

Volume 12 Número 4 Out.-Dez. 1981

Revista de Microbiologia

Publicação da 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 ($m\mu$) 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 ($m\mu$); e Angstroms (A; $10^{-10}m$). Partes por milhão (ppm) devem ser expressas como microrganismos por milímetros ($\mu g/ml$) ou microlitros por litro ($\mu l/litro$). A Revista se reserva o direito de adaptar os manuscritos ao estilo adotado.

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

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

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

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

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

Exemplo:

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

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

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

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

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

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

ILUSTRAÇÕES — Cada uma das duas vias do manuscrito deverá ser acompanhada de um conjunto completo de ilustrações (preferivelmente como fotografias). Os gráficos e desenhos devem ser concluídos, não requerendo qualquer montagem ou rearranjo. Nenhuma parte do gráfico deverá ser datilografada, devendo ser usado um e o mesmo normógrafo. As fotografias de ilustrações a traço devem ser feitas em papel de alto contraste apropriado. É recomendável submeter gráficos e desenhos no dobro da impressão final da Revista, prevendo-se todos os elementos da figura para as escalas de redução. Fotografias com reticulas 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 Outubro-Dezembro 1981 Número 4

Rev. Microbiol. (S. Paulo), 12(4)

CONTEÚDO

Sérgio O.P. da Costa Gil Vital A. Pessoa & Kinue Irino	117	Comportamento de células excretoras e não excretoras de protease (gelatinase) da mesma estirpe de <i>Proteus mirabilis</i> , quando inoculados em camundongos	<i>Behavior of protease (gelatinase)-excreting and non-excreting cells from a single <i>Proteus mirabilis</i> strain when inoculated into mice</i>
Virginia M.V. Fernandes & Jaques R. Nicoli	121	Produção de proteína a partir do fungo termotolerante <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , utilizando um dos resíduos de proteínas foliares de mandioca como substrato	<i>Production of protein from the thermo-tolerant fungus <i>Phanerochaete chrysosporium</i>, using the brown juice from a protein extract of cassava leaves as substrat</i>
Leslie C. Benchetrit & Agnes M. Sá Figueiredo	125	Hialuronidase associada com bacteriófagos temperados de <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Hyaluronidase associated with temperate bacteriophages from <i>Streptococcus pyogenes</i></i>
Walter Vieira Guimarães Arnaldo Chaer Borges Daison Olzany Silva & Servio Túlio A. Cassini	129	Transferência de plasmídios de resistência (Inc P-1) de <i>Escherichia coli</i> para <i>Rhizobium japonicum</i>	<i>Transfer of Inc P-1 drug resistance plasmids from <i>Escherichia coli</i> to <i>Rhizobium japonicum</i></i>
David E.S.N. de Barcellos	134	Comparação entre métodos de identificação de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em vísceras de suínos	<i>Comparison of identification methods for detection of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> in swine viscera</i>
Lauro Santos Filho Ilvan D. Ricciardi & Paulo P. Gontijo Filho	138	Influência da vacinação BCG na infecção experimental de camundongos por <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica infection in mice after BCG immunization</i>
Regina L.C. de Oliveira Patricia N. de Sá & Roberto A. Gomes	144	Produtos de termodegradação de açúcares em pH alcalino. II - Efeito de soluções de mono-e dissacáideos-fosfato em <i>Escherichia coli</i>	<i>Thermal degradation products of sugars in alkaline pH. II - Effect of mono- and disaccharide phosphate solutions on <i>Escherichia coli</i></i>
Hassib Ashcar & Wagner Tavelin	150	Padronização de método para detecção de cromogênese em estafilococos	<i>Standardization of a method for detecting chromogenesis of staphylococci</i>
Sérgio E.L. Fracalanza & Leslie C. Benchetrit	154	Distribuição de estreptococos beta hemolítico em material de orofaringe de crianças normais em Araraquara SP, Brasil	<i>Distribution of beta-hemolytic streptococci in pharyngeal specimens of normal children in Araraquara SP, Brazil</i>
Carlos H. Romero Armando A. Aguiar Sheila R.S. de Andrade Cheryl A. Rowe & Angela G. da Silva	158	Prevalência de anticorpos contra o vírus da papilomatose bovina no Estado do Rio de Janeiro	<i>Bovine papilloma virus antibodies in the State of Rio de Janeiro</i>
José E. dos Santos & Pedro M. Lacava	162	Variação sazonal de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio em ecossistema lacustre artificial	<i>Seasonal variation of the microaerophilic nitrogen fixing bacteria in a man made lacustrine ecosystem</i>
Odilia L. Negrão José D. Fontana & Glaci T. Zancan	170	Produção de glucoamilase por <i>Dactylium dendroides</i>	<i>Production of glucoamylase by <i>Dactylium dendroides</i></i>
Walderez Gambale Adhemar Purchio & Claudete R. Paula	176	Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Daily periodicity of airborne fungi from São Paulo city, Brazil</i>

CONTENTS

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.

Behavior of protease (gelatinase)-excreting and non-excreting cells from a single *Proteus mirabilis* strain when inoculated into mice

Sérgio Olavo Pinto da Costa

Dept.^o de Biologia, Instituto de Biociências USP,
Caixa Postal 11461

01000 São Paulo SP, Brasil

Gil Vital Alvarez Pessoa
& Kinue Irino

Laboratório de Bacteriologia, Instituto Adolfo Lutz,
Caixa Postal 01004
01000 São Paulo SP, Brasil

Summary

Protease (gelatinase)-excreting and non-excreting cells which originated from the same population by genetic instability behave differently when intraperitoneally inoculated into mice. The protease-excreting cells lower the survival rate of inoculated mice when compared to the non-excreting cells.

Resumo

*Comportamento de células excretoras e não excretoras de protease (gelatinase) da mesma estirpe de *Proteus mirabilis*, quando inoculados em camundongos*

Células excretoras e não excretoras de protease (gelatinase), que tiveram origem na mesma população de *Proteus mirabilis*, comportam-se diferentemente quando inoculadas intraperitonealmente em camundongos. As células excretoras de protease diminuem a sobrevida de camundongos inoculados, quando comparadas com as não excretoras.

Introduction

Analysis of a few newly isolated protease-excreting *P. mirabilis* population showed genetic instability characterized by the presence of a variable number of individuals which lost their ability to excrete protease. These individuals were recognized and genetically characterized by Costa (2) and designated as P⁻ (protease-negative). Even though P⁺ and P⁻ cells display very similar generation times when their growth curves in media with or without gelatin added are analyzed, a larger conversion of P⁺ cells into P⁻ cells is observed when unstable *P. mirabilis* strains are repeatedly cultured in gelatin-free nutrient broth*. Thus it is to be

expected that, in a protein habitat, unstable populations will selectively maintain the protease trait and that this enzyme provides *P. mirabilis* with some kind of advantage.

The present study attempts to show the difference in behavior between P⁺ and P⁻ individuals obtained from the same *P. mirabilis* sample when intraperitoneally inoculated into mice.

Material and Methods

Strains utilized — The *Proteus mirabilis* strains used were L-68-1-Nx-P⁺ (protease-positive) and L-68-2-Nx-P⁻ (protease-negative), both resistant to 25 µg/ml nalidixic acid

* Costa, S.O.P.; Bonato, M.C.M. & Bianco, M. — Instability of the protease (gelatinase) trait in *Proteus mirabilis*. II — Behavior of protease-excreting and non-excreting cells in the presence of gelatin. Rev. Microbiol. (São Paulo), in press.

and originating from strain L-68mNx^r. This original strain was isolated from clinical material at the Adolfo Lutz Institute designated with number 3617 and is genetically unstable with respect to protease excretion. P⁺ and P⁻ individuals from this sample were selected on plates containing NG medium with nalidixic acid added (4).

Culture media — NA (nutrient agar): Bacto beef extract, 3g; Bacto peptone, 5g; Bacto agar, 15g; distilled water to 1 liter; MT (6): Bacto peptone, 20g; lactose, 10g; sodium chloride, 5g; L-tryptophan, 4g; ammonium ferric citrate, 2g; crystal violet, 0.001g; neutral red, 0.3g; bile salts, 1.5g; agar, 1.5g; distilled water 1 liter; pH, 7.0; NG: Bacto Blood Agar Base with Bacto gelatin added, 7.5g; and agar, 10g.

Buffered saline solution — *Solution A*: KH₂PO₄, 9.78g; distilled water to 1 liter. *Solution B*: Na₂HPO₄, 17.4g; distilled water to 1 liter. Mix 10ml solution A with 40ml solution B, add NaCl, 8.5g, and distilled water to 1 liter; pH 7.4.

Mouse inoculation — P⁺ and P⁻ variants derived from strain L-68mNx^r of *P. mirabilis* were cultured in slanted NA for 15 hours at 37°C. The culture was suspended in buffered saline solution, pH 7.4, washed, resuspended in the same buffer and stored in the refrigerator while the number of viable cells from the various inocula was determined. On the following day, the viable cells, in the suspension were counted once more after inoculation in order to confirm the initial number of viable cells.

Twenty mice weighting 18-22g were utilized for each dose (0.2ml of the cell suspension), which was injected intraperitoneally. The mice were kept in appropriate individual cages and observed for 14 days, with a daily recording of deaths. The controls were groups of animals injected with buffered saline and groups of animals injected with a suspension of heat-killed bacteria.

After the animal's death, samples obtained from the peritoneal exudate and from the liver, spleen and kidneys were plated on to MT medium and incubated for 24 hours at 37°C. The resulting growth was submitted to the test of resistance to nalidixic acid

(25μg/ml) and to the gelatin hydrolysis test in NG medium, by replica plating (3).

Gelatin hydrolysis — Bacteria grown overnight in nutrient broth were diluted and spread on plates containing NG medium. After overnight incubation at 37°C, the surface of the medium was covered with a saturated solution of ammonium sulfate for 15-20 minutes. The colonies surrounded by a transparent halo indicate enzyme excretion.

Results and Discussion

The data on the effect of P⁺ *P. mirabilis* cells on mouse survival are summarized in Tables 1 and 2. The results of mouse inoculation with P⁻ *P. mirabilis* cells are given in Tables 3 and 4.

Gelatinase excretion is one of the biochemical characteristics of *Proteus mirabilis*. Gelatinase is a proteolytic exoenzyme which degrades several proteins such

Table 1 — Influence of protease-excreting (P⁺) *Proteus mirabilis*^(a) cells on mouse survival^(b)

N. ^o of P ⁺ cells inoculated in 0.2ml	Exp. N. ^o	N. ^o of inoculated animals (c)	N. ^o of dead animals
1.0x10 ⁹	1	20	20
	2	20	15
	3	20	14
	total	60	49
7.5x10 ⁸	1	20	19
	2	20	13
	3	20	16
	total	60	48
5.0x10 ⁸	1	20	16
	2	20	9
	3	20	11
	total	60	36
2.5x10 ⁸	1	20	3
	2	20	2
	3	20	0
	total	60	5
control buffered saline (d)	1	20	0
	2	20	0
	3	20	0
	total	60	0
control (heat-killed cells)			
1.0x10 ⁹	1	20	2
7.5x10 ⁸	1	20	2

(a) Strain utilized: L-68-1-Nx-P⁺; (b) Inoculation by the intraperitoneal route (c) the animals' weight varied between 18 and 22g; (d) buffered saline solution (see Material and Methods).

Table 2 — Determination of DL_{50} using the data in Table 1, by the method of accumulated results (4)

Dose $\times 10^8$	Nº of inoculated animals	Nº of dead animals	Nº of surviving animals	Accumulated dead	surviving	Nº of animals	Total % of mortality
2,5	60	5	55	5	102	107	4,67
5,0	60	36	24	41	47	88	46,59
7,5	60	48	12	89	23	112	79,46
10,0	60	49	11	138	11	149	92,61

$DL_{50} = 5.26 \times 10^8$ cells per ml.

Table 3 — Effect of non-protease-excreting (P^-) *P. mirabilis*^(a) cells on mouse survival rate^(b)

Nº 01 P^- cells inoculated in 0.2ml	Exp. Nº	Nº of inocu- lated animals (c)	Nº of dead animals
1.0x10 ⁹	1	20	18
	2	20	10
	3	20	8
	total	60	36
7.5x10 ⁸	1	20	16
	2	20	7
	3	20	4
	total	60	27
5.0x10 ⁸	1	20	9
	2	20	1
	3	20	3
	total	60	13
2.5x10 ⁸	1	20	2
	2	20	0
	3	20	0
	total	60	2
control	1	20	0
buffered	2	20	0
saline (d)	3	20	0
	total	60	0
control (heat-killed cells)			
1.0x10 ⁹	1	20	0

(a) Strain utilized: L-68-2-Nx-P⁻; (b) Intraperitoneal inoculation; (c) The animals weight varied between 18 and 22g; (d) Buffered saline solution (see Material and Methods).

as casein and albumin, and for this reason has been designated here as a protease.

The genetic information responsible for protease synthesis is of extrachromosomal nature and is characterized by great instability in protease excretion (2).

When a bacterium carrying a phenotypic characteristic such as that of protease excretion produces with high frequency cells which no longer exhibit this characteristic, interest is aroused in learning how this new variant behaves.

Protease excreting cells somehow participate in lowering the survival rate of intraperitoneally inoculated mice when compared to non-excreting cells. It should be pointed from the same *P. mirabilis* strain (L-68mNx^r) and exhibit the same marker of resistance to the drug (nalidixic acid). This isogeny overrules possible differences in behavior among different strains. In addition, the condition of resistance to nalidixic acid does not interfere substantially with growth ability (1), and both types of inoculated cells where shown to have the same generation time (2). Thus the only apparent difference between the two strains is the ability to excrete protease.

Our data may eventually explain those of Topley & col. (7). According to these in-

Table 4 — DL_{50} determination using the data in Table 3, by the method of accumulated results (4)

Dose $\times 10^8$	Nº of inoculated animals	Nº of dead animals	Nº of surviving animals	accumulated dead	surviving	Nº of animals	Total % of mortality
2,5	60	2	58	2	162	164	1,22
5,0	60	13	47	15	104	119	12,60
7,5	60	27	33	42	57	99	42,42
10,0	60	36	24	78	24	102	76,47

$DL_{50} = 8.05 \times 10^8$ cell per ml.

vestigators, very virulent *P. mirabilis* cultures exist which determine the animal's death during the first few hours, and less virulent ones which cause death only one week or more after inoculation. Thus, stable or slightly unstable cultures, consisting almost exclusively of protease-excreting cells, would be expected to be more virulent than the unstable ones, whose populations, for the most part, or even totally, would be ex-

pected to be non-protease-excreting populations.

Acknowledgment

This study was carried out with the financial support of CNPq (project CNPq/FINEP 5728/75 and 2222.1405/77).

References

1. Aoki-Watanabe, D.S. — Influência da resistência cromossómica e extracromossómica a drogas no crescimento de *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 9:31-38, 1978.
2. Costa, S.O.P. — Instabilidade genética da excreção de protease (gelatinase) em *Proteus mirabilis*. São Paulo, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, 1978. (Thesis).
3. Lederberg, J. & Lederberg, E.M. — Replica plating and indirect selection of bacterial mutants. J. Bact., 63:390-406, 1952.
4. Miller, J.H. — Experiments in molecular genetics. New York, Cold Spring Harbor laboratory, 1972.
5. Mushel, L.D. & Treffers, W.B. — Quantitative studies on bactericidae actions of serum and complement. J. Immunol., 76:1-10, 1956.
6. Pessôa, G.V.A. & Gelli, D.S. — Meio para diferenciação da tribo Proteae e outras enterobactérias. Rev. Inst. Adolfo Lutz, 32:95-96, 1972.
7. Topley, W.W.C.; Wilson, G.S. & Miles, A.A. — Bacteriología y inmunidad. 2. ed. Barcelona, Salvat Editores, 1953.

**Production of protein from
the thermotolerant fungus
Phanerochaete chrysosporium,
using the brown juice from
a protein extract of
cassava leaves as substrat**

Virginia M.V. Fernandes
& Jacques R. Nicoli

Dept.^o de Bioquímica e Imunologia UFMG,
Caixa Postal 2486
30000 Belo Horizonte MG, Brasil

Summary

The thermotolerant fungus *Phanerochaete chrysosporium* was cultured in brown juice obtained from a protein extract of cassava leaves, either pure or fortified with salts, at 45°C. The maximum biomass production, after 40 hours of incubation, was essentially the same in both conditions. The yield was low, apparently due to the lack of an important substrate. Salt fortification increased the biomass protein content and also affected the amino acid profile of the proteins.

Résumo

Produção de proteína a partir do fungo termotolerante Phanerochaete chrysosporium, utilizando um dos resíduos de proteínas foliares de mandioca como substrato

O fungo termotolerante *Phanerochaete chrysosporium* foi cultivado em resíduo do processo de extração de proteínas foliares de mandioca, puro ou reforçado com sais, a 45°C. A produção máxima de biomassa, obtida em 40 horas, foi sensivelmente igual nos dois casos e baixa, por falta de um substrato importante. O acréscimo dos sais de Hofsten aumentou o teor em proteínas da biomassa e influiu no perfil de aminoácidos dessas proteínas.

Introduction

The production and nutritional evaluation of leaf protein as an alternative source of protein as food or feed have been extensively studied (2, 3, 14). Alfalfa has been widely used as a source of leaf protein concentrate (LPC) (4, 19). More recently, cassava has been suggested as a source of LPC (5, 6, 9, 12, 18).

In the present paper, the brown juice obtained in the processing of cassava leaves has been tested as a substrate for production of a non-conventional protein: single cell protein (SCP).

Material and Methods

Microorganism — The thermotolerant fungus *Phanerochaete chrysosporium* ATCC 28326

was used. The culture was grown on Sabouraud dextrose agar slants for 14 days at 37°C and then stored in the refrigerator at 4°C for a maximum of one month.

Obtaining brown juice — Cassava leaves used came from Amarantina, Minas Gerais. The method of obtaining the LPC and, consequently, the brown juice has been described (18).

Analysis of the brown juice — Crude and real protein were determined as described by AOAC (1). Reducing and total sugar were determined according to Somogyi (15) and anthrone method (17), respectively.

The determination of minerals was carried out by X-ray fluorescence, after drying 500ml of the sample at 110°C with 1g of SiO₂.

Fermentation — Batch cultures were carried out in a bench fermentor (Model MF 114, New Brunswick Scientific Company) equipped with an automatic pH control module (Model pH 22, New Brunswick Scientific Company). During the operation, aeration and agitation were adjusted to 1vvm and 600rpm, respectively. The temperature throughout the fermentation process was maintained at 45°C. An aliquot of 10ml of *P. chrysosporium* spore suspension with approximatively 5×10^7 spores from a 14 days slant culture was transferred to a 2l Kitasato flask containing 500ml of culture medium. This flask was incubated for 72 hours with continuous shaking (120 translations per minute). The contents of the flask containing 2,1g of mycelia were transferred to the fermentor vessel containing 10l of culture medium. Foaming was controlled manually by adding soy oil. The brown juice, either pure or fortified with Hofsten salts (Table 1) (8) was used as the basal medium. At appropriate time intervals, samples of 25ml were withdrawn from the fermentation vessel. Duplicates of each sample were filtered through a preweighed membrane filter (0,45 μ pore size, Millipore), washed with distilled water, and dried to constant weight at 110°C.

The filtrate was analyzed for reducing sugar (15) and total carbohydrates (17).

Table 1 — Composition of the Hofsten mineral salts (8)

Substance	grams per liter
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2
KH_2PO_4	1
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,004
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0,004
NaCl	0,1
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,1

Harvesting — Stationary phase mycelium was harvested by filtration through a 80-mesh copper wire sieve and thoroughly washed with distilled water. The mycelia were dried at 60°C, ground in a mortar to a very fine powder and kept desiccated.

Biomass analysis — Total nitrogen was determined according to Kjeldahl (1). Crude protein was expressed as total nitrogen(N) multiplied by 6,25. Protein nitrogen was determined by AOAC procedure (1) and "real" protein by multiplying protein nitrogen by 6,25.

Moisture, ether extractives, and total ash were determined according to AOAC (1).

The amino acid analysis was carried out on an automatic amino acid analyzer (Beckman, Model 120) after hydrolysis of the sample in 6N HCl for 20 hours. Tryptophan was determined by the Miller procedure (11).

Results and Discussion

Table 2 shows the chemical composition of the brown juice. The juice has low levels of reducing sugars and total carbohydrates. There is, therefore, a deficiency of a quantitatively important substrate that can lead to a low biomass production.

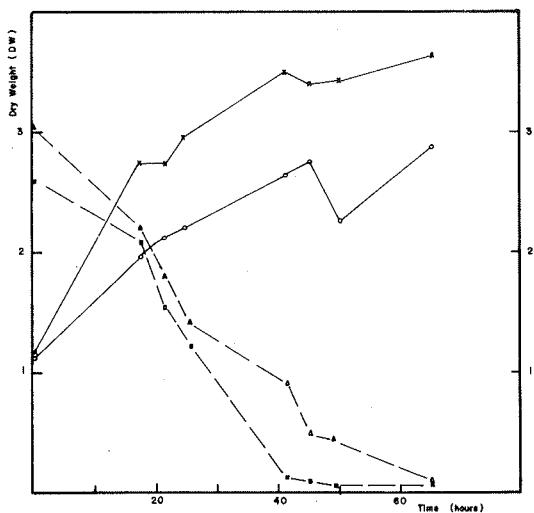
Table 2 — Chemical composition of brown juice obtained from cassava leaf protein extract

Constituents	Concentration g/100ml
Total nitrogen	0,073
Crude protein	0,456
Nitrogen protein	0,024
Real protein	0,15
Reducing sugar	0,259-0,305
Total carbohydrate	0,448-0,549

Figure 1 shows the yield of *P. chrysosporium* in function of time, with and without the salt fortification. The graph also shows the sugar consumption. The yield of mycelia was apparently higher in the experiment without salt fortification. However, the difference in initial substrate concentration may explain this result.

Table 4 shows the biomass composition of *P. chrysosporium* from media with and without salt fortification of the medium. The salt fortification did not alter significantly the biomass production after 40 hours of incubation when the stationary phase of growth was attained. However, the salt fortification changed appreciably the biomass composi-

Figure 1 — Biomass production and sugar consumption of *Phanerochaete chrysosporium* grown in brown juice, either pure or fortified with salts, from cassava leaf protein extraction*



* Brown juice pure: dry weight (x), reducing sugars (Δ);
Brown juice fortified with salts: dry weights (○), reducing sugars (x).

Table 3 — Mineral composition of the brown juice obtained from cassava leaf protein extract

Elements	Concentration g/100ml
K	0,86
P	0,19
Mn	0,33
Fe	0,13
Ca	0,20
Zn	0,0008
Cl	2,31
S	0,21

Table 4 — Proximate analysis of the biomass of *P. chrysosporium* grown in cassava brown juice with and without Hofsten salt fortification

Constituents	Without salts	With salts
Final production	0,363	0,287
Crude protein	20,73	31,91
Real protein	18,94	26,62
Ash	4,79	3,46
Fat	20,57	13,86
Moisture	8,22	9,16

tion. This effect might be due to the ratio C/N in the culture medium whose influence in the balance lipid/protein in mycelia has been reported (10). The level of protein was increased and the level of lipids was decreased due to salt fortification.

The amino acid composition of the crude protein in the biomass obtained either with or without salt fortification is shown in Table 5.

Table 5 — Amino acid composition of the protein of *Phanerochaete chrysosporium* grown in cassava brown juice either pure or fortified with Hofsten salts and essential amino acid composition of the FAO reference protein (7)

Amino acid	Concentration g/16g protein nitrogen		
	Without salts	With salts	FAO reference protein
Lysine	4,16	10,87	4,2
Histidine	1,79	3,86	
Arginine	5,47	14,08	
Aspartic acid	6,48	4,79	
Threonine	4,11	2,87	
Serine	4,37	2,57	
Glutamic acid	9,45	6,18	
Proline	3,45	3,00	
Glycine	4,29	3,30	
Alanine	5,91	4,89	
Cystine	1,31	1,12	2,0
Valine	4,64	2,84	4,2
Methionine	2,14	2,04	2,2
Isoleucine	3,59	2,54	4,2
Leucine	7,09	4,26	4,8
Tyrosine	3,15	2,21	
Phenylalanine	3,85	2,87	2,8
Tryptophane	1,44	1,48	1,4

We can see that the amino acid pattern is sensitive to salt fortification. There was an increase in lysine and a decrease in valine, tyrosine, leucine and isoleucine levels in the biomass obtained when the fungus was grown in a salt-fortified medium. When compared with the FAO reference protein (7), the product is deficient in sulfur-containing amino acids. However, the levels of these amino acids in the biomass obtained in this work is still higher than those reported for several yeasts and fungi (13).

The present paper investigates the possibility of obtaining single cell protein from one residue of cassava leaf protein extract. The choice of a thermotolerant fungus

would eliminate expensive steps such as sterilization and refrigeration and would abbreviate the time of fermentation (16). Besides, the biomass recovery may be carried out by simple filtration instead of the expensive centrifugation used for the bacteria or yeasts.

Acknowledgments

The authors would like to acknowledge Dr. Armando Gil de Almeida Neves for the aminogram and Drs. Enio Cardillo Vieira and Rolf Carlson for going through the manuscript and making helpful suggestions.

References

1. AOAC — Association of Official Analytical Chemists — Official methods of analysis. 12 ed. Washington, Association of Official Analytical Chemists, 1975.
2. Arkoll, D.B. — Agronomic aspects of leaf protein production in Great Britain. Leaf protein: its agronomy, preparation, quality and use. IBP Handbook 20. Oxford, Pirie Blackwell Scientific Publications, 1971.
3. Dayrell, M.S. & Vieira, E.C. — Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia aculeata* Mill. I — Extraction and composition. Nutr. Rep. Int., 15:529-537, 1977.
4. Edwards, R.H.; Miller, R.E.; de Fremery, D.; Knuckles, B.E.; Bickoff, E.M. & Kolher, G.O. — Pilot plant production of an edible white fraction leaf protein concentrate from alfalfa. J. Agric. Food. Chem., 23:620-626, 1975.
5. Eggum, B.O. — The protein quality of cassava leaves. Brit. J. Nutr., 24:761-768, 1970.
6. Fafunso, M.A. & Oke, O.L. — Leaf protein from different cassava varieties. Nutr. Rep. Int., 14: 629-632, 1976.
7. FAO — Nutrition Meeting Reports, Sr37. Rome Food and Agricultural Organization of the United Nations, 1965.
8. Hofsten, B.V. & Ryden, A.L. — Submerged cultivation of a thermotolerant basidiomycete on cereal flours and other substrates. Biotechnol. Bioeng., 17:1183-1197, 1975.
9. Kling, S.H.; Solewcz, E.; Daumas, M.S.P.; Silva, G.H.; Martins, M.R.J.; Moura, R.M.B. & Perrone, J.C. — Aproveitamento industrial das folhas de mandioca. Inform. Inst. Nac. Tecnol. (Rio de Janeiro), 9:13-18, 1976.
10. Litchfield, J.H. — Submerged culture of mushroom mycelium. In: — Peppler, H.J., ed. — Microbial technology. New York/Amsterdam/London, Reinhold Publishing, 1967.
11. Miller, E.L. — Determination of the tryptophan content of feedingstuffs with particular reference to cereals. J. Sci. Food Agric., 18:381-386, 1967.
12. Pechnick, E.; Guimarães, L.R. & Panek, A. — Sobre o aproveitamento da folha de mandioca (*Manihot* sp) na alimentação humana: contribuição ao estudo do valor alimentício. Arq. Bras. Nutr., 18:11-23, 1962.
13. Peppler, H.J. — Industrial production of single-cell protein from carbohydrates. In: — Mateles, R.I. & Tannenbaum, S.R., eds. — Single Cell Protein. Massachusetts, M.I.T. Press, 1968.
14. Pirie, N.W. — Leaf protein and other aspects of fodder fractionation. Cambridge, U.K., Cambridge University Press, 1978.
15. Somogyi, M.J. — Notes on sugar determination. J. Biol. Chem., 195:19-23, 1952.
16. Surucu, G.A.; Engelbrecht, R.S. & Chian, E.S.K. — Thermophilic microbiological treatment of high strength wastewaters with simultaneous recovery of SCP. Biotechnol. Bioeng., 17:1639-1662, 1975.
17. Trevelyan, W.E. & Harrison, J.S. — Studies on yeast metabolism. I — Fractionation and microdetermination of cell carbohydrates. The Biochem. J., 50:298-302, 1952.
18. Tupynamba, M.L.V.C. & Vieira, E.C. — Isolation of cassava leaf protein and determination of its nutritive value. Nutr. Rep. Int., 19:249-259, 1979.
19. Worgan, J.T. & Wilkins, R.J. — The utilization of deproteinised forage juice. In: — Green Corp. Fractionation Proc. Occasional Symposium. The British Grassland Society, Hurley, Maidenhead, U.K., 1976.

Hyaluronidase associated with temperate bacteriophages from *Streptococcus pyogenes**

Leslie C. Benchetrit

& Agnes Marie Sá Figueiredo

*Department of Medical Microbiology, Institute of Microbiology,
Federal University of Rio de Janeiro
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

Summary

Using a spectrophotometric microdetermination of hyaluronidase, hyaluronidase activities have been found to be associated with purified temperate bacteriophages isolated from 2 strains of *Streptococcus pyogenes*. The phage-associated enzyme represented 4 to 8% of the enzyme activity present in phage lysates. Most of the hyaluronidase activity present in the lysates consisted of free enzyme. The 2 phages did not require additional hyaluronidase to penetrate the hyaluronic acid capsule of the indicator strain.

Resumo

Hialuronidase associada com bacteriófagos temperados de Streptococcus pyogenes

Utilizando uma microdeterminação espectrofotométrica da hialuronidase, atividades hialuronidásicas foram encontradas em associação com bacteriófagos temperados purificados, isolados, a partir de duas cepas de *Streptococcus pyogenes*. A enzima associada ao fago representou 4 a 8% da atividade enzimática presente nos lisados de fago. A maior parte da atividade hialuronidásica presente nos lisados, consistia de enzima livre. Os 2 fagos não necessitaram da adição de hialuronidase para a penetração na cápsula de ácido hialurônico da cepa indicadora.

Introduction

The involvement of hyaluronidase in the infection of *Streptococcus pyogenes* with bacteriophages has been well established (6, 7, 9). The apparent function of the phage enzyme is to allow penetration of the mucoid hyaluronic acid capsule of the streptococcal cell by the bacterial viruses (6, 9). In the absence of an exogenous source of hyaluronidase, certain strains of *S. pyogenes* that possess a mucoid character are resistant to infection by virulent phages (9), whereas such strains are generally susceptible to infection by most temperate bacteriophages (6, 10, 11).

In a previous work from this laboratory temperate bacteriophages released by strains of *S. pyogenes* upon induction with

mitomycin C were propagated and applied on an indicator lawn (10). It was observed that the 2 streptococcal phages produced crystal clear plaques on the indicator strain in the absence of added hyaluronidase. This was probably due to phage hyaluronidase which is active on host capsular hyaluronic acid without affecting bacterial viability (6, 11, 12).

The present study was undertaken to demonstrate that a hyaluronidase activity is associated with the 2 temperate streptococcal phages. In the study, advantage is taken of a very sensitive method for detection and assay of hyaluronidase (1), a method capable of measuring 10 times less enzyme than has been reported for the previously most sensitive detection technique (5).

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

Material and Methods

Streptococcal strains and bacteriophages — The temperate bacteriophages used in the study were obtained from strains of *S. pyogenes* by induction with mitomycin C as previously described (10, 11). Strain n° 78020 was isolated from the infected skin lesion of a patient with pyoderma and strain n° 78082 was isolated from a throat culture of a patient with streptococcal pharyngitis. The Lancefield group A was determined by using the nitrous acid procedure of El Kholy (4). The nonlysogenized group A strain designated as K56 and originally received from Dr. Kjems (6) was used for the growth of the bacteriophages and as a standard indicator to prepare lawns.

