente ativação do sistema imuno-competente, é ainda desconhecido. Em nossa opinião, o vírus rábico modificado teria sofrido possíveis alterações em suas composições química, estrutural ou genética, tornando-o capaz de replicar-se em células não

Tabela 2 — Resultados das provas de IF realizadas com o tecido cerebral de camundongos inoculados com vacina Flury HEP vírus modificado

Via de inoculação	Dose* (em ml)	Prova de imunofluorescência	Positivos Total	N.º médio de corpúsculos por campo examinado (10 campos)					Porcentagem de positividade
				0	1	2-3	4-5	+5	
IM	0,3	4 dias após	5/5	—	2	2	1	—	100
	0,03		5/6	1	5	—	—	—	83,3
	0,03		5/5	—	1	3	1	—	100
IM	0,3	8 dias após	5/5	—	5	—	—	—	100
	0,03		10/10	—	2	2	2	4	100
	0,03		5/5	—	—	2	3	—	100
IM	0,3	12 dias após	0/7	7	—	—	—	—	0
	0,03		3/8	5	3	—	—	—	37,5
	0,03		6/9	3	—	3	3	—	70

* 10.000 partículas virais por 0,03ml

IM = intramuscular

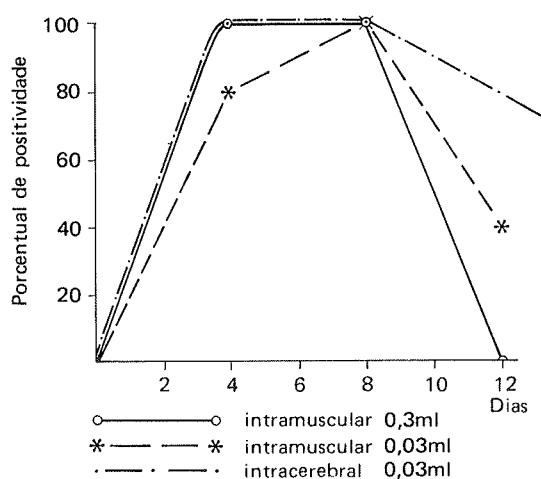
IC = intracerebral

nobres do SNC, sem induzir a lesões passíveis de uma detecção clínica.

Todavia, inegavelmente, houve a sua replicação no SNC. Os dados constantes da Tabela 2, que apresenta os resultados de prova de imunofluorescência direta, realizada em tecido cerebral dos camundongos inoculados vias IM e IC, com doses diferentes da vacina Flury HEP vírus modificado, demonstram que o número de partículas de antígeno rágico viral, aumentou em proporção direta com o aumento dos dias de observação.

As provas de IF direta parecem demonstrar que o vírus HEP pode ser encontrado no tecido cerebral, pelo menos até o 12º dia após a sua inoculação, independendo da via utilizada. A sua replicação parece mesmo ocorrer durante um tempo mais longo, em função da via de inoculação.

Figura 1 — Dinâmica do comportamento e porcentagem de positividade da replicação da vacina Flury HEP modificada, em cérebro de camundongo, detectada através da imunofluorescência



Quanto à via IC verificamos que, no 12º dia, 70% dos camundongos apresentavam vírus intracelulares, sendo este o máximo período de observação. Quando da inoculação IM de 0,3ml da suspensão do vírus, 100% dos tecidos cerebrais apresentavam reação IF positiva, observada com maior intensidade no 4º dia após a inoculação. No 12º dia, não foi constatada fluorescência nos tecidos. Os animais inoculados com 0,03ml, por via IM, da suspensão de vírus apresentaram 83% de positividade no 4º dia e, o máximo de intensidade, foi observado no 8º dia. Esta dosagem possibilitou maior persistência do vírus nos tecidos pois, no 12º dia, 37,5% dos animais ainda demonstraram

positividade da reação. Estas observações confirmam Guidolin & col. (7) que demonstraram que animais inoculados via IM apresentaram títulos de anticorpos séricos de 1:2 e de 1:5,8 nas doses de 0,3 (100.000 partículas) e de 0,03ml (10.000 partículas, respectivamente).

Estes valores são, ao menos aparentemente, paradoxais e poderiam estar relacionados à persistência do vírus por maior tempo nos tecidos. Tal ocorrência, determinaria um prolongamento do estímulo imunogênico, visto que uma grande dose de antígeno poderia induzir a títulos precoces de anticorpos ou mesmo de interferon (5), neutralizando os vírus e impedindo-os de se replicarem durante um tempo maior no tecido cerebral. Uma comprovação dessa hipótese seria o desaparecimento do vírus do tecido nervoso a partir do 12º dia, nos animais inoculados via IM com a dose de 0,3ml. Poderíamos admitir a ocorrência de neutralização pelos anticorpos formados rapidamente, detectados a partir do 2º dia, conforme demonstrado por Wiktor & col. (15), e em concentrações relativamente elevadas, devido ao maior número de partículas virais presentes. Não foi observado fato semelhante quando da inoculação IC.

Estas observações deverão ser ampliadas no futuro, pois, sendo comprovadas, viriam indicar que, sob o ponto de vista imunológico, não seria interessante a administração de doses excessivas de partículas virais ativas, na imunização dos animais contra a raiva.

Conclusões

1. Somente a vacina Flury HEP vírus modificado, induziu a títulos cérebro-neutralizantes, principalmente quando inoculada via IC;
2. parece haver replicação do vírus Flury HEP modificado no SNC, sem dano aparente às células do tecido, ao menos clinicamente detectável;
3. a inoculação IC induziu a maior persistência de partículas virais no SNC do que a inoculação IM;
4. quando da inoculação IM, a dose de 0,03ml da vacina Flury HEP vírus modificado, equivalente a 10.000 partículas virais, demonstrou superior atividade imunogênica do que a inoculação, pela mesma via, de uma dose dez vezes maior.

Referências Bibliográficas

1. Baer, G.M.; Shaddock, J.H. & Williams, L.W. — Prolonging morbidity in rabid dogs by intratechal infection of attenuated rabies vaccine. *Infect. Immun.* 12:98-103, 1975.
2. Bell, J.F.; Lodmell, D.L.; Moore, G.J. & Raymond, G.H. — Brain neutralization of rabies virus to distinguish recovered animals from previously vaccinated animals. *J. Immunol.*, 97:747-753, 1966.
3. Cherry, W.B.; Goldman, M. & Garski, T.R. — Fluorescent antibody techniques in the diagnosis of communicable diseases. Atlanta, U.S. Department of Health, Education and Welfare, 1960.
4. Eisen, H.N. — An introduction to molecular and cellular principles of the immune-responses. London, Harper & Row, 1973.
5. Fischman, H.R. & Strandberg, J.D. — Inapparent rabies virus infection of the central nervous system. *J. Amer. vet. Med. Ass.*, 1963: 1050-1055, 1973.
6. Guidolin, R. — Contribuição ao estudo imunitário da vacinação anti-rábica. Piracicaba, Faculdade de Odontologia UNICAMP, 1976. (Tese).
7. Guidolin, R.; Zelante, F.; De Lorenzo, J.L. & Villaruel, M.S. — Contribuição ao estudo da vacinação anti-rábica. Análise comparativa das respostas das vacinas Flury HEP, Fuenzalida e Flury HEP inativa-dia. *Arq. Inst. Biol. (São Paulo)*, 45:83-100, 1978.
8. Kaplan, M.M. & Koprowski, H. — Laboratory techniques in rabies. Geneva, World Health Organization, 1973.
9. Koprowski, H. — Biological modification of rabies virus as a result of its adaptation to chick embryos. *Bull. Wld. Hlth. Org.*, 10:709-724, 1954.
10. Koprowski, H. — Pre-and post exposure prophylaxis: present status and current trends. In: — Naganu, Y. & Davenport, F.M., eds. — Working Conference on rabies. Baltimore, University Park Press, 1971.
11. Koprowski, H. & Black, J. — Studies on chick-embryo adapted rabies virus. IV — Immunization of guinea-pigs and description of a potency control test. *J. Immunol.*, 72:79-84, 1954.
12. Kubes, V. & Gallia, F. — Brain-tissue neutralization: a new biological reaction for rabies virus. Ist relation to the protection and serum-neutralization tests. *Canad. J. Comp. Med.*, 7:48-60, 1944.
13. Santos, M.C.; Correa, R.; Kimura, H.; Longo, I.M.; Mendes, N.F. & Pereira, O.A.C. — Imunidade celular na vacinação anti-rábica humana. VIII Congresso Brasileiro de Microbiologia, Sociedade Brasileira de Microbiologia, Rio de Janeiro, 1977.
14. Silva, R.A.; Silva, N.M. & Menezes, P.R.V. — Ensaio com o vírus rábico "ERA" no Brasil. I — Distribuição do vírus no organismo de bovinos inoculados e formação de inclusões no sistema nervoso central. *Pesq. Agropec. Bras. Ser. Vet.*, 9:49-52, 1974.
15. Wiktor, T.J.; Koprowski, H. & Rorke, L.B. — Localized rabies infection in mice. *Proc. Soc. Exp. Biol.*, 140:759-764, 1972.

Accion del levamisole en la produccion de anticuerpos neutralizantes después de la vacunacion contra la enfermedad de Newcastle en pollos

Guillermo Calderon

IVITA, Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Apartado 4270
Lima, Peru

& Luis Inope

Dept.^o de Cirugía y Medicina Veterinaria,
Universidad Nacional Mayor de San Marcos,
Apartado 78, Barranco
Lima, Peru

Resumen

Treinta pollos de doce semanas de edad, fueron divididos al azar en tres grupos de diez aves cada uno, se usaron para estudiar el efecto inmunoestimulante del levamisole al aplicarse oralmente después de una vacunación ocular contra el virus de Newcastle. Las aves del grupo vacunado y tratado 48 horas después con levamisole, en dosis de 10mg de droga pura por kg de peso vivo, presentaron un mayor título de anticuerpos neutralizantes, estadísticamente significativo (0.01), que el grupo vacunado al que no se administró levamisole. Ambos grupos resistieron 100% al desafío de 0.2ml. intramuscular, de virus virulento de Newcastle con título de $10^{8.67}$ DL 50/0.1ml. Los pollos del grupo no vacunado y al cual no se aplicó levamisole, no desarrollaron anticuerpos y sufrieron 100% mortandad. Los resultados demuestran que el levamisole actúa como un inmunoestimulante en la tasa de anticuerpos neutralizantes del virus de Newcastle, si se usa 48 horas después que los pollos han sido vacunados.

Summary

Influence of levamisole in the production of neutralizing antibodies after vaccination against Newcastle disease

Thirty chickens twelve weeks of age were divided at random in three groups of ten each and were used to study the immunostimulating effect of levamisole when given orally after an ocular vaccination against Newcastle virus. The chickens in the vaccinated group were treated 48 hours later with levamisole in doses of 10mg of pure drug per kg, live weight. These animals presented a higher statistically significant (P. 01) titer of neutralizing antibodies than the vaccinated group that was not given levamisole. Both groups resisted in 100% the challenges of an intramuscular injection of 0.2ml. of virulent Newcastle virus with titer of $10^{8.67}$ DL50/0.1ml. The non vaccinated group which did not receive levamisole, did not produce antibodies and had 100% mortality. The data show that levamisole acts as an immunostimulant of the rate of production of neutralizing antibodies of the Newcastle virus if used 48 hours after vaccination.

Introducción

Diferentes trabajos de investigación se han realizado para explicar la actividad de algunos compuestos biológicos y principalmente químicos en el sistema inmunológico del hombre y animales, así tenemos que desde los primeros experimentos llevados en

1971, Renoux (9) demostrando que el levamisole inyectado en ratones vacunados contra la brucelosis incrementaba el efecto protector de la vacunación, se han sumado otros autores para demostrar o negar la acción inmunoestimulante de la droga en el hombre y en diferentes especies de animales. En las aves de corral, son pocos los trabajos hechos

para tal efecto y en la literatura solo se encuentra los experimentos de Meulemans & col. (6) y Pensaert (8) que usaron el levamisole después de una vacunación intramuscular y oral en pollos contra la enfermedad de Newcastle. Otros como Kulkarni (5); Bottino (1); Muñoz (7) y Hernández (4), emplean la misma molécula para similar experimento, modificando solo la vía de inoculación. Todos estos autores miden los efectos del Levamisole, principalmente, por depresión o estimulación en la producción de anticuerpos de inhibición de la hemoaglutinación del virus Newcastle.

Este trabajo tiene como intención incrementar los conocimientos del efecto del levamisole en la formación de anticuerpos neutralizantes del virus de la enfermedad de Newcastle, cuando la molécula es aplicada después de la vacunación.

Material y Metodos

Aves de experimentacion — 30 pollos de una línea comercial de postura, criados desde el primer día de nascidos en corrales adecuados e identificados individualmente con bandas alares y sin vacunar, fueron separados a la edad de 12 semanas en tres grupos de 10 aves cada uno.

Virus: virus vacunal — vacuna comercial de Newcastle cepa la Sota. Virus virulento — cepa de campo de un brote epizoótico, conservado a -70°C, y refrescado en embrión de pollo antes de ser usado en el desafío y la suero-neutralización.

Droga — clorhidrato de levamisole (RIPER-COL-L, polvo soluble al 46%. Lote 128 American Cyanamid Company): clorhidrato de L-2, 3, 5, 6-tetra-hidro-6-fenil imidazo (2,1-b) tiazol, diluido en agua corriente antes de su uso, de tal manera que cada ml de la dilución contenga 10mg de droga pura.

Alimento — alimento comercial para broilers.

Huevos fertiles — huevos embrionados de 9 días de incubados, provenientes del plantel de reproductores de Leghorn blancas IVITA,

UNMSM libres de pullorum y enfermedad de Newcastle.

Plan experimental — tratamiento de los grupos

Grupo I — Cada ave recibió una gota de (0.03ml) de vacuna Newcastle, vía ocular una sola vacunación y tratados 48 horas después con levamisole en dosis de 10mg por kg de peso vivo, aplicado con jeringa automática por vía oral.

Grupo II — Cada ave recibió una gota (0.03ml) de vacuna Newcastle, vía ocular una sola dosis y no recibieron levamisole.

Grupo III — Aves sin vacunación ni tratamiento. Sirvió de control en la exposición al virus virulento de Newcastle.

Obtención de las muestras de suero — se tomaron muestras de sangre, por punción cardíaca, de los tres grupos a los 0.14 y 21 días de vacunados y a los 28 días solamente los grupos I y II. Con los sueros se hicieron 2 pools de 5 sueros cada uno, usándose siempre los mismos animales para formar cada pool. Los sueros se almacenaron a -70°C hasta su uso.

Exposición de las aves — a los 21 días de vacunadas (8 horas después de obtenida la tercera muestra de sangre), todas las aves se expusieron al virus virulento de Newcastle con título de $10^{8.67}$ DL 50/0.1ml en dosis de 0.2ml por ave intramuscularmente y observados por 7 días. El desafío fue para determinar diferencias de mortandad en los grupos.

Prueba de suero-neutralización — la suero-neutralización se realizó con cada pool de los grupos I, II y III, siguiendo el método alfa de Cunningham (2). Diluciones decrecientes de virus suero constante en huevos fértiles de 9 días de incubados. Por el método de la dosis-respuesta cuantitativa descrita por Cunningham (3), se determinó el índice de neutralización en DL 50 de los sueros obtenidos los días 0, 14 y 28 de vacunados.

Análisis estadístico — se usó el análisis de varianza y la prueba de Duncan.

Resultados

La Tabla 1 muestra los resultados de la titulación de anticuerpos neutralizantes del virus Newcastle de los tres grupos de aves, indicando el recíproco del logaritmo de base 10 del índice de neutralización 50% (Indl. 50) de los pools de sueros, de los cuatro períodos diferentes. Se aprecia que al inicio del experimento no existía anticuerpos neutralizantes en ninguno de los grupos. Las aves vacunadas mostraron un crecimiento progresivo de dichos anticuerpos en los diferentes períodos de estudio, en cambio el grupo III no muestra anticuerpos neutralizantes hasta el 21º día, fecha en que se hizo el desafío, lo cual ocasionó 100% de mortandad entre 50 y 80 horas de inoculados. A esta exposición los grupos I y II sobrevivieron 100%.

Tabla 1 — Recíprocos del logaritmo del in en DL50 de los pools de sueros

Periodos	Pool	Grupos		
		I	II	III
0	1	1.17	0.90	1.07
	2	1.08	1.06	0.98
14	1	4.73	3.00	0.73
	2	4.00	1.73	0.17
21	1	6.17	3.67	1.00
	2	5.90	3.17	1.17
28	1	7.17	4.17	—*
	2	6.67	4.90	—

* Este grupo no llegó a los 28 días, murieron por el desafío

En la Tabla 2 se presenta el análisis de varianza de los valores del Indl. 50 hasta los 21 días, observándose que existe diferencias significativas entre los tratamientos. La comparación de los valores promedio de los gru-

Tabla 2 — Análisis de varianza de los in en DL50 de los sueros hasta 21 días

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Periodos	2	18.35560		
Tratamientos	2	26.82463	13.41232	
Error exp.	13	14.48217	1.11401	11.42*
Total	17	59.66290		

* Dif. significativa al 0.01

pos, mediante la prueba de Duncan, indica que existe diferencias significativas entre los grupos vacunados y el grupo control, así como entre ambos grupos vacunados (Tabla 3).

Tabla 3 — Comparación de promedios de los tres grupos por la prueba de Duncan

		Grupos	Promedios
I	—	III	3.8417 — 0.8533 = 2.9884**
I	—	II	3.8417 — 2.2550 = 1.5867*
II	—	III	2.2550 — 0.8533 = 1.4017*

* Dif. significativa al 0.05

** Dif. significativa al 0.01

El análisis de varianza de los valores del Indl. 50 hasta los 28 días, de los animales vacunados, se presenta en la Tabla 4, apreciándose que existe diferencia significativa (0.01) entre el grupo vacunado y tratado con levamisole frente al grupo que solo recibió vacuna.

Tabla 4 — Análisis de varianza de los in en el DL50 de los sueros de aves vacunadas

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrado medio	F
Periodos	3	49.14672		
Tratamiento	1	12.76276	12.76276	
Error exp.	11	5.42737	0.49339	25.86*
Total	15	67.33685		

* Dif. significativa al 0.01

Discussion

Los resultados obtenidos en este trabajo indican que el levamisole tuvo un efecto inmunoestimulante en la tasa de anticuerpos neutralizantes en aves vacunadas. En la literatura consultada, no se encontró referencias empleando la técnica de suero-neutralización, contra el virus de Newcastle, pero si existen experimentos usando la técnica de inhibición de la haemaglutinación (IH) que demuestran la acción inmunoestimulante del levamisole como los realizados por Kulkarni (5); Muñoz (7); Hernández (4) y Bottino (1). En cambio, otros autores como Meulemans (6) y Pensaert (8), con la misma técnica IH, llegan a resultados diferentes.

Referências Bibliográficas

1. Bottino, J.A. & Miguel, O. — Efeito imunoestimulante do cloridrato de levamisole na formação de anticorpos contra o vírus da doença de Newcastle nas aves vacinadas com vírus vivo cepa la Sota. Trabajo presentado en el Congreso de Avicultura, Ceará, Brasil, 1977.
2. Cunningham, C. — A laboratory guide in virology. 5. ed. Burgess Publ., 1963.
3. Cunningham, C. — Virología práctica. In: — Cordeiro del Campillo, M., trad. — A laboratory guide in virology. 6. ed. Zaragoza, España, Ed. Acribia, 1971.
4. Hernández, C. — Influence of levamisole (Ripercol-L) in the mechanism of defense of birds against Newcastle disease-levamisole (Ripercol-L) as a stimulant of the reticulo-endothelial system: producer of antibodies against Newcastle disease. Notícias Agropecuárias (Lima), 5, 1976.
5. Kulkarni, V.B.; Mulbagal, A.N.; Paranjape, V.L.; Khot, J.B. & Manda, A.V. — Immunoestimulating effect of tetramisole an antibody formation against Newcastle disease virus in chickens. Indian Vet. J., 50:225-227, 1973.
6. Meulemans, G.; Halen, P.; Schyns, P. & Vindevogel, H. — Stimulation de l'immunité post-vaccinale de la pseudo-peste aviare par le tétramisole. In: — Synoens, J. — The effects of levamisole en host defense mechanisms: a review. Belgium, Janssen Pharmaceutica Research Laboratories, 1975.
7. Muñoz, L. — Ripercol-L levamisole injectable 7.5% study of immunostimulatory effect on Newcastle disease vaccine in chickens. International Agricultural R and D report. American Cyanamid, 10:22, 1975.
8. Pensaert, M. — Effekt van tetramisole op immune reektie van kuikens sevaccinaerd tegen pseudovalgpes. In: — Synoens, J. — The effects of levamisole in host defense mechanisms: a review. Belgium, D. Beerse, Janssen Pharmaceutics Research Laboratories, 1971.
9. Renoux, S. & Renoux, M. — Effect immunostimulant d'un imidethiazole dans l'immunisation. Des souris contre l'infection par *Brucella Abortus*. Comptes Rendus Hebdomadaires des Sciences de L'Academie des Sciences (Paris), 272:349-350, 1971.

Isolation of bacteriophages from *Streptococcus* *pyogenes**

Leslie C. Benchetrit

& Agnes Marie Sá Figueiredo

Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology UFRJ,
Centro de Ciências da Saúde, Bloco I — Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

Techniques are described for isolation of bacteriophages from *Streptococcus pyogenes* and for their propagation. Temperate phages were isolated from 15 of the 90 strains tested. Mitomycin C was employed as an inducing agent.

Resumo

Isolamento de bacteriófagos a partir de Streptococcus pyogenes

Técnicas são descritas para o isolamento de bacteriófagos, a partir de *Streptococcus pyogenes* e para a sua propagação. Fagos temperados foram isolados a partir de 15 das 90 amostras bacterianas testadas. Mitomicina C foi empregada como agente indutor.

Introduction

Interest in the bacteriophages of *Streptococcus pyogenes* continues (despite technical difficulties not encountered in other phage-host systems) largely because they are an important mechanism of genetic exchange among group A streptococci and may influence decisive biological properties such as antibiotic resistance (11, 13, 16) and virulence (4, 5, 12). Thus bacteriophages may be significant determinants of the epidemiology of streptococcal infections and perhaps also the pathogenesis of nonsuppurative sequelae.

The possibility that phage-infected streptococci in a human host might induce production of L forms of group A streptococci has been suggested. L forms have been isolated from the blood of patients with rheumatic fever (19) and the streptococcal cell membrane which is antigenically similar to mammalian tissue (18) can be exposed by a phage-associated lysin (19). Attention has also been focused on the possible influence

of group A streptococcal phages in postsstreptococcal glomerulonephritis (15).

The present work presents methods used to detect lysogeny in strains of *S. pyogenes* and characterize temperate phages as an initial step of an investigation into the possible role of the viruses in the virulence of the organism and presence of hyaluronidase associated with temperate bacteriophages of group A streptococci.

Material and Methods

Strains — Ninety strains of *S. pyogenes* were examined for evidence of lysogeny. The strains were isolated from patients with suspected streptococcal infection or complications in Rio de Janeiro and classified into Lancefield group A according to the nitrous acid procedure (2, 6, 7).

The nonlysogenized strain designated as K56 was originally supplied by E. Kjems (8) and was used for the growth of phages and as a standard indicator to prepare lawns for

* Portion of thesis submitted by Agnes M.S. Figueiredo in partial fulfilment of requirement for M.S. degree, Federal University of Rio de Janeiro.

the examination of strains for lysogenic phage.

Media — Broth for phage and bacterial growth was a modification of the medium described by Malke (10) and contained 6% proteose peptone n° 3 (Difco Laboratories, Detroit, MI, USA), 0.3% NaCl, 0.05% glucose, 5% horse serum (Instituto Vital Brasil S.A., Niterói, RJ, Brazil) and 2mM CaCl₂.

Agar plates for plaque assays contained 5% proteose peptone n° 3, 0.6% NaCl, 0.01% glucose, 5% horse serum, 2mM CaCl₂, 0.1% sodium beta-glycerophosphate (E. Merck, Darmstadt, Federal Republic of Germany) and 1% agar (Stephen Skjold, personal communication). Hyaluronidase (bovine testes, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo, USA) was added as indicated at a concentration of 40 µg/ml in plates.

The media were prepared and autoclaved without glucose, CaCl₂, horse serum and hyaluronidase. Concentrated solutions of CaCl₂ (0.2M) and glucose (20%) were sterilized by autoclaving. Horse serum and a concentrated solution of hyaluronidase (0.1%) were sterilized by filtration through membrane filters (0.45-µ m pore size; Millipore Corp. Bedford, MA, USA). These were added along with CaCl₂ and glucose to the autoclaved media cooled at 45°C to obtain the final concentrations as indicated.

Detection of lysogeny in strains of *S. pyogenes* — Broth cultures grown for 18hr at 30°C were centrifuged at 500g for 30 min. and sterilized by filtration. Undiluted supernatant fluids were then spotted (0.03ml per spot) onto lawns of the indicator K56 to see whether the strains spontaneously released phage that could be lytic for the indicator bacterium.

Those strains that did not show lysogeny by this technique were induced by exposure to mitomycin C (Sigma) as follows. One drop of a culture from sheep blood broth was added to 5ml of broth and incubated overnight at 30°C. The culture was then mixed vigorously, diluted (1:20) into fresh medium (at 37°C) containing 0.1% glucose and incubated for 1hr in a 37°C water bath. Mitomycin C was added to a final concentration of 0.1 µ g/ml and the mixture was incubated for an additional 2hr at 37°C. The supernatant

of the culture was sterilized by filtration and spotted onto the indicator lawn.

Preparation of indicator lawns — One drop of a culture strain K56 which had been quick frozen (at -70°C) in log phase and thawed prior to use was added to 5ml of broth and incubated overnight at 30°C. The next day the culture was agitated vigorously, diluted (1:20) in broth and flooded on the surface of agar plates, and the excess fluid was removed with use of sterile Pasteur pipets. The plates were partially dried on the bench for 20 min. After inversion and further drying with lids off in an incubator for 20 min. at 35°C, dilutions of phage were applied (15). The plates were incubated at 35°C overnight and examined the following morning for plaque titer.

Propagation of bacteriophages — Plaque purification was carried out to assure purity of bacteriophages. Three serial picks were made on lawns of K56 from a single plaque and phage was then propagated to high titer.

To prepare bacteriophage stocks, overnight cultures of K56 (at 30°C) were incubated for 5 min. at 37°C with phages at an input multiplicity of about 2 plaque-forming units (PFU) per colony-forming unit and then diluted (1:100) into fresh medium. The phage multiplication was then allowed to proceed at 37°C for another 6 hr. Thereafter the lysate was chilled to 4°C and cellular debris was removed by centrifugation at 8000g for 30 min. The phage lysate was then incubated for 2 hr at 37°C after the addition of pancreatic deoxyribonuclease 1 (10 µ g/ml; Sigma) and pancreatic ribonuclease (10 µ g/ml; Sigma). Lysates were then passed through membrane filters.

Since temperate bacteriophages of *S. pyogenes* rapidly lose titer at 4°C after a few days, freshly induced or propagated lysates were used in the study.

Phage sensitivities to heat, chloroform and osmotic shock — A phage lysate of about 3 × 10⁷ PFU/ml was dialyzed against broth containing no serum or glucose.

Chloroform (0.02ml) was added to 1ml of lysate and the mixture was shaken vigorously for 1 min. and incubated for 1 hr. at 37°C. After the chloroform had settled out the broth layer was centrifuged at 500g for 20 min.

Phage suspensions were held for 1 hr. in a 56°C water bath.

Phages were sedimented by centrifugation at 30,000g for 1 hr. and suspended in 5M NaCl. After keeping the suspension at 4°C overnight and for 2 hr. at 37°C, a sample of the suspension was diluted into 50 volumes of distilled water.

After the treatments, standard plaque assays were carried out for each sample for determination of viability. Survival was expressed as percentage of the total plaque counts for control (untreated) samples.

Effect of cryoprotective additives on inactivation of phages by freezing — The additives investigated (14) were glycerol (0.1M), sucrose (0.1M), glucose (0.1M), dimethylsulfoxide (0.1%), and the polymer polyethylene glycol (10%; average molecular weight, 6000; Sigma) which is used to concentrate bacteriophages (17). The phage was dialyzed against broth containing no serum or glucose. Phage samples containing 2.0×10^7 PFU/ml were mixed with equal volumes of concentrated (twofold) additive mixtures to a final volume of 3.0ml and stored at -20 and -70°C. After storage for 35 days they were maintained at 4°C to accomplish slow thawing and immediately assayed for percentage survivals. Survivals were expressed as percentages of the control counts for the original dialyzed phage lysate.

Electron microscopy — A filtered phage lysate was centrifuged at 30,000g for 2 hr. in a Spinco type SW27 rotor at 4°C. Specimens were prepared by negative staining on Formvar coated copper grids with 2% aqueous solutions of uranyl acetate and were examined in a Philips 301 electron microscope.

Results

Detection of lysogeny — When the 90 strains of *S. pyogenes* were screened for evidence of spontaneous release of bacteriophage in broth culture with the indicator lawn (K56), only 2 strains showed spontaneous release of phage. The use of induction with mitomycin C increased the frequency of demonstration of lysogeny. Fifteen of the 90 cultures released bacteriophages after mitomycin induction as demonstrated by the activity of their supernatants on the indica-

tor lawn. Undiluted supernatant fluids gave complete clear lysis when spotted on strain K56. Lytic activity of the released phages for any of the 15 strains on indicator lawns was the same whether it was incubated at 30 or at 37°C. The use of another group A streptococcus as indicator strain in the examination of the remaining 75 strains for lysogenic phage did not increase the frequency of demonstration of lysogeny.

Plaque morphology — On the indicator strain K56 all phages produced plaques with a clear area generally 1mm in diameter surrounded by a more turbid halo about 2-3mm in diameter. On agar plates containing hyaluronidase (which prevents hyaluronic acid capsule formation) the halo was nearly absent. All phages produced plaques on K56 lawns when undiluted lysates were spotted in the absence of added hyaluronidase. Two phages (from strains nº 78020 and 78082) produced crystal clear plaques without added enzyme.

Resistance to heat, chloroform and osmotic shock — The phages obtained from strains nº 78020 and 78082 and propagated on strain K56 were examined for sensitivity to heat. They were totally inactivated when held at 56°C for 30 min. with less than 1% survivals. They were uniform with regard to sensitivity to chloroform as the percentage of survivals reached only about 5%. The phages were totally inactivated when submitted to osmotic shock as they may have released their DNA after rupture of the head membrane.

The effect of cryoprotective additives — Attempts were made to study the longevity of filtrates of the temperate phage from strain nº 78082 at -20 and -70°C. The effect of several commonly used cryoprotective additives on inactivation of the phage during freezing was determined. The additives investigated conferred almost no protection on the frozen phage when phage-additives mixtures were stored at -20 and -70°C for 35 days. The percentage survivals ranged from 0.4 to 5.5%. Polyethyleneglycol caused a 60% loss of PFU thus giving a relative protection to the frozen bacteriophage.

Studies were carried out to examine the possibility of maintaining a stock of the phage at 4°C after addition of the additives. Al-

most total inactivation (less than 2% survival) of the phage occurred. Gelatin (0.1%) did not slow down the inactivation of the phage during storage at 4, -20 and -70°C and the percentage of viability was less than 2%.

Phage morphology — The phage isolated from strain n.º 78020 had a polyhedral head that appears isometric and a long, non-contractile, unsheathed tail without a collar or obvious appendages (Fig. 1). It therefore belongs in morphological Bradley's group B (3), as do most but not all streptococcal phages reported (1).

Figure 1 — Electron micrograph of temperate bacteriophage from strain n.º 78020 of *Streptococcus pyogenes*, X 91,000



Discussion

In the present study, lysogeny was demonstrated even when only one indicator strain was used. The inability to demonstrate

lysogeny may have been due to the failure of induction with mitomycin C. It is also possible that the strains were not lysogenic. Another possible explanation is that strain K56 was not a suitable indicator strain. It could also be speculated that the strains possessed defective or cryptic phage. Because of limitations in availability of a large number of indicator strains it is difficult to assess whether the frequency of lysogeny occurs more frequently in *S. pyogenes* (16).

Since the bacteriophages obtained from strains n.º 78020 and 78082 were uniformly sensitive to heat, chloroform and osmotic shock these did not prove to be suitable methods of discrimination among them.

The protective actions of the additives studied were shown to be poorly effective. Use of polyethylene glycol during storage at -70°C however resulted in phage recovery of 40% of the lysate.

Plaque morphology on strain K56 was a small clear area surrounded by a more turbid, wider halo. This was, probably due to phage hyaluronidase activity on host hyaluronic acid (9, 15). This investigation provided two bacteriophages (isolated from strains n.º 78020 and 78082) that produced crystal clear plaques and thus were candidates as prototype viral particles for use in future investigations of phage hyaluronidase.

Acknowledgments

This study was supported by grants from CNPq (Auxilio n.º 2222.1749/78) and FINEP (Convênio 527/CT). We thank Dr. Lewis W. Wannamaker for the gift of the nonlysogenized strain K56 and Jan Dirk van Elsas for help in electron microscopy.

References

- Bauer, H.; Dentan, E. & Sozzi, T. — The morphology of some streptococcus bacteriophages. J. Microsc. Paris, 9:891-898, 1970.
- Benchetrit, L.C.; Borges-Neto, A.A.; Figueiredo, A.M.S. & Oliveira, C.M. de — Occurrence of group A and nongroup A betahemolytic streptococci in human infections in Rio de Janeiro. Rev. Microbiol., 11:50-54, 1980.
- Bradley, D.E. — Ultrastructure of bacteriocins. Bacteriol. Rev., 31:230-314, 1967.
- Cleary, P.P. & Johnson, Z. — Possible dual function of M protein: resistance to bacteriophage A 25 and resistance to phagocytosis by human leucocytes. Infect. Immun., 16:280-292, 1977.
- Colon-Whitt, A.; Whitt, R.S. & Cole, R.M. — Production of an erythrogenic toxin (streptococcal pyrogenic exotoxin) by a non-lysogenised group-A streptococcus. In: — Parker, M.T., ed. — Pathogenic streptococci. England, Reedbooks, Chertsey, p. 64-65, 1979.

6. El Kholy, A.; Wannamaker, L.W. & Krause, R.M. — Simplified extraction procedure for serological grouping of beta-hemolytic streptococci. *Appl. Microbiol.*, 28:836-839, 1974.
7. Figueiredo, A.M.S.; Benchetrit, L.C.; Borges-Neto, A.A. & Oliveira, C.M. de — Evaluation of the El Kholy technique for grouping beta-hemolytic streptococci. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 13:21-24, 1980.
8. Kjems, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. 2 — Absorption lysogenization and one-step growth experiments. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 42:56-66, 1958.
9. Kjems, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. 3 — Hyaluronidase produced by the streptococcal phage-host cell system. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 44:429-439, 1958.
10. Malke, H. — Prophage induction by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine in group A streptococcus. *Nature (London)*, 214:811-812, 1967.
11. Malke, H.; Starke, R.; Köhler, W.; Kolesnichenko, T.G. & Totolian, A.A. — Bacteriophage PI3234 mediated intra-and intergroup transduction of antibiotic resistance among streptococci. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig. Reihe A.*, 233:24-34, 1975.
12. Maxted, W.R. — The influence of bacteriophage on *Streptococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 12:484-495, 1955.
13. Skjold, S.A.; Malke, H. & Wannamaker, L.W. — Transduction of plasmid-mediated erythromycin resistance between group — A and — G streptococci. In: — Parker, M.T., ed. — *Pathogenic streptococci*. England, Reedbooks, p. 274-275, 1979.
14. Steele, P.R. — Prevention of low temperature denaturation injury in T4 Bo phage by low concentrations of traditional cryoprotective additives. *J. Hyg. (Camb)*, 76:453-458, 1976.
15. Wannamaker, L.W.; Skjold, S. & Maxted, W.R. — Characterization of bacteriophages from nephritogenic group A streptococci. *J. Infect. Dis.*, 121:407-418, 1970.
16. Wannamaker, L.W.; Almquist, S. & Skjold, S. — Intergroup phage reactions and transduction between group C and group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 137:1338-1353, 1973.
17. Yamamoto, K.R.; Alberts, B.M.; Benzinger, R.; Laurhoma, L. & Treiber, G. — Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large scale-virus purification. *Virology*, 40:734-744, 1970.
18. Zabriskie, J.B. & Freimer, E.H. — An immunological relationship between the Group A streptococcus and mammalian muscle. *J. Exp. Med.*, 124:661-678, 1966.
19. Zabriskie, J.B. — Streptococcal bacteriophages: their influence on the streptococcal cell. *J. Infect. Dis.*, 121:451-453, 1970.

Immunological properties of the hyaluronidase activity associated with a virulent group A streptococcal bacteriophage*

Leslie C. Benchetrit

Department of Medical Microbiology,
Institute of Microbiology UFRJ
Caixa Postal 68040
20000 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Lewis W. Wannamaker
& Ernest D. Gray

Departments of Pediatrics, Biochemistry and Microbiology,
University of Minnesota Medical School,
Minneapolis, MN 55455, USA

Summary

The antigenic relationships of hyaluronidases associated with temperate and virulent phages of group A streptococci were examined in a three-component (antibody, enzyme, substrate) assay for enzyme activity. The results indicate that these hyaluronidases are immunologically distinct and do not share antigenic determinants that relate to their functional capacity.

Resumo

Propriedades imunológicas da atividade hialuronidásica associada a bacteriófagos virulentos de estreptococos do grupo A

Foram examinadas as relações antigênicas de hialuronidases associadas a fagos virulentos e temperados de estreptococos do grupo A, utilizando-se um teste para medida de atividade enzimática com três componentes (anticorpo, enzima, substrato). Os resultados indicam que estas hialuronidases são imunologicamente distintas e não possuem os mesmos determinantes antigênicos responsáveis pela capacidade funcional.

Introduction

In his studies of virulent streptococcal bacteriophages from Paris sewage, Maxted showed that the addition of hyaluronidase (HAase) to the propagation mixture enabled these phages to penetrate the hyaluronic acid capsule of group A streptococci and thereby increased the phage titer by several orders of magnitude (10). In contrast to these virulent phages, most temperate phages of group A streptococci do not require extraneous HAase for maximum propagation as

the enzyme is associated with the viral particle or may be an integral element of the phage (2, 8). In recent studies we developed a sensitive method for the assay of HAase activity (3), purified and characterized the HAase associated with a temperate bacteriophage from a group A, M type 49 streptococcus (4) and reported the immunological properties of HAases associated with temperate bacteriophages from group A streptococci (5). The present report concerns the immunological properties of the HAase associated with a virulent bacteriophage of group A streptococci.

* Trabalho realizado na "University of Minnesota Medical School, Minneapolis, USA".

Material and Methods

Strains — The virulent group A streptococcal bacteriophage used in this study and designated as A25, was originally supplied by Dr. W.R. Maxted. Further details on this phage are provided in previous publications. (10, 11). The temperate phage was obtained from a group A, M type 49 streptococcus (University of Minnesota strain n.º GT 8760) by induction with mitomycin C as previously described (13). The type 49 strain was from a recurrent epidemic of acute nephritis at Red Lake, MN, USA (12, 13). In this communication, the two sorts of phage will be referred to as the virulent and the temperate phage. The group A, M type 12 strain, designated as K56 and originally received from Dr. E. Kjems was used for the growth of the virulent phage and as a standard indicator to prepare lawns. Preparation of bacteriophage lysates has been reported earlier (2, 12). Bacteriophage titers of the lysates were determined as described previously (12, 13).

Media — Broth for bacterial growth and induction of phages from the M type 49 strain and agar plates for plaques assays of the bacteriophages have been described elsewhere (2).

Concentration and purification of phages — Phages were recovered from clear lysates by using the polyethylene glycol method as described earlier (2). Purification of high-titer phage stocks by equilibrium centrifugation on cesium chloride gradients has been reported elsewhere (2).

Hyaluronidase assay — Hyaluronidase activity was determined by following the extent of degradation of hyaluronic acid (human umbilical cord; Sigma Chemical Co, St. Louis, Mo, USA) by measuring the remaining substrate by a sensitive spectrophotometric method. This assay of enzyme activity is based on the binding of a carbocyanine dye to undegraded substrate and has been previously described (3). The enzyme unit has been defined as that amount of HAase resulting in a 10% decrease in the absorbance of the dye-hyaluronic acid complex after incubation of the polysaccharide for 1h at 37°C and at pH 5.0. Half of the activity is obtained at pH 7.4 (3).

Streptococcal phage-associated hyaluronidase — The temperate phage-associated HAase activity has been described in earlier reports (2, 5). A purified form of this enzyme was prepared as previously described and purified to homogeneity as determined by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (4). In this report, this hyaluronidase will be referred to as the purified enzyme.

Immunological methods — The production of immune sera against preparations of purified enzyme and whole temperate bacteriophage has been previously described (5). Immunoglobulin fractions from these antisera were prepared by gel filtration on Sephadex G-100 as previously reported (5). Antiserum to the virulent phage was a gift from Dr. Horst Malke (9) and Mr. Stephen A. Skjold (14).

The experiments of phage neutralization were carried out according to the method of Adams (1). The experiments of neutralization of phage-associated HAase were carried out in a system of three components (phage, antibody and substrate) as reported earlier (5). The effect of various antiserum preparations on enzyme function was expressed as the percentage of inhibition of initial enzymatic activity (5).

Protein determination — Protein concentration in the immunoglobulin preparations and in antiserum to the virulent phage were determined by using the method of Bradford (6) with crystalline bovine serum albumin as standard.

Results

Neutralization of virulent phage-associated hyaluronidase by antiserum to purified enzyme, whole temperate and virulent phages — The enzyme-neutralizing capacities of antibodies against purified enzyme, homologous temperate phage and virulent phage upon the enzyme activity bound to the virulent phage are shown in Table 1. The immunoglobulin fractions obtained by gel filtration of the antisera against purified HAase or homologous whole phages were used in these enzyme-neutralization experiments (5). When increasing amounts of these immunoglobulins were added to a constant amount (10^{-9}

unit) of virulent phage-associated enzyme, only minimal inhibition (3-11%) of the catalytic activity of the enzyme was observed. The residual activity could not be neutralized even after the addition of $50 \mu\text{g}$ of immunoglobulin per 10^{-9} unit of phage-bound enzyme. Antibody for the virulent phage was strongly inhibitory for the virulent phage-associated enzyme (Table 1). The inhibition reached 100% of the initial activity at a ratio of $1.0 \mu\text{g}$ of antiserum protein to 10^{-9} unit of phage-bound enzyme. Heat denatured immunoglobulin or antiserum (heated for 10 min. in boiling water) had no effect on enzyme activity at concentrations ranging from 5 to $15 \mu\text{g}$ per 10^{-9} unit of enzyme.

Inhibition of propagation of temperate and virulent phage by antibody to temperate phage and purified hyaluronidase — The immunoglobulin fractions of the antisera against temperate bacteriophage and purified enzyme were tested for their ability to inhibit the propagation of bacteriophages from an induced lysate of strain n° GT 8760 and from a lysate of K56 infected with the virulent phage. The results of this study (Table 3) indicate that the temperate and virulent phage enzymes are not related because only the propagation of the temperate phage was inhibited by the immunoglobulin preparation. In contrast, the propagation of the virulent phage was relatively unaffected by these antibody preparations.