Bacteriophages were propagated as previously described (10, 11). Lysates were cleared from cellular debris by low speed centrifugation. Thereafter the supernates were passed through membrane filters (HA type, 0.45 μ m pore size; Millipore Corp, Bedford, Mass., U.S.A.). Bacteriophage titers were determined as reported earlier (11).

Media — Broth for bacterial growth and induction of phages from streptococcal strains and agar plates for plaque assays of the bacteriophages have been described elsewhere (10).

Concentration and purification of bacteriophages — Bacteriophages were recovered from clear lysates by using the polyethylene glycol concentration method (13). Phages were purified by layering 1ml of concentrated lysates on the top of 38ml linear sucrose gradients (10-50%) prepared in 10mM Tris-hydrochloride buffer (pH 7.2) containing 5mM MgCl₂ and 150mM NaCl. After centrifugation for 1hr at 54,000xg in a Spinco SW 27 rotor at 4°C, fractions of 1ml each were collected. The protein was located by measuring the absorbance at 280nm, and each fraction was assayed for phage content. Phages were then dialyzed overnight at 4°C against 20mM sodium acetate buffer (pH 5.0) containing 10mM NaCl before testing for hyaluronidase activity.

Hyaluronidase assay — The method used in this study utilizes a carbocyanine dye for the

spectrophotometric determination of the enzyme activity. It is based on the shift in the wavelength of maximal absorbance in the visible spectrum of the dye toward longer wavelengths (600-650nm) upon interaction with hyaluronic acid (1). Measurement of the absorbance of the dye-polysaccharide complex at 635nm allows the estimation of the extent of substrate degradation and provides an assay for hyaluronidase activity. The unit of enzyme has been defined as that amount of hyaluronidase that results in a 10% decrease in the absorbance of the dye-hyaluronic acid complex after incubation of the polysaccharide for 1hr at 37°C and at pH 5.0; it is equivalent to 0.2 National Formulary unit (1).

In the present study the assay was modified as follows: portions of purified phages in 90 μ l of 20mM sodium acetate buffer (pH 5.0; reaction buffer) containing 10mM NaCl were added to 10 μ g of hyaluronic acid solutions (10 μ l) and incubated at 37°C for various times. The reaction was terminated by dilution in 0.9ml of water at 4°C. Samples (0.7ml) were withdrawn, added to 6.3ml of dye (0.1mM in water containing 50% dioxane, 1mM acetic acid and 0.5mM ascorbic acid) and optical densities were read for measurement of dye-complex formation at 635nm. The blank contained 63 μ l of phage, 637 μ l of water and 6.3ml of dye. The controls contained (a) hyaluronic acid and reaction buffer; (b) hyaluronic acid and bovine testicular hyaluronidase; (c) purified phage and dye solution. Assays were performed in triplicate.

Results

Bacteriophage — associated hyaluronidase — Incubation of a reaction mixture containing the temperate phage from strain n° 78020 and hyaluronic acid for 5hr allowed the assay of 0.86 unit of enzyme associated with an amount of phage representing approximately 4.8×10^4 plaque-forming units. When the reaction mixture contained substrate and 1.8×10^4 plaque-forming units of the phage from strain n° 78082, one unit was determined after 5hr incubation at 37°C. Results of control experiments indicated (a) that when hyaluronic acid was in-

cubated without phage and then mixed with dye, no decrease in the absorbance at 635nm could be detected; (b) that substrate was completely digested by bovine testicular hyaluronidase after incubation at 37°C; and (c) that the temperate phages did not interact with dye.

The hyaluronidase activities associated with both of the temperate bacteriophages are compared in Table 1. The phages possessed relatively high levels of enzyme as the addition of hyaluronidase in the plates did not increase the efficiency of plating of the viral particles. With added hyaluronidase the enhancement was minor.

Hyaluronidase of bacteriophage lysates — All of the hyaluronidase present in supernatants of lysates of both of the temperate phages was not associated with viral particles. Table 2 presents the distribution of

phage-associated and free enzyme. After determination of phage titers and total hyaluronidase activities present in phage lysates, we calculated from the phage-enzyme specific activities (Table 1) that the free enzyme (non-phage-associated) amounted to 92-96% of the total hyaluronidase in the lysates (Table 2).

Discussion

As first shown by Kjems (6), the lysates of group A streptococcal temperate bacteriophages contain hyaluronidase activity. The enzyme activity was partly bound to the phage particle (30%) and partly free (70%) in the supernate of the lysate. In recent studies, a similar proportion of phage-associated enzyme (25%) was observed (2).

Table 1 — Hyaluronidase associated with temperate bacteriophages of *S. pyogenes* and the effect of the enzyme on phage titers

Bacteriophage*	Hyaluronidase		Phage titer ($\times 10^{-5}$)	
	Specific activity**		No added enzyme	Added enzyme****
	.U/PFU***	U/mg of protein****		
From strain n.º 78020	1.8×10^{-5}	588	5.0	5.3
From strain n.º 78082	5.5×10^{-5}	1480	1.6	2.3

* Obtained after induction with mitomycin C and propagated and assayed on strain K56.

** One unit is equivalent to 0.2 National Formulary Unit (1).

*** PFU, Plaque-forming units.

**** Protein concentrations were determined by using the method of Bradford (3) with crystalline bovine serum albumin as standard.

***** Hyaluronidase (bovine tests, Sigma Chemical Co., St Louis, Mo., USA) was added at a concentration of 40 µg/ml in plates.

Table 2 — Distribution of hyaluronidase activity in temperate phage lysates*

Phage lysate	Total hyaluronidase activity (U)	Phage titer (PFU)**	Phage-associated hyaluronidase activity (U)	Free hyaluronidase activity (U)
From strain n.º 78020	12.1	2.6×10^4	0.47 (4%)	11.6 (96%)
From strain n.º 78082	52.8	8.0×10^4	4.4 (8%)	48.4 (92%)

* Cultures of K56 (5ml) were infected (multiplicity of infection, 0.2) with temperate phages and the lysates were cleared from cellular debris by centrifugation at 8000xg for 30 min. Thereafter the supernates were dialyzed overnight at 4°C against the reaction buffer, sterilized by filtration and assayed for phage and enzyme content as described under Material and Methods.

** PFU, Plaque-forming units.

In confirmation of these previous studies and with the use of a different system of temperate phages, we have shown that a minor portion (4-8%) of the hyaluronidase activity present in streptococcal temperate phage lysates is associated with viral particles. The 2 temperate phages did not require the addition of extraneous hyaluronidase to the medium for maximum propagation on the indicator strain K56. This observation is consistent with the relatively high level of hyaluronidase associated with the viral particles.

Mucoidness of *Streptococcus pyogenes* is due to hyaluronic acid capsulation, a factor believed to be of importance in virulence (8, 12) and hyaluronidase associated with streptococcal temperate bacteriophages plays a

crucial role in the penetration of the host mucoid capsule for initiation of phage infection (2, 6, 9). The studies reported here have been useful in determining the phage-associated enzymes in 2 phage-host systems for use in future studies.

Acknowledgements

This study was supported by grants from CNPq (Auxílio n.º 2222.1749/78) and FINEP (Convênio 527/CT). We thank Dr. Lewis W. Wannamaker for the gift of the carbocyanine dye (catalog n.º 2718; Eastman Organic Chemicals Div., Eastman Kodak Co., Rochester, N.Y., U.S.A.).

References

1. 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.
2. 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.
3. 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.*, 12:248-254, 1976.
4. 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.
5. Herd, J.K.; Tschida, J. & Motyca, L.C. — Determination of acyl esterase activity on electrophoresis membranes and separation from hyaluronidase. *Anal. Biochem.*, 68:218-225, 1975.
6. Kjems, E. — Studies on streptococcal bacteriophages. 3 — Hyaluronidase produced by the streptococcal phage-host cell system. *Acta Path. Microbiol. Scand.*, 44:429-439, 1958.
7. Maxted, W.R. — Enhancement of streptococcal bacteriophage lysis by hyaluronidase. *Nature (London)*, 170:1020-1021, 1952.
8. Maxted, W.R. — The influence of bacteriophage on *Streptococcus pyogenes*. *J. Gen. Microbiol.*, 12:484-495, 1955.
9. Niemann, H.; Birch-Andersen, A.; Kjems, E.; Mansa, B. & Stirm, S. — Streptococcal bacteriophage 12/12-borne hyaluronidase and its characterization as a lyase (EC 4.2.99.1) by means of streptococcal hyaluronic acid and purified bacteriophage suspension. *Acta Pathol. Scand.*, 84:145-153, 1976.
10. Skjold, S. & Wannamaker, L.W. — Method for phage typing group A type 49 streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 4:232-238, 1976.
11. Wannamaker, L.W.; Skjold, S. & Maxted, W.R. — Characterization of bacteriophages from nephritogenic group A streptococci. *J. Infect. Dis.*, 121:407-418, 1970.
12. Wilson, A.T. — The relative importance of the capsule and the M-antigen in determining colony form of group A streptococci. *J. Exp. Med.*, 109:257-270, 1959.
13. Yamamoto, K.R. & Alberts, B.M. — Rapid bacteriophage sedimentation in the presence of polyethylene glycol and its application to large-scale virus purification. *Virology*, 40:743-744, 1970.

Transfer of Inc P-1 drug resistance plasmids from *Escherichia coli* to *Rhizobium japonicum**

Walter Vieira Guimarães

Arnaldo Chaer Borges

Daison Olzany Silva

& Servio Túlio Alves Cassini

Dept.^o de Biologia Geral, Universidade Federal de Viçosa
36570 Viçosa MG, Brasil

Summary

The RK2 and RP4, plasmids of the Inc P-1 group, were transferred from *Escherichia coli* to *Rhizobium japonicum*, in liquid medium, using a 21 hrs/28°C mating regime. The frequency of plasmid transfer ranged from 1.6×10^{-4} to 5.3×10^{-6} transconjugants/donor. The donor ability of *R. japonicum* R⁺ transconjugants was detected in crosses with *E. coli* after 6 hrs/28°C incubation. All of the *R. japonicum* R⁺ transconjugants retained their ability to nodulate soybean roots. These two plasmids presented great stability in *R. japonicum* cells and the antibiotic markers were always present when plasmids were transferred back to *E. coli*.

Resumo

Transferência de plasmídios de resistência (Inc P-1) de Escherichia coli para Rhizobium japonicum

Plasmídios RK2 e RP4, pertencentes ao grupo de incompatibilidade P-1 (Inc P-1), foram transferidos de *Escherichia coli* para *Rhizobium japonicum* em cruzamentos realizados em meio líquido, após 21 horas de incubação, a 28°C. A frequência de transmissão de plasmídios variou de 1.6×10^{-4} à 5.3×10^{-6} transconjugantes/doador. A capacidade doadora dos R⁺ transconjugantes de *R. japonicum* foi detectada em cruzamentos com *E. coli*, após 6 horas de incubação à 28°C. Todos os transconjugantes de *R. japonicum* testados conservaram a capacidade de produzir nódulos em raízes de soja. Os plasmídios apresentaram grande estabilidade em células de *R. japonicum* e conservaram suas marcas genéticas para resistência aos antibióticos, quando novamente em células de *E. coli*.

Introduction

Rhizobium japonicum is the mutualist of the soybean (*Glycine max* (L.) Merrill) in the symbiotic process that yields nitrogen fixation.

Traditionally soybean seeds have been inoculated with *Rhizobium* cells, with the idea that better bacterial inoculants will produce more effective nodules on the legume roots and thus, fix higher amounts of nitrogen. To improve the nitrogen fixing ability of *Rhizobium* strains, basic studies are prerequisite.

Several workers have studied the genetics of *Rhizobium*, using transduction, conjugation and transformation (6, 12, 21). Conjugation is probably the most suitable method of gene transfer for establishing linkage maps in microorganisms (2). Several plasmids of the Inc P group were transferred to and from *R. leguminosarum*, but mobilization of chromosomal markers was not detected in this bacterium (1). Beringer & col. (3) demonstrated chromosome transfer in *R. leguminosarum* by R68.45, RP4 and other plasmids. The RP4 plasmid was not

* This research was supported by Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (Grant 2222.1089/77 and 2222.0360/78.— PIG II).

very efficient in mobilizing chromosomal genes in *R. leguminosarum* but was efficient in *R. meliloti* (3, 18). Kiss & col. (16) isolated an R-prime derivative of R68.45 carrying a chromosome segment of *R. meliloti*, and Johnston & col. (15) transferred chromosomal genes between *R. leguminosarum* and *R. meliloti* using the R68.45 plasmid. The construction of an RP4-prime plasmid by Jacob & col. (14) did not improve poor chromosomal gene transfer ability of RP4 in *R. leguminosarum*. Circular maps have been constructed for *R. leguminosarum* and for *R. meliloti* (3, 17, 18).

Indigenous plasmids have been detected in several *Rhizobium* species (13, 19, 23). Casse & col. (7) isolated plasmids from most of the *R. meliloti* strains tested. They suggested that the amounts of extrachromosomal elements in *Rhizobium* should be significant and plasmids could play a role in the control of nodulating ability. It has also been suggested that host-range and nitrogen fixation genes may be plasmid-borne (2, 4, 5). Gross & col. (11) isolated plasmids from *R. japonicum* which represented a large amount of the total DNA in the cell. They suggested that the differences in plasmid numbers and mass could be a rapid and reliable means of strain distinction.

Many genetic studies have been conducted with *R. leguminosarum* and *R. meliloti*; however, little has been done with *R. japonicum*. Linkage maps for both of the former have been determined successfully but there is none as yet published for *R. japonicum*. The present work was undertaken to study the transfer of RK2 and RP4 plasmids to and from *R. japonicum* and their stabilities in that host.

Material and Methods

Isolation of R. japonicum — Healthy and large size nodules from soybean roots were washed in tap water and transferred to 95% alcohol for one minute. These were then treated with 5 vol. H₂O₂ (22) for 3 min. after which they were rinsed in sterile water and individually crushed with sterile microscopic slide. The macerate was streaked on solid YEM-HM medium of Cole & Elkan (8) and incubated at 28°C/4-7 days. Typical colonies were purified and tested for nodule formation

by inoculation of 3 to 4 sterile soybean seeds/pot, in vermiculite. The pots were kept in the greenhouse for 30 days. Nutrient solution was added every 2 to 3 days.

Spontaneous chloramphenicol resistant mutants — *Rhizobium* cells, grown in YEM-HM broth at 28°C/4-5 days, were centrifuged 7.000 rpm/5 min. and the pellet resuspended in a small volume of the same medium. Then, 0,1ml of this suspension was spread on the surface of YEM-HM agar with 30 µg/ml chloramphenicol. After 4-7 days incubation at 28°C the growing colonies were transferred to the same medium and tested for nodulation on soybean roots.

Plasmid transfer to R. japonicum — *E. coli* J5-3, harboring RK2 and RP4 drug resistance plasmids, were used as donors. The *E. coli* cells grew to log. phase in nutrient broth at 37°C and the *R. japonicum* in TY broth (1) at 28°C/4-5 days. The crosses were made at a 1:10 ratio (v/v) donor: recipient. The mating mixture was incubated for 21 hrs at 28°C without shaking, as recommended by Beringer (1). The selective medium was a mixture of 1:1 VS-NB medium (1) with 50 µg/ml of chloramphenicol and 50 µg/ml of kanamycin.

Donor ability of R. japonicum transconjugants — One-tenth ml of log. phase *R. japonicum* R⁺ cells in YEM-HM broth at 28°C, and 1ml of fresh *E. coli* C600 suspension in nutrient broth at 37°C, were added to 1ml of YEM-HM medium. After 6 hrs incubation at 28°C, without shaking, 0,1ml of the cell mixture was spread on nutrient agar with 50 µg/ml kanamycin and incubated at 40°C/24 hrs.

Characterization of R. japonicum R⁺ transconjugants — After purification of the transconjugants on selective medium, several colonies were tested for their abilities to produce nodules on soybean plants. These colonies were also tested for their abilities to grow at 28°C, but not at 40°C, in YEM-HM medium in the presence of 50 µg/ml kanamycin.

Stability of R plasmids in R. japonicum — Transconjugants were transferred to YEM-HM broth without antibiotic and incubated at

Table 1 — Bacterial strains

Strains	Relevant characteristics*	Plasmid	Source
<i>E. coli</i>			
J5-3 (RK2)	Aux ⁻ Ap ^r Km ^r Tc ^r	RK2	J. Beringer
J5-3 (RP4)	Aux ⁻ Ap ^r Km ^r Tc ^r	RP4	J. Beringer
C600	Aux ⁻	—	
<i>R. japonicum</i>			
W46C	Ap ^r Cm ^r Km ^s Tc ^r	—	Viçosa-MG
W52C	Ap ^r Cm ^r Km ^s Tc ^r	—	Viçosa-MG
W60C	Ap ^r Cm ^r Km ^s Tc ^r	—	Viçosa-MG
W46CK	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RK2	J5-3 (RK2) x W46C
W46CP	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RP4	J5-3 (RP4) x W46C
W52CK	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RK2	J5-3 (RK2) x W52C
W52CP	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RP4	J5-3 (RP4) x W52C
W60CK	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RK2	J5-3 (RK2) x W60C
W60CP	Ap ^r Cm ^r Km ^r Tc ^r	RP4	J5-3 (RP4) x W60C

* Aux-Auxotrophic; Ap-ampicillin; Cm-chloramphenicol; Tc-tetracycline; Km-kanamycin; r-resistant; s-susceptible.

28°C/7 days. After each two successive transfers, 0.1ml of the cell suspension was tested for growth in kanamycin YEM-HM broth.

Antibiotics — The antibiotics used throughout the experiments, and their sources, were: chloramphenicol, from Carlo Erba, Lab.; kanamycin, tetracycline, from Bristol Lab. and carbenicillin, from Pfizer Química Ltda.

Bacterial strains used in the experiments are listed in Table 1.

Results

Transfer of RK2 and RP4 plasmids to *R. japonicum* — The Inc P-1 group R factors RK2 and RP4, carrying ampicillin, kanamycin and tetracycline resistance genes, present in *E. coli* J5-3 strain, were transferred to *R. japonicum* in crosses performed in liquid medium at 28°C/21 hrs without shaking (Table 2). The frequency of RK2 plasmid

transfer to W60C strain was 23x and 6x higher than to W52C and W46C, and of RP4 to W60C was 10x and 20x higher than to W52C and W46C, respectively. The difference of transfer frequency between RK2 and RP4 in the same strain was about 1x to 3x. The data show that W60C accepted RK2 and RP4 plasmids in higher frequencies than W52C or W46C.

Characterization of the *R. japonicum* transconjugants — The introduction of RK2 and RP4 plasmids in *R. japonicum* produced transconjugants that were able to grow in medium with chloramphenicol and kanamycin at 28°C, but not at 40°C, as was expected for *R. japonicum* transconjugants. They were also capable of forming typical nodules on soybean roots (Table 3). The resistance to ampicillin and tetracycline could not be tested in *R. japonicum* transconjugants because the original cells were already resistant to both antibiotics.

Donor ability of *R. japonicum* transconjugants — *R. japonicum* transconjugants were crossed with *E. coli* C600 to test their donor abilities. Data in Table 4 show that *R. japonicum* transconjugants harboring RK2 and RP4 plasmids were able to transfer them to *E. coli* C600. The frequencies of plasmid transfer were low but the time of mating was short. The W46CK transconjugant, harboring RK2 plasmid, showed better donor ability than W46CP a transconjugant harboring RP4 plasmid. The donor ability of W52CK and W52CP transconjugants presented similar

Table 2 — Frequency of RK2 and RP4 plasmid transfer from *E. coli* to *R. japonicum*

<i>R. japonicum</i> Recipients	Frequency of plasmid transfer	
	Donors	
	<i>E. coli</i> J5-3 (RK2)	<i>E. coli</i> J5-3 (RP4)
transconjugants/donor		
W46C	2.1×10^{-5}	8.3×10^{-6}
W52C	5.3×10^{-6}	1.6×10^{-5}
W60C	1.2×10^{-4}	1.6×10^{-4}

Table 3 — Characterization of the *R. japonicum* transconjugants

<i>R. japonicum</i> transconjugants	Growth at		Growth medium*	Soybean nodulating ability
	28°C	40°C	YEM - HM + Km + Cm	
W46CK	+	-	+	+
W46CP	+	-	+	+
W52CK	+	-	+	+
W52CP	+	-	+	+
W60CK	+	-	+	+
W60CP	+	-	+	+

* YEM-HM growth medium of Cole & Elkan (8).

Table 4 — Frequency of donor ability of *R. japonicum* transconjugants, after 6 hours mating with *E. coli* C600

<i>R. japonicum</i> transconjugants	Frequency of plasmid transfer
	transconjugants/donor
W46CK	2,1 × 10 ⁻⁷
W46CP	1,2 × 10 ⁻⁸
W52CK	4,7 × 10 ⁻⁷
W52CP	5,3 × 10 ⁻⁷
W60CK	2,5 × 10 ⁻⁸
W60CP	1,6 × 10 ⁻⁸

frequencies. W60CK and W60CP also presented similar donor abilities. Although *E. coli* C600 transconjugants were selected in the presence of kanamycin, the resistance to ampicillin and tetracycline was also observed showing that both plasmids passed through *R. japonicum* without loss of their antibiotic markers.

Stability of RK2 and RP4 plasmids in *R. japonicum* — The RK2 and RP4 plasmids were very stable in *R. japonicum* cells. After 6 weekly transfers to a non-selective medium, the *R. japonicum* transconjugants still had the RK2 and RP4 plasmids as expressed by their resistance to kanamycin. The transconjugants also retained their ability to form nodules and their isolation from 30-days old nodules, in growth medium with kanamycin, indicated the presence of both plasmids.

Discussion

The present results showed that RK2 and RP4 plasmids were transferred at relatively low frequency from *E. coli* to *R. japonicum*, after 21 hrs mating at 28°C, in liquid medium.

Chromosome mobilization by plasmids depends on the high frequency of plasmid transfer from cell to cell. The RP4 plasmid, one member of the Inc P-1 group with a wide host-range (9, 10, 20), has been introduced and has promoted chromosomal gene transfer with high efficiency in *R. meliloti*, but not in *R. leguminosarum* (3, 18); however, derivatives of R68 plasmid mobilized chromosomal genes in *R. leguminosarum* (3).

The difficulty of plasmid transfer to *R. japonicum* could be due to the physiological state of the cells during mating. Beringer (1) reported that, in *R. leguminosarum*, the composition of the medium may affect the growth of the cells and also the frequency of plasmid transfer. Another possibility may be related to the presence of incompatible plasmids in the *Rhizobium* cells. Recently, several reports (4, 7, 13) revealed the presence of naturally occurring plasmids in *Rhizobium*, including *R. japonicum* (11).

The donor ability of *R. japonicum* R+ transconjugants, after 6 hrs mating with *E. coli* as recipient, was low, but the transfer of RK2 and RP4 to *R. japonicum* required at least 21 hrs of mating. The *R. japonicum* donor ability can probably be increased by extending the mating time. The shorter time required for donor ability expression suggests that the difficulties of RK2 and RP4 transfer depends more on the *Rhizobium* as a recipient than as a donor.

High stability, a common feature of RK2 and RP4 plasmids, was also observed in *R. japonicum* cells. It was not determined if these were integrated in the *R. japonicum* chromosome. Integration should help their stabilization.

Summarily, the results of this research were: (a) RK2 and RP4 plasmids, (Inc P-1

group) were transferred from *E. coli* to *R. japonicum*, after 21 hrs mating, in liquid medium; (b) the donor ability of *R. japonicum* transconjugants was detected after 6 hrs mating with *E. coli* as recipient, in liquid medium; (c) all of the antibiotic markers of the plasmids were transferred to and from *R. japonicum*; and (d) there was a very high stability of RK2 and RP4 plasmids in *R. japonicum* transconjugants.

Before chromosome transfer can successfully be achieved in *R. japonicum* the frequency of plasmid transfer in intragenic crosses must be improved by optimization of

conditions during mating, and perhaps by studies of naturally-occurring plasmids in these cells.

Acknowledgments

We wish to express our appreciation to Carlo Erba, Laboratory (Av. Vereador José Diniz, 3465, São Paulo, SP, Brasil), Bristol Laboratory (Carlos Gomes, 924, Santo Amaro SP, Brasil) and Pfizer Química Ltda. (Via Dutra, Km 391, Guarulhos, SP, Brasil) for supplying the antibiotics utilized in this research.

References

- Beringer, J.E. — R factor transfer in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 84:188-198, 1974.
- Beringer, J.E. — The development of *Rhizobium* genetics. *J. Gen. Microbiol.*, 116:1-7, 1980.
- Beringer, J.E.; Hoggan, S.A. & Johnston, A.W.B. — Linkage mapping in *Rhizobium leguminosarum* by means of R plasmid-mediated recombination. *J. Gen. Microbiol.*, 104:201-207, 1978.
- Beynon, J.L.; Beringer, J.E. & Johnston, A.W.B. — Plasmids and host-range in *Rhizobium leguminosarum* and *Rhizobium phaseoli*. *J. Gen. Microbiol.*, 120:421-429, 1980.
- Brewin, N.J.; Beringer, J.E. & Johnston, A.W.B. — Plasmid-mediated transfer of host-range specificity between two strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 120:413-420, 1980.
- Buchanan-Wollaston, V. — Generalized transduction in *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 112:135-142, 1979.
- Casse, F.; Boucher, C.; Julliot, J.S.; Michel, M. & Dénarié, J. — Identification and characterization of large plasmids in *Rhizobium meliloti* using agarose gel electrophoresis. *J. Gen. Microbiol.*, 113:229-242, 1979.
- Cole, M.A. & Elkan, G.H. — Transmissible resistance to penicillin G, neomycin and chloramphenicol in *Rhizobium japonicum*. *Antimicrob. Ag. Chemother.*, 4:248-253, 1973.
- Datta, N. & Hedges, R.W. — Host ranges of R factors. *J. Gen. Microbiol.*, 70:453-460, 1972.
- Datta, N.; Hedges, R.W.; Shaw, E.J.; Sykes, R.B. & Richmond, M.H. — Properties of an R factor from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.*, 108:1244-1249, 1971.
- Gross, D.C.; Vidaver, A.K. & Klucas, R.V. — Plasmids, biological properties and efficacy of nitrogen fixation in *Rhizobium japonicum* strains indigenous to alkaline soils. *J. Gen. Microbiol.*, 114:257-266, 1979.
- Heumann, W.; Pühler, A. & Wagner, E. — The two transfer regions of the *Rhizobium lupini* conjugation. II — Genetic characterization of the transferred chromosomal segments. *Mol. Gen. Genet.*, 126:267-274, 1973.
- Hirsch, P.R.; Van Montagu, M.; Johnston, A.W.B.; Brewin, N.J. & Schell, J. — Physical identification of bacteriocinogenic, nodulation and other plasmids in strains of *Rhizobium leguminosarum*. *J. Gen. Microbiol.*, 120:403-412, 1980.
- Jacob, A.E.; Cresswell, J.M.; Hedges, R.W.; Coetzee, J.N. & Beringer, J.E. — Properties of plasmids constructed by the *in vitro* insertion of DNA from *Rhizobium leguminosarum* or *Proteus mirabilis* into RP4. *Mol. Gen. Genet.*, 147:315-323, 1976.
- Johnston, A.W.B.; Setchell, S.M. & Beringer, J.E. — Interpecific crosses between *Rhizobium leguminosarum* and *R. meliloti*: formation of haploid recombinants and of R-primes. *J. Gen. Microbiol.*, 104:209-218, 1978.
- Kiss, G.B.; Dobo, K.; Dusha, I.; Breznovits, A.; Orosz, L.; Vincze, E. & Kondorosi, A. — Isolation and characterization of an R-prime plasmid from *Rhizobium meliloti*. *J. Bacteriol.*, 141:121-128, 1980.
- Kondorosi, A.; Kiss, G.B.; Forrai, T.; Vincze, E. & Banfalvi, Z. — Circular linkage map of the *Rhizobium meliloti* chromosome. *Nature (London)*, 268:525-527, 1977.
- Meade, H.M. & Signer, E.R. — Genetic mapping of *Rhizobium meliloti*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 74:2076-2078, 1977.
- Nuti, M.P.; Ledeboer, A.M.; Lepidi, A.A. & Schilperoort, R.A. — Large plasmids in different *Rhizobium* species. *J. Gen. Microbiol.*, 100:241-248, 1977.
- Olsen, R.H. & Shipley, P. — Host range and properties of the *Pseudomonas aeruginosa* R factor R1822. *J. Bacteriol.*, 113:772-780, 1973.
- Raina, J.L. & Modi, V.V. — Deoxyribonucleate binding and transformation in *Rhizobium japonicum*. *J. Bacteriol.*, 111:356-360, 1972.
- Vincent, J.M. — A manual for the practical study of the root-nodule bacteria. I.B.P. Handbook N° 15. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publ., 1970.
- Zurkowski, W. & Lorkiewicz, Z. — Plasmid deoxyribonucleic acid in *Rhizobium trifolii*. *J. Bacteriol.*, 128:481-484, 1976.

Comparação entre métodos de identificação de *Erysipelothrix rhusiopathiae* em vísceras de suínos

David Emilio Santos Neves de Barcellos

*Laboratório de Patologia Suína, Instituto de Pesquisas "Desidério Finamor",
Caixa Postal 2076
90000 Porto Alegre RS, Brasil*

Resumo

Erysipelothrix rhusiopathiae foi isolado de 16 entre 114 baços de suínos com sintomas e lesões de doença septicêmica. Foram comparados os seguintes métodos, para a evidenciação do agente: 1. bacterioscopia direta de impressões de vísceras, em lâminas coradas pelo método de Gram; 2. cultura direta em meio de Packer; 3. inoculação direta em camundongo; 4. enriquecimento em meio ESB (*Erysipelothrix Selective Broth*); e 5. enriquecimento em caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), a 4°C, por 10, 20 e 30 dias. Os três primeiros métodos permitiram identificar o agente em, respectivamente, 2,6%, 3,5% e 3,5% dos materiais. Com o uso do meio ESB, a percentagem de isolamento foi de 13,1%; com o de enriquecimento a frio, por 30 dias, 12,2%. O meio seletivo ESB foi superior aos demais e técnicas seletivas, pelo maior índice de recuperação de *E. rhusiopathiae* em menor tempo (04 dias), comparado com 32 dias para o método de enriquecimento a 4°C.

Summary

*Comparison of identification methods for detection of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in swine viscera*

Erysipelothrix rhusiopathiae was isolated from sixteen (16) out of one hundred and fourteen (114) spleen samples of pigs, with symptoms and lesions of a septicemic disease. The following methods were compared to isolate the agent: 1. direct microscopy using impression smears of spleen, stained by the Gram's method; 2. direct culture on Packer's medium; 3. direct inoculation in mice; 4. enrichment in ESB medium (*erysipelothonix selective broth*, Wood's medium); 5. cold enrichment (4°C) in BHIB (*brain heart infusion broth*) for 10, 20 and 30 days. Using the first three methods, the agent was identified respectively in 2,6%, 3,5% and 3,5% of the materials. Using the ESB medium, the percentage of isolation was 13,1%; with cold enrichment technique (30 days), 12,2%. The ESB medium was superior, for the highest recovery rate of in the lowest period of time (4 days), as compared with 32 days for the method of cold enrichment.

Introdução

Erysipelothrix rhusiopathiae é frequentemente isolado de suínos doentes ou de portadores sadios. Os quadros clínicos variam de septicemia aguda a infecções cutâneas, cardíacas ou articulares crônicas (8).