Table 1 — Inhibition of hyaluronidase activity associated with the virulent A25 phage by antibodies against virulent and temperate phages and purified enzyme

Antibody	Inhibition of hyaluronic acid degradation* (%)					
Antibody against virulent phage**	94 (0.4)	100 (0.8)	90 (1.2)	N.D.	98 (2.0)	
Antibody against temperate phage***	8 (0.5)	11 (1.0)	6 (1.5)	3 (2.0)	4 (2.5)	
Antibody against purified enzyme****	6 (0.5)	9 (1.0)	4 (1.5)	9 (2.0)	7 (2.5)	

* Amounts of whole antiserum or immunoglobulins added to the enzyme-substrate system are entered into brackets.

** Whole antiserum was used in the enzyme-neutralizing experiments.

*** Immunoglobulin preparations were obtained after gel filtration of the antisera (Material and Methods).

**** ND — not done.

In additional experiments (Table 2) treatment of bovine testes HAse, temperate bacteriophage and purified enzyme with $15 \mu\text{g}$ of protein from antiserum to the virulent phage resulted in a loss of enzyme activity of only 6-7%.

Table 2 — Inhibition of various hyaluronidase activities by antibody against the virulent phage

Hyaluronidase activity	Inhibition of hyaluronic acid degradation* (%)
Virulent phage	100 (10^{-9})
Temperate phage	7 (1.0)
Purified enzyme	6 (1.0)
Bovine tests	6 (1.0)

* Whole immune serum ($15 \mu\text{g}$) for the virulent phage was added to the enzyme-substrate system (Material and Methods). Initial enzyme activities are entered into brackets (enzyme unit).

Table 3 — Neutralization of phage propagation by antibody against purified enzyme and temperate phage

Antibody	Phage	K - value of antiserum*
Antibody against purified enzyme	Temperate Virulent	32 3
Antibody against temperate phage	Temperate Virulent	41 2

* The immunoglobulin preparations against whole temperate phage and purified enzyme were diluted at 1:250 and added to phages. The mixtures were incubated at 37°C for 30 min. before plating on the indicator strain K56. The k-value was calculated from the reduction in plaque forming units (Material and Methods).

Discussion

We have previously shown that a hyaluronidase activity is associated with the virulent A25 phage at an extremely low but detectable level (2.7×10^{-16} unit/plaque forming unit) using the sensitive dye-binding assay (2). A relatively high level of enzyme activity was associated with the temperate phage (8×10^{-7} unit/plaque forming unit; 2).

The present investigation employing antibody to purified enzyme derived from the temperate phage has provided information about the immunological relationship of the hyaluronidases associated with temperate and virulent bacteriophages. The virulent phage-bound enzyme was inhibited by antiserum to the virulent phage, yet this antise-

rum had little neutralizing effect on purified enzyme or on temperate bacteriophage. In studies of the inhibition of bacteriophage infection by antisera prepared against temperate phage and purified enzyme, the effectiveness of the inhibition of propagation (as expressed by the K-value) was clearly distinguishable for temperate and virulent phages. The results obtained by these two kinds of assay indicate an immunological diversity of the enzyme associated with these two sorts of phage. This heterogeneity in temperate and virulent phage-associated hyaluronidases is not clear. The enzymes apparently perform the same function of penetrating the mucoid hyaluronic acid capsule of the streptococcal cell. It would seem that these enzymes have similar active sites. It is possible that the principal blocking antibodies are not directed against the active site but against some adjacent structure which varies in the two phages. Temperate and virulent bacteriophages are capable of transducing resistance to antibiotics between streptococci (7, 9, 14). It could be speculated that the antigen-

nic diversity of their hyaluronidases provides a means of escaping antibody neutralization of this enzyme which is required for productive adsorption and infection of group A streptococci (2, 8, 10). This diversity may have developed in response to selective effects of immunological pressures.

Acknowledgements

This study was supported by U.S. Public Health Service grants AI-08724 and AI-09527. Dr. Wannamaker is a Career Investigator of the American Heart Association. Dr. Benchetrit was a Career Investigator Fellow of the American Heart Association and Dr. Gray was supported by U.S. Public Health Service Cardiovascular Program Project grant HL — 06314 when this study was undertaken. We thank Mary Deziel for her valuable technical assistance and Stephen A. Skjold and Dr. Horst Malke for helpful discussions and gift of the immune serum against the virulent A25 phage

References

1. Adams, M.H. — Bacteriophages. New York, Interscience Publishers/John Wiley and Sons, p. 461-466, 1959.
2. Benchetrit, L.C.; Gray, E.D. & Wannamaker, L.W. — Hyaluronidase activity of bacteriophages of group A streptococci. *Infect. Immunol.*, 15:527-532, 1977.
3. Benchetrit, L.C.; Pahuja, S.L.; Gray, E.D. & Edstrom, R.D. — A sensitive method for the assay of hyaluronidase activity. *Anal. Biochem.*, 79:431-437, 1977.
4. Benchetrit, L.C.; Gray, E.D.; Edstrom, R.D. & Wannamaker, L.W. — Purification and characterization of a hyaluronidase associated with a temperate bacteriophage of group A, type 49 streptococci. *J. Bacteriol.*, 134:221-228, 1978.
5. Benchetrit, L.C.; Wannamaker, L.W. & Gray, E.D. — Immunological properties of hyaluronidases associated with temperate bacteriophages of group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 149:73-83, 1979.
6. Bradford, M.M. — A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72:248-254, 1976.
7. Colon, A.E.; Cole, R.M. & Leonard, C.G. — Intergroup lysis and transduction by streptococcal bacteriophages. *J. Virol.*, 9:551-553, 1972.
8. Kjems, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. 3 — Hyaluronidase produced by the streptococcal phage-host cell system. *Acta. Pathol. Microbiol. Scand.*, 44:429-439, 1978.
9. Malke, H.; Starke, R.; Köhler, W.; Kolesnichenko, T.G. & Totolian, A.A. — Bacteriophage P 13234 mediated intra-and intergroup transduction of antibiotic resistance among streptococci. *Zentralbl. Bakteriol. Parasitenkd. Infektionskr. Hyg. Abt. I. Orig Reihe A.*, 233:24-34, 1975.
10. Maxted, W.R. — Enhancement of streptococcal bacteriophage lysis by hyaluronidase. *Nature (London)*, 170:1020-1021, 1953.
11. Maxted, W.R. — The influence of bacteriophage on *Streptococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 12:484-495, 1955.
12. Skjold, S.A. & Wannamaker, L.W. — Method for phage typing group A type 49 streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 4:232-238, 1976.
13. Wannamaker, L.W.; Skjold, S. & Maxted, W.R. — Characterization of bacteriophages from nephritogenic group A streptococci. *J. Infect. Dis.*, 121:407-418, 1970.
14. Wannamaker, L.W.; Almquist, S. & Skjold, S. — Intergroup phage reactions and transduction between group C and group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 137:1338-1353, 1973.

Estudo microbiológico das otites externas em cães

Marion Helena Feigl

Eduardo do Nascimento Mós

Dept.^o de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP,
Setor Medicina Veterinária, Caixa Postal 4365,
01000 São Paulo SP, Brasil

Carlos Eduardo Larsson

Dept.^o de Patologia e Clínica Médicas, Faculdade de Medicina Veterinária e
Zootecnia USP,
Cidade Universitária
05568 São Paulo SP, Brasil

& Manoel Armando Azevedo dos Santos

Dept.^o de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP,
Setor Medicina Veterinária

Resumo

Análise microbiológica de 85 amostras de secreções de ouvidos de cães com otite externa e 32 amostras de ouvidos de cães sadios, verificando-se que *P. pachydermatis* e *S. aureus* foram os agentes mais frequentemente isolados, tanto de ouvidos afetados quanto de sadios. Em todos os casos de otite, nos quais o *P. pachydermatis* esteve presente com outras bactérias, não houve necessidade de tratamento antimicótico, uma vez que a medicação antibacteriana levou o processo à cura, com subsequente desaparecimento da levedura. O papel de *P. pachydermatis*, nas otites externas, é ainda discutível.

Summary

Microbiological study of otitis externa in dog

Microbiological analysis of 85 samples from ears with otitis externa and 32 samples from normal ears of dogs. *P. pachydermatis* and *S. aureus* were the most frequently isolated agents in affected, as well as in normal ears. In all cases of otitis externa, in which *P. pachydermatis* was present with other bacteria, there was no necessity of antimycotic treatment, because only antibacterial medication was successful and cured otitis externa, with subsequent disappearance of *P. pachydermatis*. This yeast is still of doubtful responsibility in otitis externa.

Introdução

As otites externas constituem, dentre as otopatias, quadro mórbido relativamente freqüente, na prática da clínica médica dos carnívoros domésticos. Tanto na literatura nacional (4, 5), como na internacional (13, 14, 21), encontram-se trabalhos sobre a prevalência dos diferentes agentes etiológicos destes processos, em cães.

Além de bactérias Gram positivas e Gram negativas, tem-se isolado, com freqüência, levedura anascosporada da família Crypto-

coccaceae, *Pityrosporon pachydermatis* Weidman, 1925 (sinon. *Pityrosporon canis* Gustafson, 1955), tanto de ouvidos de cães sadios, como daqueles com otite. O papel desta levedura, no desencadeamento do processo, é discutido, principalmente no tocante a ser ou não agente primário destas otopatias.

O objetivo do presente estudo é concluir levantamento preliminar (4), que teve por finalidade estabelecer a freqüência dos agentes desencadeadores desta otopatia em cães e trazer subsídios à terapêutica.

Material e Métodos

Utilizaram-se secreções óticas, obtidas de cães com otite externa (85 casos) e hígidos, no tocante à patologia ótica (32 casos), trazidos para atendimento, no ambulatório da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da USP. As secreções foram coletadas com o auxílio de zaragatoas estéreis, introduzidas ao longo do conduto auditivo externo dos animais.

O material foi transportado, imediatamente, ao laboratório, em tampão fosfatado e reduzido (20), procedendo-se ao cultivo em caldo glicosado (Difco), agar sangue de carneiro a 5% (base — BHI — Difco), agar MacConkey (Difco) e agar Sabouraud (Difco) com cloranfenicol (0,05mg/ml). As colônias, obtidas após incubação a 37°C por 24-72 horas, foram identificadas bioquimicamente, segundo Lodder (15) e MacFadin (16).

Resultados e Discussão

Reuniu-se, na Tabela 1, a freqüência (%) dos diferentes microrganismos isolados de condutos auditivos de cães com otite e de cães hígidos; nas Tabelas 2 e 3, encontram-se dispostas, respectivamente, as freqüências (%) de agentes isolados em cultura pura e as associações de microrganismos obtidos de condutos auditivos afetados e normais. Finalmente, na Tabela 4, compilaram-se alguns dos trabalhos referentes ao isolamento de *P. pachydermatis*, de ouvido de cães com otite externa e de cães sem patologia de conduto auditivo. Observou-se que *Pityrosporon pachydermatis* e *Staphylococcus aureus* fo-

ram os agentes mais freqüentemente isolados, tanto de ouvidos normais, como de ouvidos afetados (Tabela 1).

Tabela 1 — Freqüência (%) de microrganismos isolados de ouvidos de cães com otite externa (85 casos) e de cães sadios (32 casos). São Paulo, 1980

Microrganismos isolados	cães com otite (%)	cães sadios (%)
<i>Pityrosporon pachydermatis</i>	50,58	43,75
<i>Staphylococcus aureus</i>	47,06	53,12
<i>Proteus mirabilis</i>	30,58	—
<i>Streptococcus</i> sp. (gama)	17,64	—
<i>Streptococcus</i> sp. (alfa hemolítico)	17,64	6,25
<i>Bacillus</i> sp.	17,64	31,25
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16,47	12,50
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12,94	—
<i>Streptococcus</i> sp. (beta hemolítico)	10,58	—
<i>Corynebacterium</i> sp.	8,23	—
<i>Enterobacter</i> sp.	4,70	3,12
<i>Escherichia coli</i>	3,52	—
<i>Proteus</i> sp.	2,35	—
<i>Alcaligenes</i> sp.	1,18	—
<i>Candida albicans</i>	1,18	—
<i>Candida parapsilosis</i>	1,18	—
<i>Candida</i> sp.	1,18	—

Tabela 2 — Freqüência (%) de microrganismos isolados, em cultura pura, de ouvidos de cães com otite externa (85 casos) e de cães sadios (32 casos). São Paulo, 1980

Microrganismos isolados	cães com otite (%)	cães sadios (%)
<i>Staphylococcus aureus</i>	7,05	31,25
<i>Pityrosporon pachydermatis</i>	3,52	9,37
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1,17	3,12
<i>Streptococcus</i> sp. (gama)	1,17	—
<i>Bacillus</i> sp.	1,17	9,37

Tabela 3 — Freqüência (%) da associação de microrganismos isolados do conduto auditivo de cães com otite externa (85 casos) e de cães sadios (32 casos)

Associações	cães com otite (%)	cães sadios (%)
<i>P. pachydermatis</i> × <i>S. aureus</i>	20,00	15,62
<i>P. pachydermatis</i> × <i>S. epidermidis</i>	4,70	9,37
<i>P. pachydermatis</i> × BGN*	3,53	—
<i>P. pachydermatis</i> × <i>Staphylococcus</i> sp. × BGN*	9,41	—

Tabela 4 — Isolamento de *P. pachydermatis* (%) em função do n.º de culturas, segundo vários autores, em diferentes países

Autor	País	Ouvidos afetados		Ouvidos sadios	
		Culturas realizadas (n.º)	Isolamento (%)	Culturas realizadas (n.º)	Isolamento (%)
Manktelow (1960)	Nova Zelândia	110	25,00	—	—
Fraser (1961)	Inglaterra	70	36,00	400	44,00
(1965)		—	—	123	43,00
(1969) cit. por Lonnon (14)		—	—	411	69,20
Gustafson (1965)	Suécia	156	15,00	345	70,00
Ribeiro & col. (1970) ⁽¹⁸⁾	Portugal	—	—	15	73,30
Virat (1972)	França	73	41,00	153	54,00
Feigl & col. (1978)	Brasil	20	30,00	—	—
Fernando & Gomes (1979)	Brasil	111	34,23	—	—
Presente trabalho	Brasil	85	50,58	32	43,75

Nossos resultados coincidiram parcialmente com os de Dufait (3), Fraser (8) e Grono (9), que isolaram *P. pachydermatis*, nas mesmas proporções, de ouvidos sadios e afetados. Interessante observar que, pela análise dos dados obtidos por outros autores, verifica-se que, como regra, a prevalência de *P. pachydermatis* é maior em ouvidos sadios, embora em nossos resultados a freqüência desta levedura seja um pouco menor (Tabela 4).

Contrariamente ao observado por Lannon (14), de que este agente micótico encontra-se sempre associado a bactérias, nossa pesquisa permitiu o isolamento de *P. pachydermatis* em cultura pura, em 3,52% dos casos de otite, como também em 9,37% dos ouvidos de cães sadios (Tabela 2). Baxter & Lawler (1) e Baxter (2) afirmam que, devido às prevalências praticamente semelhantes de isolamento de *P. pachydermatis*, em ouvidos de cães sadios e doentes, este agente pode ser considerado saprófita normal ou de importância etiológica discutível, em otites caninas, fato também observado na presente pesquisa, onde obtivemos 50,58% de freqüência do agente, em ouvidos de cães doentes e 43,75%, em cães sadios (Tabela 4). Embora Gustafson (11) tenha reproduzido a infecção pela instilação da levedura em ouvidos normais, o que encontra apoio nas pesquisas de Manktelov (17) e Smith (19), para Fraser (6); Grono (10) e Virat (21), somente a presença de grande quantidade desta levedura teria significado patológico. Isto talvez explicasse os três isolamentos (3,52%) por nós obtidos deste agente, em cultura pura de casos de otite (Tabela 2).

Dufait (3) assinala possível passagem do saprofitismo para o parasitismo, sob influência de fatores gerais ou locais, suposição apoiada por dois fatos por ele verificados:

1 — Sempre foi observada a presença de *P. pachydermatis*, em animais que apresentavam sarna otodéctica. A irritação mecânica do epitélio, provocada pelo ácaro, poderia estimular a implantação e multiplicação da levedura. Esta verificação encontra apoio nas observações de Baxter (2), que verificou serem as culturas puras de *P. pachydermatis* mais frequentemente observadas em ouvidos com grande quantidade de cerúmem, como nos casos de sarna otodéctica e/ou otite ceruminosa. Em nossa pesquisa não foram possíveis quaisquer conclusões a respeito,

pois nossas observações prenderam-se a dados de otites por bactérias e fungos, nos quais verificou-se apenas dois casos de sarna otodéctica, acompanhada da presença de *P. pachydermatis*.

2 — A cura de certas otites, pelo uso exclusivo de Nistatina, parece provar que *P. pachydermatis* foi realmente o agente etiológico das mesmas. Dufait (3) assinala dois casos em que foi obtida cura completa, através do tratamento com Nistatina, sendo que em um dos casos, a utilização prévia de vários antibióticos, tais como Neomicina, Terramicina e Cloranfenicol, não teve nenhum efeito. Virat (21), utilizando Nistatina, também obteve sucesso no tratamento de 11 casos de otite externa, onde *P. pachydermatis* foi isolado em cultura pura. Lannon (14) verificou que, contrariamente ao observado em casos de otite por *Candida* sp., nem a antibioticoterapia, nem a corticoterapia predispõem ao crescimento e multiplicação de *P. pachydermatis*.

Em nossa pesquisa, chamou-nos a atenção o fato de que em todos os casos de otite, nos quais *P. pachydermatis* esteve presente, em associação com *S. aureus* e/ou outras bactérias, não houve necessidade de tratamento antimicótico, pois apenas a medicação antibacteriana levou os processos à cura, com subsequente desaparecimento da levedura. Este fato explicaria as observações de Fraser (7), Gustafson (11) e Hatsig (12), de que nas associações de *S. aureus* e *P. pachydermatis* haveria elaboração de metabólitos, utilizados para o crescimento de ambos, e que a eliminação de *S. aureus*, por tratamento antibacteriano levaria também ao desaparecimento de *P. pachydermatis*. Fato idêntico foi observado na associação de *P. pachydermatis* com outras bactérias (Tabela 3), o que permitiria admitir outras possíveis associações do tipo *S. aureus* e *P. pachydermatis*.

Assim, quanto à importância de *P. pachydermatis*, nas otopatias caninas, nossos resultados coincidem com os de outros autores (6, 9, 21), concluindo-se ser esta levedura de responsabilidade discutida nas otites externas em cães, salientando-se que nos únicos casos em que a mesma foi isolada em cultura pura, não foi possível a avaliação terapêutica. Em relação a outros microrganismos isolados, nossos resultados coincidiram parcialmente com os obtidos por outros autores (9, 14, 21).

Referências Bibliográficas

1. Baxter, M. & Lawler, D.C. — The incidence and microbiology of otitis externa of dogs and cats in New Zealand. *New Z. Vet. J.*, 20:29, 1972.
2. Baxter, M. — The association of *Pityrosporon pachydermatis* with the normal external ear canal of dogs and cats. *J. Small Anim. Pract.*, 17:231-234, 1976.
3. Dufait, von R. — Ueber die Bedeutung von *Pityrosporon canis* bei Otitis externa und Dermatitis des Hundes. *Kleintier Praxis*, 23:29-32, 1978.
4. Feigl, M.H.; Mós, E.N.; Santos, M.A.A. & Larsson, C.E. — Levantamento microbiológico dos agentes participantes de otite externa em cães. Anais do IX Congresso Brasileiro de Microbiologia, Belo Horizonte, M.G., 1978.
5. Fernandes, J.C.T. & Gomes, M. — Microbiologia das otites externas caninas. Anais do VI Congresso Estadual de Med. Vet., III Congresso Nacional de Clínica Vet. de Pequenos Animais; III Encontro Sul Brasileiro de Médicos Veterinários. Gramado, R.S., 1979.
6. Fraser, G. — Factors predisposing to canine external otitis. *Vet. Rec.*, 73:55-58, 1961.
7. Fraser, G. — *Pityrosporon pachydermatis* Weidmann of canine origin. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 44:441-448, 1961.
8. Fraser, G. — Aetiology of otitis externa in the dog. *J. Small Anim. Pract.*, 6:45, 1965.
9. Grono, L.R. — Incidence of otitis externa in the dog. *Aust. Vet. J.*, 45:417, 1969.
10. Grono, L.R. — The experimental production of otitis externa in the dog. *Vet. Rec.*, 85:34-36, 1969.
11. Gustafson, B.A. — Otitis externa in the dog: a bacteriological and experimental study. *Nord. Vet. Med.*, 6:434, 1954.
12. Hatsig, M.; Sankovic, F.; Kipozencic, M. & Maticic, Z. — Observations on *Pityrosporon canis* in the external auditory canal in dogs and on their relation to Staphylococci. *Microbiologia*, 5:307-316, 1968.
13. Langlois, L. — Contribution a l' étude bactériologique et mycologique des otites externes du chien. Sensibilité des germes aux antibiotiques. France, École Nationale Vétérinaire de Toulouse, 1976. (Thesis).
14. Lannon, J. — Les otitis externes du chien et du chat: essai de traitement du syndrome catarrhal. France, École Nationale Vétérinaire D' Alfort, 1979. (Thesis).
15. Lodder, J. — The yeasts: a taxonomic study. Amsterdam, North Publishing, 1971.
16. MacFadin, J.F. — Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. Buenos Aires, Editorial Medica Panamericana, 1980.
17. Manktelow, B.W. — Yeasts of the genus *Pityrosporon* in the mammalian external auditory canal with special reference to the dog. *New Z. Vet. J.*, 8:76, 1960.
18. Ribeiro, A.M.; Lourdes Quintas, M. & Abreu, M.D. — The relationship of laboratory diagnosis to treatment of canine otitis externa. *J. Small Anim. Pract.*, 10:645, 1970.
19. Smith, J.M.B. — The association of yeasts with chronic otitis externa in the dog. *Aust. Vet. J.*, 44:413, 1968.
20. Socransky, J.J.; Gibbons, R.J.; Dale, A.C.; Bortnick, L.; Rosenthal, E. & MacDonald, J.B. — The microbiota of gingival crevice area of man. I — Total microscopic and viable counts and counts of specific organisms. *Archs. Oral Biol.*, 8:275-280, 1963.
21. Virat, M. — La flore fongique de l' oreille du chien. France, École Nationale Vétérinaire D' Alfort, 1972. (Thesis).