Embora, *E. rhusiopathiae* não seja culturalmente exigente, há dificuldades associadas à identificação, em casos de doenças em suínos. As principais razões apontadas são o diminuto tamanho das colônias, após 24 horas de incubação a 37°C, e a freqüência com que bactérias contaminantes mascaram seu

crescimento, em meios de cultura não seletivos.

As técnicas mais usadas para evidenciação da bactéria, em materiais patológicos, são a bacterioscopia direta de impressões de vísceras em lâminas coradas pelo método de Gram (1), cultura direta em meio seletivo de Packer (4), inoculação direta de macerado de vísceras em camundongos (2), enriquecimento em meio líquido seletivo contendo antibióticos (6) e enriquecimento em caldo nutritivo a 4°C por tempo variável de 5 a 35 dias, e posterior subcultura em meio sólido ou inoculação em camundongo (3, 7).

Os resultados têm sido bastante variáveis, sem dados sobre a eficácia comparativa.

O propósito da presente investigação foi de realizar esta comparação, através da tentativa de isolamento do *E. rhusiopathiae* de baços de 114 suínos com quadros clínicos e anatomo-patológicos de doença septicêmica.

Material e Métodos

Visceras ou suínos de rebanhos, com suspeita de doença septicêmica, foram enviados ao Laboratório de Patologia Suína, Instituto de Pesquisas "Desidério Finamor", Guaíba, RS, no período de junho de 1978 a junho de 1979. Os materiais foram remetidos refrigerados, sendo processados no período máximo de 4 dias após a coleta ou mantidos congelados até o exame. Foram usados 114 baços, correspondendo a 114 diferentes rebanhos.

Métodos bacteriológicos

1. *Bacterioscopia em lâmina corada pelo método de Gram* — Impressão da superfície de corte de baço em lâmina de microscopia, após prévia secagem da área a ser impressa com papel filtro (1) e fixação pelo calor e coloração pelo método de Gram.

2. *Cultura direta em meio de Packer* — Após prévia flambagem com álcool, fragmentos de baço foram triturados em gral com areia e solução fisiológica estéreis; as suspensões resultantes foram semeadas em placas do meio de Packer (3). A leitura foi realizada após incubação, por 48 horas a 37°C.

3. *Inoculação direta em camundongos* — O triturado descrito foi inoculado em orelha de camundongo previamente escarificada (7). *E. rhusiopathiae* foi recuperado, dos animais afetados, por cultura do sangue do coração em meio de Packer.

4. *Enriquecimento em meio ESB* — 0,1ml do triturado descrito foi inoculado em meio ESB (*Erysipelothrix selective broth*), consistindo de caldo triptose-soro, adicionado de Kana-micina, Neomicina e Vancomicina (6). Após incubação por 48 horas a 37°C, as subculturas foram preparadas em placas do meio de Packer. A leitura das mesmas foi feita após incubação por 48 horas a 37°C.

5. *Enriquecimento por refrigeração em meio BHI* — Após prévia flambagem com álcool, fragmentos de baço foram imersos em caldo BHI (Brain Heart Infusion Broth, DIFCO) e mantidos a 4°C. Após períodos de incubação de 10, 20 e 30 dias, foram feitas subculturas em placas do meio de Packer e inoculação em orelha escarificada de camundongo.

Identificação das bactérias isoladas — A identificação foi baseada na verificação de características culturais, morfológicas, tintoriais, fermentação de carboidratos, produção de H₂S e crescimento em gelatina. Os meios, testes e interpretação dos resultados seguiram as recomendações de Wood (7), com exceção da prova de detecção do H₂S; em vez da modificação do meio TSI proposta por Vickers & Bierer (5), foi usado o meio não modificado de SIM (DIFCO).

Foi realizada também a prova da soroproteção em camundongo, nos moldes propostos por Wood (7), com antisoro preparado em coelho contra amostras dos grupos sorológicos A e B. O teste consiste na inoculação dos animais com 0,3ml do antisoro, e agressão com 0,1ml de caldo com crescimento de 24 horas de *E. rhusiopathiae*.

Resultados

E. rhusiopathiae foi identificado em 16 dos 114 materiais, através da positividade em um ou mais entre os métodos usados (Tabela 1).

Dos seis métodos testados, o enriquecimento em meio ESB e o enriquecimento a frio por 30 dias (com subcultura em meio de Packer ou inoculação em camundongo) deram melhores resultados, não tendo havido diferença estatística (para $\alpha = 0,05$) em relação à recuperação da bactéria com o uso das três técnicas.

As 16 amostras de bactérias identificadas apresentaram características culturais, morfo-tintoriais, bioquímicas e crescimento em gelatina, características de *E. rhusiopathiae*, de acordo com a descrição de Wood (7). Com o uso do meio de SIM, após 48 horas a 37°C, houve nítido escurecimento do meio, acompanhando, em 1 a 2mm, a zona de picada, em toda sua extensão, indicando a produção de H₂S.

Tabela 1 — Isolamento de *E. Rhusiopathiae* de baços de suínos com o uso de diferentes técnicas

Material número	Sem enriquecimento				ESB	Com enriquecimento					
	Bacterios- copia direta	Packer direto	Camun- dongo direto			Meio BHI a 4°C, com subcultura em meio de Packer			Meio BHI a 4°C, com posterior inoculação em camundongo		
						10 dias	20 dias	30 dias	10 dias	20 dias	30 dias
1	—	—	—	—	POS	—	—	POS	—	—	POS
2	—	—	—	—	POS	—	—	—	—	—	POS
7	—	—	—	—	POS	—	—	POS	—	—	POS
18	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
27	—	—	—	—	POS	—	—	—	—	—	POS
28	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
41	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS	—	POS	POS
64	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS	POS
65	—	—	POS	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
66	POS	POS	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
67	—	POS	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
68	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
71	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	—
72	—	—	—	—	—	—	—	POS	—	—	POS
73	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	POS
105	—	—	—	POS	POS	—	—	POS	—	—	—

— = Negativo

POS = Positivo

A prova de soro-proteção em camundongo apresentou 100% de proteção nos animais injetados com o antisoro e posteriormente agredidos.

Todos os animais não protegidos apresentaram sintomas de conjuntivite, apatia e pelo arrepiado, em graus variáveis e morreram no período de 3 a 10 dias, com exceção da amostra 71, que produziu infecção com sintomatologia reversível (conjuntivite bilateral após 5 dias, com regressão a partir do 7º dia).

Foi possível reisolar *E. rhusiopathiae* em cultura pura do sangue do coração de todos os camundongos que reagiram à inoculação experimental do material de campo, seja pela inoculação de material sem enriquecimento, enriquecido em BHI a 4°C, ou nos animais testemunhos da prova de soroproteção.

Discussão

Os testes bacteriológicos usados permitiram o isolamento e identificação *E. rhusiopathiae* em baços de suínos infectados. Entretanto, o uso de mais de um teste laboratorial pode apresentar vantagens por evitar o aparecimento de exames com resultados falsos-negativos.

A bacterioscopia direta por impressão de órgãos, ao contrário do postulado por Barnes & Sorensen (1), não permitiu diferenciação

fácil entre septicemias causadas por *E. rhusiopathiae* e outros agentes bacterianos. A presença de grande número de bactérias contaminantes, em muitos casos, torna difícil a decisão sobre a positividade de materiais, apresentando poucos germes com características morfo-tintoriais compatíveis com as do *E. rhusiopathiae*.

A razão pela qual apenas 4 entre 16 materiais apresentaram isolamento do agente, na cultura direta de baço, em meio de Packer, não pode ser concluída. Uma provável explicação é a possível presença de baixos títulos da bactéria em materiais remetidos para exame. Em tais casos, as técnicas de enriquecimento se tornam indispensáveis, para que a bactéria atinja número detectável, quando da subcultura em meio sólido. No caso da baixa percentagem de recuperação de *E. rhusiopathiae* com o uso da inoculação direta de macerado de vísceras em camundongo, a hipótese do título bacteriano baixo pode ser novamente levantada. Além disso, a possibilidade da presença de bactérias, com baixa patogenicidade para o animal de laboratório, não pode ser desprezada: pelo menos uma das 16 amostras no presente estudo (amostra 71), se apresentou com baixa patogenicidade.

A análise do tempo necessário para que o germe alcançasse títulos satisfatórios, com o uso do enriquecimento a 4°C, mostrou a ineeficiência do uso de tempo inferior a 30 dias.

Entretanto, Connel & Langford (3) isolaram o agente de 30% entre 639 materiais de suínos aparentemente sadios, usando um período de incubação de 7 a 14 dias. Baseado nos dados obtidos no presente estudo, é válido questionar se, em tempo de incubação maior, a percentagem obtida não poderia ter sido aumentada.

Após período de enriquecimento a 4°C por 30 dias, não houve diferença detectável entre a recuperação de *E. rhusiopathiae* por inoculação em camundongo ou subcultura em meio de Packer. Fatores como tempo, simplicidade e possibilidade de se estar trabalhando com amostras não patogênicas para camundongos, indicam vantagem com o uso da subcultura em placa sobre a inoculação do animal.

Em termos de aplicação em rotina de diagnóstico, o uso do meio ESB foi considerado superior aos demais métodos analisados: além da maior porcentagem de isolamento do agente, o tempo menor (quatro dias comparados com 32 dias do método de enriquecimento a frio) indicam ser este melhor entre os métodos analisados.

Agradecimentos

Agradecemos ao Professor A.F. Pestana de Castro, da UNICAMP, São Paulo, pela cessão das amostras do *E. rhusiopathiae* usadas na preparação dos soros hiperimunes.

Referências Bibliográficas

1. Barnes, D.M. & Sorensen, O.K. — Diseases of swine. 4. ed. Ames, The Iowa State University Press, 1975.
2. Castro, A.F.P.; Santa Rosa, C.A.; Troise, C. & Gissoni, R.H. — Isolamento do *Erysipelothrix rhusiopathiae* de suínos aparentemente normais abatidos em matadouros. Arq. Inst. Biol. (São Paulo), 30:115-118, 1963.
3. Connel, R. & Langford, E.V. — Studies of swine erysipelas. V — Presence of *Erysipelothrix rhusiopathiae* in apparently healthy pigs Can. J. Comp. Med., 17:448-453, 1953.
4. Spears, H.N. — Carriers of swine erysipelas. J. Comp. Path., 64:152-156, 1955.
5. Vickers, C.L. & Bierer, B.W. — Triple sugar iron agar as an aid in the diagnosis of erysipelas. J. Amer. Vet. Med. Ass., 133:543-544, 1958.
6. Wood, R.L. — A selective liquid medium utilizing antibiotics for isolation of *Erysipelothrix insidiosa*. Am. J. Vet. Res., 26:1303-1308, 1965.
7. Wood, R.L. — Manual of clinical microbiology. 2. ed. Bethesda, Lennette & Truant, 1970.
8. Wood, R.L. & Shuman, R.D. — Diseases of swine. 4. ed. Ames, The Iowa State University Press, 1975.

Influência da vacinação BCG na infecção experimental de camundongos por *Yersinia enterocolitica**

Lauro Santos Filho

Dept.^o de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal da Paraíba,
Campus Universitário

58000 João Pessoa PB, Brasil

Ilvan Delgado Ricciardi

& Paulo Pinto Gontijo Filho

Instituto de Microbiologia UFRJ, Centro de Ciências da Saúde,
Bloco I – Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Resumo

Avaliação da resistência de camundongos albinos, vacinados com BCG, à infecção com *Yersinia enterocolitica*, utilizando-se para este fim as sub-amostras Brasil e Glaxo da vacina BCG, inoculadas pelas vias subcutânea, intraperitoneal e oral. A inoculação com *Yersinia enterocolitica* foi realizada pela via intraperitoneal injetando-se aproximadamente 500 DL50. Os camundongos vacinados, independente da via utilizada, apresentaram-se tão suscetíveis à infecção por *Yersinia enterocolitica* quanto os animais-controle. Entretanto, quando camundongos vacinados pelas vias subcutânea e intraperitoneal foram reinfetados com BCG, pela via intraperitoneal, quando era mais intensa a hipersensibilidade tuberculínica, o decréscimo na mortalidade foi significativo ($p < 0,01$). A amostra Glaxo induziu um nível de resistência mais pronunciado do que o observado com a amostra Brasil.

Summary

Yersinia enterocolitica infection in mice after BCG immunization

The resistance of white mice vaccinated with BCG to *Yersinia enterocolitica* infection was evaluated, using BCG substrains, Brazil and Glaxo, inoculated intravenously, intraperitoneally, subcutaneously and orally. Intraperitoneal *Yersinia enterocolitica* challenge was done using approximately 500 DL50. Subcutaneous and intraperitoneal infections were applied in the revaccination experiments. Vaccinated mice and the control group were found equally susceptible to *Yersinia enterocolitica* infection apart from the via used. However, when subcutaneous and intraperitoneally vaccinated mice were reinfected intraperitoneally with BCG, the decrease in the mortality ratio was found significant ($p < 0,01$). The Glaxo strain induced a more significant resistance level than the Brazil strain.

Introdução

Animais inoculados com BCG têm capacidade aumentada de inibir o crescimento de microrganismos intracelulares facultativos, incluindo-se não só o bacilo da tuberculose, que é taxonomicamente relacionado, mas também aqueles antigenicamente distintos, como *Salmonella* e *Lysteria monocytogenes* (16).

Em todas as infecções, por microrganismos intracelulares facultativos, a destruição do parasita depende da presença de macrófagos ativados nos tecidos. As alterações morfológicas, enzimáticas e metabólicas associadas com a ativação de macrófagos foram apreciadas em várias revisões (1, 2, 6, 15). Mecanismos imunológicos específicos estão envolvidos na ativação de macrófagos (4, 14), através da interação de

* Trabalho realizado no Instituto de Microbiologia da UFRJ, com recursos do CNPq (Processo 40.0527/79) e FINEP (Convênio 527/CT).

populações imunologicamente específicas de linfócitos T com os respectivos抗ígenos e liberação de substâncias farmacologicamente ativas (17, 18).

O propósito deste trabalho é avaliar a resistência de camundongos vacinados com BCG à infecção com *Yersinia enterocolitica*. Foi investigada a influência da via de vacinação e o efeito da revacinação com BCG, para se determinar se a resposta anamnéstica resulta na eliminação mais rápida do parasita.

Material e Métodos

Animais — Foram utilizados camundongos albinos de aproximadamente oito semanas de idade, com peso em torno de 30 gramas, provenientes do Centro Pan Americano de Febre Aftosa, Rio de Janeiro, RJ., mantidos em gaiolas de plástico, com água e ração "ad libidum".

Amostras — Foram utilizadas as amostras BCG-Brasil e BCG-Glaxo, recebidas do "Trudeau Institute, Saranac Lake, N.Y., USA". As vacinas foram cultivadas a 37°C, em 200ml de meio de Dubos ("Difco Laboratories"), contendo "Tween 80" na concentração de 0,02%, para obtenção de massa de germes. Após 10-14 dias de incubação foram tomados volumes de 10ml da suspensão em frascos tipo penicilina, e estocados a temperatura de -30°C. Nesta oportunidade, foi determinado em cada amostra, o número de unidades viáveis (UV/ml), através de diluições seriadas em tampão fosfato-gelatina e semeadura em meio de Loewenstein Jensen.

Foi utilizada a amostra WA de *Yersinia enterocolitica*, biotipo 2, sorotipo 0:8 (NCTC 10.938) que, após passagem em animal, para exaltar a virulência, foi testada bioquímica e sorologicamente. A seguir, foi cultivada em caldo "Brain Heart Infusion" (BHI) a 25°C, para obtenção de massa de germes, sendo a suspensão resultante dividida em volumes de 5ml, e preservada em frascos tipo penicilina a -30°C. Na oportunidade, determinou-se o número de unidades viáveis/ml, através da técnica de diluição em série em solução salina, e plaqueamento em meio de agar BHI.

Determinação da DL50 da amostra WA para camundongos albinos inoculados por via intraperitoneal (IP) — A determinação da DL 50 foi feita em lotes de dez camundongos, inoculados, respectivamente, com doses entre 10^{-1} e 10^{-7} de um inóculo inicial de 2.0×10^8 UV/ml, utilizando-se a via intraperitoneal. Os animais foram observados diariamente, durante 30 dias, determinando-se as taxas de mortalidade em função do tempo. A DL50 foi calculado pelo método de Reed & Muench (20).

Resistência de camundongos vacinados com BCG à infecção com *Yersinia enterocolitica*

— Dois grupos de 120 camundongos, foram vacinados pelas vias intraperitoneal (IP), intravenosa (IV), subcutânea (SC) e oral (O), com BCG-Brasil e BCG-Glaxo, respectivamente, utilizando-se suspensões contendo aproximadamente 10^7 UV/ml. Os animais foram inoculados por via IP com 500 DL50 de *Yersinia enterocolitica*, após 0, 7, 14, 21, 28 e 60 dias da vacinação, utilizando-se lotes de cinco animais para cada via. Foram mantidos grupos controle não vacinados e inoculados com *Y. enterocolitica*. Com finalidade de confirmar a infecção por *Yersinia enterocolitica*, como causa de morte, ou o estado de portador dos camundongos, foram colhidas amostras fecais, no interior das caixas, em intervalos de 4-5 dias a partir da inoculação. O material foi suspenso em solução salina tamponada, e mantido a 4°C, para enriquecimento, durante aproximadamente 10 dias, quando foi inoculado em agar desoxicolato-citrato e incubado a 25°C, por 48 horas. As colônias suspeitas foram testadas sorologicamente, com antisoro específico (7).

Resistência de camundongos vacinados e revacinados com amostras de BCG-Brasil e BCG-Glaxo à infecção com *Yersinia enterocolitica* — Dois grupos de 100 camundongos foram vacinados pelas vias IP e SC com as duas vacinas, utilizando-se a mesma técnica descrita no tópico anterior. Cada grupo foi dividido em dois lotes de 50 animais, sendo um inoculado por via IP com 500 DL50 de *Yersinia enterocolitica*, decorridos 1, 3, 7, 14 e 28 dias da vacinação. O segundo lote foi revaccinado pela via IP, com um intervalo de 14 dias, utilizando-se o BCG homólogo e a mesma dose inicial. A seguir, os camundongos foram inoculados 1, 3, 7, 14 e 28 dias após

Tabela 1 — Determinação da DL50 de *Yersinia enterocolitica* por via intraperitoneal (IP) em camundongos albinos

conc. de Y.e.	Resultados Acumulados					
	Mortos	Sobrev.	Mortos	Sobrev.	Totais	% Mortos
10 ¹	0	10	0	20	20	0
10 ²	3	7	3	10	13	23,07
10 ³	7	3	10	3	13	76,92
10 ⁴	10	0	20	0	20	100
10 ⁵	10	0	30	0	30	100
10 ⁶	10	0	40	0	40	100
10 ⁷	10	0	50	0	50	100

$$\frac{76,92 - 50,0}{76,92 - 23,07} = \frac{26,92}{53,85} = 0,4999$$

$$DL50 = 10^{2,4999}$$

$$DL50 = 3,1 \times 10^3 \text{ UV/ml}$$

a revacinação. Foram mantidos para cada tempo, grupos controle não vacinados e apenas inoculados com *Y. enterocolitica*.

Os animais foram observados durante o período de 30 dias, determinando-se as taxas de mortalidade em função do tempo, nos dois experimentos.

Estatística — As médias aritméticas dos dados obtidos de cinco ou 10 camundongos foram analisadas estatisticamente pelo teste *t* de Student, considerando-se como significativos as diferenças de $p < 0,05$.

Resultados

DL 50 da amostra WA de *Yersinia enterocolitica* para camundongos albinos inoculados por via IP — A Tabela 1 apresenta o número de camundongos mortos e sobreviventes em totais acumulados. A DL50, calculada pelo método de Reed & Muench, foi de $3,1 \times 10^3$ UV/ml.

Níveis de sobrevivência de camundongos vacinados com BCG-Brasil e BCG-Glaxo pelas vias IP, SC, IV e O, e desafiados intraperitonealmente com *Yersinia enterocolitica* — Nas Figuras 1 e 2, observam-se as curvas de sobrevivência obtidas, tomando-se valores cumulativos, para os lotes de camundongos vacinados pelas diferentes vias com as duas vacinas e inoculados com *Yersinia enterocolitica* pela via IP. As vacinas, independentemente da via de administração considerada, não mostraram um grau significativo de proteção, embora os camundongos inoculados pelas vias IV e IP sobrevivessem um pouco mais, quando comparado com o grupo con-

trole não vacinado e inoculado com *Y. enterocolitica*.

Níveis de sobrevivência de camundongos vacinados e revacinados com BCG-Brasil e BCG-Glaxo e desafiados com *Yersinia enterocolitica* — Os animais apresentaram níveis de proteção de 20% e 28% para camundongos vacinados, respectivamente, pelas vias SC e IP e revacinados pela via IP quando a vacina utilizada foi a Brasil (Figura 3) e 36% e 40% para o BCG-Glaxo (Figura 4).

Discussão

O BCG-Brasil é uma das sub-amostras de BCG mais imunogênicas, em animais de experimentação e inquéritos em crianças, enquanto o BCG-Glaxo coloca-se entre as menos ativas (11). A sensibilização pela amostra brasileira é mais intensa do que a conseguida com o BCG-Glaxo (5, 12, 19, 22).

O grau de sensibilização tuberculínica varia com a via utilizada na vacinação. As inoculações SC e IP favorecem o desenvolvimento da hipersensibilidade tuberculínica quando comparadas com as vias IV e O (8, 13). Os nossos resultados correlacionam-se com esses dados, com a via subcutânea, destacando-se entre as demais, seguida da via IP. Os camundongos apenas vacinados pelas vias SC e IP não mostraram nenhuma resistência à infecção com *Yersinia enterocolitica*, mesmo quando inoculados duas a quatro semanas após a vacinação, período em que a sensibilização, para as duas vacinas, apresenta-se mais intensa. Observações semelhantes foram feitas por Blan-

Figura 1 — Camundongos vacinados pelas vias (IV, IP, SC, O) com BCG-Brasil e inoculados pela via IP com *Yersinia enterocolitica*

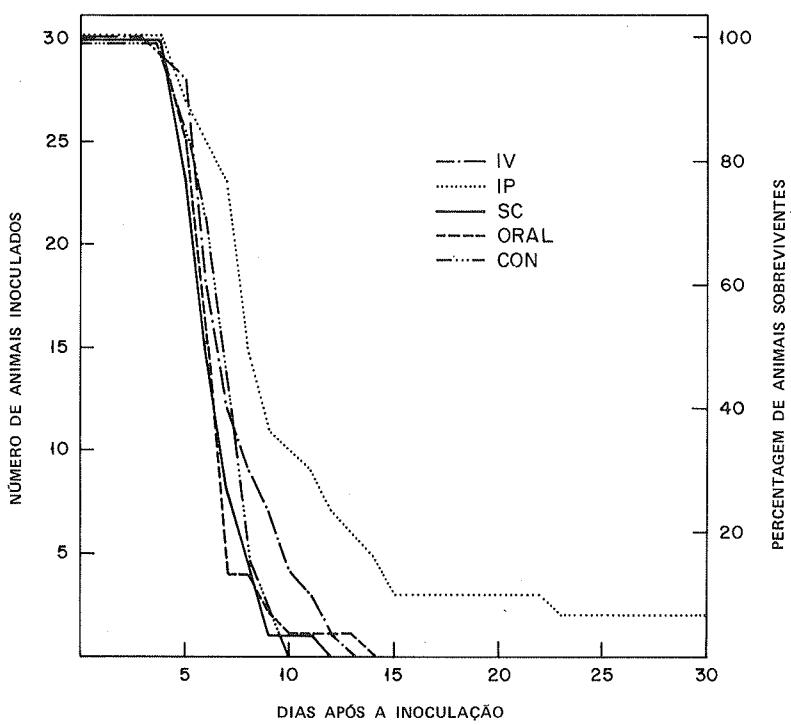


Figura 2 — Camundongos vacinados pelas vias (IV, IP, SC, O) com BCG-Glaxo e inoculados pela via IP com *Yersinia enterocolitica*

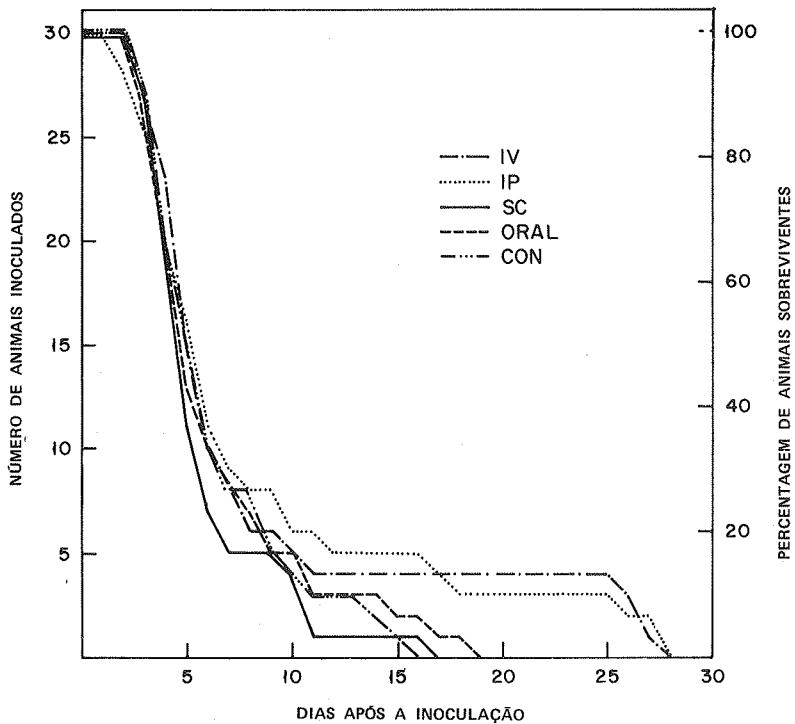


Figura 3 — Camundongos revacinados com BCG Brasil e inoculados pela via IP com *Yersinia enterocolitica* (grupos de 5 animais)

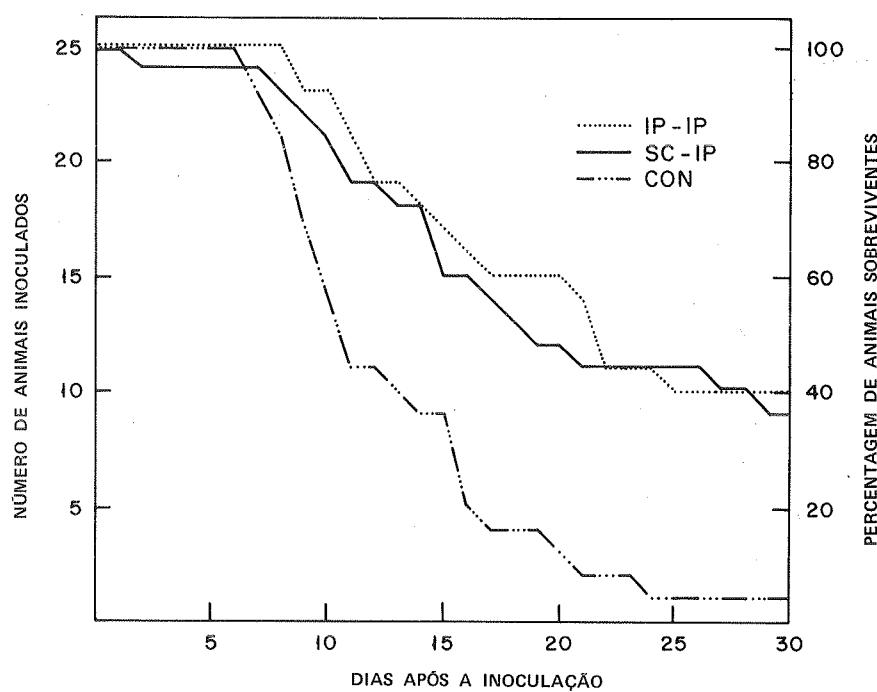
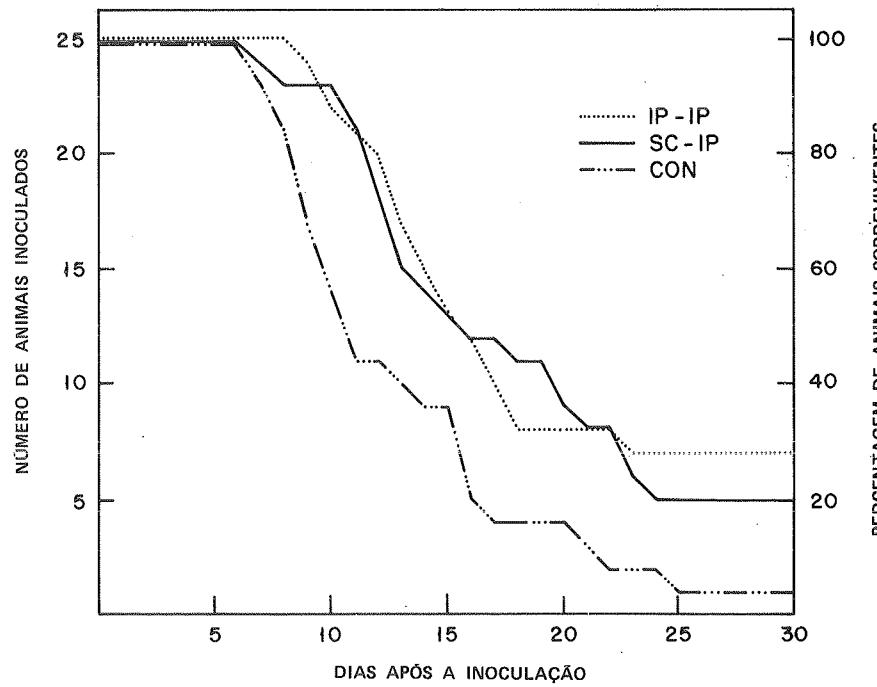


Figura 4 — Camundongos revacinados com BCG-Glaxo e inoculados pela via IP com *Yersinia enterocolitica* (grupos de 5 animais)



den & col. (3) e Smrkovsky & Strickland (23) para *Salmonella typhimurium* e esporozoitos de *Plasmodium berghei*, respectivamente. Por outro lado, Senterfitt & Shands (21) verificaram que camundongos infectados por via IV com BCG mostraram-se significantemente ($p < 0,01$) mais resistente a uma inoculação IP com *Salmonella typhimurium*. Essas discrepâncias podem meramente refletir uma diferença no grau de estimulação antigênica, pois Blanden & col. (3) verificaram que uma dose reinfectante de BCG ou uma dose inicial mais elevada em térmos de unidades viáveis, regularmente produzem alterações nas células peritoneais de camundongos, associadas com um aumento pronunciado na capacidade microbicida. Sabe-se que uma segunda injeção de BCG produz uma resposta anamnética que resulta numa produção de

linfocinas, incluindo aquelas com capacidade de ativarem os macrófagos. Hibbs & col. (9, 10) e Blanden & col. (3) verificaram que este "booster" é necessário para que ocorra a fagocitose e morte dos parasitos. Nossos achados sugerem que os macrófagos ativados pela vacinação e revacinação podem desempenhar um papel no "clearance" de *Yersinia enterocolitica*, protegendo os animais. A vacina Glaxo mostrou-se superior, com sua proteção de 40%, contra os 28% conferidos pela Brasil, quando os camundongos foram revacinados pela via IP. Os resultados obtidos, quando da revacinação por via SC foram ligeiramente inferiores. Esses resultados são interessantes e deverão ser reavaliados através da contagem de bactérias em órgãos de camundongos infectados, método de maior sensibilidade.