**Fungos toxicogênicos
associados a cereais.
2 — Bioensaio com ratos
albinos, com os isolados
letais provenientes de milho,
trigo e arroz**

Jocelem Mastrodi Salgado

Dept.^o de Tecnologia Rural, Escola Superior de Agricultura

Luiz de Queiróz — USP,

Caixa Postal 9

13400 Piracicaba SP, Brasil

& Paulo Campos T. de Carvalho

Dept.^o de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiróz — USP

Resumo

Ocorrência de isolados fúngicos letais, associados a milho, trigo e arroz através de ensaio biológico com ratos albinos. Alguns isolados dos gêneros *Fusarium*, *Diplodia*, *Aspergillus* e *Penicillium* foram letais, matando os animais durante o período experimental de 10 dias.

Summary

Biological effects of lethal fungi, isolated from corn, wheat and rice seeds on white rats (var. albinus)

Some isolates of *Fusarium*, *Diplodia*, *Aspergillus* and *Penicillium* where lethal to rats, killing all animals during the experimental period of 10 days.

Introdução

As micotoxinas podem ser consideradas como metabólitos secundários, sintetizados durante o crescimento e multiplicação de certos fungos, quando condições ambientais de umidade, temperatura e substrato são favoráveis. Essas micotoxinas podem ser produzidas dentro das estruturas do fungo (hifas, esporos e outros) ou serem elaboradas no substrato. Num, como no outro caso, podem produzir reações tóxicas, em animais ou pessoas expostas a elas por ingestão, contacto ou inalação, sendo a ingestão a forma mais comum de intoxicação (5).

Foram os trabalhos de Carll & col. (4) e os de Forgacs & col. (10) que despertaram o interesse de estudos sobre as intoxicações fúngicas de animais. Esses trabalhos evidenciaram o papel dos fungos em certos casos de hiperceratose bovina, provocada aparentemente pela ingestão de ração contaminada por espécies do gênero *Aspergillus*.

Posteriormente, outros autores descreveram diversas manifestações de intoxicações em suínos, aves, bovinos, a partir de milho e amendoim mofados, tanto no exterior como no Brasil (1, 6, 20, 26).

Por outro lado, o que é mais importante, muitas doenças humanas, de etiologia então desconhecida, têm sido atribuídas à ingestão de alimentos mofados (13). Assim, no início do ano 1900 significante micotoxicose ocorreu na Rússia, resultando em morte de um grande número de pessoas. A causa exata dessas mortes não foi apurada até 1960, quando foi estabelecido que o consumo de grãos de arroz contaminado por *Fusarium*, *Cladosporium* e *Alternaria* era o responsável pela micotoxicose hoje conhecida como Aleucia Tóxica Alimentar (ATA).

Outros deuteromicetos, entre os quais devem ser destacadas várias espécies de *Fusarium*, podem produzir micotoxinas, tais como zearalenone ou F-2, responsável pela síndrome estrogênica em animais e pelo mau fun-

cionamento do sistema genital (15), e o grupo de tricotecenos, responsável por violenta atividade dermatítica no homem e animais (2).

As pesquisas mais recentes mostraram que o estudo das micotoxinas é de grande significado e importância para o homem, principalmente porque os alimentos como trigo, aveia, cevada, arroz, centeio, amendoim, semente de algodão e seus subprodutos poderão ser substratos para a produção de micotoxinas, resultando em micotoxicoses em homens e animais (9, 12, 23, 24, 27).

Nem todos os animais ou homens exibem o mesmo grau de sensibilidade às várias micotoxinas. Diferentes fatores regulam essa sensibilidade: fatores específicos individuais, de idade, estado de saúde, grau de exposição e outros (3, 7). Entre esses outros deve ser destacada a quantidade de toxina ingerida. Dados revelam que pequenas doses de uma toxina poderão acarretar efeitos imediatos em termos de evidente redução da capacidade mental, da habilidade física e da absorção do alimento. A absorção, em doses moderadas, freqüentemente resulta em redução da resposta imune e consequente aumento da susceptibilidade a doenças causadas por alguns agentes. Por outro lado, ingestão de doses elevadas causa uma série de anormalidades como por exemplo: nefropatia endêmica, carcinoma primário do fígado, proliferação do ductobiliar, necrose de vários órgãos, leucopenia, edema, hiperplasia da paratireóide, perturbações renais de vários tipos, parada respiratória, e, em casos extremos a morte (9).

O presente trabalho teve por objetivo verificar a ocorrência de isolados fúngicos letais associados a milho, trigo e arroz através de ensaio biológico com ratos albinos.

Material e Métodos

Produção de micotoxina — Preparo do meio e semeadura — Cerca de 300 gramas de milho (variedade Central mex, ESALQ safra 76/77) foram transferidas para frascos de conserva de capacidade de 750ml com tampas perfuradas tamponadas com algodão hidrófilo, para permitir trocas gasosas. Em seguida, adicionou-se cerca de 100ml de água em cada frasco autoclavando-os, por trinta minutos a 1 atmosfera de pressão (121°C). Após a autoclavagem, esses meios foram semeados

asepticamente com os isolados por nós obtidos, a partir de cereais (22).

Essa semeadura foi feita transferindo-se o conteúdo de um tubo de cultura adicionado a 5ml de água estéril para cada frasco de meio de milho.

Condições de produção — Os meios inoculados com os respectivos isolados foram incubados por duas semanas a 25°C para o desenvolvimento do fungo. Após esse período, os frascos foram transferidos para câmara fria com temperatura regulada entre 12-14°C, por um período de três semanas para a produção de toxina (8).

Secagem e obtenção das rações — Após as três semanas de incubação, o material contido nos frascos, foi transferido para estufa de circulação forçada (temperatura controlada para 65°C) por três dias. Posteriormente, o material seco foi moído em moinho de facas e em seguida, acondicionado em sacos plásticos para posterior utilização no ensaio biológico.

Ensaio Biológico — Seleção dos Animais — Para testar a presença de isolados tóxicos foram utilizados no presente trabalho *Rattus norvegicus* (variedade Albinus), da linhagem wistar. As matrizes, ou as linhagens puras de machos e fêmeas adultas (cerca de 35 fêmeas e 15 machos) para os cruzamentos sucessivos, foram provenientes do Biotério da Faculdade de Ciências Médicas e Biológicas do Campus de Botucatu, da UNESP.

Cruzamento para obtenção dos animais para o teste de toxicidade — O cruzamento entre os animais foi feito, colocando duas fêmeas e um macho adultos em gaiolas próprias durante cinco dias consecutivos. Após esse período, as fêmeas foram separadas em gaiolas individuais, apresentando um período de gestação de 21 dias. Os filhotes foram deixados com a mãe até o desmame o que se deu após 21 a 23 dias. Após esse período os animais foram alimentados com ração comercial para ratos (Anderson Clayton), isenta de micotoxinas, até o dia de montagem do experimento.

Condução do experimento — As rações obtidas como descrito anteriormente foram fornecidas aos ratos desmamados, utilizando três animais para cada isolado. Os animais

foram padronizados por peso, e tinham idade que variava de 30 a 55 dias. Esses animais foram colocados em três grupos, sendo que no primeiro encontravam-se os animais mais pesados, no segundo os de peso intermediário e no terceiro grupo os animais de mais baixo peso.

Cerca de 50 gramas de ração representativa do isolado foram colocadas para cada um dos três animais. Para os três animais de cada controle foi utilizada a ração (milho autoclavado e moído) sem inoculação. Os isolados que resultaram em morte dos ratos das três repetições dentro de um período de quatro a dez dias, foram referidos como letais. As rações inoculadas com esses isolados foram mantidas em frascos hermeticamente fechados, para que em trabalhos futuros seja possível a identificação das toxinas através da técnica de cromatografia em camada delgada.

Resultados e Discussão

Os resultados do número de isolados letais associados a milho, trigo e arroz aparecem na Tabela 1.

Tabela 1 — Levantamento do número de isolados letais associados a milho, trigo e arroz através de ensaio biológico com ratos albinos

Gêneros isolados	N.º total de isolados	N.º letais		
		Milho	Trigo	Arroz
<i>Fusarium</i> spp. (1)*	49	7	—	—
<i>Fusarium</i> spp. (2)	37	9	2	1
<i>Fusarium</i> spp. (3)	10	2	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. (1)	28	1	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. (2)	6	—	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. (3)	2	—	—	—
<i>Aspergillus</i> spp. (4)	1	—	—	—
<i>Penicillium</i> spp.	3	1	—	—
<i>Diplodia</i> spp.	8	4	—	—
Total	142	24	2	1

* O número entre parênteses corresponde ao grupo de isolados com características morfológicas semelhantes (22).

Os resultados foram analisados em função da letalidade dos isolados, critério semelhante ao adotado por MiRocha & col. (16), e de uma variação quantitativa, através do ganho ou perda de peso que serão descritos em trabalho futuro.

Como se pode observar na Tabela 1, as espécies do gênero *Fusarium* foram freqüentemente letais, provocando nos animais

acentuada hemorragia intestinal, hepática e esplênica, sintomas esses sempre associados a secreções purulentas ou sanguinolentas nos órgãos genitais externos dos animais. Segundo a literatura esse quadro sintomatológico está freqüentemente associado a micotoxicose (11, 18, 19, 21, 25).

Embora, não tenha sido feita ainda a identificação química da toxina envolvida, provavelmente o grupo de micotoxinas presente seja o dos tricotecenos produzidos por espécies de *Fusarium*. Segundo a literatura, quando esses tricotecenos são ingeridos pelos animais tornam-se inativos provocando diarréia e hemorragia retal. Exames internos desses animais mostraram que tanto a mucosa do intestino delgado como a do estômago se rompem provocando hemorragias que podem progredir para gastroenterites causando a morte (17).

Além dessas desordens digestivas e diarréias com sangue, lesões hemorrágicas dos intestinos, dos rins, coração, bexiga, pulmões, já foram atribuídas à ingestão de milho contaminado predominantemente por *Fusarium tricinctum* (25).

Esse resultado não chegou a surpreender, uma vez que *Fusarium tricinctum* é um dos isolados mais comuns em milho, e o extrato de sua cultura é mais potente que o produzido por outros isolados (18, 28).

No presente trabalho além das espécies do gênero *Fusarium*, espécies do gênero *Penicillium* e *Aspergillus*, embora menos freqüentes, causaram a morte dos animais, quando presentes na alimentação.

Ao exame interno, esses animais apresentaram acentuada hemorragia hepática, esplênica e renal, e quando não, dependendo de espécie envolvida (22), somente hemorragia intestinal. Isso sugeriu, que, provavelmente, a micotoxina atuante seja a ochratoxina, pois, segundo Krogh (14) os órgãos afetados por essa toxina são o fígado, os rins e o intestino. Síndrome hemorrágica típica foi descrita por Gilgan & col. (11) em animais que ingeriram milho contaminado por espécies dos gêneros *Aspergillus* e *Penicillium*.

Resultado surpreendente, observado nesse trabalho, foi a produção de micotoxina por isolados de fungo do gênero *Diplodia*, os quais não são citados na literatura como produtores de micotoxina. Alguns isolados desse gênero, quando presentes na alimentação dos animais, foram letais, e os animais, ao

serem observados internamente, exibiram acentuada hemorragia intestinal associada a secreção purulenta nos órgãos genitais. Outros isolados do mesmo gênero, além de causarem essa hemorragia intestinal característica, provocaram lesões hemorrágicas no fígado e baço dos animais.

Dos resultados obtidos no bioensaio foi possível tirar as seguintes conclusões: 21 isolados do gênero *Fusarium*, 4 do gênero *Diplodia*, 1 espécie do gênero *Aspergillus* e uma do gênero *Penicillium* foram letais, matando os animais durante o período experimental de 10 dias.

Referências Bibliográficas

1. Amaral, L.B.S. — Torta de amendoim e morte de suínos. O Biológico, 27:63, 1961.
2. Bamburg, J.R. & Strong, F.M. — In: — Kadis, S.; Ciegler, A. & Ajl, S.J., eds. — Microbial Toxins, 8:207-292. New York, Academic Press, 1971.
3. Butler, W.H. & Barnes, J.M. — Toxic effect of groundnut meal containing aflatoxin to rats and guinea pigs. Brit. J. Canc., 17:699-710, 1973.
4. Carll, W.T.; Forgacs, J. & Herring, A.S. — Toxicity of fungi isolated from food concentrate. Amer. Jom. Hug., 60:8-14, 1954.
5. Carlton, W. — Mycotoxicoses in animals and humans. Proc. Of the Amer. Phytopathol. Soc., 3:140-155, 1976.
6. Carnaghan, R.B.A. & Sargeant, K. — The toxicity of certains groundnut meals to poultry. Vet. Rec., 73:726-727, 1961.
7. Carnaghan, R.B.A. & Crawford, M. — Relationship between in gestion of aflatoxin and primary liver cancer. Brit. Vet. Jour., 120:201-204, 1964.
8. Christensen, C.M.; Nelson, G.H. & MiRocha, C.J. — Effect on the White rat uterus of a toxic substance isolated from *Fusarium*. Appl. Microbiol., 13:653-659, 1965.
9. Diener, U.L. — Environment factors influencing mycotoxin formation in the contamination of foods. Proc. of the Amer. Phytopathol., 3:126-139, 1976.
10. Forgacs, J.; Carll, W.T.; Herring, A.S. & Mahlandt, B.G. — A toxic *Aspergillus Clavatus* isolated from feed pellets. Amer. Jour. Hyg., 60:15-26, 1954.
11. Gilgan, M.W.; Smalley, E.B. & Strong, F.M. — Isolation and partial characterization of a toxic from *Fusarium tricinctum* on moldy corn. Arch. of Biol. and Bioph., 114:1-3, 1966.
12. Hesseltine, C.W. — Natural occurrence of mycotoxins in cereal. Mycopath. Mycol. Appl., 53:141-153, 1974.
13. Jarvis, S.B. — Factors affecting the production of mycotoxins. J. Appl. Bact., 34:199-213, 1971.
14. Krogh, P. — Mycotoxic nephropathy. In: — Purchase, I.F.H., ed. — Mycotoxins. Amsterdam, Elsevier Press, p. 419-427, 1974.
15. MiRocha, G.J.; Christensen, C.M. & Nelson, G.H. — Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. Appl. Microb., 15:497-503, 1967.
16. MiRocha, G.J.: Christensen, C.M. & Nelson, G.H. — Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. Biotech. and Bioeng., 10:469-482, 1968.
17. MiRocha, G.J. & Christensen, C.M. — Fungi metabolites toxic to animals. Ann. Review of Phytopathol., 12:303-329, 1974.
18. MiRocha, G.J. & Christensen, C.M. — Mycotoxins and the fungi that produce them. Proc. of the Americ. Phytopathol. Society , 3:110-125, 1976.
19. Pettit, R.E. & Taber, A.R. — Symposium on mycotoxicology food and feed contamination. Proc. of the Amer. Phytopathol. Society , 3:99-125, 1976.
20. Raimo, H.F.; Correa, R. & Andrade, B.M. — Ação tóxica do farelo de torta de amendoim produzido em São Paulo, para aves e outros animais. Bol. Ind. Animal, 20:361-364, 1962.
21. Romer, T.R. — Analytical approaches to the trichotecenes mycotoxins. Cereal Food World, 22:520-523, 1977.
22. Salgado, J.M. & Carvalho, P.C.T. — Fungos Toxigenicos associados a cereais. I — Levantamento da micoflora em milho, trigo e arroz. Rev. Microbiol. (S. Paulo), 11:60-63, 1980.
23. Sargeant, K.; Carnaghan, B.A. & Allcroft, R. — Toxic products in groundnuts: chemistry and origin. Chem. Ind. (London), 12:53-55, 1963.
24. Scott, P.M. & Hand, T.B. — Method for the detection and estimation of ochratoxin A in some cereals products. Jour. A.O.A.C., 50:336-370, 1967.
25. Shotwell, O.L. — Mycotoxins in corn: related problems. Cereal Food World, 22:524-527, 1977.
26. Sippel, W.L.; Burnside, J.E. & Atwood, M.B. — A disease of swine and cattle caudae by eatin moldy Corn. Proc. Brook Amer. Med. Ass., 90:174-181, 1953.
27. Stob, M.; Baldwin, R.S.; Tuite, J.; Andrews, F.N. & Gillette, K.G. — Isolation of a anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Gibberella zeae*. Nature, 196:1318, 1962.
28. Vesonder, R.F.; Ciegler, A. & Jensen — Isolation of the emetic principle from *Fusarium* infected corn. Appl. Microbiol., 26:1008-1010, 1973.

**Fungos toxicogênicos
associados a cereais.
3 – Bioensaio com ratos
albinos com isolados
não letais do milho,
trigo e arroz**

Jocelem Mastrodi Salgado

Dept.^o de Tecnologia Rural, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP,
Caixa Postal 9
13400 Piracicaba SP, Brasil

& Paulo Campos T. de Carvalho

Dept.^o de Fitopatologia, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP

Resumo

Efeito biológico sobre ratos brancos (var. *albinus*) de fungos não letais, isolados de sementes de milho, trigo e arroz. Cinco isolados do gênero *Aspergillus*, um do gênero *Fusarium* e dois de *Mycelia sterilia* apresentaram resposta linear, com os animais ganhando peso durante todo o período experimental e com quadro sintomatológico tóxico e ligeiramente tóxico, o que pode ser explicado, entre outros fatores, por acúmulo anormal de líquido, retenção de resíduos metabólicos ou a um efeito hormonal estrogênico. 20 isolados de gênero *Fusarium*, dois do gênero *Aspergillus*, uma espécie do gênero *Trichoderma*, uma do gênero *Diplodia* e uma de *Mycelia sterilia* apresentaram resposta linear, com os animais perdendo peso durante todo o experimento e com quadro sintomatológico tóxico e ligeiramente tóxico, sendo essa redução de peso efeito característico de micotoxicoses. Três isolados do gênero *Fusarium* e um do gênero *Aspergillus* apresentaram regressão linear, com os animais perdendo peso durante toda a fase experimental. Entretanto, isso não deve ser atribuído a efeito tóxico, uma vez que os animais apresentaram quadro sintomatológico normal, devendo ser, provavelmente, atribuído a fatores específicos na ração, tais como palatibilidade ou baixo valor energético ou protéico, devido à imobilização dos nutrientes pelo próprio fungo. Algumas espécies do gênero *Fusarium* apresentaram resposta quadrática, com os animais perdendo peso no início, atingindo um ponto de mínimo e ganhando peso a seguir. Entretanto, esse ganho de peso, associado a quadro sintomatológico variando de tóxico a ligeiramente tóxico, sugere micotoxicose, provavelmente por ação de hormônios estrogênicos. Três isolados do gênero *Aspergillus* e dois isolados do gênero *Curvularia* apresentaram resposta quadrática, ou seja, animais ganharam peso no início, atingiram um ponto de máxima e depois passaram a perder peso. Essa perda de peso, associada a quadro patológico tóxico ou ligeiramente tóxico, sugere o envolvimento de micotoxinas. Alguns isolados dos gêneros *Fusarium*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Mycelia sterilia*, mesmo presentes nas rações, não manifestaram efeitos tóxicos aos animais.

Summary

Biological effects of non lethal fungi isolated from corn, wheat and rice seed on white rats (var. albinus)

Five isolates of *Aspergillus*, one of *Fusarium* and two of *Mycelia sterilia* presented a positive linear response in which the animals presented a steady weight gain but with a toxic symptomatology which varied from toxic to mildly toxic, and which can be explained, among other factors, by an abnormal retention of liquid or metabolic residues or also by an estrogenic hormonal effect. 20 isolates of *Fusarium*, two of *Aspergillus*, one of *Trichoderma*, one of *Diplodia* and one of *Mycelia sterilia* showed a negative linear response, in which the animals presented a steady weight loss and with toxic to mildly toxic symptomatology; this weight loss is a characteristic effect of mycotoxicosis. Three isolates of *Fusarium* and one of *Aspergillus* presented a negative linear regression, with the animals having a weight loss during the whole experimental period. These cases, however, should not be attributed to toxic effects because the animals showed a normal symptomatology; the causes of this effect are probably specific factors of the feed as, for example, the taste or a low energetic or proteic

content due to the immobilization of nutrients by the fungi. Some isolates of *Fusarium* presented a quadratic response, with the animal suffering a weight loss at the beginning followed by a period of weight gain. However, this weight gain was associated to a toxic or mildly symptomatology; suggesting a mycotoxicosis probably due to strogenic hormones. Three isolates of *Aspergillus* and two of *Curvularia* presented a quadratic response, which means that the animals gained weight in the beginning and showed a weight loss during a latter period of the experiment. This weight loss associated to a toxic or wildly toxic symptomatology suggests the effect of mycotoxins. A few isolates of *Fusarium*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* and *Mycelia sterilia* did not show any toxic effect on the animals.

Introdução

A ação hepatocarcinogênica das aflatoxinas para ratos tem sido mostrada por vários autores. Lancaster & col. (17) foram os primeiros a evidenciar ter a aflatoxina tal atividade. Em estudos iniciais, verificaram que ratos alimentados por trinta semanas com farelo de amendoim contaminado, apresentaram lesões no fígado e tumores múltiplos, incluindo carcinoma. Por outro lado, injeções subcutâneas de 50 ou 500 µg de aflatoxina B e G, em ratos, produziram simultaneamente sarcomas e fibrosarcomas, após 20 a 21 semanas (10).