Referências Bibliográficas

- Axline, S.G. — Functional biochemistry of the macrophage. *Semin. Hematol.*, 7:142-150, 1970.
- Blanden, R.V. — Modification of macrophage function. *J. Reticuloendothel. Soc.*, 5:179-202, 1968.
- Blanden, R.V.; Lefford, M.J. & Mackaness, G.B. — The host response to Calmette-Guerin bacillus infection in mice. *J. Exp. Med.*, 129:1078-1101, 1969.
- Blanden, R.V.; Mackaness, G.B. & Collins, F.M. — Mechanisms of acquired resistance in mouse typhoid. *J. Exp. Med.*, 124:585-600, 1966.
- Bunch-Christensen, K.; Ladefoged, A. & Guld, J. — The virulence of some strains of BCG for golden hamsters. *Bull. WHO*, 43:65-70, 1970.
- Dannenberg, A.M. — Cellular hypersensitivity and cellular immunity in the pathogenesis of tuberculosis: specificity, systemic and local nature and associated macrophage systems. *Bacteriol. Rev.*, 32:85-102, 1968.
- Eiss, J. — Selective culturing of *Yersinia enterocolitica* at a low temperature. *Scand. J. Infect. Dis.*, 7:249-251, 1975.
- Galindo, B. & Myrvik, O.N. — Migratory response of granulomatous alveolar cells from BCG — sensitized rabbits. *J. Immunol.*, 105:227-237, 1970.
- Hibbs, J.B.; Lambert, L.H. & Remington, J.S. — Possible role of macrophage mediated nonspecific cytotoxicity in tumor resistance. *Nature*, 177:48-50, 1972.
- Hibbs, J.B.; Lambert, L.H. & Remington, J.S. — Control of carcinogenesis: a possible role for the activated macrophage. *Science*, 177:998-1000, 1972.
- Ladefoged, A.; Bunch-Christensen, K. & Guld, J. — Tuberculin sensitivity in guinea pigs after vaccination with varying doses of BCG of 12 different strains. *Bull. WHO*, 53:435-443, 1976.
- Lagrange, P.H.; Miller, T.E. & Mackaness, G.B. — Parameters conditioning the potentiating effect of BCG and immune response. In: — Samoreux, G.R.; Turcotte, R. & Portelance, V. — BCG in cancer immunotherapy. New York, Grunell Statton, 1976.
- Lefford, M.J. — Induction and expression of immunity after BCG immunization. *Infect. Immun.*, 18:646-653, 1977.
- Mackaness, G.B. — Cellular resistance to infection. *J. Exp. Med.*, 116:381-406, 1962.
- Mackaness, G.B. — The monocyte in cellular immunity. *Semin. Hematol.*, 7:172-184, 1970.
- Murahata, R.I. & Mitchel, M.S. — Modulation of the immune response by BCG: a review. *Yale J. Biol. Med.*, 49:283-291, 1976.
- Nelsen, D.S. — Macrophages as effectors of cell-mediated immunity. *CRC Crit. Rev. Microbiol.*, 1:353-362, 1972.
- North, R.J. — Cell mediated immunity and the response to infection. In: — McCluskey, R.J. & Cohen, S., eds. — Mechanism of cellular immunity. New York, Wiley Press, 1974.
- Palhano Jr., L. & Gontijo Fº, P.P. — Comparação da imunogenicidade de sub-amostras de BCG em camundongos. *Rev. Bras. Pesq. Med. Biol.*, 12:311-315, 1979.
- Reed, L.J. & Muench, H. — A simple method for estimating fifty percent endpoints. *Am. Rev. Hyg.*, 27:493-497, 1938.
- Senterfitt, V.C. & Shands, J.W. — Salmonellosis in mice infected with *Mycobacterium bovis* BCG. II — Resistance to infection. *Infect. Immun.*, 1:583-586, 1970.
- Sher, N.A.; Chaparas, S.D.; Pearson, J. & Chirigos, M.A. — Virulence of six strains of *Mycobacterium bovis* (BCG) in mice. *Infect. Immun.*, 8:736-742, 1973.
- Smrkovsky, L.L. & Strickland, G.T. — Rodent malaria: BCG induced protection and immunosuppression. *J. Immunol.*, 121:1257-1261, 1978.

**Thermal degradation products
of sugars in alkaline pH.
II — Effect of mono and
disaccharide phosphate solutions
on *Escherichia coli***

Regina L. Costa de Oliveira

Patricia N. de Sá

& Roberto Alcantara Gomes

*Biophysics Laboratory, Biology Institute UERJ, Av. 28 de Setembro, 87
20551 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

Resumo

*Produtos de termodegradação de açúcares em pH alcalino. II — Efeito de soluções de mono-e dissacarídeos-fosfato em *Escherichia coli**

A esterilização a quente de mono-e dissacarídeos redutores, na presença de fosfatos, em pH alcalino, promove reações de caramelização que resultam em uma série de produtos de degradação. Dentre estes, os de natureza aldeídica parecem ser os responsáveis pela diminuição da viabilidade de células de *E. coli*/ proficientes em reparo de DNA, quando previamente irradiadas com UV. O efeito das soluções de sacarídeos redutores testados, quando mantidas as condições experimentais, é expresso através de cinéticas de inativação cujas características são similares; durante a incubação o fenômeno é inhibido pela presença de catalase. Com soluções de dissacarídeos não redutores, observa-se uma alteração negligenciável na viabilidade celular, sugerindo que a geração de substâncias tóxicas pode estar associada à existência de, pelo menos, um grupamento carbonila livre na estrutura do sacarídeo.

Summary

The heat sterilization of reducing sugars promotes caramelization reactions in the presence of phosphates and in alkaline pH, yielding a lot of degradation products. Among them, aldehyde-like compounds seem to be responsible for the decrease in viability of UV-irradiated DNA repair-proficient *E. coli* cells. A positive interaction between toxic solutions and UV-irradiation effects is observed in these cells. All tested reducing sugars, when experimental conditions remained constant, showed similar inactivation kinetics shape, whose effects were equally inhibited by catalase activity, during incubation. The effect of non-reducing sugars on cellular viability is negligible, suggesting that the generation of toxic substances is associated to the presence of at least a free carbonyl group in sugar structure.

Introduction

Among the common cellular systems available for photobiology experiments, *Escherichia coli* is generally used. This bacteria can grow in a chemically simple and defined medium containing an organic compound (specifically, a sugar) as carbon and energy source, magnesium, and compounds such as phosphate and ammonium chloride or ammonium sulphate, which assures a buffered medium at neutral pH (13).

During the preparation of these defined media, the heat sterilization of sugar solu-

tions sometimes leads to the generation of substance(s) that is(are) able to interfere in some microorganism metabolism. Lewis (14) reported that the growth of some bacterial strains could be completely inhibited when they were cultivated in media containing glucose, maltose, lactose, galactose or levulose, in the presence of phosphate and a nitrogen source, whenever these media were sterilized at 122°C during 15 minutes. It was then suggested that this inhibition was due to the conversion of the nitrogen compound to a non metabolizable form by some bacterial strains. Nevertheless, Baumgartner

(6) verified that this toxic substance was formed independently of the presence of nitrogen compounds and its activity was not associated to the pigments responsible for the development of the characteristic colour. Afterwards, Finkelstein & Lankford (10) detected the inhibition of *Vibrio cholerae* multiplication in a medium containing glucose and phosphate, when sterilized in autoclave; it was dependent on the pH and time of sterilization. The ability of reducing agents as cysteine and compounds as bactopeptone and yeast extract, to block this toxicity, supported the idea of presence of a carbonyl group in the inhibitor(s) factor(s), probably aldehydic-compounds, with a bactericide and(or) bacteriostatic action.

Alcantara Gomes (1) reported the generation of a "dark medium" whenever agar is heat sterilized with phosphate in alkaline pH; he observed the presence of toxic substances for certain UV-irradiated bacteria, phage and bacteria-phage complexes. Considering that agar is an heteropolysaccharide which generates galactose residues and sulphate radicals upon hydrolysis, the toxic effect of this medium may be related to the presence of this reducing sugar.

In this paper we describe some aspects as the pH and radicals presence in mono-and disaccharides alkaline solutions, as well as its relationship to bacterial survival.

Material and Methods

Bacterial strain — *Escherichia coli* K12S (3) was used in all experiments, for its capacity of using all tested sugars as energy source and proficiency in repairing UV-induced lesions.

Culture media and growth — Cells were grown in M9 medium (2) as previously described (15), until they reached mid-exponential phase. For determination of colony forming ability, aliquots were properly diluted in 0.15M NaCl solution and plated on nutrient agar plates. Colonies were counted after incubation for at least 16 hours at 37°C, in the dark.

Ultraviolet irradiation — UV-irradiation and dosimetry had been carried out as previously described (4). Cells were exposed to a UV

dose enough to reduce to 10% the number of viable cells in culture (LD_{10}).

Preparation of sugar-phosphate solutions — The heat sterilization of the solution of sugar and disodium phosphate (Na_2HPO_4), 1M and 1.5M respectively in autoclave for 30 minutes at 120°C, leads to the production of the sugar-phosphate toxic solution (SPT), which was used as soon as room temperature was attained (about 5 minutes). Each of the following mono-and disaccharides was used: fructose, galactose, glucose, mannose and lactose, maltose, sucrose, trehalose.

The control solution (SPC) was obtained by mixing twice concentrated autoclaved solutions. Potentiometric measurements showed that the addition of either SPT or SPC into the M9 salts solution caused no change in the pH.

Inactivation kinetics — UV-irradiated and unirradiated bacterial cells in M9 salts buffer were incubated with ten times diluted SPT solutions (SPT/10) and assayed for lethal effect by determining the cell viability at periods of time varying from 0 to 120 minutes. Incubation was carried out by shaking (125 oscillations/min) at 37°C, as previously established for autoclaved glucose-phosphate solution (15). Controls were performed with diluted SPC solutions (SPC/10). Similar experiments were carried out in the presence of catalase, in a final concentration of 0.1mg of protein/ml (activity: 1520000 μ u/ml).

Characteristics of sugar-phosphate solutions — The reducing capacity of sugar solutions was characterized through its positive reaction with the Benedict reagent (17). The detection of organic peroxides in solution was done through Lehner reaction (12). All tested solutions had their pH controlled by potentiometric measurements (model pHN₄, Procyon Instrumentação Científica para Laboratórios Ltda., Brazil).

Drugs — Culture media components were obtained from E. Merck Darmstadt (Germany) and Difco Laboratories (U.S.A.). The tested sugars were from Reagen Ltda. (Brazil) and E. Merck Darmstadt (Germany) also provided disodium phosphate. Catalase (E.C.1.11.16) was from Calbiochem (U.S.A.).

Results and Discussion

Reducing mono-and disaccharides solutions, whenever heat sterilized in the presence of phosphate in alkaline pH, present a toxic effect upon *E. coli* K12S cells. The treatment of bacterial cells with toxic solutions was carried out in previously established conditions. Our experimental system has been chosen based on the fact that the bacterial strain is able to metabolize any of the tested sugars, avoiding a possible starvation during incubation. As can be observed in Figures 1 and 2, the previous UV irradiation (60J.m^{-2}) promotes a bacterial sensitization to the drug, enhancing the toxic activity.

The final portion of inactivation kinetics curves for irradiated cells, treated with SPT/10, are parallel to the ones obtained with unirradiated cells. In those curves we can observe two distinct portions: one at the first 30 minutes, with an intense inactivation rate, and another where the rate decreases and the curve's shape tends to a plateau, up to 120 minutes. This decrease could be interpreted as a loss of UV-SPT synergism. This positive interaction is probably due to an additional lethal effect between induced DNA damages by SPT and by enzymatic repair processes.

Among the tested sugars, only the ones with a free carbonyl group, responsible for their reducing capacity (11) are able to exert lethal effect upon *E. coli* K12S cells (Figs. 1, 2 and 3). Non reducing disaccharides submitted to the same sterilization conditions, as previously described, present little toxic on *E. coli* K12S cells, as shown in Figure 3; even this negligible toxicity is inhibited by catalase activity. The SPC of these disaccharides does not show any lethal effect on the tested cells. In Tables 1 and 2 we can observe some characteristics of the sugar solutions. Catalase treatment does not significantly alter the SPC/10 activity on both irradiated and unirradiated cells (data not shown).

The chemical characteristics of each sugar accounts for the slight differences in biological effects, although the inactivation kinetic curves shape is similar and, its toxic effect is equally inhibited by catalase activity, an hydrogen peroxide-oxide redutase. We may suggest an analogy between the toxic

substance(s) present in SPT/10 solutions due to the catalase activity, probably through its similar inhibitory effect upon peroxides action on bacterial cells.

Whenever a reducing sugar is in water solution, it can suffer a series of reactions, characterized by enolization, fragmentation and polymerization, originating yellow and brown pigments, known as caramels, that are responsible for the typical solution colour (16). The sequence of these caramelization reactions is mainly dependent on the pH, temperature and nature of reactants. The fact that non reducing sugars do not generate toxic solutions is in agreement to their inability of undergoing typical sugar reactions.

The observed pH decrease, when sugar phosphate solutions are heated (see Tables 1 and 2), is probably due to the acidic intermediates generated during the above described processes (18). Generally, caramelization reactions occur at a lower

Table 1 — Reducing sugars solutions characteristics

	Sugar + Phosphate*	Phosphate**	Sugar***
Before Sterilization	8.5-9.0	9.5	4.5-5.5
After Heat Sterilization	6.5-7.0	9.5	4.5-5.5
pH			
After Filter Sterilization	8.5-9.0	9.5	4.5-5.5
Peroxide Radicals	+	-	- ****
Reducing Radicals	+	-	+ ****

Table 2 — Non reducing sugars solutions characteristics

	Sugar + Phosphate*	Phosphate**	Sugar***
Before Sterilization	9.0	9.5	5.0
After Heat Sterilization	8.5	9.5	5.0
pH			
After Filter Sterilization	9.0	9.5	5.0
Peroxide Radicals	-	-	- ****
Reducing Radicals	-	-	- ****

* The sugar + phosphate is a water solution of the tested sugar and disodium phosphate, 1M and 1.5M respectively.

** The phosphate solution is 3M, in distilled water.

*** The sugar solution is 2M, in distilled water.

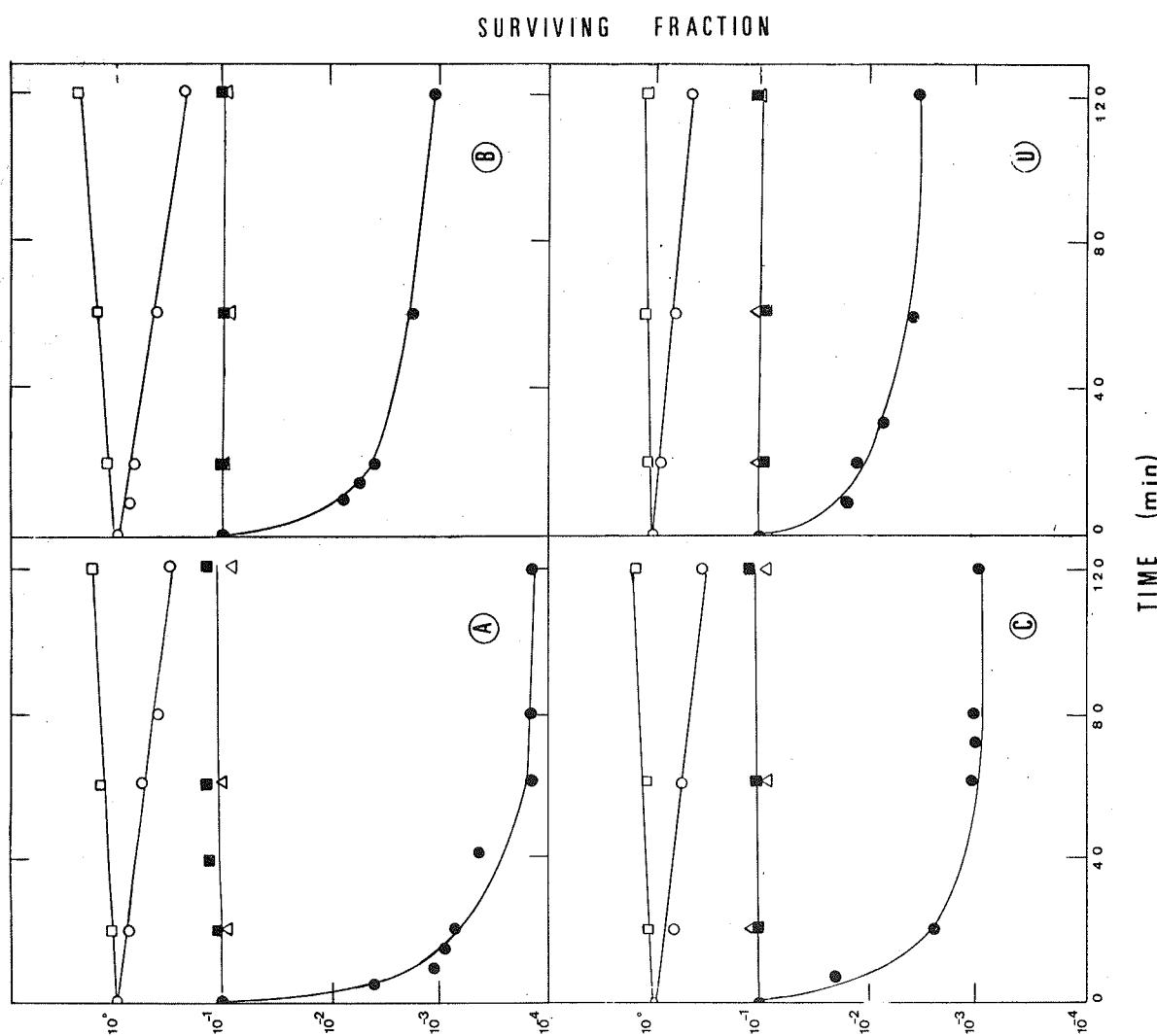
**** Peroxides radicals were characterized through Lehner assay and reducing radicals were detected through Benedict reaction.

rate near the optimal stability pH of each sugar in solution. Considering that this pH is 3.3 for fructose and 4.0 for glucose, the loss of structure stability, at alkaline pH, is greater for the first one (7), which probably accounts for the greater toxicity of fructose-

phosphate solutions (Fig. 1). We may suggest that, the greater is the instability of the sugar in solution, a larger toxic effect upon bacterial suspensions is verified.

The components of buffer solutions can interfere in caramelization reactions, chan-

Figure 1 — Effect of reducing monosaccharides and phosphate solutions on *E. coli* K12S cells



E. coli K12S cells, grown in minimal medium up to 2×10^8 cells/ml, were filtered and resuspended in M9 salts buffer. Aliquots of the culture were submitted to the following treatments:

(□) Incubation with SPC/10 in a water bath shaker, at 37°C for 120 minutes

(○) Incubation with SPT/10 under the conditions described above

(■) UV irradiation (60 J.m^{-2}) and treatment with SPC/10, as described above

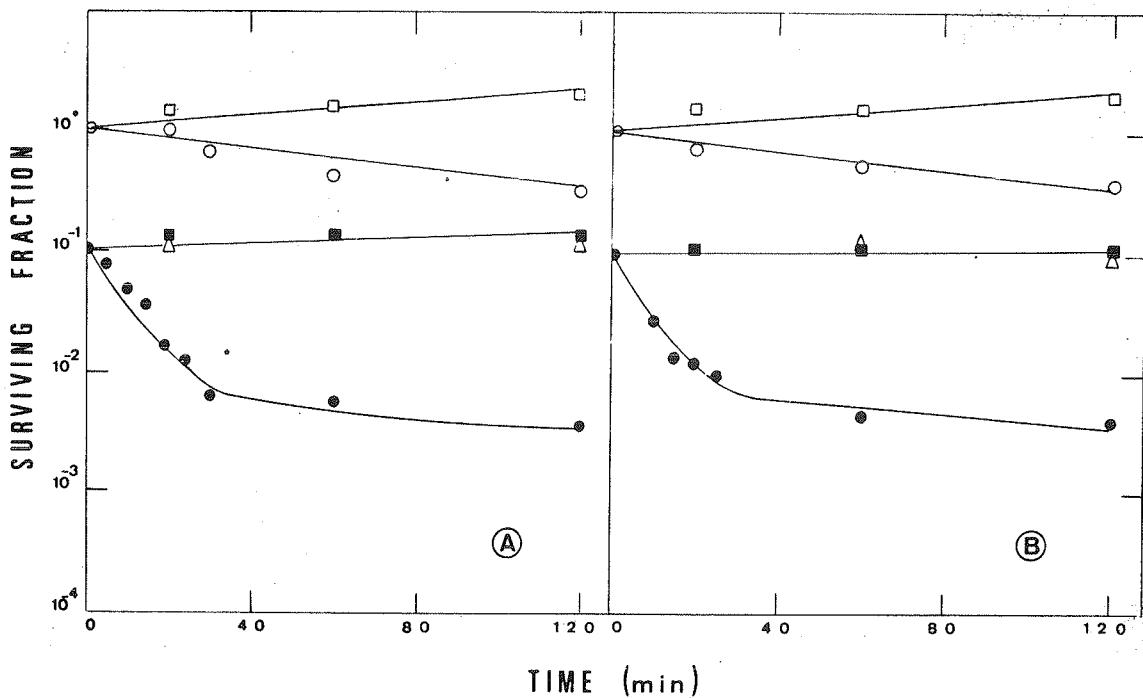
(●) UV irradiation (60 J.m^{-2}) and treatment with SPT/10, as described above

(△) UV irradiation (60 J.m^{-2}) incubation with SPT/10, as described above, in the presence of catalase, at a final concentration of 0.1mg of protein/ml.

SPT/10 and SPC/10 were obtained as described in Material and Methods; with disodium phosphate and each of the following monosaccharides:

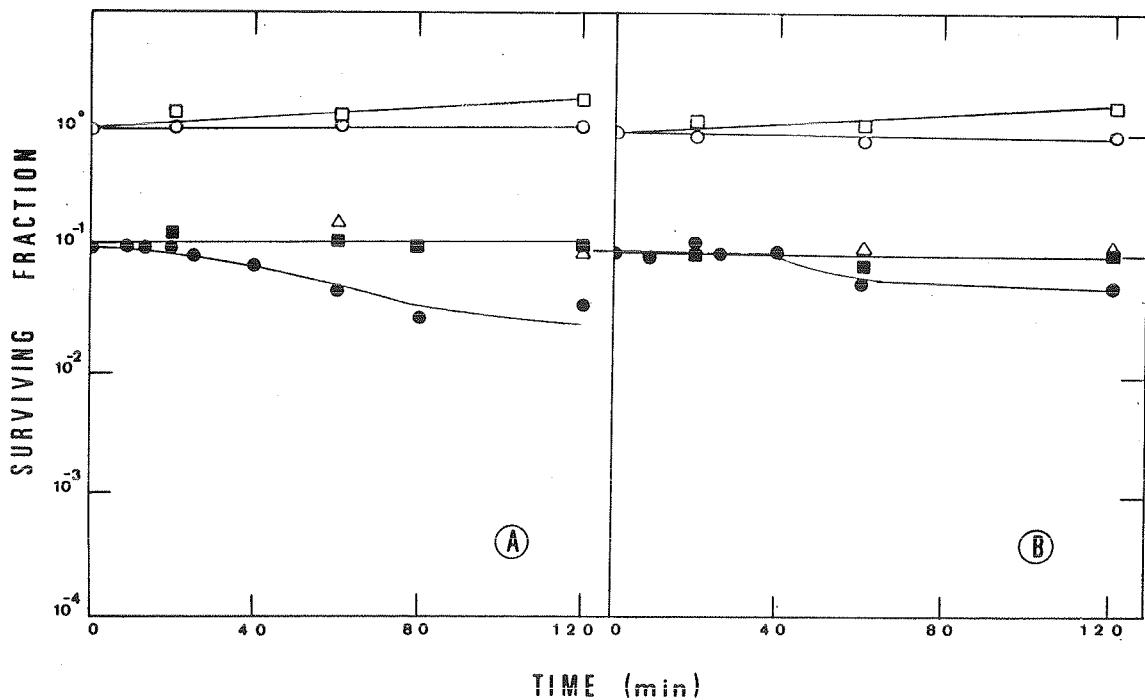
(A) fructose; (B) galactose; (C) glucose; (D) mannose.

Figure 2 — Effect of reducing disaccharides and phosphate solutions upon *E. coli* K12S cells



Experimental conditions and symbols are identical to those of Figure 1. The tested solutions were obtained with disodium phosphate and:
(A) lactose; (B) maltose.

Figure 3 — Effect of nonreducing disaccharides and phosphate solutions upon *E. coli* K12S cells



Experimental conditions and symbols are similar to those of Figure 1. SPT/10 and SPC/10 were obtained as described in Material and Methods with disodium phosphate and: (A) sucrose; (B) trehalose.

ging the extent of pH influence (16). Englis & Hanahan (9) showed that, at a constant pH, the heat transformation of glucose was greater with increase in phosphate concentration, probably due to a decrease in the initial structure stability.

Although the caramelization reaction is autocatalytic (8), its rate is temperature dependent. So, filter sterilized solutions neither present the same characteristics of SPT (Table 1) nor exert toxic effect upon bacterial cells (data not shown).

In observing the inactivation kinetics with non reducing sugars, the little lethal effect can be justified by the presence of monosaccharides residues or its generation by partial hydrolysis at alkaline pH. Inhibition of these effects by catalase activity reinforce this hypothesis. These results suggest that non reducing disaccharides and polysaccharides would present similar effects as those of reducing sugars whenever they were degraded to its monosaccharides constituents, that are able to undergo caramelization reaction. As previously suggested (15)

SPT activity is linked to an activation by O₂ or even the development of toxic(s) substance(s) within the incubation tubes catalyzed by O₂, which is not observed when the treatment is held in N₂ atmosphere.

The main stable products of caramelization would be aldehydes and enediol structures, that at cellular level, would act as previously described for glucose-phosphate solutions (15). It has long been shown that, under several experimental conditions, when oxidizing molecules are available, aldehydes can form reactive hydroxy-alkyl peroxides and/or free radicals (5).

Acknowledgments

We are grateful for the following Brazilian Granting Agencies support: CNEN (Comissão Nacional de Energia Nuclear), CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico), PIG (Programa Integrado de Genética) and SESU/MEC (Secretaria de Ensino Superior do Ministério da Educação e Cultura).

References

1. Alcantara Gomes, R. — Mecanismo de restauração pela catalase: interpretação e fenômenos correlatos. Rio de Janeiro, Instituto de Biofísica, UFRJ, 1966. (PhD Thesis).
2. Anderson, E.H. — Growth requirement of virus resistant mutant of *Escherichia coli* strain "B". Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 32:120-128, 1946.
3. Appleyard, R.K. — Segregation of new lysogenic types during growth of a doubly lysogenic strain derived from *E. coli* K12. Genetics, 39:440-452, 1954.
4. Aragão, B.R. & Alcantara Gomes, R. — Liquid holding recovery in *Escherichia coli* K12. I — Substances released during buffer holding. Rev. Bras. Pesquisas Méd. e Biol., 12:117-122, 1979.
5. Auerbach, C.; Moutschen-Dahmen, M. & Moutschen, J. — Genetic and cytogenetical effects of formaldehyde and related compounds. Mut. Res., 39:317-362, 1977.
6. Baumgartner, J.G. — Heat sterilized reducing sugars and their effects on the thermal resistance of bacteria. J. Bacteriol., 36:369-382, 1938.
7. Burton, H.S. & McWeeny, D.J. — Non-enzymatic browning reactions: consideration of sugar stability. Nature, 197:266-268, 1963.
8. Doss, K.S.G. & Ghosh, S.K. — Kinetics of color development in invert sugar solutions. Proc. Sugar Technol. Assoc. (India), 18 (part I): 26-29, 1949.
9. Englis, D.T. & Hanahan, D.J. — Changes in autoclaved glucose. J. Am. Chem. Soc., 67:51-54, 1945.
10. Filkenstein, R.A. & Lankford, C.E. — A bacteriotoxic substance in autoclaved culture media containing glucose and phosphate. Appl. Microbiol., 5:74-79, 1956.
11. Hodge, J.E. — Chemistry of browning reactions in model systems. J. Agr. Food Chem., 1:928-943, 1953.
12. Jardim, I.R.S. — Farmácia Química — Água Oxigenada. Universidade do Brasil, Ed. Faculdade Nacional de Farmácia, 1954.
13. Jawetz, E.; Melnick, J.L. & Adelberg, E.A. — Cultura de microorganismos. In: — Microbiologia Médica, p. 73-77. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1974.
14. Lewis, J.M. — The inhibition of *Phytomonas malvaceae* in culture media containing sugars. J. Bacteriol., 19:423-433, 1930.
15. Oliveira, R.L. & Alcantara Gomes, R. — Thermal degradation products of sugar in alkaline pH. I — Lethal effect of glucose-phosphate solutions on *Escherichia coli*. Rev. Microbiol., 11:55-59, 1980.
16. Shallenberger, R.S. & Birch, G.G. — Sugar chemistry. Westport, Connecticut, Avi Publishing, 1975.
17. Shriner, R.L. & Fuson, R.C. — The systematic identification of organic compounds. 2. ed. New York, Wiley International, 1966.
18. Shroeder, L.J.; Jacobellis, M. & Smith, A.H. — The influence of water and pH on the reaction between amino compounds and carbohydrates. J. Biol. Chem., 212:973-983, 1955.

Padronização de método para detecção de cromogênese em estafilococos

Hassib Ashcar

Dept.^o de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP
Caixa Postal 4365
01000 São Paulo SP, Brasil
& Wagner Tavelin
Seção de Bacteriologia, Laboratório Central do Hospital das Clínicas
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255
05403 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Padronização de método para detectar a produção de pigmento em estafilococos, visando sua importância taxonômica. Investigou-se a influência, sobre a cromogênese, do cálcio, glicose e leite adicionados, isolados e associadamente, ao meio básico ágar triptona soja (TSA), em condições determinadas de tempo e temperatura de incubação. As melhores condições para pigmentação foram obtidas pela adição ao TSA de leite e cloreto de cálcio, incubação durante 24h a 37°C, seguida de permanência de mais um dia à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).

Summary

Standardization of a method for detecting chromogenesis of staphylococci

A standardized method for detecting pigment production by the staphylococci was developed on purpose to evaluate its taxonomic value. The influence of calcium, glucose and milk on chromogenesis was investigated. These substances were added, isolated and in association, to the basic medium Tryptic Soy Agar (TSA), in determined conditions of time and temperature for incubation. The best conditions for pigment production in TSA were obtained by the addition of milk and calcium chloride, incubation for 24h at 37°C followed by one day more at room temperature ($\pm 20^{\circ}\text{C}$).

Introdução

A diversidade de métodos usados na detecção de pigmentação em estafilococos não tem permitido comparar satisfatoriamente os resultados obtidos por vários autores, ocasionando dúvidas quanto a seu valor na identificação dessas bactérias. Por essa razão, foi investigada a influência de algumas substâncias, adicionadas a meio básico de cultura, como fator estimulante da produção de pigmento, em condições determinadas de tempo e temperatura de incubação. A seleção das substâncias foi feita com base em trabalhos com uso de leite (2,3), carboidratos (5) e sais de cálcio (4).

Material e Métodos

Culturas bacterianas — A partir de 721 culturas de estafilococos, isoladas de diversos materiais de pacientes do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, e de portadores nasais e bucais, estudantes da Faculdade de Odontologia da USP, compreendendo 317 cepas coagulase positivas e 404 cepas coagulase negativas, foram selecionadas, para estudo, 96 culturas. Esta seleção foi feita devido à baixa incidência, tanto de cepas coagulase positivas não cromogênicas, como de cepas coagulase negativas cromogênicas, observada no meio básico ágar triptona soja (TSA). Des-

sas 96 cepas selecionadas, 42 com provas de coagulase e DNase positivas foram identificadas como *Staphylococcus aureus*; das 54 cepas restantes, coagulase e DNase negativas, 37 foram identificadas como *Staphylococcus epidermidis* por serem sensíveis à novobiocina; as outras 17, resistentes a este antibiótico, foram classificadas como *Staphylococcus saprophyticus* (1).