Segundo Barnes & Butler (3), os ratos parecem ser em parte resistentes à aflatoxina, uma vez que são capazes de sobreviver por curto período experimental, alimentando-se com dieta contendo mais de 50% de farelo tóxico. Entretanto, prolongada ingestão de cerca de 20% de dieta tóxica, reduz a taxa de crescimento daqueles animais, bem como a absorção do alimento, além de originar lesões no fígado e hepatomas (17). Os danos causados pelas aflatoxinas não se restringem apenas aquele órgão. Trabalhos mostram que já foram observados tumores nos rins e também mudanças no quadro hematológico com visível síndrome anêmica em ratos alimentados com dietas contendo aflatoxinas (5).

Outra micotoxina intensivamente investigada é a ochratoxina, metabólito tóxico produzido pelo fungo *Aspergillus ochraceus* W(1, 13, 27, 33, 35, 36). Até o momento, foram descritas três ochratoxinas: A, B, C. A ochratoxina é produzida por *Aspergillus ochraceus* e *P. viridicatum* em vários substratos naturais, destacando-se entre eles grãos de milho moído e esterilizados, grãos de trigo, aveia, arroz polido, pecans, com concomitante produção de ácido penicílico e citrinina (1, 2, 9, 27).

Tanto a ochratoxina A como a B tem sido encontrada como contaminante natural de

pós-colheita, em vários produtos agrícolas entre eles cevada, aveia, milho, arroz, nozes e feijão branco (1, 27).

Os efeitos causados pela ochratoxina em animais, especialmente em ratos, têm sido verificados por vários autores. Theron & col. (3) observaram, através de exames anátomo-patológicos, degeneração hialina e necrose das células hepáticas em ratos. Os autores sugerem que o retículo endoplasmático seja o local onde a toxina exerce primariamente sua atividade patológica. Estudos mais recentes mostram que os órgãos afetados pela ochratoxina são o fígado, rins e intestinos, provocando necrose tubular dos rins, degeneração hepática e enterite ou inflamação do intestino delgado (16).

Recentemente, alguns problemas de infertilidade em porcos nos Estados Unidos têm sido explicados pela descoberta de um metabólito estrogênico, produzido por *Fusarium graminearum* em milho. A síndrome estrogênica em porcos, onde pela primeira vez associou-se estrogenismo e *Fusarium*, inicia-se pelo sistema genital. A vulva apresenta-se intumescida, avermelhada e, muitas vezes, em casos severos, poderá haver progressão para um prolapsus vaginal. Por outro lado, o útero torna-se alargado, edematoso e tortuoso, os ovários apresentam-se encolhidos e a porca em prenhez poderá abortar. Para os machos, efeitos feminilizantes, como atrofia dos testículos e aumento das glândulas mamárias, já foram observados. Atualmente, há evidência de que a maior causa da doença em porcos seja uma toxina produzida pelo fungo *Fusarium graminearum* e talvez por outras espécies do complexo *Giberella zae*, quando o substrato é o milho armazenado (7, 19, 22, 32).

O fungo não é comum em milho logo após ser colhido, mas, desde que o milho seja deixado na espiga, no campo, ou armazenado em celeiros e exposto ao tempo, poderá ser invadido por outros fungos, podendo alguns destes, serem produtores de toxinas. Um

período de baixa temperatura e temperatura alternada, moderada e baixa, é necessário para a produção da toxina F-2 ou zearalenone. O composto estrogênico produzido por *Fusarium* tem sido encontrado em alimentos comercializados para porcos, em quantidades suficientes para causar a síndrome estrogênica nestes e em outros animais, aos quais a ração seja administrada (20).

Sharda & col. (31), estudando a toxidez de *Fusarium graminearum* em ratos e porcos, verificaram que todos os animais que morreram apresentaram ictericia e alteração histológica no fígado. Além disso, os ratos alimentados com milho contaminado apresentaram diminuição na ingestão de alimentos e no ganho em peso, quando comparados com o controle. Atualmente, há evidências de que frequentes abortos, que ocorrem em rebanhos de ovelhas, sejam devidos ao consumo de rações contaminadas com fungos produtores de F-2 (23).

Quanto aos epoxitricotecenes, trata-se de um grupo de metabólitos secundários, química e biologicamente ativos, produzidos em laboratório por *Fusarium tricinctum* (sin. *F. poae*, *F. sporotrichioides*), *Fusarium solani*, *F. roseum* (*Giberella zaeae*), *Fusarium lateritium* e *Trichoderma lignorum* (14, 15, 27, 28).

Estas substâncias, quando aplicadas na pele de ratos ou coelhos, produzem violenta reação dermatítica, caracterizada por severa irritação local, inflamação, descamação e hemorragia subepidermal (12, 21). Esse método é bastante sensível para acusar a presença de tricotecenes, uma vez que análise química é difícil, pois não fluorescem sob ultravioleta, e nenhum deles absorvem luz nessa região do espectro (22).

Quando os tricotecenes são administrados oralmente, método usual de ingestão pelos animais, estes tornam-se inativos, apresentando diarréia e hemorragia retal. Exames internos dos animais mostraram que tanto a mucosa epitelial do intestino delgado como a do estômago se rompem, provocando hemorragias, as quais poderão progredir para severa gastroenterite, seguida por morte. Além disso, os intestinos sofrem degeneração e, em animais de grande porte, é observada violenta hemorragia no lúmen do intestino delgado (21).

Segundo Burmeister (4), embora muitas espécies de fungos sejam isoladas de amostras tóxicas de milho, *Fusarium tricinctum* é

uma das mais comuns. O extrato de cultura desse fungo é mais potente do que o produzido por outros isolados. Recentemente, outra micotoxina, produzida por espécies de *Fusarium*, foi isolada de milharais. Essa micotoxina recebeu o nome de vomitoxina, por produzir sintomas de vômito nos animais que a ingiram (22, 37).

Outra micotoxina estudada é a produtora de aleucia tóxica alimentar (ATA), conhecida como angina séptica, produzida por *Fusarium poae* e *F. sporotrichioides* (sin. *F. tricinctum*), em grãos de cereais expostos à neve. Para a produção dessa micotoxina, o fungo exige temperatura ao redor de -5°C. Como em nossas condições dificilmente os cereais ficam expostos no campo a essa temperatura, é de se supor que essa micotoxina não ocorra ou seja extremamente rara no Brasil (11, 27). Em trabalhos anteriores, os autores realizaram o levantamento da micoflora associada a milho, trigo e arroz (29) e posteriormente foram estudados os isolados que produziram toxinas letais.

O presente trabalho teve por objetivo estudar o comportamento biológico dos isolados não letais, associados a milho, trigo e arroz, através de ensaio com ratos albinos.

Material e Métodos

Produção de micotoxina — Fundamentalmente, a metodologia empregada no ensaio biológico, bem como o meio para produção de micotoxina, foi o sugerido por Salgado & Carvalho (29). Cerca de 50 gramas de ração representativa do isolado foram colocadas para cada um dos três animais. Para os três animais de cada controle foi utilizada a ração (milho autoclavado e moído sem inoculação). Os animais foram pesados diariamente, no mesmo horário, durante os dez dias do experimento. Curvas de peso, consumo de rações e todos os sintomas externos como palidez, perda de pelo, dermatite e secreções foram observados e anotados. Devido a limitações quanto ao número de gaiolas e animais adequados ao bioensaio, este foi realizado em cinco lotes para os isolados de milho, dois lotes para os isolados de trigo, um lote para arroz. Os resultados foram analisados estatisticamente, empregando-se blocos casualizados com três repetições e análise de variância de regressões polinomiais.

Após o período experimental, todos os animais foram sacrificados e feitas obser-

vações macroscópicas do fígado, baço, rins e intestinos. Fígados, baços e rins dos ratos, representativos de um isolado, foram mantidos em solução fixadora (solução de Zenker), a fim de serem feitos estudos histológicos em trabalhos futuros.

Avaliação do nível de toxidez — Como critério para a avaliação do nível de toxidez dos isolados não letais, foi utilizada a escala descrita a seguir:

Tóxico — Alguns dos animais morreram, ou, se sobreviveram, perderam muito peso. Ao exame interno, apresentaram acentuada hemorragia intestinal.

Ligeiramente tóxico — Os animais sobreviveram, mas, após o período experimental, ao serem feitas as biópsias, exibiram discreta hemorragia intestinal ou secreção purulenta nos órgãos genitais externos.

Atóxico — Os animais sobreviveram, mantiveram o peso inicial ou, às vezes, até o

Tabela 1 — Estudo do comportamento biológico dos isolados fúngicos com resposta linear ou quadrática ao ganho ou perda de peso

Regressão	Quadro Sintomatológico	Substrato	Fungo	Nº de isolados
Linear (-)	Ausente	Milho	<i>Fusarium</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Diplodia</i> sp.	1 1 1
		Trigo	<i>Penicillium</i> sp.	1
		Arroz	<i>Curvularia</i> sp.	1
	Tóxico	Milho	<i>Aspergillus</i> spp. (1) <i>Aspergillus</i> spp. (2) <i>Aspergillus</i> spp. (4)	2 2 1
		Arroz	<i>Mycelia sterilia</i>	1
Linear (+)	Ausente	Trigo	<i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Aspergillus</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Fusarium</i> spp. (3) <i>Aspergillus</i> spp. (1)	3 1 7 3 2 1
		Milho		
		Arroz	<i>Aspergillus</i> spp. (1) <i>Diplodia</i> sp. <i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Mycelia sterilia</i> <i>Fusarium</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (3) <i>Trichoderma</i> sp.	1 1 3 1 2 1 1
	Ligeiramente Tóxico	Milho	<i>Fusarium</i> spp. (2)	1
Quadrática (+)*	Ausente	Milho	<i>Cephalosporium</i> sp. <i>Aspergillus</i> spp. (2)	1 1
		Trigo	<i>Fusarium</i> spp. (2)	1
		Arroz	<i>Mycelia sterilia</i>	1
		Milho	<i>Fusarium</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Fusarium</i> spp. (3)	2 1 2
	Ligeiramente Tóxico	Milho	<i>Fusarium</i> spp. (1)	1
Quadrática (-)*	Ausente	Milho	<i>Fusarium</i> spp. (1) <i>Fusarium</i> spp. (2) <i>Aspergillus</i> spp. (1)	3 3 1
		Trigo	<i>Aspergillus</i> spp. (2)	1
		Milho	<i>Fusarium</i> spp. (2)	2
	Tóxico	Arroz	<i>Aspergillus</i> spp. (1)	2
			<i>Curvularia</i> sp.	2
	Ligeiramente Tóxico	Milho	<i>Aspergillus</i> spp. (1)	1

* Quadrática (+) indica que a curva apresenta um ponto de mínimo

* Quadrática (-) indica que a curva apresenta um ponto de máximo

A representação gráfica dos isolados com resposta linear ou quadrática ao ganho ou perda de peso aparece nos gráficos 1, 2, 3 e 4.

aumentaram. Ao ser feita a biópsia, não exibiram qualquer anormalidade interna.

Gráfico 1 — Representação gráfica do comportamento linear dos animais quanto ao ganho de peso.
Exemplo típico: *Diplodia* sp.(16)
 $(\hat{Y} = 0,2989x + 36,58)$

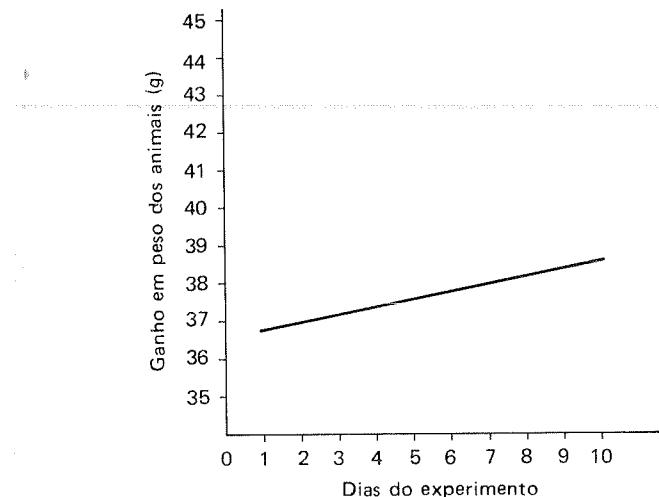


Gráfico 2 — Representação gráfica do comportamento linear dos animais quanto ao ganho de peso.
Exemplo típico: *Fusarium* sp.(35)
 $(\hat{Y} = 1,5583x + 37,11)$

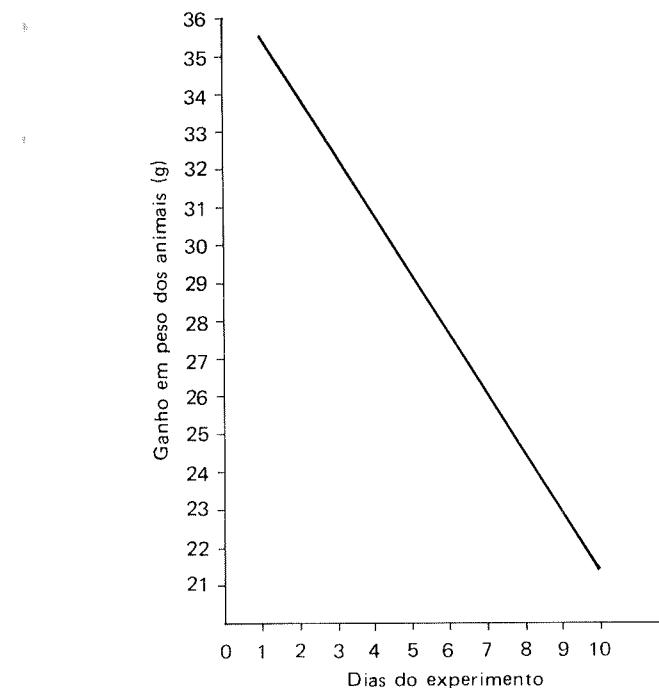


Gráfico 3 — Representação gráfica do comportamento quadrático dos animais quanto ao ganho de peso.
Exemplo típico: *Aspergillus* sp.(69)

$$(\hat{Y} = -0,2098x^2 + 2,5471x + 41,63)$$

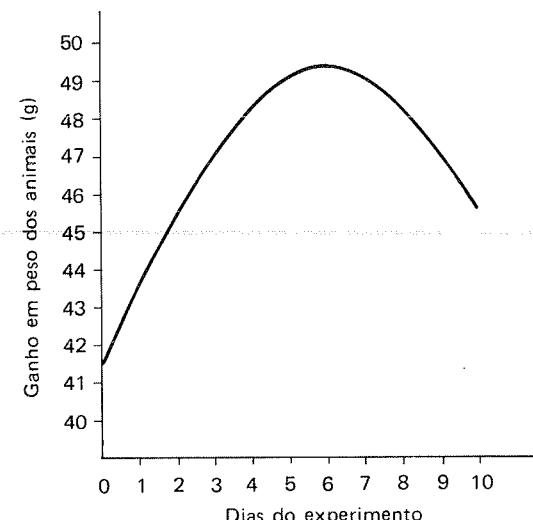
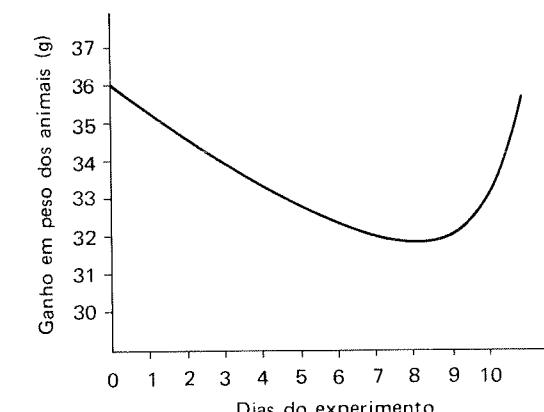


Gráfico 4 — Representação gráfica do comportamento quadrático dos animais quanto ao ganho de peso.
Exemplo típico: *Fusarium* sp.(18)

$$(\hat{Y} = 0,0465x^2 + 0,7284x + 35,68)$$



Resultados

Os resultados do comportamento biológico dos isolados, com resposta linear ou quadrática ao ganho ou perda de peso aparecem na Tabela 1.

As Figuras 1, 2 e 3, a seguir, mostram o efeito do nível de toxidez dos isolados sobre os animais.

Figura 1 — Isolado tóxico, acentuada hemorragia intestinal, secreção purulenta nos órgãos genitais externos (animal à esquerda) — Controle (animal à direita)

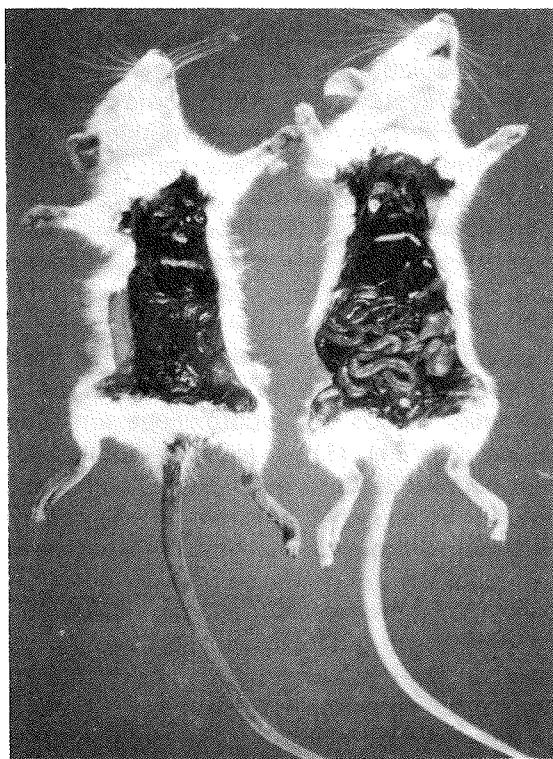


Figura 3 — Isolado atóxico — Quadro sintomatológico normal

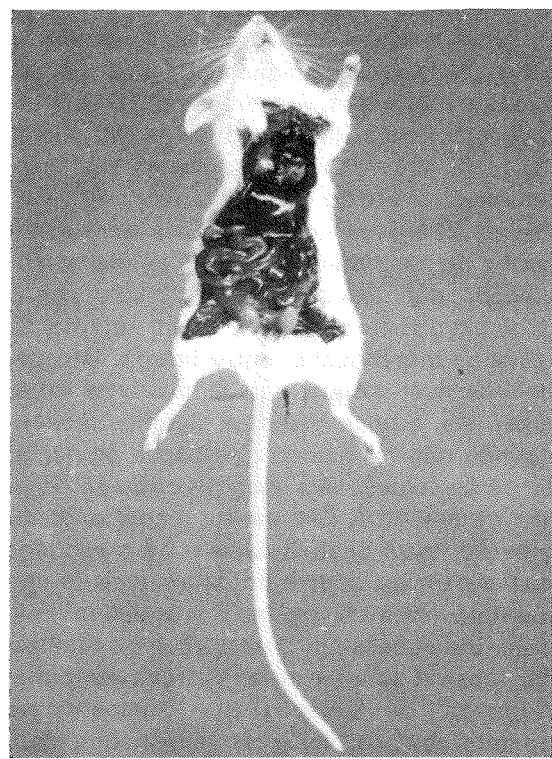
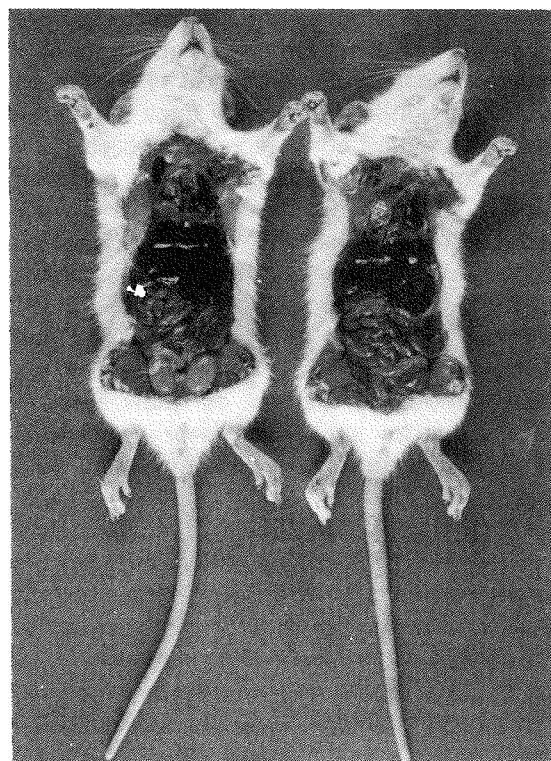


Figura 2 — Isolado ligeiramente tóxico — Discreta hemorragia intestinal (animal à direita) — Controle (animal à esquerda)



Discussão

Na condição dos experimentos, foram obtidos dados diários sobre o peso dos animais, consumo de ração, quadro sintomatológico, etc. Assim, para os isolados não letais foram efetuadas análises matemáticas, visando o estudo dos desvios, em relação ao controle. Foi adotada a premissa de que certas micotoxinas, dentro da metodologia empregada, embora não manifestassem sua letalidade, produziriam outros sintomas. Esta metodologia foi desenvolvida com base na literatura consultada, na qual sintomas como perda de apetite, letargia, edemas, redução ou aumento do peso corpóreo, diarréia, hemorragias, lesões necróticas na região da boca, etc., são mencionados (6, 18, 22, 26).

Esses sintomas, não letais em dez dias, seriam igualmente letais se os animais continuassem a ingerir a ração contaminada por um período mais prolongado, o que não é possível em bioensaio com ratos, face ao mascaramento de resultados pelas deficiências nutricionais advindas de uma dieta não completa. Entretanto deve ser ressaltado que por se tratar de uma metodologia não

frequentemente utilizada a análise de seus resultados deve ser mais acurada, visando a obtenção de outras correlações além das verificadas nesse trabalho.

Fundamentalmente, o ganho ou perda de peso é função da qualidade e da absorção ou não dos nutrientes, presentes na dieta. O estado patológico do animal influencia o processo de absorção e utilização do alimento, refletindo assim no ganho ou perda de peso. Assim, o animal doente poderá apresentar ganho de peso maior do que o animal sadio, devido, por exemplo, a disfunção renal, acúmulo de líquidos, ou retenção anormal de resíduos metabólicos, entre outros. Isto poderá explicar porque, para alguns lotes experimentais, o teste F não foi significativo, sugerindo não ter havido diferenças no ganho ou perda de peso dos animais, entre os diversos tratamentos. Entretanto, a análise da regressão, para cada isolado e os resultados das autópsias sugeriram diferenças fundamentais quanto à toxidez dos isolados. Pelo critério de avaliação quantitativa da toxidez, foi possível agrupar, através tratamento matemático, os isolados que apresentaram comportamento biológico semelhante, conforme mostra a Tabela 1.

Assim, um grupo foi formado pelos isolados que induziram ou estimularam resposta linear positiva quanto ao ganho de peso, ou seja, os animais ganharam peso durante todo o período experimental. O quadro sintomatológico desses animais foi tóxico, ligeiramente tóxico ou ausente. Para os animais com quadro normal, os resultados indicaram que não houve produção de toxina ou alteração significativa no valor nutricional da ração. Para os animais que apresentaram quadro patológico, os resultados sugerem a presença de metabólitos tóxicos, elaborados pelos fungos, situação já citada na literatura, pois, espécies de *Aspergillus* têm sido responsabilizadas pelo acúmulo de líquido ou edema (26). Para espécies de *Fusarium*, foi proposto que o ganho de peso seria uma resposta hormonal típica, na dependência da baixa concentração de fatores estrogênicos (18). Christensen & col. (8) chegaram a realizar comparações entre esse fator hormonal e o dietilestilbestrol (DES) utilizado em certos países na alimentação animal, para forçar o ganho de peso.

Em outro grupo foram colocados os isolados que apresentaram resposta linear negativa, quanto ao ganho de peso, ou seja, os ani-

mais perderam peso durante toda fase experimental. Da mesma forma que para o grupo anterior houve animais com quadro sintomatológico ausente, tóxico e ligeiramente tóxico. Essa perda de peso não associada a quadro patológico pode ser atribuída a certos fatores desfavoráveis da ração, como palatibilidade, diminuição de valor energético, proteico, entre outros e, até mesmo, a imobilização dos nutrientes pelo fungo. Por outro lado, os animais perderam peso durante todo o experimento, e esta perda foi relacionada com o quadro patológico, conforme mostra a Tabela 1; provavelmente estaria associada à presença de micotoxina na ração, pois, falta de apetite e redução no ganho de peso são sintomas típicos de micotoxicose em fase aguda (26, 31). Houve isolados que induziram comportamento quadrático "negativo" em relação ao ganho de peso, ou seja os animais ganharam peso no início do experimento, atingiram um ponto de máxima e depois passaram a perder. Pelo exame interno dos animais desse grupo foi possível separar os isolados em dois subgrupos: um, no qual o comportamento não foi associado a quadro sintomatológico dos animais, e portanto a nenhum efeito tóxico do isolado; outro, no qual os animais apresentaram quadro sintomatológico típico de micotoxicose. Nesse grupo, foram encontradas espécies de fungos do gênero *Aspergillus*, os quais provocaram acentuada hemorragia intestinal nos animais, revelando resultados de acordo com os encontrados por Gilgan & col. (12), que observaram síndrome hemorrágica típica em animais, após o consumo de milho contaminado com espécies de *Aspergillus* e *Penicillium*. Por outro lado, espécies do gênero *Curvularia* foram responsáveis também por acentuada hemorragia intestinal nos animais, sintoma esse associado a secreções e dermatites da boca e fossas nasais. Segundo MiRocha & col. (18), *Curvularia* spp. produzem compostos tóxicos, os quais apresentam estrutura similar ao fator estrogênico (F-2), diferindo porém em atividade biológica.

Observando-se a Tabela 2, pode-se verificar que algumas espécies de *Fusarium* induziram resposta quadrática, com os animais perdendo peso no início, atingindo um ponto de mínima e ganhando peso a seguir. Entretanto, esse ganho de peso, associado a quadro sintomatológico variando de tóxico a ligeiramente tóxico, sugere uma micotoxicose.

se, provavelmente por ação de hormônios estrogênicos.

Conclusões

Para os isolados não letais, provenientes de amostragens ao acaso de milho, trigo e arroz, procedentes de várias regiões do Brasil, foi estudado o comportamento biológico de animais submetidos a dietas contendo rações contaminadas pelos mesmos. Através tratamento estatístico dos resultados e com base nesses dados, foram extraídas as seguintes conclusões:

- cinco isolados do gênero *Aspergillus*, um do gênero *Fusarium* e dois *Mycelia sterilia* apresentaram resposta linear, com os animais ganhando peso durante todo o período experimental e com quadro sintomatológico altamente tóxico, tóxico e ligeiramente tóxico, o que pode ser explicado entre outros fatores, por acúmulo anormal de líquido, retenção de resíduos metabólicos ou a efeito-hormonal estrogênico.
- vinte isolados de gênero *Fusarium*, dois do gênero *Aspergillus*, uma espécie do gênero *Trichoderma*, um do gênero *Diplodia* e uma de *Mycelia sterilia* apresentaram resposta linear, com os animais perdendo peso durante todo o experimento e com quadro sintomatológico altamente tóxico, tóxico e ligeiramente tóxico, sendo essa redução de peso efeito característico de micotoxicoses.

• três isolados do gênero *Fusarium* e um do gênero *Aspergillus* apresentaram regressão linear, com os animais perdendo peso durante toda fase experimental. Entretanto, isso não deve ser atribuído a efeito tóxico, uma vez que os animais não apresentaram quadro sintomatológico, devendo ser, provavelmente, devido a fatores específicos na ração, tais como palatibilidade ou mesmo baixo valor energético ou proteico, devido à imobilização dos nutrientes pelo próprio fungo.

Algumas espécies do gênero *Fusarium* apresentaram resposta quadrática, com os animais perdendo peso no início, atingindo um ponto de mínimo e ganhando peso a seguir. Entretanto, esse ganho de peso, associado a quadro sintomatológico, variando de tóxico a ligeiramente tóxico, sugere uma micotoxicose, provavelmente por ação de hormônios estrogênicos.

• três isolados do gênero *Aspergillus* e dois isolados do gênero *Curvularia* apresentaram resposta quadrática, ou seja, animais ganharam peso no início, atingiram um ponto de máxima e depois passaram a perder peso. Essa perda de peso, associada a quadro patológico tóxico ou ligeiramente tóxico, sugere o envolvimento de micotoxinas.

Alguns isolados dos gêneros *Fusarium*, *Diplodia*, *Curvularia*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Cephalosporium* e *Mycelia sterilia*, mesmo presentes nas rações, não manifestaram efeitos tóxicos aos animais.

Referências Bibliográficas

1. Bacon, C.W.; Sweeney, J.G.; Robbins, J.D. & Burdick, D. — Production of Penicillic acid and ochratoxin A or poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: temperature and mixture experiments. *Appl. Microbiol.*, 26:155-160, 1973.
2. Bacon, C.W.; Robbins, J.D. & Burdick, D. — Metabolism of glutamic acid in *Aspergillus ochraceus* during the biosynthesis of ochratoxin A. *Appl. Microbiol.*, 29:317-322, 1974.
3. Barnes, J.M. & Butler, W.H. — Carcinogeneses activity of aflatoxin in rats. *Nature*, 202:1016, 1964.
4. Burmeister, H.R. — T-2 toxin production by *Fusarium tricinctum* on solid substrate. *Appl. Microbiol.*, 21:739-742, 1971.
5. Butler, W.R. & Barnes, J.M. — Carcinogenic action of groundnut meal containing aflatoxin in rats. *Food Cosmet. Toxicol.*, 6:135-141, 1968.
6. Carlton, W. — Mycotoxicoses in animals and humans. *Proc. of the Amer. Phytopathol. Soc.*, 3:140-155, 1976.
7. Christensen, C.M.; Nelson, G.H. & MiRocha, C.J. — Effect on the white rat uterus of atoxic substance isolated from *Fusarium*. *Appl. Microbiol.*, 13:653-659, 1965.
8. Christensen, C.M.; MiRocha, C.J. & Meronuck, R.A. — Molds, mycotoxins, and mycotoxicoses. *Cereal Foods Words*, 22:513-520, 1977.
9. Ciegler, A.; Kadis, S.; Ajl, S.J. — Microbial toxins. New York, Academic Press, 1971.
10. Dickens, F. & Jones, H.E.H. — The carcinogenic action of aflatoxin after its subcutaneous injection in the rats. *Brit. J. Canc.*, 17:691-781, 1963.
11. Forgacs, J. & Carll, W.T. — Mycotoxicoses. *Adv. Vet. Sci.*, 7:273-382, 1962.

12. Gilgan, M.W.; Smalley, E.B. & F.M. — Isolation and partial characterization of a toxin from *Fusarium tricinctum* on moldy corn. *Srch. of Bioch. and Bioph.*, 114:1-3, 1966.
13. Hesseltinge, C.W. — Natural occurrence mycotoxins in cereal. *Mycopath. Mycol. Appl.*, 53:141-153, 1974.
14. Hesseltinge, C.W. — Mycotoxins other than aflatoxins. In: — Sharpey, Z.M. & Kaplan, A.M., eds. — *Proc. Third International Biodegradation Symposium Appl. Science Publ.*, London, p. 607-623, 1976.
15. Jarvis, S.B. — Factors affecting the production of mycotoxins. *J. Appl. Bact.*, 34:199-213, 1971.
16. Krogh, P. — Mycotoxins nephropathy. In: — Purchase, I.F.H., ed. — *Mycotoxins*. Elsevier Press, p. 419-422, 1974.
17. Lancaster, M.C.; Jenkins, F.P. & Philp, J.M. — Toxicity associated with certain samples of groundnuts. *Nature (London)*, 192:1095-1096, 1961.
18. MiRocha, C.J.; Christensen, C.M. & Nelson, G.H. — Estrogenic metabolite produced by *Fusarium graminearum* in stored corn. *Appl. Microbiol.*, 15:497-503, 1967.
19. MiRocha, C.J.; Christensen, C.M. & Nelson, G.H. — Toxic metabolites produced by fungi implicated in mycotoxicoses. *Biotch. and Bioeng.*, 10:469-482, 1968.
20. MiRocha, C.J.; Christensen, C.M. & Nelson, G.H. — F-2 (zearalenone) estrogenic mycotoxin from *Fusarium*. In: — Kadis, S., Ciegler, A. & Ajl, S.J., eds. — *Microbial toxins*, 8:107-138. New York, Academic Press, 1971.
21. MiRocha, C.J. & Christensen, C.M. — Fungus metabolites toxic to animals. *Ann. Rev. of Phytopathol.*, 12:303-329, 1974.
22. MiRocha, C.J. & Christensen, C.M. — Mycotoxins and the fungi that produce them. *Proc. of the Amer. Phytopathol. Society*, 3:110-125, 1976.
23. Mitton, A.; Collet, J.C.; Szymanski, J. & Gousse, R. — Abortions in a flock of sheep and the presence of Zearalenone in the feed. *Revue de Medicine Veterinaire*, 126:813-820, 1975.
24. Newberne, P.M.; Wogan, G.N.; Carlton, W.W. & Kader, M.M. — Histopathologic lesions in ducklings caused by *Aspergillus flavus* cultures, culture extracts and crystalline aflatoxins. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 6:542-546, 1964.
25. Panda, P.C.; Murty, A.S.; Murty, V.S.; Murty, I.D. & Amila, S. — Effect of aflatoxin in the haematological picture biology. *Indian Journ. of Experimental Biology*, 13:569-570, 1975.
26. Pettit, R.E. & Taber, A.R. — *Symposium on Mycotoxicology*. Society, 3:99-125, 1976.
27. Purchase, I.F.H. — *Mycotoxins*. New York, Elsevier Sci. Publ., 1974.
28. Rodricks, J.V. — Mycotoxins and other fungal related food problems. *Adv. Chem. Soc.*, 149:409, 1976.
29. Salgado, J.M. & Carvalho, P.C.T. — Fungos toxicogênicos associados à cereais. 1 — Levantamento da micoflora associada a milho, trigo e arroz. *Rev. Microbiol. (S. Paulo)*, 11:60-63, 1980.
30. Salmon, W.D. & Newberne, P.M. — Occurrence of hepatomas in rats fed diets containing peanut meal as major source of protein. *Cancer Res.*, 23:571-575, 1963.
31. Sharda, D.P.; Wilson, R.F.; Willians, L.F.; Swigen, L.A. & Cross, R.F. — Effect of feeding corn inoculated with *Nigrospora oryzae* and *Cladosporium* on the performance of growing swine and rats. *Animal Science*, 33:1259-1262, 1971.
32. Stob, M.; Baldwin, R.S.; Tuite, J.; Andrews, F.N. & Gillette, K.G. — Isolation of anabolic uterotrophic compound from corn infected with *Giberella zaeae*. *Nature*, 196:1318, 1962.
33. Stoloff, L.; Ciegler, A.; Kadis, S.; Ajl, S.J., eds. — *Microbial toxins*. New York, Academic Press, 1971.
34. Theron, J.J.; Merwe, K.J.; Liebenberg, N.; Joubert, H.J.B. & Nel, W. — Scute liver injury in duckling sand rats as a result of ochratoxin poisoning. *Journ. Bath. Bacteriol.*, 91:521-529, 1966.
35. Van Der Warmerwe, K.H.; Steyn, P.S. & Fourie, L. — Mycotoxins. II — The constitution of ochratoxins A, Band C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* wilh. *Journ. Chem. Soc. (London)*, p. 7083-7088, 1965.
36. Van Walbeeck, W.; Clademenos, T. & Tratcher, F.S. — Influence of refrigeration on aflatoxin production by strains of *Aspergillus flavus*. *Can. J. Microb.*, 15:629-632, 1969.
37. Vesonder, R.F.; Ciegler, A. & Jensen, A.H. — isolation of the emetic principal from *Fusarium* infected corn. *Appl. Microbiol.*, 26:1008-1010, 1973.

El periodo de latencia de *Schizosaccharomyces pombe**

Juan L. Carrau

Rita M. Callegari-Basso

& Daniel E. Basile

*Instituto de Biotecnología de la Universidad de Caxias do Sul,
División de Microbiología Enológica, Caixa Postal 1352
95100 Caxias do Sul RS, Brasil*

Resumen

Se evalúan las consecuencias tecnológicas de las marcadas diferencias en velocidad de fermentación de varios *Schizosaccharomyces pombe*, en relación a *Saccharomyces cerevisiae* cepa Montrachet. Se miden comparativamente, momento y velocidad con que es degradado el ácido L-málico por distintas cepas de *Schizosaccharomyces*. Se extraen conclusiones en cuanto a como debe utilizarse el *Schizosaccharomyces* para controlar las concentraciones en ácido málico durante la vinificación de mostos de uvas.

Summary

The latent period of Schizosaccharomyces pombe

The technological consequences of the differences of fermentation velocity between various *Schizosaccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae*, Montrachet strain, are evaluated. The moment when the L-malic acid is decomposed and the speed with which different strains of *Schizosaccharomyces* decompose it, is studied. Consequences are extracted about how the *Schizosaccharomyces* should be used in order to be able to control de L-malic acid concentrations, during the vinification of grape musts.

Introducción

En uvas sólo parcialmente maduras las bajas tasas respiratorias de las bayas condicionan concentraciones de ácido L-málico superiores a las deseables.

Ante tal problema las tecnologías químicas disponibles se muestran ineficaces por carecer de especificidad, ya que salifican fundamentalmente ácido tartárico. En tales circunstancias la utilización de *Schizosaccharomyces pombe* se presenta como una alternativa para deponer específicamente el ácido L-málico.

Existe consenso, sin embargo, en que es difícil sobrenumerar la flora nativa, fundamentalmente *Saccharomyces*, que acompaña la uva, con *Schizosaccharomyces pombe*.

Brugirard & Roques (3) son los primeros investigadores a notar que el prolongado

periodo de latencia de *Schizosaccharomyces pombe* es la principal barrera en los intentos de desmalificación de mostos de uvas no estériles. Posteriormente, Benda (1) mide uno de los efectos del fenómeno cuando establece que el poder fermentativo de *Schizosaccharomyces pombe*, medido como anhidrido carbónico desprendido por unidad de tiempo, es después del tercer día mayor que el de varias cepas de *Saccharomyces*.

Yang (9) constata que puede retrasarse diferencialmente el inicio de la fermentación de levaduras del género *Schizosaccharomyces* en relación a *Saccharomyces* mediante la utilización de anhidrido sulfuroso en dosis de 300 µg/ml, se favorece de tal forma, la sobre-numeración por parte de las levaduras del género *Schizosaccharomyces*. Debe hacerse notar con todo que según el propio autor el procedimiento tiene el inconveniente de que implica en un alargamiento de la fermenta-

* Trabajo presentado en el VII Congreso Latinoamericano de Microbiología, 1977. Financiado por la FAPERGS (Proyecto Biol. 159/77) y por el Instituto de Biotecnología, UCS.

ción y además en la necesidad de utilizar altas concentraciones de anhidrido sulfuroso con los consecuentes problemas legales.

En trabajo publicado anteriormente Carrau & col. (4) reafirman la importancia tecnológica de reducir el período de latencia de *Schizosaccharomyces* como camino para conseguir desmalificar mostos de uvas verdes.

Se cuentan entre los objetivos del presente trabajo: la comparación de las velocidades de fermentación de los *Schizosaccharomyces* y del *Saccharomyces* estudiado, medidas como anhidrido carbónico desprendido, total y por día; el estudio comparativo de las velocidades de descomposición del ácido L-málico durante la fermentación y la determinación del momento en que este es más descompuesto.

Material y Metodos

Medios de cultivo — Mosto, variedad Saint Emillion con las siguientes características analíticas: acidez total 142meq/l, azúcares reductores 170g/l, densidad 1.0745, pH 2,89. Este medio fue utilizado para los estudios de velocidad de fermentación, anhidrido carbónico desprendido por día y curvas de variación de la acidez total.

Los estudios sobre velocidad de descomposición, del ácido L-málico se realizaron sobre medio líquido de la siguiente composición: extracto de levadura 3g/l, ácido D-L málico p.a. 10g/l sacarosa 200g/l, agua destilada hasta completar 1000ml.

Levaduras — *Schizosaccharomyces pombe* cepas: FCA, Castelli, Benda 3, Benda 2, Benda 1, NRRPI. Como referencia del género *Saccharomyces*, se utilizó la cepa Montrachet. Todas pertenecientes a la micoteca del Instituto de Biotecnología de la Universidad de Caxias do Sul.

Las mismas cepas fueron estudiadas en cuanto a la capacidad de descomponer el ácido L-málico.

La velocidad de descomposición del ácido L-málico fue medida analizando las concentraciones del mismo por la técnica de Peynaud & Lafon-Lafourcade (8). Se hicieron también curvas de variación de la acidez total por el Método Oficial de Análisis (2) considerando el mismo mosto fermentado por las distintas levaduras. En las citadas curvas se

determinó el momento de total consumo de ácido L-málico por la técnica de Michod (7).

El gas carbónico desprendido, total y por día, se midió utilizando válvulas de Müller, de acuerdo con Castelli (5).

Todas las fermentaciones se realizaron en erlenmayer de 1000ml, dotados de válvulas de Müller, en los cuales se ocuparon tan solo 800ml de la capacidad total, con mosto esterilizado por calor (70°C durante 15 minutos). En todos los casos se hicieron en duplicado.

La temperatura de fermentación fue fijada en 25°C.

Resultados y Discusión

La Figura 1 muestra que las velocidades de fermentación de los *Schizosaccharomyces* estudiados, fueron durante los primeros días siempre inferiores a las del *Saccharomyces* utilizado como referencia.

Las diferencias en velocidades de fermentación, durante la fase inicial de las fermentaciones, son corroboradas por el hecho de que el máximo de anhidrido carbónico desprendido en un día, Figura 2, se dan en el *Saccharomyces* al séptimo día de fermentación en tanto que en todos los *Schizosaccharomyces* se presenta al décimo día.

La Figura 3, complementada por el análisis cuantitativo de ácido L-málico cuyos resultados se presentan através de la Tabla 1, permite determinar el momento en que las cepas estudiadas descomponen el ácido L-málico en los distintos medios de cultivo considerados.

Por la técnica de Michod (7) se confirmó que al sexto día de fermentación, en el mosto solo quedaban concentraciones insignificantes de ácido L-málico.

Es interesante la discrepancia en cuanto a capacidad de descomponer ácido L-málico que plantea la cepa NRRPI, aparentemente atribuible a los distintos medios de cultivo utilizados para montar la Tabla 1 y la Figura 3.

Todo parece indicar que la citada cepa presenta requerimientos nutricionales, que inciden de manera importante en su capacidad de degradar el ácido L-málico.

La citada información puede ser muy útil ya que por extrapolación permitiría inferir que existen nutrientes capaces de aumentar la capacidad de degradar el ácido L-málico.