As 42 cepas de *S. aureus* compreendiam dois lotes: um constituído de 20 cepas não cromogênicas, apresentando colônias brancas em meio básico (TSA) e outro, formado por 22 cepas que produziam pigmento amarelo cuja intensidade variava de fraca a forte.

As 37 cepas de *S. epidermidis* compreendiam um lote de 30 cepas não cromogênicas no meio básico e outro de sete produzindo pigmento amarelo fraco.

As 17 cepas de *S. saprophyticus* não apresentavam pigmentação no meio básico.

Meios de cultivo — Ágar triptona soja (TSA-Difco) foi adicionado isolado e associadamente, das seguintes substâncias: 0,15% de cloreto de cálcio, 1% de glicose e 10% de leite (preparado a partir do leite em pó desnatado). Os testes de cromogênese foram feitos, simultaneamente, nos seguintes meios distribuídos em placas: TSA (meio básico); TSA + cálcio; TSA + glicose; TSA + leite; TSA + cálcio + glicose; TSA + cálcio + leite; TSA + glicose + leite e TSA + cálcio + glicose + leite.

Semeadura e cultivo — As semeaduras foram feitas por estrias radiais, reservando o centro das placas para os controles: um positivo (*S. aureus*, com pigmentação amarela forte) e outro negativo (*S. epidermidis*, cepa não cromogênica). As placas foram incubadas a 37°C por 24h e, em seguida, mantidas à temperatura ambiente ($\pm 20^\circ\text{C}$) durante 9 dias.

Avaliação dos resultados — Foram feitos exames diariamente, durante 10 dias, com o seguinte critério para a avaliação da cromogênese das culturas: não pigmentada (branca) — ; amarelo fraco + ; amarelo médio ++ ; amarelo forte +++ e laranja +++.

Resultados

Provas de cromogênese dos estafilococos que não pigmentaram no meio básico — Os

resultados obtidos com as 20 cepas de *Staphylococcus aureus* não cromogênicas no meio básico (TSA) estão apresentados na Tabela 1 e expressam o número de cepas que apresentaram pigmentação do 1º ao 10º dia de observação. Desses 20 cepas, uma produziu pigmento no meio TSA + cálcio e três pigmentaram no meio TSA + glicose, a partir de 24h de incubação; nos meios TSA + cálcio + glicose, TSA + glicose + leite e TSA + cálcio + glicose + leite quatro cepas pigmentaram a partir de 24h de incubação; no meio TSA + leite houve pigmentação em quatro cepas após 24h, em seis do 2º ao 4º dia e em sete cepas a partir do 5º dia de observação; finalmente, no meio TSA + cálcio + leite já se manifestou a pigmentação em seis cepas após 24h de incubação a 37°C e, após permanência de mais um dia à temperatura ambiente, nove cepas se revelaram cromogênicas.

Tabela 1 — Número acumulado de cepas de *S. aureus* que pigmentaram, de acordo com o meio de cultura (Total de 20 cepas não cromogênicas no TSA)

Meios de cultura \ Dias de observação	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TSA + C	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TSA + G	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
TSA + L	4	6	6	6	7	7	7	7	7	7
TSA + CG	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
TSA + CL	6	9	9	9	9	9	9	9	9	9
TSA + GL	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4
TSA + CGL	4	4	4	4	4	4	4	4	4	4

TSA = meio básico

C = cálcio

G = glicose

L = leite

A Tabela 2 mostra os resultados obtidos com as 30 cepas de *Staphylococcus epidermidis* não cromogênicas no meio básico (TSA). Desses, nenhuma apresentou pigmentação no meio TSA + cálcio; uma cepa produziu pigmento, a partir de 24h de incubação nos meios TSA + glicose, TSA + cálcio + glicose, TSA + glicose + leite e TSA + cálcio + glicose + leite; no meio TSA + cálcio + leite, uma cepa pigmentou após 24h, duas cepas mostraram pigmentação do 2º ao 4º dia e, a partir do 5º dia de observação, quatro cepas apresentaram cromogênese. No meio TSA + leite, quatro cepas manifestaram pigmentação após 24h de incubação a 37°C seguida da permanência de mais um dia à temperatura ambiente.

Tabela 2 — Número acumulado de cepas de *S. epidermidis* que pigmentaram, de acordo com o meio de cultura (Total de 30 cepas não cromogênicas no TSA)

Meios de cultura	Dias de observação									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TSA + C	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TSA + G	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TSA + L	0	4	4	4	4	4	4	4	4	4
TSA + CG	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TSA + CL	1	2	2	2	4	4	4	4	4	4
TSA + GL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
TSA + CGL	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

TSA = meio básico

C = cálcio

G = glicose

L = leite

Com relação às 17 cepas de *Staphylococcus saprophyticus* não cromogênicas no meio básico (TSA), houve, nos meios enriquecidos, pigmentação de uma a duas cepas, com intensidade que variou de + a ++. Os meios em que houve pigmentação só de uma cepa foram o TSA + cálcio a partir do 5º dia e o TSA + leite a partir do 2º dia de prova. A pigmentação de duas cepas foi observada a partir do 5º dia de observação nos meios TSA + glicose, TSA + cálcio + glicose, TSA + glicose + leite, TSA + cálcio + glicose + leite e TSA + cálcio + leite, sendo que neste último meio uma das duas cepas revelara-se cromogênica já no 2º dia de observação.

Provas de cromogênese dos estafilococos que pigmentaram no meio básico — Estas provas foram feitas com cepas de *Staphylococcus aureus* e de *Staphylococcus epidermidis*. Os resultados foram lidos após incubação de 24h a 37°C seguida de permanência de mais um dia à temperatura ambiente. A Tabela 3 mostra o comportamento de 22 cepas de *Staphylococcus aureus* cromogênicas no meio básico, distribuídas pelos graus de pigmentação apresentados nos meios utilizados. Verificou-se que, no meio básico (TSA) e no meio TSA + cálcio, o grau de pigmentação variou de + a ++; nos meios TSA + leite e TSA + cálcio + leite, a pigmentação variou de ++ a ++++ e, nos meios adicionados de glicose, certas cepas apresentaram pigmentação de + a ++, enquanto outras não revelaram cromogênese.

Tabela 3 — Distribuição do número de cepas de *S. aureus* que pigmentaram, de acordo com o meio de cultura e os graus de pigmentação (Total de 22 cepas cromogênicas no TSA)

Meios Pigmentação	TSA	TSA C	TSA G	TSA L	TSA CG	TSA CL	TSA GL	TSA CGL
	+	++	+++	++++	0	0	0	0
+	9	9	2	8	0	9	1	0
++	9	10	1	4	2	4	4	5
+++	4	3	13	0	15	0	13	13
++++	0	0	6	0	5	0	4	4

TSA = meio básico

C = cálcio

G = glicose

L = leite

Com relação às culturas de *Staphylococcus epidermidis*, a Tabela 4, do mesmo modo que a anterior, mostra a distribuição de sete cepas, pelos graus de pigmentação apresentados nos meios empregados. Verificou-se que, no meio básico (TSA), a pigmentação de todas as sete cepas foi +; no meio TSA + cálcio o grau de pigmentação variou de + a ++; nos meios TSA + leite e TSA + cálcio + leite, a variação foi de + a ++++; finalmente, nos meios adicionados de glicose, certas cepas apresentaram pigmentação variando de + a ++, enquanto outras não revelaram cromogênese.

Tabela 4 — Distribuição do número de *S. epidermidis* que pigmentaram, de acordo com o meio de cultura e os graus de pigmentação (Total de 7 cepas cromogênicas no TSA)

Meios Pigmentação	TSA	TSA C	TSA G	TSA L	TSA CG	TSA CL	TSA GL	TSA CGL
	+	++	+++	++++	0	0	0	0
+	0	0	0	0	0	0	0	0
++	0	0	0	2	0	1	0	0
+++	0	3	1	2	0	4	1	1
++++	7	4	5	3	1	2	3	4
-	0	0	1	0	6	0	3	2

TSA = meio básico

C = cálcio

G = glicose

L = leite

Discussão

Os resultados obtidos com as 20 cepas de *Staphylococcus aureus* (Tabela 1), que não

pigmentaram no meio básico (TSA), revelam que a adição de cálcio, glicose e leite, isolados ou associadamente, estimulam a cromogênese de número de cepas, que varia conforme as substâncias adicionadas. O meio que apresentou melhores resultados foi TSA + cálcio + leite, no qual se revelaram cromogênicas seis cepas após 24h de incubação a 37°C e nove cepas, após permanência de mais um dia à temperatura ambiente ($\pm 20^{\circ}\text{C}$). Dos meios restantes, destacou-se o TSA + leite no qual observou-se cromogênese de quatro cepas após 24h de incubação e de seis cepas no 2º dia de observação. Esses resultados indicam, que o menor tempo recomendável de leitura para a prova de cromogênese de *S. aureus* é de dois dias, isto é, incubação de 24h a 37°C seguida de permanência de mais um dia à temperatura ambiente. Nestas condições, verificou-se que, no meio TSA + cálcio + leite, 45% das cepas de *S. aureus* foram estimuladas e revelaram-se cromogênicas, enquanto que, no meio TSA + leite, a pigmentação foi manifestada por 30% das cepas.

Analizando-se os resultados obtidos com as 30 cepas de *Staphylococcus epidermidis* (Tabela 2), que não pigmentaram no meio básico TSA, verifica-se também que os

meios que mais estimularam a pigmentação foram os adicionados de leite e de cálcio + leite, porém em proporção muito menor do que a observada com as cepas de *S. aureus*. Com efeito, comparando-se, nas Tabelas 1 e 2, os resultados do 2º dia de prova, no meio TSA + cálcio + leite, verifica-se que apenas duas cepas de *S. epidermidis*, ou seja, 6,6%, revelaram-se cromogênicas, enquanto que para a espécie *S. aureus* o estímulo da cromogênese ocorreu em 45% das cepas.

Por outro lado, os resultados da Tabela 3 mostram que os graus de cromogênese, apresentados no meio TSA + cálcio + leite, pelas cepas de *S. aureus*; em sua maioria, mais intensos do que no meio básico (TSA), variando de +++ a +++, enquanto que, para as cepas de *S. epidermidis* (Tabela 4), a variação foi geralmente de + a ++; essas tabelas mostram também que a adição de glicose provoca um decréscimo ou até inibição da cromogênese de certas cepas dessas duas espécies de estafilococos.

Finalmente, apenas duas das 17 cepas de *Staphylococcus saprophyticus* revelaram pigmentação de + a ++, no meio TSA + cálcio + leite, mostrando comportamento semelhante ao das cepas de *S. epidermidis* e diferente ao das cepas de *S. aureus*.

Referências Bibliográficas

1. Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. 8. ed. Baltimore, Willians & Wilkins, 1974.
2. Chapman, G.H. — Determination of the chromogenic property of staphylococci. J.Bact., 45:405-406, 1943.
3. Elek, S.D. & Levy, E. — Diffusible antigens in staphylococcal cultures. Brit. Jour. Exp. Path., 31:358-368, 1950.
4. Johnston, J.A. — The effect of calcium on chromogenesis in *Micrococcus pyogenes*. Tex. Rep. Biol. Med., 14:74-78, 1956.
5. Sevag, M.G. & Green, M.N. — The role of carbohydrates in the development of pigment by *Staphylococcus aureus*. J. Bact., 48:496, 1944.

Distribution of beta-hemolytic streptococci in pharyngeal specimens of normal children in Araraquara SP, Brazil

Sérgio E.L. Fracalanza
& Leslie C. Benchetrit

Department of Medical Microbiology, Federal University of Rio de Janeiro
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil

Summary

Fifty eight strains of beta-hemolytic streptococci were recovered from pharyngeal cultures obtained from 80 apparently healthy children. The overall carriage rate of hemolytic streptococci was 59%. All but five of the 58 strains were identified to species on the basis of biochemical tests and serological procedures. Non-group A isolates (34 strains) predominated over group A strains (19 isolates).

Resumo

Distribuição de estreptococos beta hemolítico em material de orofaringe de crianças normais em Araraquara SP, Brasil

Cinquenta e oito amostras de estreptococos beta hemolítico foram isoladas a partir de material de orofaringe obtido de 80 crianças aparentemente sadias. A taxa total de portadores de estreptococos hemolítico foi de 59%. Das 58 amostras, 53 foram identificadas a nível de espécie com base em testes bioquímicos e sorológicos. As amostras de outros grupos sorológicos (34 estíries) predominaram sobre as estíries do grupo A (19 amostras).

Introduction

Additional information has been published on pharyngitis caused by beta-hemolytic streptococci and throat carriership of various streptococcal serogroups in tropical and subtropical countries (8, 18). The information available in Brazil indicates that the prevalence of throat carriers of group A and non-group A organisms is as common as in temperate areas (3, 17, 20).

We report here the distribution of various serogroups of hemolytic streptococci in pharyngeal specimens obtained from apparently healthy children. Various tests are used for presumptive identification of streptococcal isolates and Lancefield groups are confirmed or determined by serological procedures.

Material and Methods

Specimens — Specimens were obtained from healthy children in a child care center during the period August to December 1979. The age of the children ranged from 8 months to 11 years. There were 35 females and 45 males. The children played together. A number of these children attended school and spent only half a day in the center Nossa Senhora do Carmo, Araraquara, SP, Brazil.

Two pharyngeal swabs were obtained from each individual and immediately cultured. Each child was cultured only once.

Processing of cultures — One swab was mixed with 1ml of Todd-Hewitt broth (BBL, Division of Becton, Dickinson and Company, Cockeysville, Md., USA). Half of the broth

was transferred into 10ml of medium containing 5% sheep blood, 0.1% agar (Difco), crystal violet (0.5 µg/ml) and sodium azide (0.2mg/ml; 20). The other half of the broth was transferred into 5ml of a selective medium for group B streptococci containing 5% sheep blood, gentamicin sulfate (8 µg/ml) and nalidixic acid (15 µg/ml; 2). Incubation of the 2 media was for 24hr at 37°C in normal atmosphere. Each medium was then streaked on Trypticase agar plates containing 5% sheep blood. Plates were incubated for 24hr at 37°C. One plate was incubated in a candle extinction jar and the second was incubated in a Gaspak anaerobic jar (BBL). The second swab was rolled on blood agar plates which were then streaked for isolation and incubated as described above.

Suspicious beta-hemolytic colonies were subcultured in Thioglycollate medium (BBL) for further identification and Gram stains were prepared from these subcultures.

Identification of streptococci — Presumptive identification of beta-hemolytic streptococci was performed using the following procedures: (a) Susceptibility to bacitracin by using the disk method (14); (b) CAMP test. The method was the standard CAMP test (7); (c) Growth in 6.5% NaCl broth (10); (d) Hippurate hydrolysis. The ferric chloride reagent was used to detect benzoic acid (1, 11); (e) Esculin reaction. Esculin hydrolysis was determined as described by Facklam (10); (f) Methylene blue medium contained 13% instant dry milk and 0.1% dye (10). All tests were read after overnight (16 to 18hr)

incubation at 37°C in normal atmosphere. The NaCl tolerance test was incubated aerobically at 37°C for 2 days.

Definitive identification of the streptococcal isolates was performed by serological grouping after extraction of the carbohydrate antigen with nitrous acid (9). Streptococcal grouping antisera were produced in our laboratory.

Results

One hundred and sixty swabs were cultured from the 80 children. Fifty eight beta-hemolytic streptococci were recovered from 47 (59%) of these. Of the 58 streptococcal isolates, 19 (32.8%) were group A, 6 (10.4%) group B, 5 (8.6%) group C and 23 (39.6%) group G. Five isolates (8.6%) could not be grouped. No beta-hemolytic group D streptococci were recovered.

The reactions obtained with the streptococcal isolates are listed in Table 1. Two group A strains were resistant to bacitracin, reacted negatively in CAMP, methylene blue and esculin tests and did not grow in NaCl broth. They were presumptively identified as non-group A, B or D and serologically, grouped by the El Kholy procedure (9). Only strains which reacted positively in CAMP tests and hydrolyzed sodium hippurate were group B. Three isolates grew in NaCl broth and were presumptively identified correctly as group B by resistance to bacitracin, positive reaction in CAMP tests, hydrolysis

Table 1 — Biochemical and physiological characters of 58 strains of beta-hemolytic streptococci

Nº of strains	Susceptibility to bacitracin	CAMP test	Hippurate hydrolysis	Methylene blue	Esculin hydrolysis	Growth in 6.5% NaCl	Presumptive identification	Lancefield serological group
17	+	-	ND**	-	-	-	A	A
2	-	-	ND	-	-	-	Non-group A, B or D	A
3	-	+	+	-	-	+	B	B
3	-	+	+	-	-	-	B	B
5	-	-	ND	-	-	-	Non-group A, B or D	C
23	-	-	ND	-	-	-	Non-group A, B or D	G
5	-	-	ND	-	-	-	Non-group A, B or D	NG***

* + = Positive reaction in CAMP or hippurate tests, susceptibility to bacitracin or growth in NaCl broth; - = negative reaction in CAMP, methylene blue or esculin tests, resistance to bacitracin and no growth in NaCl broth

** ND = Not done

*** NG = Non-groupable.

Table 2 — Age and sex distribution of children with throat cultures positive for beta-hemolytic streptococci

Nº of children	Sex		Age range (year)*	
	Female	Male	0-5	6-11
80	35	45	36(45)**	38(47.5)

* Age not available on 6(7.5%) children

** Number of children with streptococci in pharyngeal specimens (per cent).

of hippurate and negative reaction in esculin medium. The serological group of these 3 isolates was confirmed by precipitin tests with nitrous acid extracts.

There was a greater recovery of hemolytic streptococci (40 strains) from specimens obtained during the winter months. The recovery of group A strains demonstrated a variation with 17 of the 19 strains isolated during the winter months. Patients in the age group 6 to 11 years had the highest number of streptococcal isolates (30 strains). The age and sex of individuals with hemolytic streptococci are summarized in Table 2.

Groups A and G streptococci were isolated from the pharyngeal specimens of 12 and 16 children respectively. Simultaneous carriage was found in 10 children. Seven of them were carrying a group A strain and a group G (4 children), a group B (2 children) or a non-groupable strain (1 child). One child was carrying 1 group B, 1 group C and 1 group G strain.

Discussion

Young children have been reported to harbor commonly group A streptococci on throat cultures (5, 16). The recovery of *S. pyogenes* has been shown to be 2 to 3 times more frequent from pharyngeal specimens obtained from children than from specimens obtained from adults (16). It has also been shown that recovery of group A streptococci from throat swab specimens fluctuates with a higher incidence during the winter and early spring (12, 15, 16). Prevalence of non-group A streptococci in pharyngeal cultures has been shown to vary (13, 16, 20) and the significance of these non-group A streptococcal isolates is unclear. Group C and G have been recovered from children with clinical evidence of pharyngitis (4, 19).

In a survey among healthy rural school children of Ribeirão Preto (SP, Brazil) 23%

were found to harbor group A streptococci, 9% group C and 8% group G (20).

We report here the occurrence of 4 serogroups of beta-hemolytic streptococci in pharyngeal cultures in an apparently healthy pediatric population. Groups B, C and G streptococci predominated over group A streptococci. This result is consistent with previously reported studies from developing countries (3, 6, 18). It is apparent from this study that when serological grouping is not available, the bacitracin test and either the CAMP or hippurate test may be used for presumptive identification of group A and B streptococci. Definitive serological grouping remains the method of choice for determination of group C and G which are also present in the throat.

It was apparent from the observations we made during this study that anaerobic incubation was superior over aerobic incubation for detection of beta-hemolytic streptococci in primary throat cultures when blood plates were swabbed with throat swab specimens. Sensitivity for isolation of streptococci was also increased with the use of enrichment media (2, 20). Specificity of the media however was maintained. The use of media and techniques which provide a significant degree of anaerobiosis (20) will thus result in maximum sensitivity for recovery of beta-hemolytic streptococci from throat cultures.

Acknowledgments

This work was supported in part by grants from CNPq (Auxílio n.º 2222.1749/78) and FINEP (Convênio 527/CT). We wish to express our appreciation to the nursing personnel of the child care center Nossa Senhora do Carmo, Araraquara SP, Brazil. We thank Dr. Antonio Carlos Pizzolitto for providing laboratory facilities in the initial stages of this study.

References

1. Ayers, S.H. & Rupp, P. — Differentiation of haemolytic streptococci from human and bovine sources by the hydrolysis of sodium hippurate. *J. Infect. Dis.*, 30:388-399, 1977.
2. Baker, C.J.; Clark, D.J. & Barrett, F.F. — Selective broth medium for isolation of group B streptococci. *Appl. Microbiol.*, 26:884-885.
3. Benchetrit, L.C.; Borges-Neto, A.A.; Figueiredo, A.M.S. & Oliveira, C.M. — Occurrence of group A and non-group A beta-hemolytic streptococci in human infections in Rio de Janeiro. *Rev. Microbiol.*, 11:50-54, 1980.
4. Benjamin, J.T. & Perriello Jr., V.A. — Pharyngitis due to group C hemolytic streptococci in children. *J. Pediatr.*, 89:254-256, 1976.
5. Breese, B.B.; Disney, F.A. & Talpey, W. — The nature of a small pediatric group practice. II — The incidence of beta-hemolytic streptococcal illness in a private pediatric. *Pediatrics*, 38:277-285, 1966.
6. Castro, H.S. — Dados de um inquérito sobre a ocorrência de estreptococos em crianças normais e doentes no Rio de Janeiro. *An. Microbiol.*, 4:329-351, 1961.
7. Darling, C.L. — Standardization and evaluation of the CAMP reaction for the prompt, presumptive identification of *Streptococcus agalactiae* (Lancefield group B) in clinical material. *J. Clin. Microbiol.*, 1:171-174, 1975.
8. El Kholy, A.M.; Sorour, A.H.; Wannamaker, L.W.; Robbins, M.; Poitras, J.M. & Krause, R.M. — A three year prospective study of streptococcal infections in a population of rural Egyptian school children. *J. Med. Microbiol.*, 6:101-110, 1973.
9. 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.
10. Facklam, R.R. — Recognition of group D streptococcal species of human origin by biochemical and physiological tests. *Appl. Microbiol.*, 23:1131-1139, 1972.
11. Hwang, M. & Ederer, G.M. — Rapid hippurate hydrolysis method for presumptive identification of group B streptococci. *J. Clin. Microbiol.*, 1:114-115, 1975.
12. Kaplan, E.L.; Top Jr., F.H.; Dudding, B.A. & Wannamaker, L.W. — Diagnosis of streptococcal pharyngitis: differentiation of active infection from the carrier state in the symptomatic child. *J. Infect. Dis.*, 123:490-501, 1971.
13. Margileth, A.M.; Mella, G.W. & Zilvetti, E.E. — Streptococci in children's respiratory infections: diagnosis and treatment. Clinical characteristics of pharyngitis related to group A streptococci and practical utility of nose and throat bacteriology in office practice. *Clin. Pediatric.*, 10:69-77, 1971.
14. Maxted, W.R. — The use of bacitracin for identifying group A streptococci. *J. Clin. Pathol.*, 6:224-226, 1953.
15. Mogabgab, W.J. — Beta-hemolytic streptococcal and concurrent infections in adults and children with respiratory disease, 1958 to 1969. *Am. Rev. Respir. Dis.*, 102:23-34, 1970.
16. Murray, P.R.; Wold, A.D. & Washington II, J.A. — Recovery of group A and non-group A beta-hemolytic streptococci from throat swab specimens. *Mayo Clin. Proc.*, 52:81-84, 1977.
17. Noronha, M.C.C.; Riedel, O.O. & Souza, T.T. — Grupagem de estreptococos beta-hemolíticos e tipagem dos do grupo A, em universitários de Fortaleza, Ceará, Brasil. *Rev. Med. Univ. Fed. Ceará*, 15:45-50, 1975.
18. Ogunbi, O. — A study of beta-hemolytic streptococci in throats, noses and skin lesions in a Nigerian (Lagos) urban population. *J. Nig. Med. Ass.*, 3:159-164, 1971.
19. Quinn, R.W. & Lowry, P.N. — The anatomical area of involvement in streptococcal infections and the carrier state. *Yale J. Biol.*, 43:1-10, 1970.
20. Solé-Vernin, C. — Groups A, C and G streptococci and antistreptolysin O serum level from healthy rural school children of Ribeirão Preto, SP., Brasil. Hospital (Rio), 66:331-348, 1964.

Prevalência de anticorpos contra o vírus da papilomatose bovina no Estado do Rio de Janeiro

Carlos H. Romero

*EMBRAPA – Projeto Patologia Animal, Km. 47 Antiga Rio - São Paulo
23460 Seropédica RJ, Brasil*

Armando A. Aguiar

*Instituto de Veterinária UFRJ, Km. 47
23460 Seropédica RJ, Brasil*

Sheila R. S. de Andrade

Bolsista CNPq

Cheryl A. Rowe

EMBRAPA – Projeto Patologia Animal

& Angela Gonçalves da Silva

*Instituto de Microbiologia UFRJ, Ilha do Fundão
21941 Rio de Janeiro RJ, Brasil*

Resumo

Soros de 1174 bovinos, de 10 rebanhos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro, foram testados para anticorpos contra o vírus de papilomatose bovina, utilizando-se a microprova de imunodifusão em agar. A especificidade das reações foi confirmada quando grupos de partículas virais foram observados nas linhas de precipitação, pela microscopia eletrônica. Anticorpos de origem materna foram demonstrados em 18,3% dos bezerros, menores de três meses de idade, enquanto que anticorpos só foram demonstrados em 2,0% dos bezerros, entre quatro e seis meses de idade. Anticorpos também foram demonstrados em 21,5% dos bezerros, entre sete e 12 meses de idade; em 25,0% dos animais, entre 13 e 18 meses de idade; em 21,2% dos animais, entre 19 e 30 meses de idade; em 23,7% dos animais, entre 31 e 48 meses de idade e em 23,1% dos animais, maiores de 49 meses de idade.

Summary

Bovine papilloma virus antibodies in the State of Rio de Janeiro

One thousand one hundred and seventy-four bovine sera, obtained from 10 dairy farms in the State of Rio de Janeiro, were tested for antibodies to bovine papilloma virus using the agar gel microimmunodiffusion test. The specificity of the reactions was confirmed when, upon examination with the electron microscope, clusters of bovine papilloma virus were found in the precipitation lines. Maternally-derived antibodies were demonstrated in 18.3% of the calves younger than three months of age, while antibodies could only be shown in 2.0% of the calves between four and six months of age. Antibodies were also demonstrated in 21.5% of the animals between seven and 12 months of age; in 25.0% of the animals between 13 and 18 months of age; in 21.2% of the animals between 19 and 30 months of age; in 23.7% of the animals between 31 and 48 months of age and in 23.1% of the animals older than 49 months.

Introdução

A papilomatose bovina é uma neoplasia, de curso benigno, caracterizada pela aparição de fibropapilomas cutâneos (10) e de tumores fibromatosos, no trato genitourinário (3). A neoplasia é de etiologia viral (5) e o agente causal, o vírus da papilomatose

bovina (VPB), parece estar bem disseminado na natureza, atingindo principalmente bovinos jovens (9). A papilomatose pode ser prevenida pela vacinação, com homogenados de papilomas, inativados com formalina (2). Esta vacinação estimula a aparição de soro-precipitininas, as quais são detectadas pela prova de imunodifusão (8). Porém, o sig-

nificado destes anticorpos em relação a imunidade contra o VPB é ainda discutível (1).

No presente trabalho, apresenta-se os resultados sobre a prevalência de anticorpos contra o VPB em bovinos, de várias faixas etárias, não vacinados contra a papilomatose, de alguns rebanhos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro.

Material e Métodos

Soros — Os soros foram obtidos, de sangue coletado da veia jugular ou da veia mamária, por punção direta com agulha, clarificados por centrifugação e armazenados a - 20°C.

Antígeno — O antígeno, utilizado na prova de imunodifusão de Ouchterlony, foi preparado a partir da porção epitelial de papilomas, obtidos de bezerros naturalmente infectados. Os papilomas foram removidos, utilizando-se pinça e tesoura, colocados diretamente em solução de partes iguais de glicerina neutra e tampão fosfato-salino (TFS), pH 7,3 e armazenados a 4°C.

No dia da prova, preparou-se uma suspensão a 25% dos papilomas em TFS, utilizando-se areia estéril como abrasivo. A suspensão foi centrifugada a 2500rpm, durante 10 minutos, em centrífuga refrigerada e o sobrenadante utilizado como antígeno, na prova de imunodifusão para o VPB.

Soro padrão — O soro padrão foi obtido de uma bezerra, naturalmente infectada com grande número de papilomas cutâneos. Este soro reagia, formando uma linha de precipitação, com o antígeno preparado com a parte epitelial dos papilomas, utilizados neste trabalho.

Prova de imunodifusão — A microprova de imunodifusão, previamente descrita para o VPB (8), foi utilizada com pequenas modificações. Seis lâminas de vidro foram colocadas em um suporte de plástico para imuno-eletroforese e os contornos das lâminas lacrados com uma suspensão de agar a 0,2%. Logo, foram colocados, em cada uma das suas divisões do suporte plástico, contendo três lâminas, cada uma, 15ml de uma suspensão a 0,8% de agar purificado (Difco Labs., Detroit, MI, USA). Depois da solidificação do agar, as lâminas foram mantidas em câmara

úmida, a 4°C, no mínimo 24 horas, antes do uso. Foi adotado o padrão hexagonal, com um orifício central e seis orifícios periféricos, todos de 3,5mm de diâmetro e 3,5mm equidistantes um do outro. O antígeno, contendo o VPB, foi colocado nos orifícios superior, central e inferior, e os soros a testar, como o soro padrão, colocados nos orifícios periféricos. As provas foram realizadas à temperatura ambiente e a leitura final feita após 72 horas. Os soros, que produziram linhas de precipitação contínuas às do soro padrão, foram considerados positivos.

Microscopia eletrônica — Para confirmar a especificidade da microprova de imunodifusão, foi aspirado, com pipeta Pasteur, material das linhas de precipitação no agar e colocado sobre a grade, por um a dois minutos. Logo após a retirada do agar, as preparações foram coradas com ácido fosfotungstico a 2% e examinadas sob microscópio eletrônico Philips EM 301.

Coleta de dados — Só foram utilizadas amostras obtidas de rebanhos que possuíam dados referentes à idade dos bovinos. A maioria dos animais testados pertencia às raças Holandês Preto e Branco, Holandês Vermelho e Branco, mestiços da raça Gir e alguns bovinos da raça Guernsey.

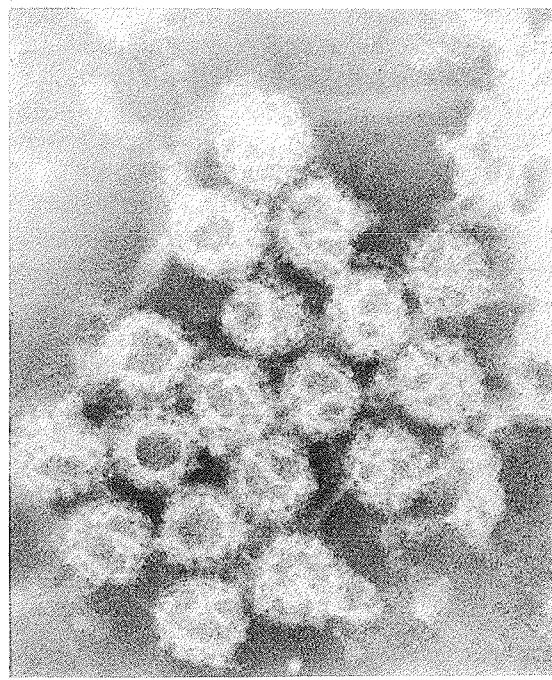
Ainda que nenhum dado quantitativo sobre a ocorrência de papilomas fosse disponível, papilomas cutâneos foram observados em alguns animais, em quase todos os rebanhos testados.