Figura 1 — Comparación de las velocidades de fermentación medidas como CO₂ desprendido (g%) en 100ml de mosto (média de 2 fermentaciones)

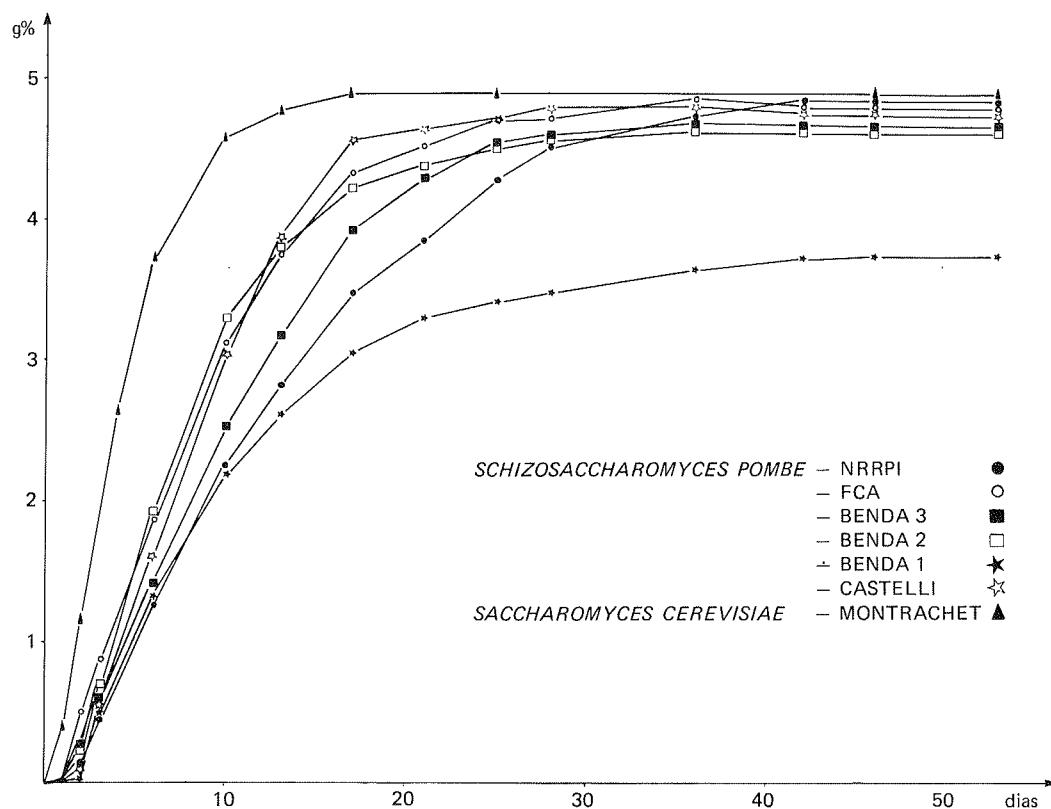


Figura 2 — Comparación de las cantidades de CO₂ desprendido por día (g) (média de 2 fermentaciones)

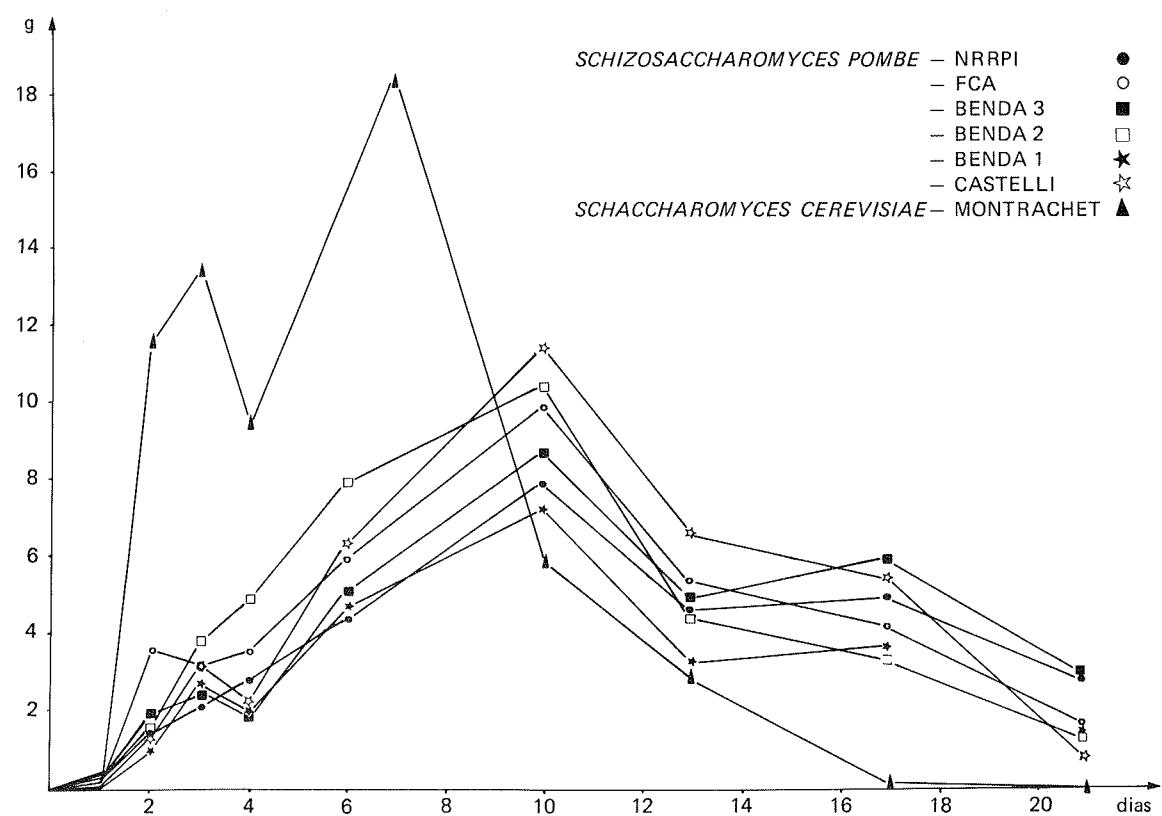


Figura 3 — Variación de la acidez total (meq/l) en fermentaciones con *Schizosaccharomyces pombe* (média de 2 fermentaciones)

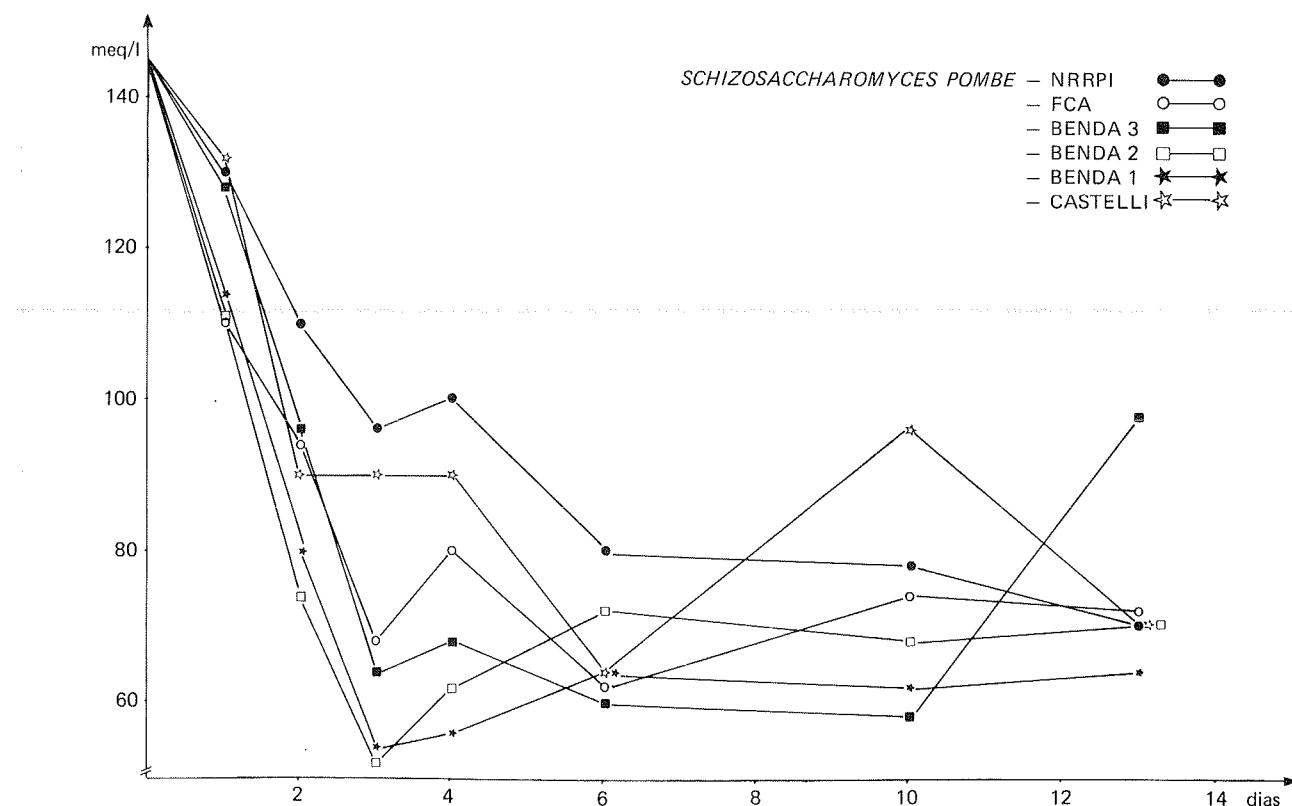


Tabla 1 — Capacidad de degradar ácido L-málico, comparativo entre distintas cepas de *Schizosaccharomyces*

Schizo.	1º dia g	L-málico consumido 24h. %	3º dia	L-málico consumido 72h. %	24-72h. g	L-málico consumido 24-72h. %
NRRPI	3,75	75,0	4,48	89,6	0,73	14,6
Benda 2	3,68	73,6	4,82	96,4	1,14	22,8
Benda 3	3,56	71,2	4,77	95,4	1,21	24,2
Benda 1	3,43	68,6	4,94	98,8	1,51	30,2
FCA	3,25	65,0	4,71	94,2	1,46	29,2
Castelli	2,75	55,0	4,19	83,8	1,44	28,8

En relación al momento en que es descompuesto el ácido L-málico, entre las cepas estudiadas no hay mayores diferencias, todas lo descomponen fundamentalmente durante los tres primeros días de fermentación.

Esta es una característica de importancia tecnológica evidente, cuando el objetivo es desmalificar por sobreenumeración con *Schizosaccharomyces pombe*, ya que implica en que basta sobreenumerar durante el citado período.

El inicio de la fermentación, durante el período de latencia, es la fase de la fermentación en que las cepas de *Schizosaccharomyces pombe* estudiadas, descomponen más ácido L-málico.

Lo antedicho induce a tomar partido por lo sugerido por Castelli (5) y por Galander (6) en cuanto a la utilización de *Schizosaccharomyces pombe* a nivel industrial.

O sea:

1. Inoculación masiva del mosto a fermentar con *Schizosaccharomyces* multiplicados sobre mosto estéril.

2. Inoculación posterior con *Saccharomyces*, cuando se obtenga la desmalificación parcial deseada.

La desmalificación de vinos de baja graduación alcohólica, propuesta por Benda (1), es una operación lenta (tres a cuatro semanas), no exenta del riesgo de dejar el vino con azúcares reductores residuales, con los consecuentes problemas para la estabilidad del mismo.

Como contrapartida la desmalificación parcial de mostos, puede completarse en dos o tres días.

Inoculando después *Saccharomyces* seleccionados para vinificación, se garante que no queden azúcares reductores residuales, sin depender de la graduación alcohólica del vino a producir.

Se garante también una usual composición en cuanto a compuestos secundarios de fermentación y consecuentemente, características organolépticas óptimas para el vino producido.

Referencias Bibliográficas

1. Benda, I. — Les *Schizosaccharomyces* et leur effet désacidifiant en vinification. *Vignes et Vins* (número special):31-6, 1974.
2. Brasil. Ministério da Agricultura — Port. N.º 370 (9/9/74) — Métodos Oficiais de Análises. Diário Oficial de 19 de setembro de 1974, p. 65-72 (suplemento).
3. Brugirard, A. & Roques, J. — Les *Schizosaccharomyces*: utilizacion du désacidifiant de ces levures. *Rev. Fr. d'Oenol.*, 13:26-36, 1972.
4. Carrau, J.L.; Callegari, R.M. & Basile, D.E. — Evaluación de la posibilidad de utilizar *Schizosaccharomyces pombe* como medio de desmalificación en la vinificación de uvas ácidas. *Horiz. Agrar. Ind. (Mendoza)*, 29:64-67, 1976.
5. Castelli, T. — In: — Il vino al microscopio. Roma, Luigi Scialpi, 1969.
6. Galander, J.F. — Deacidification of eastern table wines with *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Viticolt.*, 28:65-68, 1977.
7. Michod, J. — Evaluation de l'acide malique par chromatografie sur papier. In: — Ribereau-Gayon, J. & Peynaud, E. — Analyse et Controle des Vins. 2.ed. Paris, Béranger, p. 128-129, 1958.
8. Ribereau-Gayon, J. — Sciences et techniques du vin. Paris, Dunod, 1972.
9. Yang, H.Y. — Effect of sulfur dioxide on the activity of *Schizosaccharomyces pombe*. *Am. J. Enol. Viticolt.*, 26:1-4, 1975.

**Acumulações limosas na
indústria de chapas de
fibras de madeira.
III – Alternativas de controle***

Augusto Ferreira da Eira

Dept.^o de Defesa Fitossanitária, Faculdade de Ciências Agronômicas de Botucatu,
Campus de Botucatu UNESP
18600 Botucatu SP, Brasil

Paulo Campos T. de Carvalho

Dept.^o de Fitopatologia e Microbiologia Agrícola,
Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz – USP
13400 Piracicaba SP, Brasil

& Onaur Ruano

Instituto Agronômico do Paraná – IAPAR
86100 Londrina Pr, Brasil

Resumo

Estudo de alternativas no controle de acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira, através de biotestes, envolvendo elevação da temperatura e utilização de agentes biocidas e biostáticos "in vitro". Os testes de 39 tipos culturais, de microrganismos isolados de acumulações limosas e de um inóculo misto da flora natural dessas acumulações, foram realizados em meio natural de "água-servida" – agar, frente às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. Os testes com agentes biostáticos e biocidas foram realizados em meio líquido de "água-servida", sob agitação horizontal, para *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans* e um inóculo misto da flora natural de acumulações limosas. Conclusões: a) não foram encontrados microrganismos termófilos, na população das acumulações limosas, uma vez que todos os microrganismos testados foram inibidos por incubação contínua a 45°C; b) Santophen I (o-benzil-p-clorofenol) a 80 μ g/ml de i.a., e Merpacine (fenil acetato de mercúrio) a 10 μ g/ml de i.a., inibiram o crescimento da população microbiana de acumulações limosas; c) por outro lado, Derosal (2-metoxicarbonilamina-bencimidazol) a 30 μ g/ml do i.a. e Santicizer-9 (o-p-toluenosulfanamida), a 1.000 μ g/ml do i.a., foram ineficientes para o controle de acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras da madeira.

Summary

Slime accumulations in fiberboard industries. III – Control ways

Control of slime accumulations in fiberboard industries through temperature elevation and slimicides biotests "in vitro". Biotests with thirty nine microrganisms isolated from slime accumulation and a mixed inoculum from this accumulations were carried out in waste water-agar medium at temperatures of 20, 25, 30, 35, 40, 45 and 50°C. The slimicides biotests were carried out with liquid waste-water natural medium in shaking flasks, utilizing isolates of *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans* and a natural population from slime accumulation. Conclusions: a) thermophilic microrganisms were not found in the slime microbial population, since continuous "in vitro" incubation under 45°C inhibited them; b) Santophen I (o-benzyl-p-chlorophenol) at 80 μ g/ml of a.i., and Merpacine (mercuric phenyl acetate) at 10 μ g/ml of a.i., inhibited the microbial population growth of the slime accumulation "in vitro"; c) on the other hand, Derosal (2-metoxicarbonilamine-bencimidazol), at 30 μ g/ml of a.i. and Santicizer-9 (o-p-toluenesulphonamide), at 1.000 μ g/ml of a.i., were inefficient to control the slime accumulations.

* Pesquisa subvencionada pela Duratex S.A. Indústria e Comércio; parte da Dissertação de Mestrado do primeiro autor.

Introdução

Paralelamente ao desenvolvimento da tecnologia da madeira, abriu-se um campo de suma importância e inegável interesse à microbiologia, visto que a matéria prima básica e muitos materiais empregados na fabricação da celulose, papel e outros produtos derivados da madeira, também podem suprir as exigências nutricionais de microrganismos. Se de um lado, podem ser obtidos alimentos através do crescimento microbiano, a partir desses resíduos industriais (19, 20, 39), de outro estes microrganismos podem causar sérios prejuízos, por se estabelecerem nas "águas-servidas", em recirculação nos sistemas industriais (3, 4, 10, 34).

De acordo com relatos anteriores (11, 12, 13), as instalações de indústrias de chapas de fibras de madeira têm apresentado problemas de acumulações limosas, de origem microbiana, nos sistemas de recirculação da "água-servida", principalmente na máquina formadora do colchão de polpa, depreciando a qualidade do produto final. Nesses relatos, foi estudada a natureza da flora microbiana associada às acumulações limosas, nas condições ambientais então descritas (12, 13), objetivando elucidar as causas do problema e fornecer subsídios para o controle.

Na literatura consultada, foram encontradas duas opções de controle à microflora de indústrias de celulose e papel: elevação da temperatura e utilização de agentes biocidas ou biostáticos.

O efeito da temperatura, no crescimento de microrganismos, foi abordado sob aspectos gerais, por Cochrane (6), encontrando-se também relatos mais específicos em relação à flora microbiana do limo (5, 14, 15). Algumas espécies de leveduras psicrófilas (*Trichosporon pullulans*, *Candida* spp. e *Torulopsis inconspicua*) apresentaram crescimento ótimo a 20°C, e inibição a partir de 25°C (14).

A água aquecida e o vapor têm sido largamente utilizados nas operações de limpeza dos sistemas industriais de celulose e papel (5), onde a água aquecida tem mostrado maior eficiência que o vapor, pelo fato de entrar em contato com todo o sistema, por um período mais longo. Por outro lado, a resistência de microrganismos à temperatura e agentes biostáticos tem sido enfatizada por vários autores (5, 6, 40, 41, 42) e, sob outro aspecto, a morte ou inibição de um grupo de

microrganismos pode redundar no crescimento de outros, que eram inibidos pelos primeiros (5).

A escolha do biocida industrial, adequado a um determinado uso, requer conhecimento de certas condições fundamentais como: tipo de microrganismo predominante no ambiente, nível de eliminação microbiana requerido, emprego de tratamento periódico ou contínuo, pH, temperatura, presença de emulsificantes, matéria orgânica, potencial de inóculo, espectro de ação, estabilidade e poder residual do produto, dosagem inibitória e letal, preço, corrosão e suas implicações na poluição das águas, com esgotos industriais (1, 2, 5, 17, 18, 21, 24, 25, 33, 36, 37, 41, 43).

Dentre os principais biocidas utilizados nas indústrias de celulose e papel, os efeitos da cloração, cloraminas, fenóis clorinados, compostos organo-mercuriais e outros germicidas, são discutidos na literatura (5). Uma extensa lista, com a toxicidade relativa de agentes biostáticos é sugerida para a utilização em indústrias de celulose e papel (8). O método para testar esses produtos foi o de placas-de-Petri, contendo meio artificial (Bacto-malt-extract agar), ao qual foram adicionadas concentrações conhecidas de um grande número de produtos, frente às bactérias dos gêneros *Aerobacter* e *Bacillus* aos fungos *Aspergillus* e *Penicillium*.

A avaliação da eficiência relativa de agentes biocidas ou biostáticos pode ser realizada na própria indústria, através de método que consiste no peso seco do material limoso, em g, acumulado em chapas de plástico de área conhecida, mergulhadas no sistema de recirculação da "água-servida" e os resultados expressos em g/unidade de área (5). A maioria dos métodos, entretanto, consiste na utilização de técnicas de laboratório, ou seja, no teste "in vitro" das propriedades biocidas ou biostáticas de produtos (5, 7, 8, 21, 37).

Vários autores (5, 7, 9) discutem as vantagens e desvantagens da utilização de diferentes métodos "in vitro". Correlações de 47 a 77% foram observadas entre três métodos utilizados para testar a eficiência de produtos biostáticos "in vitro": incorporação dos produtos a placas-de-Petri, contendo meio artificial, inoculadas com o microrganismo teste; incorporação de produtos e culturas puras de microrganismos, a meio líquido de polpa desintegrada — "spore-pulp-method" — incubado sob agitação constan-

te; incorporação de produtos e populações naturais da microflora do limo, a meio líquido de "água branca", incubado sob agitação constante (7). Segundo os autores, o último método mostrou-se desejável para comparar ou recomendar a utilização de produtos biocidas ou biostáticos, em situações específicas de cada indústria.

No presente trabalho, são estudados os efeitos da temperatura e de alguns agentes biostáticos e biocidas, no crescimento de microrganismos isolados de acumulações limosas de indústrias de chapas de fibras de madeira, com o objetivo de estabelecer alternativas de controle.

Material e Métodos

Efeito da temperatura — Com base em resultados obtidos anteriormente (11, 12, 13), foram selecionados 39 tipos culturais de microrganismos, de acordo com seu crescimento em "água-servida" (acima de 70mg/150ml) e/ou com a habilidade em reproduzir as características microscópicas mais freqüentes do limo, "in natura".

Desta forma, tipos culturais de *Trichosporon cutaneum* (de Beurm., Gaugerot et Vancher) Ota, *T. inkin*, *T. pullulans* (Lindner) Diddens et Lodder, *Trichosporon* spp., *Candida curvata*, *Endomycopsis bispora*, *Penicillium* spp., *Aspergillus niger*, *Paecilomyces* spp. e *Trichoderma viride*, foram inoculados por blocos de cultura de 2mm² no centro de placas-de-Petri, contendo meio de "água-servida"-agar, descrito anteriormente (12). Paralelamente, inoculou-se pequenas porções de limo claro (LC) "in natura" (12), para testar a representatividade dos tipos culturais selecionados em relação a uma população mista.

Os microrganismos inoculados foram incubados durante seis dias, às temperaturas de 20, 25, 30, 35, 40, 45 e 50°C. As placas, incubadas a 40, 45 e 50°C, foram vedadas com fita adesiva, para evitar o secamento do meio de cultura.

O parâmetro de avaliação, utilizado na medição do crescimento, foi o diâmetro médio das colônias em mm. Os dados não foram submetidos à análise estatística.

Após a leitura do ensaio anterior, as placas de Petri, incubadas a 40, 45 e 50°C, foram reincubadas a 25°C, durante seis dias. O método de avaliação foi o mesmo do ensaio anterior e da mesma forma, os dados não foram submetidos à análise estatística.

Efeito de biostáticos e biocidas — Com base na revisão da literatura, na solubilidade dos produtos em água e na amplitude de seus espectros de ação biostática ou biocida (1, 2, 8, 17, 18, 21, 22, 23, 24, 25, 28, 31, 33, 36, 37, 40, 41, 43), foram utilizados os seguintes produtos e dosagens:

- *Derosal*, pó molhável, com P.A. a 60% de 2-(metoxicarbonilamino)-bencimidazol, na dosagem de 30µg/ml do P.A.;
- *Santizer-9*, pó molhável com P.A. a 100% de orto-paratoluenosulfonamida (40% na forma "orto" e 60% na forma "para"), na dosagem de 1.000 µg/ml do P.A.;
- *Merpacine*, com P.A. a 1,7% de fenil acetato de mercúrio, na dosagem de 10 µg/ml do P.A.;
- *Santophen / Flakes*, com P.A. a 100% de orto-benzil-para-clorofenol, na dosagem de 80µg/ml do P.A.

Os produtos foram adicionados em frascos contendo 150ml de "água-servida", filtrada em areia e esterilizada a uma atmosfera por 20 minutos. Os produtos não foram autoclavados, devido às suas características termolábeis.

Foram utilizados os seguintes inóculos: 1ml da diluição 1:10 de limo claro (LC); e blocos de cultura (2mm²); dos tipos culturais T44 (*Trichosporon pullulans* e T46 (*T. cutaneum*). Para correção dos dados de peso seco dos tratamentos inoculados, acrescentou-se os seguintes tratamentos: sem inóculos com produtos (peso seco dos veículos dos produtos e dos sólidos insolúveis da "água-servida") e, sem inóculos sem produtos (peso seco dos sólidos insolúveis da "água-servida"). Os tratamentos, com inóculos sem produtos, constituiram as testemunhas.

Após a inoculação, os frascos foram incubados durante 10 dias, sob agitação horizontal de 100r.p.m. a 27°C. Como critério de avaliação, utilizou-se o peso seco do material, formado pelos microrganismos, retido em papel de filtro Whatman nº 1.

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com três repetições. O efeito da testemunha, com igual número de repetições, foi incluído na análise estatística.

Resultados e Discussão

Os efeitos de agentes físicos e químicos, no crescimento de populações naturais e de microrganismos isolados de acumulações limosas, são apresentados na Tabela 1 e Figura 1.

Tabela 1 — Determinação da temperatura inibitória e letal ao crescimento dos principais tipos culturais de microrganismos isolados do limo

Microrganismos	Tipos culturais	Temperatura inibitória temperaturas °C							Temperatura letal (**)			
		20	25	30	35	40	45	50	p/ 25°C	De 40 p/ 25°C	De 45 p/ 25°C	De 50 p/ 25°C
<i>Trichosporon cutaneum</i>	T6	23,75 *	40,75	50,50	27,50	0,00	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00	0,00
	T15	12,50	16,50	17,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T37	31,00	42,75	60,75	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T38	8,25	15,25	22,75	22,25	8,50	0,00	0,00	22,50	0,00	0,00	0,00
	T42	8,75	16,50	23,50	25,25	8,50	0,00	0,00	23,75	0,00	0,00	0,00
	T46	29,75	38,50	26,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T47	26,25	41,50	56,50	45,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T69	7,50	9,00	10,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T75	26,00	37,25	33,00	1,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T76	26,00	31,50	11,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T87	28,00	39,00	26,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T110	9,00	15,50	24,75	27,25	7,00	0,00	0,00	20,00	0,00	0,00	0,00
	T115	28,50	39,50	55,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T117	37,25	38,00	6,45	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T124	11,00	16,00	20,50	22,75	3,00	0,00	0,00	15,00	0,00	0,00	0,00
	T128	27,75	37,75	29,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T130	26,50	35,25	24,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T137	28,50	42,75	56,50	51,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T157	29,75	38,50	27,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T165	28,50	34,25	32,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T170	10,50	15,75	16,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T173	17,00	28,25	37,00	23,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média		22	21,91	30,45	30,39	12,78	1,23	0,00	0,00	4,38	0,00	0,00
<i>T. inkin</i>	T50	9,50	14,50	20,50	21,00	4,25	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00	0,00
<i>T. pullulans</i>	T44	22,75	26,00	34,25	16,50	0,00	0,00	0,00	19,50	0,00	0,00	0,00
<i>Trichosporon spp.</i>	T40	11,75	22,50	23,50	23,75	7,75	0,00	0,00	20,75	0,00	0,00	0,00
	T68	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	T82	9,00	14,00	22,50	25,25	5,75	0,00	0,00	18,75	0,00	0,00	0,00
	T106	5,25	11,75	15,75	6,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T107	11,50	14,25	21,50	23,00	5,25	0,00	0,00	13,50	0,00	0,00	0,00
	T108	9,25	16,25	25,75	26,75	8,25	0,00	0,00	21,50	0,00	0,00	0,00
	T176	8,75	15,25	33,75	23,25	6,00	0,00	0,00	17,00	0,00	0,00	0,00
Média		8	10,97	16,81	24,69	20,75	4,66	0,00	0,00	15,78	0,00	0,00
p/o gen. <i>Trichosporon</i>		30	18,99	26,82	28,87	14,90	2,14	0,00	0,00	7,42	0,00	0,00
<i>Candida curvata</i>	T5	7,75	15,50	24,25	25,50	4,75	0,00	0,00	15,25	0,00	0,00	0,00
<i>Endomycopsis bispora</i>	T24	23,00	32,75	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
<i>Penicillium spp.</i>	T10	22,25	25,75	7,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T17	26,50	55,25	84,75	25,25	0,00	0,00	0,00	54,50	0,00	0,00	0,00
	T51	22,00	28,25	18,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	T169	15,50	26,75	21,25	8,25	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Média		4	21,56	34,00	33,00	8,37	0,00	0,00	0,00	13,62	0,00	0,00
<i>Aspergillus niger</i>	T43	17,50	34,50	50,00	46,25	8,25	0,00	0,00	51,50	0,00	0,00	0,00
<i>Paecilomyces sp.</i>	T39	21,00	28,50	51,00	41,00	29,25	0,00	0,00	72,50	55,00	0,00	0,00
<i>Trichoderma viride</i>	T11	60,25	81,50	75,25	34,50	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
Limo claro	LC	27,00	35,00	44,50	4,00	2,50	0,00	0,00	36,00	0,00	0,00	0,00
Média geral	40	20,30	29,20	31,10	15,80	2,70	0,00	0,00	11,30	1,40	0,00	0,00

* Diâmetro médio da colônia em mm, dados médios de 2 repetições.

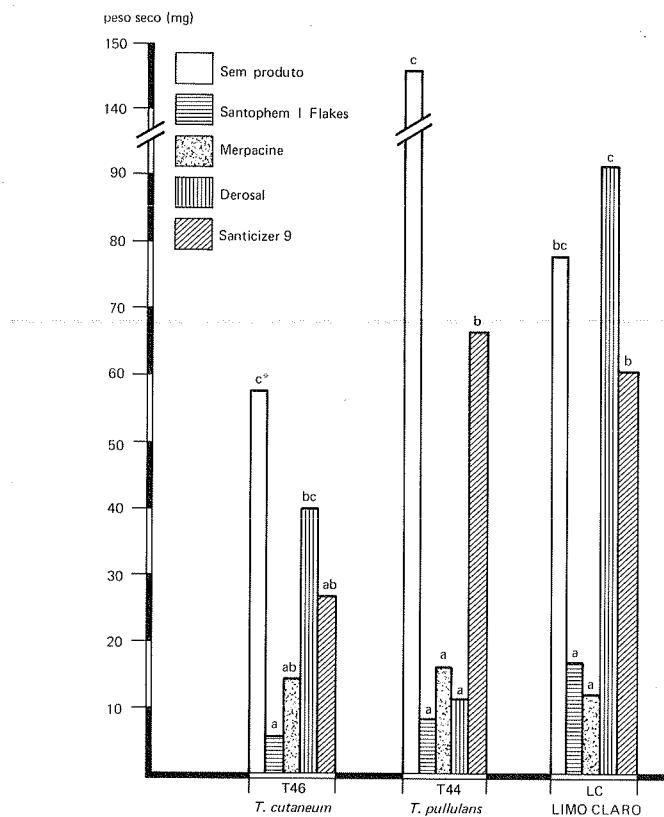
** Reincubação a 25°C dos microrganismos previamente incubados às temperaturas de 40, 45 e 50°C.

A opção, geralmente empregada nas indústrias de celulose e papel, é o controle das acumulações limosas através de produtos de ação biostática ou biocida, enquanto que a elevação da temperatura (vapor e água aquecida) tem sido utilizada nas operações de limpeza, para redução do potencial de inóculo (5).

Os resultados apresentados na Tabela 1, onde se estudou a influência da temperatura no crescimento e morte dos principais tipos culturais de microrganismos, isolados dos materiais limosos, bem como de uma população natural do limo, mostra que, tanto as culturas puras quanto a população natural,

foram inibidas a 45°C. Por outro lado, a temperatura de 40°C foi letal a alguns inóculos; a de 45°C foi letal a 97,4%; e a de 50°C foi letal a todos os inóculos. Estes resultados sugerem que, pelo menos nas condições atuais, não existem microrganismos termófilos, pelo conceito de Cochrane (6). Por outro lado, deve ser lembrado que a morte de microrganismos, pela aplicação contínua e prolongada das temperaturas mais altas, não preenche o senso estrito de "ponto letal" (6) e que, apesar de não terem sido constatados microrganismos termófilos, não pode ser excluída a possibilidade de pressão de seleção para que alguns microrganismos da flora mi-

Figura 1 — Influência de biostáticos e biocidas no crescimento de microrganismos isolados do limo e de uma população natural de limo claro



* Para cada microrganismo, as colunas com letras iguais não diferem significativamente ao nível de 5% de probabilidade (teste Tukey).

crobiana tornem-se adaptados a temperaturas mais elevadas, durante os programas de controle (6, 38).

Alguns tipos culturais de *Trichosporon cutaneum*, *Penicillium* spp., *Trichoderma viride* e *Endomycopsis bispora* evidenciaram temperatura ótima de crescimento em torno de 25°C (Tabela 1). Embora não sejam considerados psicrófilos, em comparação com resultados obtidos na literatura (14), a baixa temperatura ótima de crescimento poderá significar enormes esperanças, na utilização da elevação da temperatura (aquecimento de água de lavagem das telas ou aplicações de choques de vapor), para o controle da flora microbiana do limo, nas indústrias de chapas de fibras da madeira.

A hipótese de controle da flora limosa, através da utilização de agentes biocidas ou biostáticos, foi confirmada através dos resultados ilustrados na Figura 1. Dentre os produtos testados, Santophen I apresentou efeito equivalente a Merpacine (mercurial orgâni-

co), controlando *Trichosporon cutaneum*, *T. pullulans* e a população natural do limo. Resultados semelhantes são relatados na literatura (8), para alguns microrganismos da flora limosa de indústrias de celulose e papel.

Considerando a possível propriedade corrosiva dos produtos mercuriais, ainda que não tenha sido discutida na literatura (5, 10, 35), provavelmente pelas baixas dosagens recomendadas, o Merpacine foi incluído no trabalho apenas para servir como testemunha de um agente de poder biocida, já que a sua utilização na prática seria inviabilizada por suas características poluentes (41). Por outro lado, os produtos Santicizer-9 e Derosal não controlaram a flora limosa e apresentaram efeitos inversos no controle de *T. cutaneum* e *T. pullulans*, quando confrontados entre si (Figura 1). Este fato poderia ser explicado por um desequilíbrio biológico da flora natural, provocado pela ação seletiva ou unilateral dos produtos (5, 16), pois a morte ou inibição de um grupo de microrganismos pode redundar no crescimento de outros, não afetados pelos produtos, mas que eram inibidos pelos primeiros (26, 32). Este aspecto deve ser sempre levado em consideração, na escolha do biocida industrial ou em qualquer programa de controle, fato que não está bem esclarecido na literatura consultada, onde os biotestes são normalmente dirigidos a microrganismos em cultura pura (7, 8, 9).

O método utilizado neste trabalho, para testar produtos químicos com propriedades biostáticas ou biocidas "in vitro", embora não satisfaça todos os requisitos levantados na literatura (9), foi considerado importante para aquilar a estabilidade dos produtos em "água-servida", cuja acidez e a possível presença de substâncias oxidantes, poderia afetar o princípio ativo ou a sua solubilidade (23, 27, 28, 29, 30, 31, 40, 41).

Por outro lado, a resistência de microrganismos a produtos químicos, abordada com freqüência na literatura (5, 38, 41, 42), pode ser um dos fatores responsáveis pelos baixos índices de controle de acumulações limosas nas instalações de indústrias de chapas de fibras da madeira, onde é incorporado o pentaclorofenol aos sistemas de recirculação da "água-servida", desde longa data. Este fato mostra a necessidade de se conhecer a eficiência de vários produtos no controle da flora limosa, para que haja a possibilidade de aplicá-los alternadamente, evitando-se a pressão de seleção às linhagens tolerantes.

Deve-se ressaltar, finalmente, que nenhum programa de controle poderá surtir efeitos satisfatórios, sem a limpeza e desinfecção prévia de todo o sistema industrial, visando reduzir o potencial de inóculo e evitar a auto-proteção das camadas mais internas das acumulações limosas (5).

Agradecimentos

Os autores agradecem aos Engºs. Agrºs Eneida Assumpção, Benedito Tadeu Calsolari e Agenor Martinho Correa, pela colaboração prestada durante o transcorrer desta pesquisa.

Referências Bibliográficas

1. Alper, N. — Paper manufacture under near sterile conditions. *Tappi* (N.Y.), 43:181A-183A, 1960.
2. Benignus, P.G. — Copper 8-quinolinolate industrial preservative. *Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn.* (Easton Pa.), 40:1426-1429, 1948.
3. Beckwith, T.D. — The bacteriology of pulp slime. *J. Bact.* (Baltimore), 22:15-22, 1931.
4. Brewer, D. — Studies on slime accumulation in pulp and paper mills. I — Some fungi isolated from mills in New Brunswick and Newfoundland. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 36:941-946, 1958.
5. Casey, J.P. — Pulp and paper: chemistry and chemical technology. 6. ed. New York, Interscience Publishers, 1960. Vol. II.
6. Cochrane, V.W. — Physiology of fungi. New York, John Wiley & Sons, 1958.
7. Conkey, J.H. & Carlson, J.A. — An examination of methods for testing biostatic agents. *Tappi* (N.Y.), 45:514-523, 1962.
8. Conkey, J.H. & Carlson, J.A. — Relative toxicity of biostatic agents suggested for use in the pulp and paper industry. *Tappi* (N.Y.), 46:23A-39A, 1963.
9. Coster, E. — The slime problem in the paper industry caused by microorganisms. *Appita* (Sidney), 21:132-138, 1968.
10. Diehm, R.A. — Microbiología de la pulpa y del papel. In: — Libby, C.E. — Ciencia y tecnología sobre pulpa y papel. II — Papel. 2. ed. Mexico, Espanha, Argentina e Chile, Editorial Continental, 1969.
11. Eira, A.F. — O problema de acumulações limosas de origem microbiana em indústrias de chapas de fibras da madeira. Piracicaba, E.S.A. "Luiz de Queiroz" — USP, 1975. (mimeografado). (Dissertação de Mestrado).
12. Eira, A.F.; Carvalho, P.C.T.; Goldoni, J.S. & Assumpção, E. — Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. I — Natureza da flora microbiana. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 8:31-35, 1977.
13. Eira, A.F.; Carvalho, P.C.T. & Ruano, O. — Acumulações limosas na indústria de chapas de fibras de madeira. II — Caracterização e reprodução "in vitro" das acumulações limosas. *Rev. Microbiol.* (S. Paulo), 8:64-73, 1977.
14. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. — Ecological observations on the fungi and bacteria in slime accumulations in a paper mill. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 42:35-43, 1964.
15. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. — Nutritional requirements of the microflora of a slime accumulation in a paper mill. *Can. J. Bot.* (Ottawa), 42:341-350, 1964.
16. Eveleigh, D.E. & Brewer, D. — Interrelationships between microorganisms in a accumulation of slime in a paper mill. *Can. J. bot.* (Ottawa), 43:519-526, 1965.
17. Hackett, W.J. — Germicidal cleaners and anti-bacterial cleaning. *Detergent Age*, 4:68-70, 1967.
18. Hackett, W.J. — Germicidal cleaners and anti-bacterial cleaning. *Detergent Age*, 5:85-98, 1968.
19. Harris, E.E.; Hannan, M.L.; Marquardt, R.R. & Bubl, J.L. — Fermentation of wood hydrolyzates by *Toxula utilis*. *Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn.* (Easton Pa.), 40:1216-1220, 1948.
20. Harris, E.E.; Hannan, M.L.; Marquardt, R.R. & Bubl, J.L. & Rogers, S.C. — Fodder yeast from wood hydrolyzates and still residues. *Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn.* (Easton Pa.), 40:1220-1223, 1948.
21. Hill, E.C. — Choosing an industrial biocide. *Process Biochem.* (London), 6:17-18-34, 1971.
22. Hodgman, C.D.; Weast, C.R.; Shankland, R.S. & Selby, S.M. — Handbook of chemistry and phisics. 43. ed. Cleveland, Ohio, Chemical Rubber Publishing, 1962.
23. Hoechst Boletim HOE 17411OF — Derosal — Dados técnicos e instrucciones preliminares para el uso. (mimeografado), 1973.
24. Lagarde, E. — Étude du pouvoir bactériostatique et bactéricide de quelques composés vis-a-vis de une souche pure de bactéries sulfato-réductrices. *Annls. Inst. Pasteur* (Paris), T100:368-376, 1961.
25. Marsh, P.B.; Greathouse, G.A.; Bollenbacker, K. & Butler, M.L. — Copper soaps as rot-proofing agents on fabrics. *Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn.* (Easton Pa.), 36:176-181, 1944.
26. Marshall, C.E. — Microbial associations. *Science* (N.Y.), 41:306-312, 1915.
27. Monsanto Tech. Bull. N.º 0/PS-2 — Santobrite — micro-organism control in the pulp and paper industry. (impresso).
28. Monsanto Tech. Bull. N.º 0/PL-9 — Santicizer-9 — Solid Processing aid and reactive plasticizer. (impresso).
29. Monsanto Tech. Bull. N.º SC-6 — Santobrite control for slime and algae. (impresso), 1963.
30. Monsanto Tech. Bull. N.º IC/PS-8 — Monsanto Pentá — pentachlorophenol technical. (impresso).
31. Monsanto Tech. Bull. N.º Q-444B-1 — An independent test report on Santophen 1, Monsanto's "Broad Spectrum" germicide. (mimeografado).

32. Pochon, J. & Barjac, H. — Traité de microbiologie des sols: applications agronomiques. Paris, Dunod Ed., 1958.
33. Ross, R.T. — Microbiology of paint films. Adv. Appl. Microbiol. (N.Y. & London), 5:217-233, 1963.
34. Sanborn, J.R. — Development and control of microorganisms in a pulp and paper mill system. J. Bact. (Baltimore), 26:373-378, 1933.
35. Sanborn, J.R. — Slime control in the pulp and paper industry. New York, Lockwood Trade Journal, 1965.
36. Schmitz, H.; Bateman, E.E.; Colley, R.H.; Church, S.R.; Hartley, C.; Waterman, R.E.; Kammerer, A.L.; von Schrenk, H.; Fulks, E.B.; Hubert, E.E.; Reeve, C.S.; Snell, W.B.; Richards, C.A.; Linder, D.H.; Barnes, J.D. & Schmitz, H. — A suggested toximetric method for wood preservatives. Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn. (Easton, Pa.), 2:361-363, 1930.
37. Shapiro, S. — The evaluation of fungicides for use in paints. Off. Dig. Fed. Paint Varn. Prod. Clubs. (Philadelphia), 30:414-430, 1958.
38. Stanier, R.Y.; Doudoroff, M. & Adelberg, E.A. — Mundo dos micróbios. São Paulo, Edgard Blücher, 1969.
39. Stranks, D.W. — *Trichoderma viride* enzymic degradation of wood structure. Bi-Mon Res. Notes, (Can.), 26:23-24, 1970.
40. Thomson, W.T. — Agricultural chemicals book. IV — Fungicides. 3. ed. Thompson Publications, 1973.
41. Torgeson, D.C. — Fungicides: an advanced treatise. N. York/London, Academic Press, 1967.
42. Unligil, H.H. — Depletion of pentachlorophenol by fungi. For. Prod. J.: 18:45-50, 1968.
43. Wessel, C.J. & Bejuki, W.M. — Industrial fungicides. Ind. Engng. Chem. Analyt. Edn. (Easton, Pa.), 51:52A-63A, 1959.