Resultados

O antígeno e o antisoro padrão, utilizados, reagiram formando uma linha de precipitação, a qual serviu como referência para as linhas de precipitação, formadas pelos soros em prova. As preparações obtidas das linhas de precipitação, observadas sob o microscópio eletrônico, continham abundante número de partículas virais, as quais encontravam-se agregadas e cobertas por fino material granular (Fig. 1). O diâmetro destas partículas virais era de aproximadamente 46,5nm.

A microprova de imunodifusão foi realizada no soro de 1174 bovinos, verificando-se a presença de anticorpos contra o VPB, em

Figura 1 — Microfotografia eletrônica de uma linha de precipitação, ilustrando vírus de papilomatose bovina agregados, possivelmente por anticorpo, corados com ácido fosfatúngstico (PTA) a 2%, $\times 285.000$



255 (21,7%) soros. Pode-se constatar a presença de anticorpos, em 21 (18,3%) dos 115 bovinos testados, menores de 3 meses. Quando 51 bovinos, entre 4-6 meses de idade, foram testados, anticorpos só foram demonstrados em 1 (2,0%) bovino. Porém, anticorpos foram novamente detectados em 17 (21,5%), de 79 bovinos testados, de 7-12 meses de idade. Daí em diante, anticorpos foram detectados em 24 (25,0%) de 96 bovinos, entre 13-18 meses de idade; em 25

(21,2%), de 118 bovinos, entre 19-30 meses de idade; em 61 (23,7%), de 257 bovinos, entre 31-48 meses de idade; e em 106 (23,1%), de 458 bovinos, maiores de 49 meses de idade (Tabela 1).

Discussão

A visualização de partículas virais, nas preparações obtidas das linhas de precipitação em agar, demonstrou a especificidade da prova de imunodifusão, para detectar anticorpos contra o VPB (8). Estas partículas virais correspondem aproximadamente aquelas descritas para os vírus de papilomatose, de diversas espécies (4, 11).

O presente levantamento soro-epidemiológico revelou ampla disseminação do VPB. À exceção do rebanho I, onde o número de soros testados foi relativamente pequeno, os anticorpos foram demonstrados em todos os rebanhos testados. Trabalhos prévios demonstraram que 36% de bovinos, inoculados, com vacinas formalizadas, contra o VPB, desenvolviam anticorpos específicos, 4 semanas após a vacinação (2). Na presente pesquisa, desde que não existiu um programa de vacinação contra o VPB, em nenhum dos rebanhos testados, pode-se concluir que a presença de anticorpos correspondeu à infecção natural com o VPB.

Os anticorpos, demonstrados em bovinos menores de 3 meses de idade, correspondem provavelmente a anticorpos de origem materna, adquiridos com o colostro. Estes anti-

Tabela 1 — Anticorpos contra o VPB em rebanhos leiteiros do Estado do Rio de Janeiro

Rebanhos	Idade em meses							Total
	0-3	4-6	7-12	13-18	19-30	31-48	49+	
A	0/34	0/11	7/15	5/16	12/24	12/38	19/83	55/221 (24,9)*
B	1/14	1/4	1/8	2/12	2/25	3/25	8/78	18/166 (10,8)
C	1/3	0/4	0/3	1/3	0/3	1/5	9/20	12/41 (29,3)
D	SA**	SA	4/12	7/15	1/2	9/24	6/20	27/73 (37,0)
E	SA	SA	SA	SA	2/3	7/31	9/34	26/54 (48,1)
F	12/28	0/21	2/7	6/25	3/32	6/36	32/90	61/239 (25,5)
G	SA	SA	1/8	1/8	1/2	1/12	10/31	14/61 (23,0)
H	SA	SA	1/5	0/11	1/9	7/55	0/2	9/82 (11,0)
I	0/2	0/5	0/11	0/3	SA	SA	0/21	0/21 (0,0)
J	7/34	0/6	1/10	2/3	5/21	20/59	15/103	50/236 (21,2)
Total	21/115	1/51	17/79	24/96	25/118	61/257	106/458	255/1174 (21,7)

* Número de bovinos com anticorpos/Número de bovinos testados (percentagem de reagentes positivos)

** Sem animais, nesta faixa de idade.

corpos foram detectados no soro de 18,3% dos bezerros, menores de 3 meses de idade, percentagem que, aproximadamente, corresponde à percentagem de infecção das vacas mães, maiores de 19 meses. A ausência de anticorpos no soro dos bovinos, na faixa de 3-6 meses de idade, é, com certeza, um indicador da catabolização dos anticorpos maternos. Anticorpos foram novamente detectados no soro de bovinos, maiores de 7 meses de idade, provavelmente como resposta a infecção natural, em torno dos 6 meses de idade. Após 12 meses de idade, as taxas de anticorpos detectadas foram semelhantes para os bovinos, em diferentes faixas de idade.

Na presente pesquisa, a relação entre a presença de anticorpos e o desenvolvimento ou a regressão de papilomas não foi avaliada. Porém, Koller & col. (7) verificaram que o título de anticorpos no soro aumentava, em

bezerros com papilomas em fase ativa de crescimento. Por outro lado, Barthold & Olson (1) acharam que, depois do desafio com o VPB, os bezerros desenvolviam uma imunidade sólida, mas esta não era concomitante com a aparição ou com os títulos de anticorpos no soro.

Interessantemente, anticorpos contra o VPB foram demonstrados em soros de pacientes humanos adultos, com papilomas cutâneos (12). Porém, todos os soros de bovinos, suínos, cães e humanos, naturalmente infectados, reagem com uma linha de identidade com antígeno preparado com o vírus da papilomatose humana (13). Assim, o VPB além de causar tumores benignos, que esporadicamente alcançam proporções epidêmicas (10), de importância veterinária, pode também adquirir importância para saúde humana (6), por poder estar envolvido na etiologia de certos papilomas cutâneos.

Referências Bibliográficas

1. Barthold, S.W. & Olson, C. — Fibroma regression in relation to antibody and challenge immunity to bovine papilloma virus. *Cancer Res.*, 34:2436-2439, 1974.
2. Barthold, S.W.; Olson, C. & Larson, L.L. — Precipitin response of cattle to commercial wart vaccine. *Amer. J. Vet. Res.*, 37:449-451, 1976.
3. Brobst, D.F. & Olson, C. — Histopathology of urinary bladder tumors induced by bovine cutaneous papilloma agent. *Cancer Res.*, 25:12-19, 1965.
4. Coggin, J. R. & Zur Hausen, H. — Workshop on papilloma viruses and cancer. *Cancer Res.*, 39:545-546, 1979.
5. Creech, G.T. — Experimental studies of the etiology of common warts in cattle. *J. Agric. Res.*, 39:723-737, 1929.
6. Grenier, R.; Wilkinson, R. D. & Silpanantia, P. — Les verrues animales sont-elles vraiment inoffensives pour l'homme? *Vie Med. Can. Fr.*, 5:263-265, 1976.
7. Koller, L.D.; Barthold, S.W. & Olson, C. — Quantitation of bovine papilloma virus and serum antibody by immunodiffusion. *Amer. J. Vet. Res.*, 35:121-124, 1974.
8. Lee, K.P. & Olson, C. — A gel diffusion precipitin test for bovine papilloma virus. *Amer. J. Vet. Res.*, 30:725-735, 1969.
9. Olson, C.; Luedke, A.J. & Brobst, D.F. — Incidence of bovine cutaneous papillomatosis in beef cattle. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 140:50-52, 1962.
10. Olson, C.; Robl, M.G. & Larson, L.L. — Cutaneous and penile bovine fibropapillomatosis and its control. *J. Amer. Vet. Med. Ass.*, 153:1189-1194, 1968.
11. Pyrhönen, S. — Antibody response against human papilloma viruses. Finland, University of Helsinki, p. 24, 1978. (PhD Dissertation).
12. Pyrhönen, S. & Neuvonen, E. — The occurrence of human wart-virus antibodies in dogs, pigs, and cattle. *Arch. Virology*, 57:297-305, 1978.

Variação sazonal de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio em ecossistema lacustre artificial

José Eduardo dos Santos

Dept.^o de Ecologia, Instituto de Biociências UNESP, Caixa Postal 178
13500 Rio Claro SP, Brasil

& Pedro Magalhães Lacava

Dept.^o de Biologia, Universidade Federal São Carlos, Caixa Postal 676
13560 São Carlos SP, Brasil

Resumo

Estudos ecológicos, na Represa do Lobo (São Carlos), no período de maio de 1977 a abril de 1978, relacionados a variação sazonal de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio e sua interação com parâmetros físico-químicos, para duas estações de coleta. Análises estatísticas evidenciaram a interação entre os parâmetros físico-químicos estudados e a distribuição de bactérias.

Summary

Seasonal variation of the microaerophilic nitrogen fixing bacteria in a man made lacustrine ecosystem

Seasonal variation of the microaerophilic nitrogen fixing bacteria, their relationship with physical and chemical parameters were carried out at Lobo Reservoir (São Carlos) for the period of May 1977 to April 1978 at two stations located in different sites of the reservoir. The relationship between the physico-chemical parameters and the distribution of the nitrogen fixing bacteria was statistically significant.

Introdução

Dos poucos trabalhos relacionados ao número e proporção de bactérias heterótrofas, fixadoras de nitrogênio em ambientes naturais, a maioria deles relaciona-se com o solo, onde uma variação considerável, no número de bactérias, torna-se evidente, de uma investigação para outra. Tais variações são, sem dúvida, atribuídas aos diferentes métodos de contagem, fontes de carbono ou mesmo de nitrogênio utilizadas (15). É de se esperar que tais variações ocorram dentro dos ambientes aquáticos, desde que os fatores permaneçam os mesmos e que os métodos de contagem reflitam, de modo geral, o índice de alguma atividade fisiológica (11). Para ambientes aquáticos de regiões tropicais, dados envolvendo distribuição de bactérias heterótrofas, fixadoras de nitrogênio, são praticamente inexistentes (21); a maioria deles refere-se à simples detecção

de formas heterótrofas, desde que a maioria dos pesquisadores aceitam que tais formas são ineficientes na realização do processo de fixação biológica de nitrogênio, por serem os carboidratos solúveis limitantes ao processo e raramente disponíveis no ambiente (22).

Foram relacionados ao redor de 15 gêneros, das ordens *Eubacteriales* e *Pseudomonadales*, para os quais há evidências de que há fixação de nitrogênio em cultura pura (22). Bioquimicamente, muita atenção tem sido dada ao gênero *Azotobacter*, incluído dentre os principais fixadores de potencial limnológico (6), mas outros gêneros, como *Beijerinckia*, *Klebsiella* e *Spirillum* têm demonstrado boas evidências de que fixam nitrogênio (22). Com relação a microrganismos caracterizados como microaerófilos fixadores de nitrogênio, estes (15) apenas têm sido isolados de uma variedade de águas naturais (águas poluídas, reservatórios, pequenos lagos, água armazenada, bem como de outras

fontes), ou então têm sido evidenciados, ocorrendo em associação com raízes de gramíneas (14, 15).

Este trabalho faz parte de uma série de estudos realizados a respeito da ocorrência, distribuição, significado e possível associação com rizosfera de macrohidrófitas, de microrganismos fixadores de nitrogênio (aeróbios e microaerófilos) na Represa do Lobo e teve como objetivo, determinar a distribuição quantitativa de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio, em amostras de água de superfície, de maio de 1977 a abril de 1978, a fim de obter dados comparativos do ponto de vista qualitativo e quantitativo, de duas estações de coleta pré-estabelecidas. Foram também relacionados alguns parâmetros físicos e químicos que provavelmente atuam na distribuição de tais organismos.

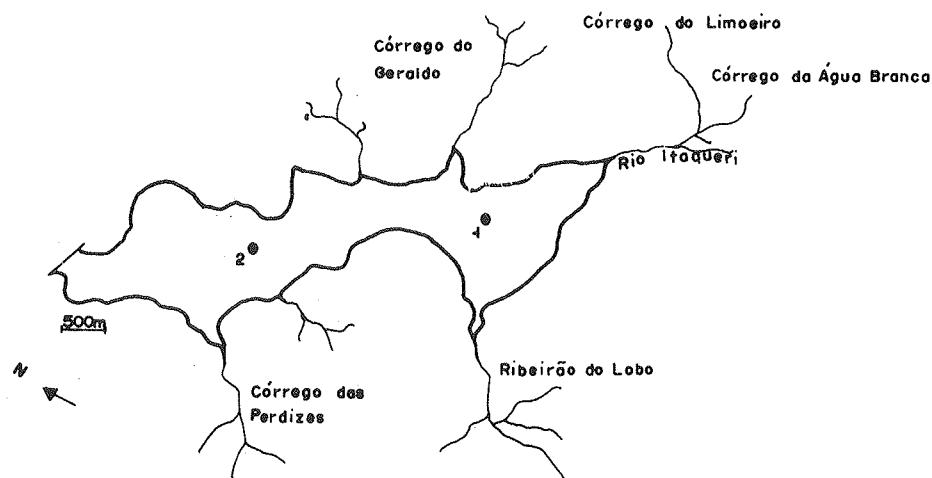
Material e Métodos

As estações de coleta (Fig. 1) foram estabelecidas com base em estudos limnológicos, anteriormente realizados na represa e na natureza trófica de suas extremidades (25, 26). A região *alta represa* (estação 1) possui características que a diferenciam grandemente de *baixa represa* (estação 2), tais como: contribuição de vários efluentes, presença de macrohidrófitas enraizadas e flutuantes além de pequena profundidade. As coletas foram realizadas quinzenalmente, em condições de superfície, a partir de maio de 1977, para análise de parâmetros físico-

químicos e biológicos, a saber: temperatura, pH, oxigênio dissolvido e condutividade, de acordo com técnicas descritas em Golterman (9).

Estimativa do número de bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, foi realizada através do método do número mais provável (NMP), em frascos de vidro contendo meio malato semi-sólido (5), aos quais foram inoculadas alíquotas de diluições convenientes (10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}), de amostras de água das estações de coleta. A seguir, os frascos foram incubados por 48 horas a 28°C. A formação de uma película branca e delgada, a alguns milímetros abaixo da superfície do meio e a atividade da nitrogenase (15), foram os critérios para evidenciar a presença de bactérias. O número final foi determinado pelo uso da tabela de McCrady (18) e o resultado dado em fixadoras de nitrogênio por mililitro. A verificação da atividade da nitrogenase foi realizada pelo método de redução do acetileno (10, 23), sendo para isso os frascos de vidro convenientemente vedados por tampões de borracha. A reação foi iniciada, inoculando-se acetileno (10% do volume do frasco) nos frascos de reação (10) e a seguir incubados durante uma hora a 28°C. Volume de 0,5ml da fase gasosa dos frascos de reação foram retirados através de seringas e o conteúdo de etileno ensaiado por cromatografia gasosa, em um cromatógrafo CG 370, com detector de ionização de chama e coluna de Porapak N (tubo de aço, 1,80m de comprimento, 3/16" de diâmetro), operada a 110°C, com nitrogênio como gás de arraste.

Figura 1 — Localização das estações de coleta. As estações 1, 2 são pontos de coleta para análise de parâmetros biológicos e físico-químicos



Análise estatística — Inicialmente, para todas as variáveis estudadas, foram feitos cálculos de média, variância, desvio padrão e coeficiente de variação, visando a caracterização de cada uma delas. Através de Teste "t", para amostras dependentes, pareadas de acordo com o mês de coleta, foi verificada a diferença dos valores de médias obtidas para: temperatura, pH, oxigênio dissolvido, condutividade e NMP/ml de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio, entre as duas estações de coleta. Foram realizados, também, estudos de regressão simples, envolvendo cada uma das variáveis separadamente, utilizando-se para isso, um programa computacional baseado no método dos mínimos quadrados (17), que fornece valores para o ajuste de regressão, bem como várias equações.

Resultados e Discussão

Os valores médios mensais, dos parâmetros físico-químicos determinados, encontram-se nas Tabelas 1 e 2. A distribuição horizontal dos mesmos, para as duas estações de coleta, demonstrou um ciclo sazonal bem marcante (Figuras 2 e 3). Durante todo o período de estudo foi possível observar que: os valores de temperatura mostraram diferenças bastante acentuadas de inverno e

Tabela 1 — Valores médios mensais de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade (amostras de superfície) para estação 1 (maio de 1977 — maio de 1978)

Meses	Temp. (°C)	O ₂ dissolv. (mg/l)	pH	Cond. (umho/cm)
Mai.	19.4	6.81	5.2	8.79
Jun.	18.6	7.40	5.5	8.01
Jul.	17.8	7.56	5.0	8.43
Ago.	20.8	7.02	5.2	10.56
Set.	22.3	6.72	5.3	10.72
Out.	24.8	6.32	5.5	11.23
Nov.	23.5	6.50	5.8	12.76
Dez.	24.6	5.65	5.6	10.10
Jan.	24.8	4.83	5.1	12.44
Fev.	27.2	5.43	5.0	13.56
Mar.	27.6	4.95	4.9	14.48
Abr.	23.8	5.83	5.2	11.26

Tabela 2 — Valores médios mensais de temperatura, oxigênio dissolvido, pH e condutividade (amostras de superfície) para estação 2 (maio de 1977 — maio de 1978)

Meses	Temp. (°C)	O ₂ dissolv. (mg/l)	pH	Cond. (umho/cm)
Mai.	18.6	8.01	6.4	6.74
Jun.	17.6	8.42	5.8	6.73
Jul.	16.7	8.87	5.9	6.24
Ago.	19.8	7.93	6.1	7.36
Set.	20.6	7.82	6.4	8.06
Out.	21.2	7.65	6.0	7.04
Nov.	22.2	7.05	6.6	7.98
Dez.	22.5	7.42	6.2	7.55
Jan.	23.6	6.18	5.6	8.96
Fev.	24.4	5.90	5.4	9.28
Mar.	24.2	5.97	5.5	9.46
Abr.	21.3	6.82	6.2	8.94

verão (julho e março) para ambas estações de coleta; valores inferiores de oxigênio dissolvido foram encontrados para a *alta represa* (estação 1), provavelmente devido à grande quantidade de macrohidrófitas, material em suspensão (25, 26) e bactérias (8); valores de pH foram menores para estação 1 e valores de condutividade foram superiores para estação 1, provavelmente devidos à ação dos efluentes e da presença de macrohidrófitas não enraizadas, as quais podem provocar alterações no estado químico da água, seja pela retirada de nutrientes necessários ao seu crescimento, seja pela liberação de produtos metabólicos (20). Análises estatísticas, entre os valores de média dos parâmetros físico-químicos determinados (21), permitiram evidenciar diferenças altamente significativas, entre as estações de coleta, durante a variação sazonal, com relação a tais fatores.

A densidade de bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio (Tabela 3), para ambas estações de coleta, demonstrou um padrão sazonal bem definido (Figuras 2 e 3). A distribuição apresentou-se ligeiramente estável, sendo observado apenas duas ocasiões com números relativamente altos, novembro e março, e um ligeiro decréscimo em julho. Os valores observados em novembro podem ser explicados pelo período de chuvas, verificado na ocasião das coletas. A ocorrência de precipitação (4, 12) tem sido relatada como um fator que pode afetar a

Figura 2 — Variação sazonal do NMP/ml de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio, pH, O₂ dissolvido, condutividade e temperatura para estação 1

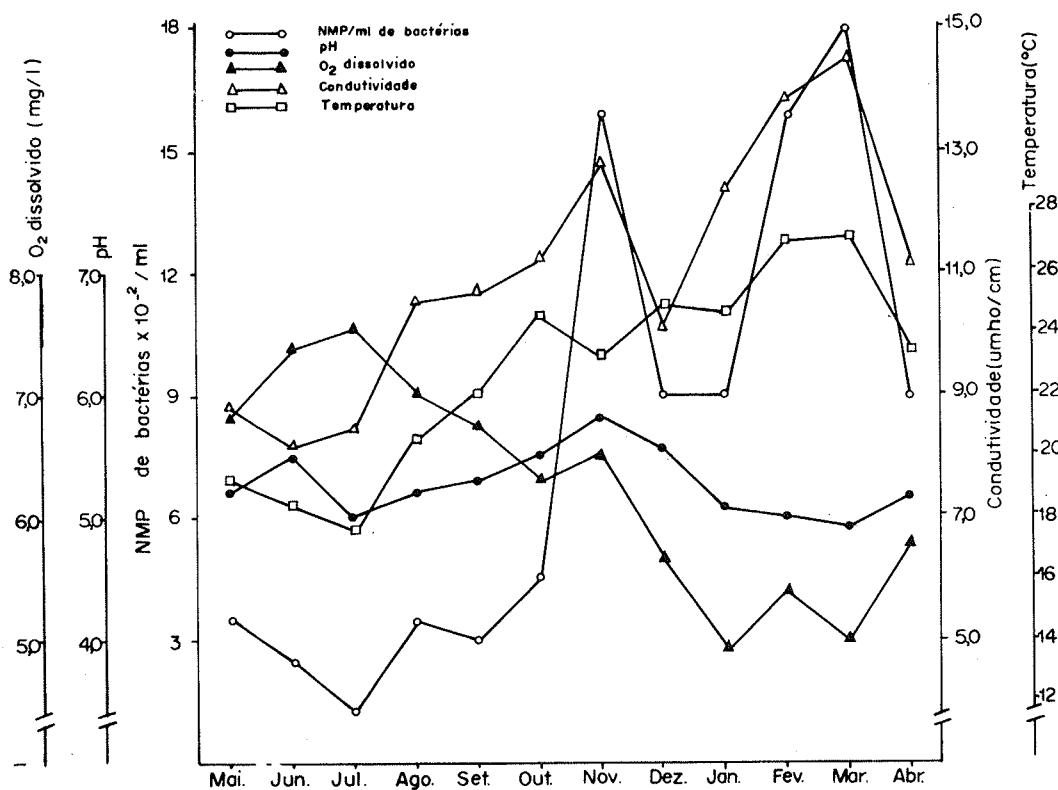


Figura 3 — Variação sazonal do NMP/ml de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio, pH, O₂ dissolvido, condutividade e temperatura para a estação 2

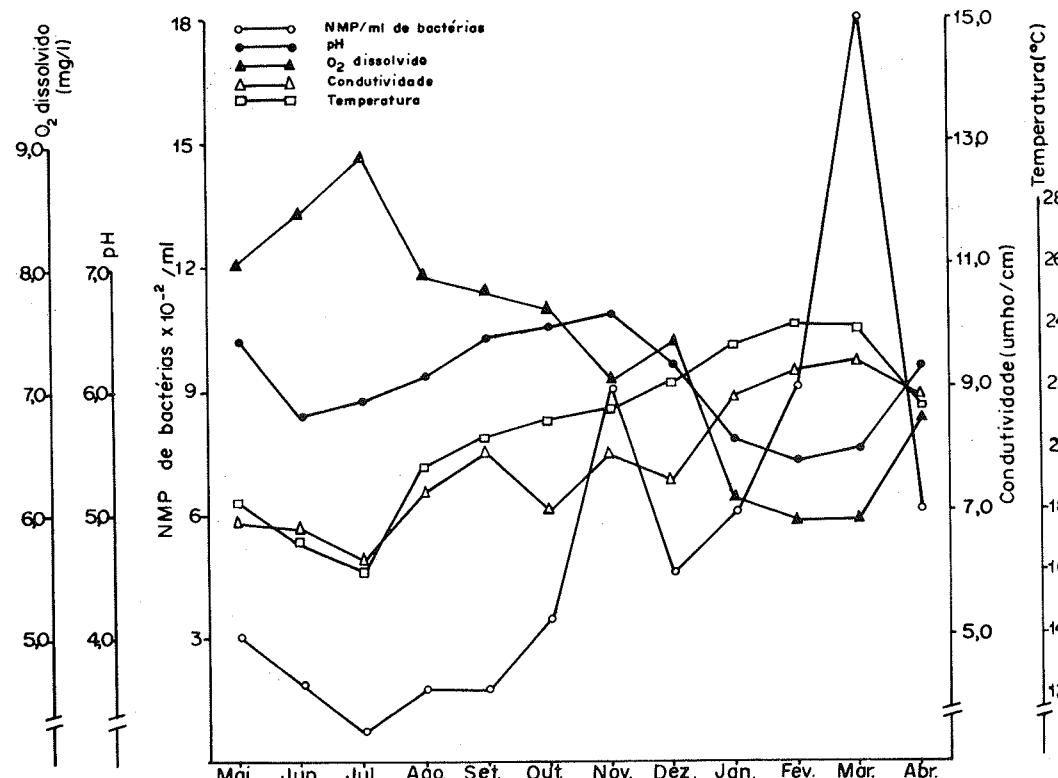


Tabela 3 — Valores médios mensais do número de bactérias microaerófilas na água pelo método NMP (maio de 1977 — maio de 1978) (1)

Meses	Nº de bactérias/ml	
	Estação 1	Estação 2
Mai.	3.5 . 10 ²	3.0 . 10 ²
Jun.	2.5 . 10 ²	2.0 . 10 ²
Jul.	1.3 . 10 ²	0.8 . 10 ²
Ago.	3.5 . 10 ²	1.75 . 10 ²
Set.	3.0 . 10 ²	1.7 . 10 ²
Out.	4.5 . 10 ²	3.5 . 10 ²
Nov.	18.0 . 10 ²	9.0 . 10 ²
Dez.	9.0 . 10 ²	4.5 . 10 ²
Jan.	9.0 . 10 ²	6.0 . 10 ²
Fev.	16.0 . 10 ²	9.0 . 10 ²
Mar.	18.0 . 10 ²	18.0 . 10 ²
Abr.	9.0 . 10 ²	6.0 . 10 ²

(1) Meio malato semi-sólido isento de nitrogênio.

quantidade de nutrientes na água, ou mesmo provocar a entrada de bactérias de áreas adjascentes, possibilitando a alteração na densidade da população bacteriana. Valores de março e julho foram coincidentes com os de alta e baixa temperatura, respectivamente, para ambas estações de coleta. A temperatura tem sido considerada como um fator que pode ter mais de um componente de ação, influenciando não apenas a atividade fisiológica dos organismos, mas criando diferentes condições ambientais ou a estratificação térmica do ambiente (20, 25, 26), que podem influenciar o desenvolvimento das populações. Maiores populações bacterianas têm sido encontradas no verão (1, 16, 19), nas mais diversas regiões climáticas, muitas vezes com efeitos mais evidentes na população de um grupo fisiológico do que sobre a população heterótrofa total (12).

Durante todo o período de estudo, foi observada a presença de bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, para ambas estações de coleta, mas com maior ocorrência das mesmas na estação 1. Testes estatísticos comparativos (21) permitiram constatar diferenças em níveis significativos para as médias do número de bactérias, entre as estações de coleta, durante a variação sazonal.

Fatores que agem na variação da população heterótrofa total, tais como introdução de nutrientes e bactérias dos sedimentos na

coluna de água devido à pouca profundidade (24), predominância de macrohidrófitas que, por decomposição podem originar matéria orgânica particulada e dissolvida (7), introdução de bactérias por efluentes (4, 7), podem, provavelmente, auxiliar a explicação nas diferenças de densidade de bactérias, entre as duas estações de coleta, desde que a estação 1 esteja sujeita à ação de tais fatores. Mesmas considerações foram anteriormente encontradas para a represa (8), em se tratando da distribuição horizontal da população bacteriana heterótrofa total, tornando possível evidenciar uma situação crescente de eutrofia, da baixa (estação 2) para a alta represa (estação 1).

Além dos fatores anteriormente citados, parâmetros físico-químicos tem sido relatados como importantes no controle da população bacteriana heterótrofa total (12). Assim, bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, como um grupo fisiológico pertencente à população heterótrofa total, podem ter sua variabilidade explicada para as duas estações de coleta, em função da atuação de tais parâmetros, desde que ambas as estações apresentam diferenças estatisticamente significativas, com relação às médias dos mesmos.

Das equações fornecidas pelo programa de regressão simples, para cada estação de coleta e para cada par de variável relacionada, dentro do trecho estudado $x > 0$, as monologarítmicas foram as mais explicativas, em função dos valores de r , r^2 e F (Figuras de 4 a 7), com relação à distribuição de bactérias. Os resultados permitiram demonstrar que:

1) a expressão que melhor se ajusta à variação do número de bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, com relação aos parâmetros físico-químicos, para cada estação de coleta, é uma função exponencial da fórmula:

$$\ln y = A + Bx \longrightarrow y = e^{A+Bx};$$

2) baseado nos valores dos coeficientes de correlação (r^2), podemos afirmar que: há correlação positiva e altamente significativa, entre o número de bactérias e as variáveis temperatura e condutividade, para as duas estações de coleta (Figuras 4 e 7); há correlação negativa e altamente significativa, entre o número de bactérias e oxigênio dissolvido, para ambas estações de coleta (Figura 5);

Fig.4-Varição do NMP/ml de bactérias microaerófilas em função da Temperatura, para ESTAÇÃO 1:
 $\ln y = 1,07 + 0,23x \Rightarrow y = e^{1,07 + 0,23x}$
 $\frac{dy}{dx} = 0,23 \cdot e^{1,07 + 0,23x}$
 $r = 0,87; r^2 = 0,75; F = 30,43.$

para ESTAÇÃO 2:
 $\ln y = 0,44 + 0,30x \Rightarrow y = e^{0,44 + 0,30x}$
 $\frac{dy}{dx} = 0,30 \cdot e^{0,44 + 0,30x}$
 $r = 0,87; r^2 = 0,76; F = 31,28.$

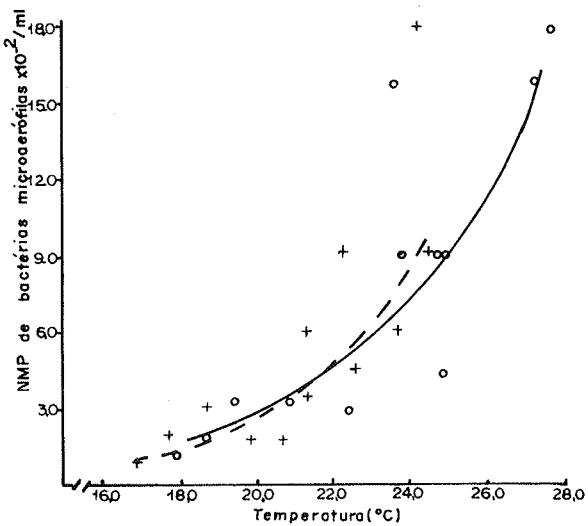


Fig.5-Variação do NMP/ml de bactérias microaerófilas em função do teor de O_2 dissolvido, para ESTAÇÃO 1:
 $\ln y = 11,19 - 0,77x \Rightarrow y = e^{11,19 - 0,77x}$
 $\frac{dy}{dx} = -0,77 \cdot e^{11,19 - 0,77x}$
 $r = -0,81; r^2 = 0,66; F = 19,72.$

para ESTAÇÃO 2:
 $\ln y = 12,01 - 0,82x \Rightarrow y = e^{12,01 - 0,82x}$
 $\frac{dy}{dx} = -0,82 \cdot e^{12,01 - 0,82x}$
 $r = -0,91; r^2 = 0,82; F = 46,39.$

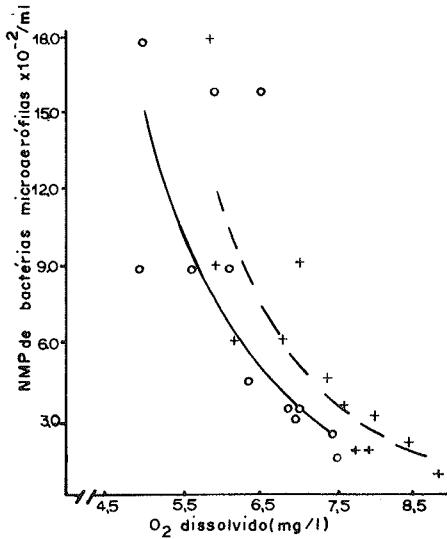


Fig.6-Variação do NMP/ml de bactérias microaerófilas em relação ao pH, para as ESTAÇÕES 1 e 2.

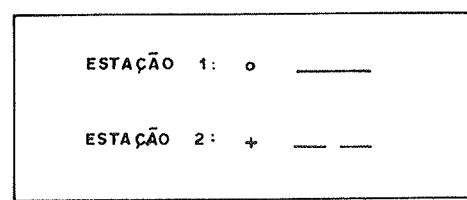
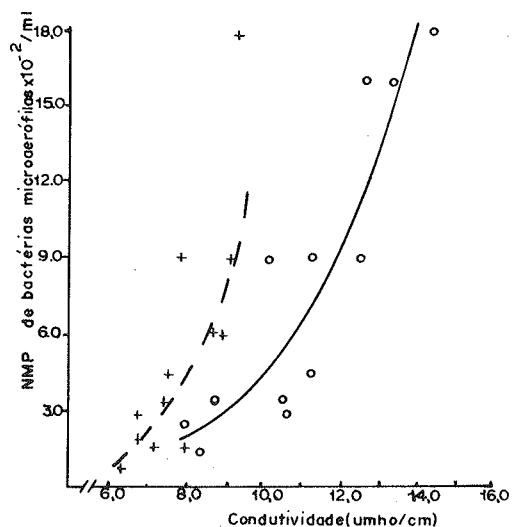


Fig.7-Variação do NMP/ml de bactérias microaerófilas em função da Condutividade para ESTAÇÃO 1:
 $\ln y = 2,34 + 0,37x \Rightarrow y = e^{2,34 + 0,37x}$
 $\frac{dy}{dx} = 0,37 \cdot e^{2,34 + 0,37x}$
 $r = 0,87; r^2 = 0,76; F = 30,91.$

para ESTAÇÃO 2:
 $\ln y = 0,85 + 0,65x \Rightarrow y = e^{0,85 + 0,65x}$
 $\frac{dy}{dx} = 0,65 \cdot e^{0,85 + 0,65x}$
 $r = 0,81; r^2 = 0,66; F = 19,02$



3) sendo os coeficientes de correlação altamente significativos, é possível calcular o número de bactérias, dentro do intervalo de estudo $x > 0$, em função de cada parâmetro (temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade) para cada estação de coleta, a partir da taxa de variação do número de bactérias (Figuras 4, 5 e 7), cuja fórmula é:

$$\frac{dy}{dx} = B \cdot e^{A+Bx};$$

4) o intervalo de variação do pH, para ambas as estações, foi insuficiente para determinar uma relação que explique a variação do número de bactérias em função de tal parâmetro (Figura 6);

5) em função dos coeficientes de regressão (r), podemos considerar que a média, ao redor de 80% da variabilidade do número de bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, para as duas estações, po-

de ser explicada como resultado da atuação de temperatura, oxigênio dissolvido e condutividade.

Pudemos assim estabelecer que as duas estações de coleta apresentam diferenças estatisticamente significativas, em função de suas características físico-químicas e de outras variáveis a que a estação 1, particularmente, está sujeita (ação de efluentes, pequena profundidade, presença de macro-hidrófitas) e que tais condições podem provavelmente, explicar a variabilidade do número de bactérias para as duas estações de coleta e a maior ocorrência das mesmas para a estação 1. O fato de que bactérias microaerófilas, fixadoras de nitrogênio, estejam presentes, durante toda variação sazonal, não é prova de que elas estejam realmente fixando nitrogênio no ambiente, mas esta capacidade, pode ser útil ao crescimento e sobrevivência destes microrganismos em determinado habitat (2, 3, 13).

Referências Bibliográficas

1. Boyd, W.L. & Boyd, J.W. — A bacteriological study of an arctic coast lake. *Ecology*, 44:705-710, 1963.
2. Brezonik, P.L. & Harper, C.L. — Nitrogen fixation in some anoxic lacustrine environments. *Science*, 164:1277-1279, 1969.
3. Brooks, R.H.; Brezonik, P.L.; Putnam, H.D. & Keirn, M. — Nitrogen fixation in a estuarine environment: the Waccasassa on the Florida Gulf coast. *Limnol. Oceanogr.*, 16:701-710, 1971.
4. Colins, V.G. — The distribution and ecology of Gram-negative organisms other than *Enterobacteriaceae* in lakes. *J. Appl. Bact.*, 23:510-514, 1960.
5. Dobereiner, J.; Married, J.E. & Nery, M. — Ecological distribution of *Spirillum lipoferum* Beijerinckia. *Can. J. Microbiol.*, 10:1464-1473, 1976.
6. Dugdale, V.A. & Dugdale, R.C. — Nitrogen metabolism in lakes. II — Role of nitrogen fixation in Sanctuary Lake, Pennsylvania. *Limnol. Oceanogr.*, 7:170-177, 1962.
7. Fonden, R. — Heterotrophic bacteria in Lake Mälaren and Lake Hjalmaren. *Oikos*, 20:344-372, 1969.
8. Godinho, M.J.L. — Ciclo sazonal, "standing-stock" e distribuição do bacteriplanton em ecossistema lacustre artificial (Represa do Lobo, São Carlos). Depto. Zoologia USP, 1976. (Tese de Mestrado).
9. Golterman, H.L. — Methods for chemical analysis of fresh water. vol. 8. London, Blackwell Sci. Publ., IBP Handbook, 1970.
10. Hardy, R.W.F.; Holsten, R.D.; Jackson, E.K. & Burns, R.C. — The acetylene-ethylene assay for N_2 fixation: laboratory and field evaluation. *Plant Physiol.*, 43:1185-1207, 1968.
11. Jannasch, H.W. & Jones, G.E. — Bacterial population in sea water as determined by different methods of enumeration. *Limnol. Oceanogr.*, 44:128-139, 1959.
12. Jones, J.G. — Studies on fresh water bacteria: factors which influence the population and its activity. *J. Ecol.*, 59:593-613, 1971.
13. Keirn, M.A. & Brezonik, P.L. — Nitrogen fixation by bacteria in Lake Mize, Florida, and in some lacustrine sediments. *Limnol. Oceanogr.*, 16:720-731, 1971.
14. Krieg, N.R. — Taxonomy of the root associated nitrogen fixer *Spirillum lipoferum*. Int. Symposium on the Limitations and Potentials of Biological Nitrogen Fixation in the Tropics, Brasília, Brazil, 1977.
15. Krieg, N.R. & Hylemon, P.B. — The taxonomy of the chemoheterotrophic Spirilla. *Ann. Rev. Microbiol.*, 30: 303-325, 1976.
16. Kuznetsov, S.I. — The microflora of lakes and its geochemical activity. Austin, Univ. of Texas Press, 1970.
17. Mood, A.M. & Graybill, F.A. — Introducción a la teoría de la Estadística. Madrid, Aguilar, 1966.
18. Pochon, J. & Tardieu, P. — Techniques d'analyses en microbiologie du sol. Editions de la Tourelle, 1962.

19. Rai, H. & Hill, G. — Bacteriological studies on Amazonas, Mississippi and Nile waters. *Arch. Hidrobiol.*, 81:445-461, 1978.
20. Ruttner, F. — Fundamentals of limnology. Toronto, University of Toronto Press, 1975.
21. Santos, J.E. — Fixação de nitrogênio em ambiente aquático por bactérias heterótrofas. *Univ. Fed. de São Carlos*, 1979. (Tese de Mestrado).
22. Stewart, W.D.P. — Biological and ecological aspects of nitrogen fixation by free living microorganisms. *Proc. Roy Soc. B.*, 172:367-388, 1969.
23. Stewart, W.D.P.; Fitzgerald, G.P. & Burris, R.H. — In situ studies on N₂ fixation using the acetylene reduction technique. *Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.*, 58:2071-2078, 1967.
24. Tundisi, J.G. — Produção primária, "standing-stock" e fracionamento do fitoplâncton na região lagunar de Cananéia. São Paulo, USP, 1969. (Tese de Doutoramento).
25. Tundisi, J.G.; Strixino, G.; Marins, M.; Tundisi, T.M.; Strixino, S.; Morais, E.M. & Santos, E.P. — Pesquisa em ecologia aquática: estudos ecológicos em ambiente lacustre. I — Resultados e análises de dados do levantamento geral de fatores ambientais (Julho, 1971). *Univ. Fed. de São Carlos*, 1972.
26. Tundisi, J.G.; Strixino, G.; Martins, M.; Tundisi, T.M.; Strixino, S.; Morais, E.M. & Santos, E.P. — Pesquisa em ecologia aquática: estudos ecológicos em ambiente lacustre. II — Resultados e análises de dados do levantamento geral de fatores ambientais (Fevereiro, 1972). *Univ. Federal de São Carlos*, 1972.

Production of glucoamylase by *Dactylium dendroides*

Odilia L. Negrão
José D. Fontana
& Glaci T. Zancan

*Dept.^o de Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Caixa Postal 939
80000 Curitiba PR, Brasil*

Summary

The mold *Dactylium dendroides* accumulated into the culture medium a glucoamylase depending on the carbon source used for growth. Yields were highest with starch, whereas no enzyme or only traces of it were obtained when the carbon source was glycerol or glucose. Optimum pH and temperature for this enzyme were determined. Hydrolysis limit for glycogen, amylose and amilopectin were 84%, 100% and 100% respectively. *D. dendroides* glucoamylase hydrolyzed soluble starch from cassava and potato more efficiently than soluble starch from corn.

Resumo

Produção de glucoamilase por Dactylium dendroides

O fungo *Dactylium dendroides* liberou no meio de cultura uma glucoamilase, dependendo da fonte de carbono utilizada. Maiores rendimentos foram obtidos com amido solúvel, enquanto apenas traços ou nenhuma enzima foi detectada quando a fonte de carbono era glicerol ou glucose. Aspectos da produção da enzima, pH e temperatura ótimos foram estudados. O limite de hidrólise do glicogênio, amilose e amilopectina foi 84%, 100% e 100% respectivamente. A glucoamilase hidrolisou amido solúvel da mandioca e de batata mais eficientemente que o amido solúvel de milho.

Introduction

The extracellular glucoamylase (α -D-(1 → 4) glucan hydrolase (EC 3.2.1.3) produced by several fungi has been employed for the industrial depolymerization of starch (5, 23). In this report the present data on the production and characterization of a glucoamylase from *Dactylium dendroides*.

the enzyme the mold was grown in the above medium supplemented with 0.2% starch.

Potato or cassava roots (40g) were blended in a Waring blender with distilled water or 0.1M phosphate buffer, pH 5.8. The suspension was filtered in cheese-cloth and the filtrate sterilized under steam during 20min. and used as culture medium.

Material and Methods

Organism and growth conditions — A strain of the ascomycete *Dactylium dendroides* producer of galactose oxidase (7) was maintained on slants of Sabouraud glucose agar in our laboratory since its original isolation and was stored at 4°C. The mold was grown in the liquid medium described by Markus (11) with 0.2% of carbon source and 1 μ g/ml of thiamine. Cultures were routinely incubated for 48h at 28°C in a rotatory shaker at 100rpm. For characterization of

Enzyme source — The culture was filtered in cheese-cloth and the filtrate was used as enzyme source after lyophilization and storage at 4°C.

Dry weight determinations — Mycelia were harvested by suction filtration on filter paper, washed with distilled water and dried at 60°C until constant weight.

Glucoamylase activity — The enzyme system contained 4mg of soluble boiled starch, 20 μ moles of MES (morpholino)

ethane sulfonic acid) pH 6.0 and the enzyme in a final volume of 1.0ml. The mixture was incubated in a Dubnoff shaker for 30min. at 50°C and the reaction stopped by heating for 5min. in boiling water. Glucose was determined by glucose oxidase (2) and reducing sugars were measured by the method of Somogyi (19) and Nelson (14).

One unit of glucoamylase was defined as the amount of enzyme releasing 1 μmol of glucose per minute under the conditions of the experiment. Specific activity indicated enzyme units per mg of protein in the culture medium filtrate.

Determination of protein — The protein concentration was determined by the method of Lowry & col. (10) using bovine serum albumin (Sigma) as standard. For the experiment with resting cells the protein content in the medium was determined by the method of Warburg (21).

Polysaccharide hydrolysis — Percent hydrolysis of polysaccharide by the enzyme was calculated considering as 100% the amount of glucose release by acid hydrolysis with 1N H_2SO_4 at 100° for 4 hours, corrected for glucose lost (12).

Amylolytic activity — The amylolytic activity was determined by the method of Drummond & col. (3).

Reagents — Soluble starch, glycerol and D-glucose were purchased from Merck, Darmstadt, Germany, glycogen, amylose, amylopectin, maltotriose, trehalose, melibiose, gentibiose and methyl-D-glucoside were products of Sigma Chemical Co. Missouri USA; maltose, sucrose, turanose, cellobiose were supplied by Calbiochem Co. Potato starch, cassava starch and corn starch were prepared according to Schoch (18) and oxidized amylose according to Buonocore (1). Glucose oxidase, peroxidase and O-dianisidine were from Sigma Chemical Co.

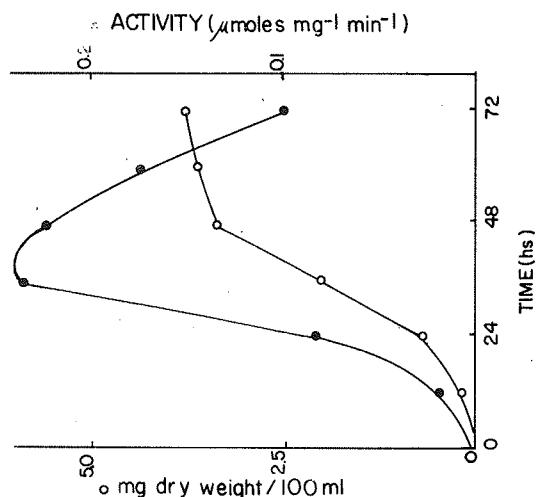
Results

Glucoamylase accumulation in the growth medium — The effect of the carbon source on the production of glucoamylase is shown in Table 1. The enzyme activity was almost

Table 1 — Effect of carbon source

Carbon source	Specific activity ($\mu\text{mol glucose mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Glycerol	0.00
D-glucose	0.01
D-Cellobiose	0.28
D-Melibiose	0.37
D-Maltose	3.40
Soluble starch	8.29

Figure 1 — Relationship between organism growth and enzyme production



undetectable when the mold was grown with glycerol or glucose.

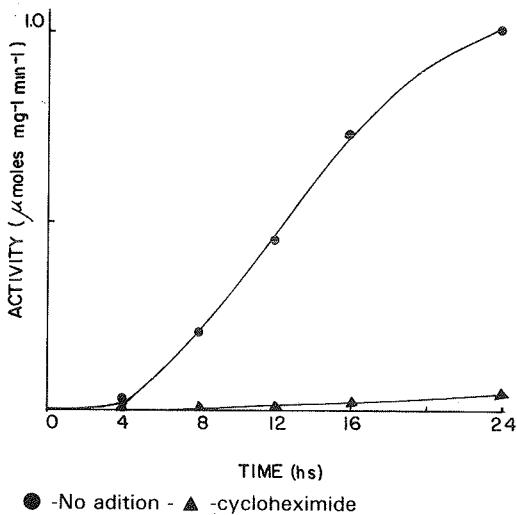
Since starch was the best inducer of the enzyme among other saccharides tested, it was generally used as carbon source. As shown in Fig. 1 glucoamylase accumulation in the medium was highest during the logarithmic phase of growth. The production of enzyme decreased when the minimum mineral medium containing 0.2% soluble starch was replaced by potato or cassava liquor (Table 2) in spite of the normal mycelium growth in the latter. When the mold grown in glucose was transferred to a

Table 2 — Effect of the culture medium

Medium	Specific activity ($\mu\text{mol glucose mg}^{-1} \text{min}^{-1}$)
Minimum medium-0.2% starch pH 5.8	8.20
Potato in 0.1M phosphate buffer pH 5.8	6.27
Potato in distilled water pH 6.1	5.40
Cassava in 0.1M phosphate buffer pH 5.8	1.41
Cassava in distilled water pH 6.1	1.76

medium containing 0.08% of starch the enzyme levels increased (Fig. 2). The formation of glucoamylase was completely inhibited by cycloheximide.

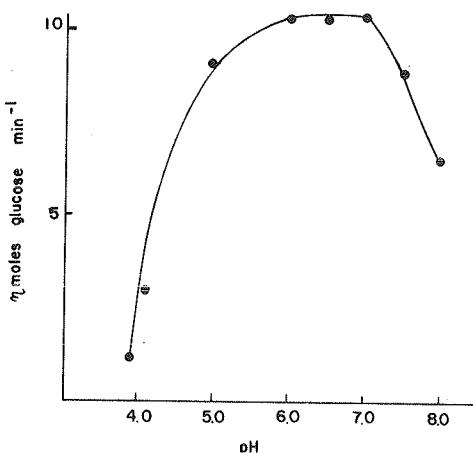
Figure 2 — Glucoamylase formation in an induction medium: 1.5g of wet mycelium grown in glucose medium as incubated in minimal medium (9) containing 0.08% soluble starch with or without cycloheximide (20 μ g/ml)



Enzyme characterization — All attempts to purify the enzyme failed as it became insoluble with decreasing ionic strength. Enzyme characterization was then performed with crude preparations.

The glucoamylase was active at pH values in the range of 4.5-8.0 with optimum pH at 5.6-7.2 (Fig. 3). The optimum temperature was 60°C (Fig. 4A) at pH 6.5

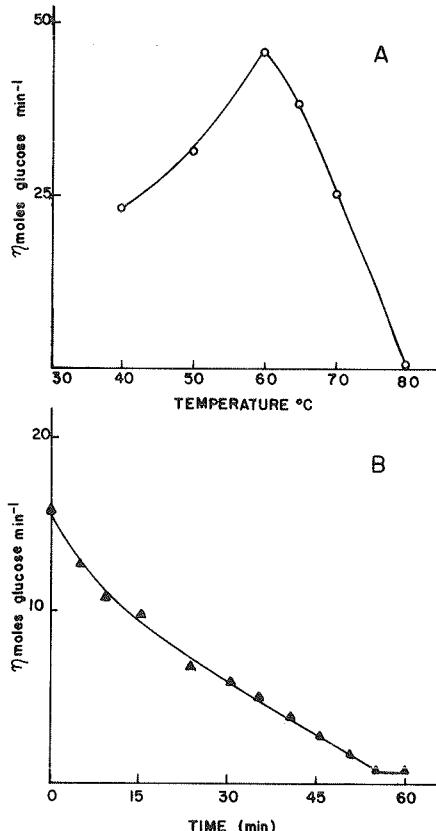
Figure 3 — Dependence of starch hydrolysis on pH



Buffers were 0.05M acetate citrate (pH 3.7 to 5.6); 0.05M MES (2 (N-morpholino) ethane sulfonic acid) (pH 5.6 to 7.0); HEPES (N-2-hydroxyethylpiperazine N'-2-ethanesulfonic acid) (pH 6.8 to 8.0)

with the enzyme losing 50% of its activity after 20min. at this temperature in the absence of substrate (Fig. 4B). The specificity of crude preparations for glycosides is shown in Table 3.

Figure 4 — Effect of temperature on enzyme activity



A) Optimum temperature: 1ml of the reaction mixture containing 20 μ moles of MES pH 6.5, 4mg of soluble starch and 7.3 μ g of protein was incubated at the indicated temperature for 15min.

B) Thermal inactivation at 60°C: A mixture of 3.6 μ g of protein, 70 μ mol of MES pH 6.5 was incubated at 60°. At various time intervals aliquots were taken and glucoamylase activity was determined as described in Material and Methods.

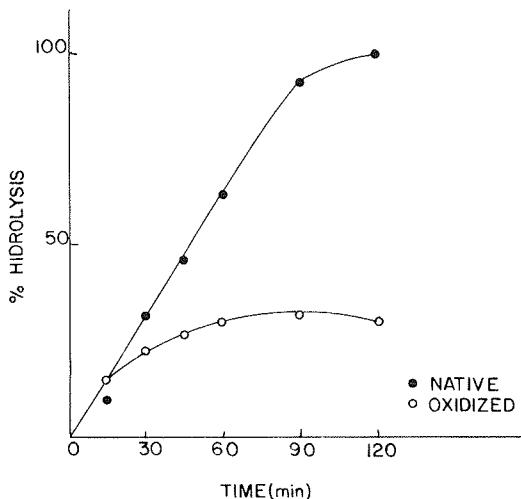
Table 3 — Specificity of enzyme hydrolysis

Substrate	nmol min^{-1}
Maltotriose	17.77
Maltose	11.42
Trehalose	4.65
Sucrose	1.69
Gentibiose	6.77
Melibiose	0.00
Turanose	0.80
Cellobiose	4.65
Methyl α -D-glucoside	0.00

System: 2 μ g of protein, 1000 μ mol of substrates, 10 μ moles of MES buffer pH 6.0 to a final volume of 0.5ml was incubated 15min. at 50°C, and glucose liberated was determined by glucose oxidase.

Determination of the amyloytic pattern — The enzyme was able to hydrolyse native amylose but only 30% of oxidized amylose was degraded (Fig. 5). These results are consistent with a typical exoamylolytic activity.

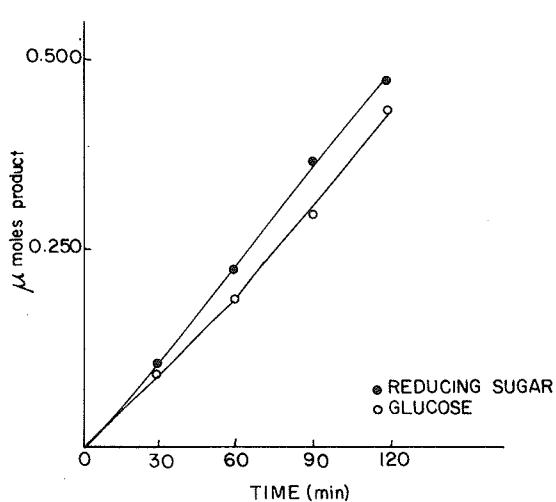
Figure 5 — Hydrolysis pattern of amylose with native and oxidized amylose at 50°C



Samples were collected at different intervals and reducing sugars were determined. The maximal activity with native amylose was taken as 100%.

Chromatography of products of 15min. glucoamylase hydrolysis of starch gave only one spot with Rf identical to that of glucose in butanol: pyridine: water. The relationship between reducing sugar and glucose after one hour was 1:1.19. (Fig. 6).

Figure 6 — Time course of soluble starch hydrolysis



1ml of the reaction mixture containing 20 μmoles of MES pH 6.0, 2mg of soluble starch and 2.3 μg protein were incubated at 50°C

Hydrolysis of polysaccharides — Amylose and amylopectin were completely hydrolyzed by the enzyme preparation as shown in Fig. 7A whereas 84% of glycogen was converted to glucose after 240min. Soluble starches from different sources are also hydrolysed at different rates. (Fig. 7B). No hydrolysis was detected with unboiled starch even after 24 hours of incubation.

Discussion

Extracellular glucoamylase was obtained when different saccharides were supplied as sources of carbon and energy. With glycerol or glucose, however only traces of enzyme were detected even in the presence of rapid growth and normal mycelial development. The high yield in maltose or trehalose supplemented medium shows that highly polymerized substrates such as starch are not essential for the formation of glucoamylase since oligosaccharides containing one α -glucosidic bond are equally effective.

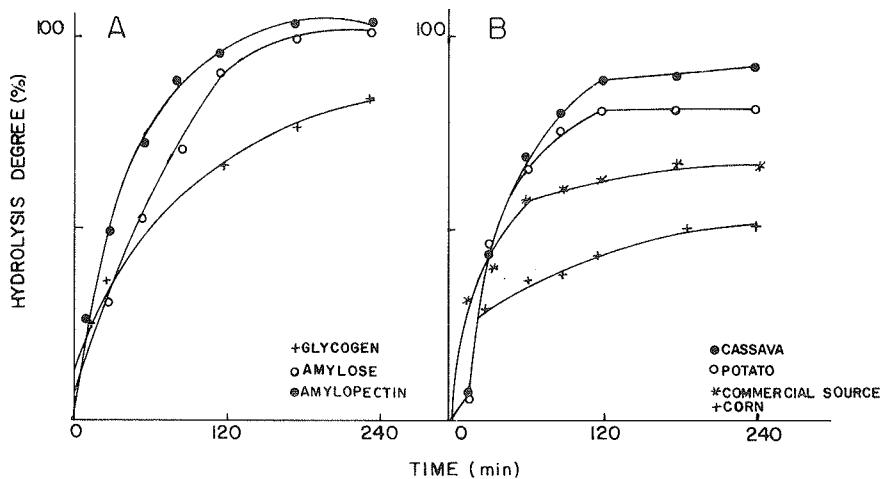
The addition of cycloheximide to starch-growing cells halted any increase in enzyme activity. This result suggests that glucoamylase is synthesized *de novo*.

Low specific activities were observed when the mold was grown in cassava liquor. This could be due to the presence of an inhibitor, probably cyanogenic glucosides (13) since protein and carbohydrate contents of potato and cassava liquors were similar.

D. dendroides glucoamylase had an optimum pH of 5.6-7.2 similar to the glucoamylases from *Aspergillus oryzae* (15). It was inactivated at pH values lower than 3.0 as with the enzyme of *Humicola lanuginosa* (20). Optimum temperature was 60°C and the reaction was linear up to 120 minutes. The enzyme lost its activity after 50min. in the absence of starch suggesting that the substrate protected against heat inactivation. It was more stable than similar enzymes produced by fungi (20, 25) but was less stable than the enzyme from *A. niger*, which is used in industrial process (23).

D. dendroides enzyme was active against oligosaccharides but a highly purified glucoamylase (16) from *A. niger* was also able to hydrolyse glucosides showing a certain degree of non specificity. The β -glyco-

Figure 7 — Hydrolysis of polysaccharides



The reaction mixture (1ml) containing 2mg of polysaccharide, 50 μ moles of MES pH 6.0 and 9.1 μ g of protein was incubated at 50°C.

sidase detected in our preparations could be due to contamination.

Since our enzyme preparation showed an activity with oxidized amylose weaker than that with other glucoamylases (25) it probably did not contain an α -amylase contamination.

Hydrolysis limits of polysaccharides and soluble starches with *D. dendroides* enzyme were similar to those with other glucoamylases (4, 6, 8, 9, 17, 24). The differential degree of hydrolysis observed with starches

isolated from cassava, potato and corn is probably associated to the different composition of the starches (22).

Acknowledgements

We thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP) for financial support.

References

- Buonocore, V.; Poerio, E.; Silano, L.V. & Tomasi, M. — Physical and catalytic properties of amylase from *Tenebrio molitor* L. Larvae. *Biochem. J.*, 153:21-25, 1976.
- Dalhkqvist, A. — Determination of maltase and isomaltase activities with a glucose oxidase reagent. *Biochem. J.*, 80:547-551, 1961.
- Drummond, G.S.; Smith, E.E. & Whelan, W. — A general method for distinguishing between endo and exoactions of carbohydrases. *FEBS letters*, 15:302-304, 1971.
- Fukui, T. & Nikum, N. — Preparation and properties of glucoamylase from *Endomyces* species II 00111. *Agr. Biol. Chem.*, 33:884-891, 1969.
- Greenwood, C.T. & Milne, E.A. — Starch degrading and synthesizing enzymes: a discussion of their properties and action pattern. *Adv. Carbohydr. Chem.*, 23:281-366, 1968.
- Tisuka, H. & Mineki, S. — Studies on the genus *Monascus*. II — Purification and properties of two forms of glucoamylase from *Monascus Kaoliang*. Nov. Sp. F-1. *J. Gen. Appl. Microbiol.*, 23:217-230, 1978.
- Kemmelmeier, C. & Zancan, G.T. — Studies on the taxonomy of galactose oxidase mold producer. *Arq. Biol. Tecnol. (Brasil)*, 21:75-78, 1978.
- King, N.J. — The glucoamylase of *Coniophora cerebella*. *Biochem. J.*, 105:577-583, 1967.
- Lineback, D.E. — Properties of a glucoamylase from *Aspergillus phoenicis*. *Carbohydr. Res.*, 14:341-353, 1970.
- Lowry, O.H.; Rosembrough, A.; Farr, A.L. & Randall, R.J. — Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, 193:265-275, 1951.
- Markus, Z.; Miller, G. & Avigad, G. — Effect of culture conditions on the production of D-galactose oxidase by *Dactylium dendroides*. *App. Microbiol.*, 13:86-93, 1965.
- Marshall, J.J. & Whelan, W.J. — Detection of endo-acting carbohydrases particular in the presence of exoenzymes acting on the same substrate. *Anal. Biochem.*, 43:316-320, 1971.
- Nartley, F. — Studies on cassava *Manihot utilissima* Pohl. I — Cianogenesis: the biosynthesis of

- Linamarin and Lotaustralin in etiolated seedlings. *Phytochemistry*, 7:1307-1312, 1968.
14. Nelson, N.A. — A photometric adaptation of the Somogyi method for the determination of glucose. *J. Biol. Chem.*, 153:375-380, 1944.
15. Ohga, M.; Shimazu, K. & Morita, Y. — Studies on amylases of *Aspergillus oryzae* cultures on rice. II — Some properties of glucoamylases. *Agr. Biol. Chem. (Tokyo)*, 30:967-972, 1966.
16. Pazur, J.H. & Kleppe, K. — Hydrolysis of D-glucosides by Amyloglucosidase from *Aspergillus niger*. *J. Biol. Chem.* 237:1002-1006, 1962.
17. Phillips, L.S. & Caldwell, M.L. — A study of the purification and properties of a gluco forming amylase from *Rhizopus delemar*, glucoamylase. *J. Am. Chem. Soc.*, 73:3563-3568, 1951.
18. Schoch, T.J. — Preparation on starch and starch fractions. In: — Colowick, S.P. & Kaplan, N.O., eds. — *Methods in enzymology*. vol. III. New York, Academic Press, 1957.
19. Somogyi, M. — A new reagent for the determination of sugars. *J. Biol. Chem.*, 160:61-68, 1945.
20. Taylor, P.M.; Napier, E.J. & Fleming, I.D. — Some properties of glucoamylase produced by the thermophilic fungus *Hemicoloma lanuginosa*. *Carbohydr. Res.*, 61:301-308, 1978.
21. Warburg, O. & Cristian, W. — Isolierung und Kristallisation des fermenten enolase. *Biochem. Z.*, 310:384-391, 1941.
22. Whistler, R.L. & Paschall, E.F., eds. — *Starch: chemistry and technology*. New York, Academic Press, 1967.
23. Wiseman, A. — Enzyme utilization in industrial processes. In: — Wiseman, A. — *Handbook of enzyme biotechnology*. New York, Ellis Horwood, 1975.
24. Yamasaki, Y.; Susuki, Y. & Ozawa, J. — Purification and properties of two forms of glycoamylase from *Penicillium oxalicum*. *Agr. Biol. Chem.*, 41:755-762, 1977.
25. Yamasaki, Y.; Tsuboi, A. & Susuki, Y. — Two forms of glucoamylase from *Mucor rouxinus*. II — Properties of the two glucoamylase. *Agr. Biol. Chem.*, 41:2139-2148, 1977.

Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil

Walderez Gambale

Adhemar Purchio

& Claudete Rodrigues Paula

Dept.^o de Microbiologia e Imunologia, Instituto de Ciências Biomédicas USP,
Seção de Micologia, Ed. Biomédicas II, Cidade Universitária
05568 São Paulo SP, Brasil

Resumo

Através do método de exposição ao ar de placas de Petri contendo ágar Sabouraud adicionado de cloranfenicol (100 μ g/ml) foram realizadas 360 coletas de fungos no ar, distribuídas mensalmente: 10 coletas às 9 horas, 10 às 15 horas e 10 às 21 horas, num período de 12 meses. Estudou-se a variação periódica (manhã, tarde e noite) de fungos dos gêneros mais comuns em São Paulo: *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhodotorula* e *Aureobasidium* e ainda dos fungos não esporulados, bolores e leveduras totais. Leveduras totais e gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Rhodotorula* não tiveram variação de freqüência nos três períodos. Bolores totais e *Epicoccum* spp. ocorreram em ordem crescente de freqüência às 21, 9 e 15 horas. Os fungos não esporulados e dos gêneros *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Fusarium* e *Alternaria* ocorreram com maior freqüência às 15 horas em relação às 21 horas e o último também em relação às 9 horas. Os fungos não esporulados e os bolores esporulados tiveram comportamento semelhante, nos horários de maior freqüência. No período noturno, não houve variação significativa de freqüência dos fungos, sugerindo que os fatores que condicionam a dispersão aérea desses microrganismos não apresentam expressão nesse período.

Summary

Daily periodicity of airborne fungi from São Paulo city, Brazil

Petri's dishes containing Sabouraud agar with chloramphenicol (100 μ g/ml) were exposed to the air, at a determined place of São Paulo city, performing 360 samples monthly distributed: 10 at 9a.m., 10 at 3p.m. and 10 at 9p.m., on a period of 12 months. It was studied the periodical variation of the most common genera of fungi in São Paulo: *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Rhodotorula*, *Aureobasidium* and also the not sporulates fungi, molds and total yeasts. Total yeasts and *Aspergillus*, *Penicillium* and *Rhodotorula* genera did not have the variation of frequency on the periods. Total molds and *Epicoccum* spp. occurred on an increasing order of frequency at 9p.m., 9a.m. and 3p.m. The not sporulated fungi and *Cladosporium*, *Aureobasidium*, *Fusarium* and *Alternaria* genera occurred with major frequency at 3p.m. related to 9p.m. and latter also related to 9a.m. The not sporulated fungi and the sporulated molds had a similar behavior in the hours of major frequency, suggesting that the factor which regulates the aerial dispersion of these microorganisms do not present any value in this period.

Introdução

Um dos primeiros autores a observar a periodicidade diária de microrganismos foi Miquel (11), que verificou em 1884, a maior ocorrência de fungos e bactérias no período diurno. Álvarez & Castro (3) e Sreeramulu (20) salientaram maior concentração de fungos no ar, à noite. Em 1952, Gregory (7) res-

saltou que os ascomicetos e basidiomicetos apresentam maiores freqüências à noite, enquanto que os deuteromicetos manifestam um padrão vespertino.

Os resultados são controversos: alguns relatam maior número de fungos no ar, em período matutino (13, 19, 22), em período vespertino (9, 18, 21), enquanto outros co-

mo Medrano (10), não indicam diferenças significativas, entre os períodos diurnos e noturnos.

Mishra & Kamal (12) notaram variações horárias de fungos no ar, de acordo com a época sazonal. No inverno, o maior número ocorreu à noite; no verão, pela manhã. Os autores sugeriram que o conteúdo de esporos no ar difere nos três períodos diários, dependendo da vegetação e das condições climáticas do local em estudo.

Todos os trabalhos citados referem-se, de maneira geral, ao número total de fungos. A periodicidade diária foi analisada ainda sob outro aspecto, ou seja, a variação da freqüência de alguns gêneros nos períodos diários. Assim, é salientada na literatura, ocorrência predominante para o gênero *Cladosporium* nos períodos matutino (4, 10), vespertino (4, 8, 17) e noturno (1, 16).

Para o gênero *Alternaria* foram também encontradas freqüências máximas de manhã (1, 4, 16) e a tarde (8, 14, 16). Com efeito, Pathak & Pady (17) verificaram que, para esse gênero, o máximo de freqüência ocorria ao meio dia, decrescendo à tarde e aumentando novamente ao redor de 18 horas. Pady & col. (15) concluíram que nos dois gêneros não havia padrão consistente de comportamento, na periodicidade diária. Da mesma maneira, para o gênero *Fusarium* foram especificadas freqüências máximas no período matutino (1, 12, 17) e noturno (15).

Panzer & col. (16) verificaram a maior ocorrência de *Penicillium* spp. durante o dia. Hamilton (8) salientou a predominância desse fungo, assim como do gênero *Aspergillus*, no período vespertino. Agarwal & col. (1) assinalaram esse fato no período matutino. Por outro lado, Barkai-Golan (4) não obteve dados conclusivos sobre os referidos gêneros.

Resultados discordantes têm sido verificados em estudos sobre outros fungos, como *Epicoccum* spp. e leveduras, com observações de freqüências máximas tanto no período noturno (15, 16) como no matutino (1).

Considerando os resultados divergentes de freqüência dos fungos no ar, com referência à periodicidade diária, bem como a ausência de estudos específicos no ecossistema da cidade de São Paulo, o presente trabalho teve por finalidade trazer novas contribuições referentes a este assunto enfocando bolores, leveduras e fungos não esporulados.

Material e Métodos

O experimento foi realizado no Campus da Universidade de São Paulo, Cidade Universitária Armando de Salles Oliveira, situado a 23°34'S de latitude e 46°44'W de longitude numa altitude de 795m. Utilizou-se o método de exposição, durante 15 minutos, de placas de Petri (10 x 100mm) contendo ágar Sabouraud (DIFCO) adicionado de 100 µg de cloranfenicol/ml. As coletas foram realizadas no mesmo local, na região sul do campus, sendo as placas colocadas a uma altura de 60cm do solo.

Após as exposições, as placas foram incubadas a 25-27°C durante 5 dias, anotando-se em seguida o número total de colônias de bolores e leveduras. Colônias dos gêneros mais freqüentes em São Paulo (6): *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Rhodotorula*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Aureobasidium*, *Phoma*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Trichoderma* e *Cephalosporium*, assim como dos que não apresentaram esporos, foram contadas e identificadas através dos métodos usuais de classificação micológica.

O experimento foi realizado no período de 21 de março de 1978 a 21 de março de 1979. Durante dez dias de cada mês, escollidos ao acaso, foram realizadas 30 coletas assim distribuídas: 10 coletas às 9 horas, 10 às 15 horas e 10 às 21 horas, totalizando 360 coletas no final do período estudado.

Na comparação dos resultados obtidos utilizou-se o modelo de análise de variância (5) e o teste de Tukey (5), para determinação das diferenças significativas.

Todo o trabalho foi baseado num nível de significância = 0,05, sendo os dados processados em computador modelo B67000.

Resultados

Foram coletadas, através de 360 exposições de placas de Petri, 8.256 colônias de fungos, sendo 7.547 de bolores e 709 de leveduras (Tabela 1).

O maior número de colônias de fungos foi obtido às 15 horas, com exceção dos gêneros *Aspergillus*, *Phoma* e *Cephalosporium* que tiveram maior incidência na coleta das 9 horas. Às 21 horas, de maneira geral, houve um decréscimo no número de colônias isoladas.

Tabela 1 — Distribuição periódica do número de colônias de fungos isolados do ar em 360 coletas

Fungos	Período/n.º de coletas			Total 360
	Manhã (9h) 120	Tarde (15h) 120	Noite (21h) 120	
Bolores				
FNE	660	840	495	1995
<i>Cladosporium</i> (CL)	543	680	442	1665
<i>Epicoccum</i> (EP)	309	514	143	966
<i>Alternaria</i> (AL)	103	184	60	347
<i>Penicillium</i> (PE)	58	169	97	324
<i>Aspergillus</i> (AS)	91	62	48	201
<i>Fusarium</i> (FS)	69	78	26	173
<i>Phoma</i> (PH)	33	21	12	66
<i>Trichoderma</i> (TR)	12	15	14	41
<i>Cephalosporium</i> (CE)	18	9	16	43
Outros	594	736	396	1726
Bolores totais (BO)	2490	3308	1749	7547
Leveduras				
<i>Rhodotorula</i> (RH)	57	80	63	200
<i>Aureobasidium</i> (AU)	43	54	21	118
Outras	101	140	150	391
Leveduras totais (LE)	201	274	234	709

Pela análise de variância (Tabela 2), somente bolores totais, FNE e gêneros *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Alternaria*, *Fusarium* e *Aureobasidium* apresentaram diferenças significativas entre as médias gerais de isolamento. Pelo teste de Tukey (Tabela 2), as

médias de isolamento de bolores totais e do gênero *Epicoccum* foram diferentes nos três horários estudados, podendo-se afirmar que o número de colônias desses fungos ocorreu em ordem crescente, a partir das 21 horas. Os gêneros *Cladosporium*, *Aureobasidium* e

Tabela 2 — Resumo da análise da variância e teste de Tukey dos fungos isolados do ar em diferentes períodos do dia (360 coletas)

Fungos	Média ± desvio padrão			F	F _α	Resultado	Valor absoluto da diferença de médias	C	Resultado
	Manhã (M)	Tarde (T)	Noite (N)						
FNE	5,50 ± 5,12	7,00 ± 6,60	4,13 ± 3,45	9,08	3,02	S	T - M = 1,50 T - N = 2,90 M - N = 1,40	1,58	NS
CL	4,52 ± 5,30	5,67 ± 7,74	3,68 ± 5,48	3,02	3,02	S	T - M = 1,20 T - N = 2,00 M - N = 0,80	1,89	NS
EP	2,57 ± 3,90	4,28 ± 5,65	1,19 ± 2,31	16,33	3,02	S	T - M = 1,70 T - N = 3,10 M - N = 1,40	1,26	S
AL	0,86 ± 1,07	1,53 ± 1,68	0,50 ± 1,08	19,07	3,02	S	T - M = 0,68 T - N = 1,03 M - N = 0,35	0,39	S
PE	0,48 ± 0,85	1,41 ± 8,47	0,81 ± 2,97	0,98	3,02	NS			NS
AS	0,78 ± 2,84	0,51 ± 0,87	0,40 ± 1,19	1,31	3,02	NS			NS
FS	0,58 ± 1,11	0,70 ± 1,36	0,23 ± 0,60	6,10	3,02	S	T - M = 0,13 T - N = 0,47 M - N = 0,34	0,32	S
RH	0,48 ± 0,92	0,67 ± 1,14	0,53 ± 1,17	1,02	3,02	NS			NS
AU	0,33 ± 0,91	0,45 ± 0,84	0,18 ± 0,84	3,07	3,02	S	T - M = 0,12 T - N = 0,28 M - N = 0,16	0,26	S
BO	20,75 ± 17,15	27,57 ± 19,66	14,58 ± 11,04	18,94	3,02	S	T - M = 6,80 T - N = 1300 M - N = 6,10	4,90	S
LE	1,68 ± 2,62	228 ± 313	1,95 ± 2,71	1,39	3,02	NS			S

S -- Significativo

NS -- Não Significativo

os FNE, embora tivessem ocorrido igualmente em ordem crescente, a partir das 21 horas, apresentaram médias de freqüência significativas somente entre os períodos de 21 e 15 horas. Com base nas diferenças significativas, conclui-se que *Alternaria* spp. ocorre em maior número às 15 horas e em menor às 9 e 21 horas; *Fusarium* spp. ocorre em menor número às 21 horas e em maior número às 9 e 15 horas.

Na Tabela 3 são apresentadas as freqüências mensais de isolamento, de acordo com os períodos estudados, dos FNE, bo-

lores e leveduras totais, onde se observa de maneira geral, aumento de freqüência, nos meses de outono e inverno.

Com base na significância estatística (Tabela 4), verifica-se que às 9 horas, FNE ocorreram com maior freqüência em agosto e menor em março; bolores totais com menor freqüência em janeiro e maior em junho e leveduras totais com menores freqüências nos meses de março, novembro, dezembro e maior em agosto.

Às 15 horas, os não esporulados e bolores totais ocorrem com menor freqüência em

Tabela 3 — Média mensal, de acordo com o período diário, de FNE, bolores e leveduras isolados do ar

Meses	FNE			Bolores totais			Leveduras totais		
	Manhã (M)	Tarde (T)	Noite (N)	Manhã (M)	Tarde (T)	Noite (N)	Manhã (M)	Tarde (T)	Noite (N)
Jan	2,70 ± 3,65	7,10 ± 3,63	3,80 ± 3,49	9,30 ± 10,53	27,00 ± 23,37	10,10 ± 5,34	3,00 ± 4,19	3,10 ± 2,85	2,50 ± 3,21
Fev	3,30 ± 2,41	3,30 ± 3,34	3,30 ± 2,58	12,90 ± 10,15	21,50 ± 33,29	15,10 ± 11,56	0,80 ± 1,03	1,00 ± 1,25	1,00 ± 1,15
Mar	2,50 ± 2,32	1,60 ± 1,43	2,50 ± 2,84	12,40 ± 7,03	8,80 ± 5,53	12,40 ± 9,37	0,10 ± 0,32	1,00 ± 1,25	1,00 ± 1,15
Abr	6,50 ± 4,60	3,30 ± 4,30	4,20 ± 3,39	30,60 ± 25,81	39,10 ± 17,76	19,10 ± 18,84	1,60 ± 2,07	4,50 ± 6,11	1,70 ± 2,41
Mai	5,90 ± 5,97	7,30 ± 4,22	3,20 ± 3,05	19,60 ± 13,04	34,10 ± 16,94	14,60 ± 12,02	2,40 ± 3,17	1,70 ± 2,75	2,00 ± 2,26
Jun	7,80 ± 6,21	13,50 ± 9,96	6,30 ± 4,57	33,80 ± 29,89	38,60 ± 19,82	19,60 ± 11,19	1,70 ± 2,21	1,10 ± 1,52	1,50 ± 1,27
Jul	4,20 ± 4,59	5,60 ± 4,74	3,10 ± 3,28	22,00 ± 13,86	21,60 ± 11,66	12,50 ± 7,75	1,80 ± 1,23	4,90 ± 3,96	3,80 ± 6,53
Ago	8,90 ± 6,77	8,40 ± 8,29	4,80 ± 3,26	28,80 ± 15,94	24,90 ± 18,28	16,30 ± 12,52	4,40 ± 4,62	4,80 ± 3,05	2,70 ± 1,57
Set	7,10 ± 4,12	10,80 ± 7,79	3,60 ± 3,27	25,50 ± 13,64	32,10 ± 12,92	13,20 ± 12,96	1,20 ± 1,55	2,10 ± 2,28	3,10 ± 1,73
Out	3,30 ± 2,36	11,40 ± 8,44	4,80 ± 4,78	16,30 ± 8,17	37,50 ± 17,04	17,90 ± 16,24	2,30 ± 2,79	1,50 ± 2,22	1,40 ± 1,35
Nov	3,79 ± 8,14	6,20 ± 4,21	5,30 ± 2,54	22,50 ± 19,17	26,50 ± 16,99	13,90 ± 7,61	0,50 ± 0,71	1,40 ± 1,65	2,10 ± 3,07
Dez	5,10 ± 2,13	5,50 ± 4,70	4,60 ± 3,78	15,30 ± 9,13	19,10 ± 13,72	10,20 ± 6,60	0,30 ± 0,67	0,30 ± 0,67	0,60 ± 1,58

Tabela 4 — Resumo da análise da variância dos grupos de fungos isolados do ar em diferentes meses, num mesmo período

Fungos/Período	F	F _α	Resultado	Valor absoluto da diferença das médias	C	Resultado
FNE-manhã	2,30	1,89	S	Ago – Mar = 6,4 Outros	6,33	S NS
FNE-tarde	3,58	1,89	S	Jun – Mar = 11,9 Out – Mar = 9,8 Set – Mar = 9,2 Outros	8,88	S S S NS
FNE-noite	0,97	1,89	NS			
Bolores-manhã	2,33	1,89	S	Jun – Jan = 24,5 Outros	24,15	S NS
Bolores-tarde	2,46	1,89	S	Abr – Mar = 30,3 Jun – Mar = 29,8 Out – Mar = 28,9 Outros	27,54	S S S NS
Bolores-noite	0,81	1,89	NS			
Leveduras-manhã	2,56	1,89	S	Ago – Mar = 4,3 Ago – Dez = 4,1 Ago – Nov = 3,9 Outros	3,66	S S S NS
Leveduras-tarde	3,29	1,89	S	Jul – Dez = 4,6 Ago – Dez = 4,5 Outros	4,24	S S NS
Leveduras-noite	1,24	1,89	NS			

Obs.: Valores calculados através dos resultados das médias de freqüências expostas na Tabela 3 e relativas aos meses e períodos considerados.

S — Significativo

NS — Não Significativo

março e maiores, respectivamente em junho, setembro, outubro e abril, junho, outubro; e as leveduras ocorrem com maior freqüência em julho e agosto e menor em dezembro.

Às 21 horas não houve diferenças significativas entre as médias de freqüência dos fungos considerados.

Discussão

Somente *Epicoccum* spp. comportou-se de maneira idêntica aos bolores totais, ocorrendo em ordem crescente de freqüência às 21, 9 e 15 horas. Fungos de outros gêneros foram isolados, de maneira geral, em maior número às 15 horas e em menor, às 21 horas. Em alguns casos as freqüências verificadas às 9 horas não diferiram, estatisticamente, das observadas às 21 horas e, em outros, das obtidas às 15 horas. No cômputo geral, apesar das diferenças de comportamento entre os gêneros, os bolores tiveram menor dispersão no período noturno, talvez devido à existência de fator limitante ou, em contraposição, à ação de fatores favoráveis no período diurno. Esses resultados são contrários às afirmações de Ali & col. (2) de que a radiação solar tem efeito adverso à concentração de esporos de fungos no ar.

As leveduras comportaram-se, nos vários períodos estudados, de maneira diversa dos

bolores, pois, em geral, suas freqüências não apresentaram variação significativa. Este fato sugere que, possivelmente, não foram afetadas pelos mesmos fatores.

Com relação aos fungos não esporulados (FNE), supunha-se, inicialmente, que teriam comportamento oposto aos bolores esporulados. Sabe-se que em determinadas condições ambientais desfavoráveis, os fungos esporulam, devendo essa condição refletir-se na sua dispersão pelo ar. Assim, quanto maior o número de esporulados, menor o de não esporulados. Com respeito à periodicidade diária, o fato não se verificou, como pode ser observado na Tabela 3, onde há, praticamente, semelhança entre as médias de freqüência desses dois grupos. Há, portanto, indicações de que os mesmos fatores que condicionaram a variação dos bolores totais sejam válidos, em geral, para os FNE.

Nota-se, ainda, com referência à periodicidade diária, resultados concordantes e discordantes com os de outros autores, considerando-se tanto a freqüência dos fungos totais como a de gêneros isolados. Este fato era esperado, não só pelas diferenças ambientais, entre os diversos ecossistemas, como pela não fundamentação da maioria dos autores, em observações estatisticamente significativas, conduzindo-os, muitas vezes, a interpretações não verdadeiras.

Referências Bibliográficas

- Agarwal, M.K.; Shrivari, D.N. & Mukherji, K.G. — Studies on the allergenic fungal spores of the Dehi, India metropolitan area. *J. Allergy*, 44:193-203, 1969.
- Ali, M.I.; Salama, A.M. & Ali, M.T. — Possible role of solar radiation on the viability of some air fungi Egypt. *Zbl. Bakt. Abt.*, 131:529-534, 1976.
- Alvarez, J.C. & Castro, J.F. — Quantitative studies of airborne fungi of Havana in each of the twenty four hours of the day. *J. Allergy*, 23:259-264, 1952.
- Barkai-Golan, R. — A study of air-borne fungi in Israel. *Bull. Res. Coun. Israel*, 6:247-258, 1958.
- Bowker, A.H. & Lieberman, G.J. — Handbook of industrial statistics. New Jersey, Prentice Hall, 1955.
- Gambale, W. — Flora fúngica anemófila da Grande São Paulo. *Rev. Microbiol.*, 8:47-79, 1977.
- Gregory, P.H. — Spore content of the atmosphere near the ground. *Nature*, 170:475-477, 1952.
- Hamilton, E.D. — Studies on the air spora. *Acta Allergol.*, 13:143-175, 1959.
- Hirst, J.M. — Changes in atmospheric spore content: diurnal periodicity and the effects of weather. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 36:375-393, 1953.
- Medrano, C.E. — Determinación genérica de los hongos aislados del aire de Ciudad Bolívar durante el periodo comprendido entre los meses de noviembre de 1978 a octubre de 1979. Venezuela, Ciudad Bolívar, Universidad de Oriente, 1979. (Tese).
- Miquel, M.P. — Annuaire de l'observatoire de Montsouris pour l'an. Paris, 1885.
- Mishra, R.R. & Kamal — Aeromycology of Gorakhpur. III — Seasonal variation in air fungal spora. *Mycopathologia*, 45:301-310, 1971.
- Özkaragöz, K. — A study of airborne fungi in the Ankara area of Turkey in 1966. *Acta Allergol.*, 24:147-156, 1969.

14. Pady, S.M. — A continuous spore samples. *Phytopathology*, 49:757-760, 1959.
15. Pady, S.M.; Kramer, C.L. & Willey, B.J. — Kansas aeromycology. XII — Materials, methods and general results of diurnal studies 1959-1960. *Mycologia*, 54:168-180, 1962.
16. Panzer, J.D.; Tullis, F.C. & Van Arsdell, E.P. — A simple 24 hour slide spore collector. *Phytopathology*, 47:512-514, 1957.
17. Pathak, V.K. & Pady, S.M. — Numbers and viability of certain airborne fungus spores. *Mycologia*, 57:301-310, 1965.
18. Reiss, J. — Aeromicological investigations in West-Germany. II — Seasonal and diurnal periodicity in the period 1971-1972. *Zbl. Bakt. Abt.*, 130:157-160, 1975.
19. Rich, S. & Waggoner, P.E. — Atmospheric concentration of *Cladosporium* spores. *Science*, 137:962-965, 1962.
20. Sreeramulu, T. — The diurnal and seasonal periodicity of spores of certain plant pathogens in the air. *Trans. Brit. Mycol. Soc.*, 42:177-184, 1959.
21. Tomsíková, A. & Novácková, D. — Zum studium opportunitäts chen Pilze. I — Pilzflora in der atmosphäre von Pilsen (CSSR). *Mykosen*, 14:93-101, 1971.
22. Waggoner, P.E. & Taylor, G.S. — Dissemination by atmospheric turbulence spores of *Peronospora tabacina*. *Phytopatology*, 48:46-51, 1958.

Revista de Microbiologia

Publicação da Sociedade Brasileira de Microbiologia

CONTEÚDO

CONTENTS

Volume 12

Janeiro-Março 1981

Número 1

João R. dos Santos & Romain R. Golgher	1	Efeitos de inibidores metabólicos na multiplicação de arbovírus do grupo C	Effects of metabolic inhibitors in the growth of group C arboviruses
Deise Pasetto Falcão	5	Presença de <i>Yersinia enterocolitica</i> e <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> na América Latina	Présence de <i>Yersinia enterocolitica</i> et <i>Yersinia pseudotuberculosis</i> en Amérique Latine
Leslie C. Benchettit Lúcia M. Teixeira Gedalia V.V. Borba & César M. de Oliveira	11	Sensibilidade de estreptococos à cefoxitina e a outros agentes antimicrobianos	Susceptibility of streptococci to cefoxitin and to other antimicrobial agents
Fernando P. Câmara, & Maria Amélia Cardoso	14	Epidemiologia da resistência plasmidial a drogas em salmonelas isoladas em esgotos da cidade do Rio de Janeiro	Epidemiology of drug resistance plasmids in <i>Salmonella</i> isolated from sewage of Rio de Janeiro
Saemi Ogassawara Sérgio Benassi José Luiz D'Angelino Wanderley P. de Araújo & Antonio Carlos Gouveia	17	Observações sobre <i>Trypanosoma (Megatrypanum) theileri Laveran, 1902</i> em bovino no Estado de São Paulo	Observations on <i>Trypanosoma (Megatrypanum) theileri</i> in a bovine in the state of São Paulo, Brazil
Mathylde R. de Camargo Murilo Graner Alcides Martinelli Filho	22	Qualidade microbiológica da carne bovina moída a nível de varejo e sua avaliação pela prosa da resazurina	Microbiological quality of raw ground beef and its evaluation through a resazurin test

Volume 12

Abril-Junho 1981

Número 2

José Valter C. Pélico Janice Oliveira Valsa Israel Felzenswabl & Roberto A. Gomes	29	Estudo quantitativo da fotorresistência induzida por carenciamento em <i>E. coli</i>	A quantitative study for starvation-induced photoresistance in <i>E. coli</i>
Paulo H. Yasuda & Carlos A. Santa Rosa	35	Correlação entre soroaglutinação e isolamento de leptospiras em cães	The correlation between microscopic agglutination test and the isolation of leptospires in dogs
Marcelo Magalhães Marlene Andrade & Ana E. Carvalho	38	<i>Escherichia coli</i> patogênica associada à diarréia infantil	Pathogenic <i>Escherichia coli</i> associated with infantile diarrhea
Rosa G.B. Oliveira & Adam Drozdowicz	42	As bacteriocinas no gênero <i>Azospirillum</i>	Bacteriocins in the genus <i>Azospirillum</i>
Jan Dirk van Elsas & Elisa G. da C. Penido	48	Caracterização de fagos de <i>Bacillus subtilis</i> isolados de solos brasileiros	Characterization of phages of <i>Bacillus subtilis</i> isolated from Brazilian soils
Fernando Cordeiro Catherine R. Sulzer & Auvanir de A. Ramos	55	Dois novos sorovares de leptospira no grupo Javanica isolados no Brasil	Two new leptospiral serovars in the Javanica group isolated in Brazil
Vera Maxemiuc-Naccache & Sonia M.C. Dietrich	61	Composição da parede celular de uredosporos de <i>Hemileia vastatrix</i> (ferrugem do café)	Cell wall composition of spores of <i>Hemileia vastatrix</i> (coffee rust)

Volume 12 Julho-Setembro 1981 Número 3

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 víru- 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 Campos 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>

Volume 12 Outubro-Dezembro 1981 Número 4

Sérgio O.P. da Costa Gil Vital A. Pessoa & Kinue Irino	117	Comportamento de células excreto- ras e não excretoras de protease (gelatinase) da mesma estirpe de <i>Proteus mirabilis</i> , quando inocula- dos em camundongos	<i>Behavior of protease (gelatinase)-ex- creting and non-excreting cells from a single <i>Proteus mirabilis</i> strain when inoculated into mice</i>
Virginia M.V. Fernandes & Jaques R. Nicoli	121	Produção de proteína a partir do fun- go termotolerante <i>Phanerochaete chrysosporium</i> , utilizando um dos resídios de proteínas foliares de mandioca como substrato	<i>Production of protein from the thermo- tolerant fungus <i>Phanerochaete chry- sosporium</i>, using the brown juice from a protein extract of cassava lea- ves as substrat</i>

Leslie C. Benchetrit & Agnes M. Sá Figueiredo	125 Hialuronidase associada com bactériofagos temperados de <i>Streptococcus pyogenes</i>	<i>Hyaluronidase associated with temperate bacteriophages from <i>Streptococcus pyogenes</i></i>
Walter Vieira Guimarães Arnaldo Chaer Borges Daison Olzany Silva & Servio Túlio A. Cassini	129 Transferência de plasmídios de resistência (Inc P-1) de <i>Escherichia coli</i> para <i>Rhizobium japonicum</i>	<i>Transfer of Inc P-1 drug resistance plasmids from <i>Escherichia coli</i> to <i>Rhizobium japonicum</i></i>
David E.S.N. de Barcellos	134 Comparação entre métodos de identificação de <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> em vísceras de suínos	<i>Comparison of identification methods for detection of <i>Erysipelothrix rhusiopathiae</i> in swine viscera</i>
Lauro Santos Filho Ilvan D. Ricciardi & Paulo P. Gontijo Filho	138 Influência da vacinação BCG na infecção experimental de camundongos por <i>Yersinia enterocolitica</i>	<i>Yersinia enterocolitica infection in mice after BCG immunization</i>
Regina L.C. de Oliveira Patricia N. de Sá & Roberto A. Gomes	144 Produtos de termodegradação de açúcares em pH alcalino. II — Efeito de soluções de mono-e dissacáideos-fosfato em <i>Escherichia coli</i>	<i>Thermal degradation products of sugars in alkaline pH. II — Effect of mono- and disaccharide phosphate solutions on <i>Escherichia coli</i></i>
Hassib Ashcar & Wagner Tavelin	150 Padronização de método para detecção de cromogênese em estafilococos	<i>Standardization of a method for detecting chromogenesis of staphylococci</i>
Sérgio E.L. Fracalanza & Leslie C. Benchetrit	154 Distribuição de estreptococos beta hemolítico em material de orofaringe de crianças normais em Araraquara SP, Brasil	<i>Distribution of beta-hemolytic streptococci in pharyngeal specimens of normal children in Araraquara SP, Brazil</i>
Carlos H. Romero Armando A. Aguiar Sheila R.S. de Andrade Cheryl A. Rowe & Angela G. da Silva	158 Prevalência de anticorpos contra o vírus da papilomatose bovina no Estado do Rio de Janeiro	<i>Bovine papilloma virus antibodies in the State of Rio de Janeiro</i>
José E. dos Santos & Pedro M. Lacava	162 Variação sazonal de bactérias microaerófilas fixadoras de nitrogênio em ecossistema lacustrí artificial	<i>Seasonal variation of the microaerophilic nitrogen fixing bacteria in a man made lacustrine ecosystem</i>
Odilia L. Negrão José D. Fontana & Glaci T. Zancan	170 Produção de glucoamilase por <i>Dactylium dendroides</i>	<i>Production of glucoamylase by <i>Dactylium dendroides</i></i>
Walderez Gambale Adhemar Purchio & Claudete R. Paula	176 Periodicidade diária de fungos anemófilos na cidade de São Paulo, Brasil	<i>Daily periodicity of airborne fungi from São Paulo city, Brazil</i>



DISTRIBUIDORA DE PRODUTOS CIENTÍFICOS S/A

MATRIZ — Rua Luiz Goes, 853/859 — Vila Mariana — São Paulo — SP — fone: 577-3311 — Caixa Postal 15.192 — CEP.: 04043 — Endereço Telegráfico YNRAN — Telex nº 112-5357 — I EAL —

RIO DE JANEIRO: Av. Nossa Senhora de Copacabana, 605 — fone: 256-7648.
PORTO ALEGRE: Rua Dos Andradas, 1.755 — fone: 24-2147
CURITIBA: Rua Fernando Amaro, 430 — fone: 263-2475
BRASÍLIA: Conjunto Comercial Amazonas, Sobreloja 12 — fone: 226-1108
GOIÂNIA: Rua A. Napoleão, P. Silva, 14 — fone: 225-7277
MARILIA: Rua Azaria Carvalho Lemes, 67 — fone: 33-6519
MARILIA: Rua Particular, 53 — fone: 33-7618
RIBEIRÃO PRETO: Rua Serafim Teixeira da Cunha, 520 — fone: 24-2174
CAMPINAS: Rua Joaquim Vilac, 829 — fone: 42-5956



**Meios de Cultura, antisoros, disco de sensibilidade,
reagentes diagnósticos, corantes.**

NA VANGUARDA DA TECNOLOGIA NACIONAL

L/B

Meios de cultura prontos
em placa, tubo e frascos.
Hemocultura-frascos c/CO₂ e vácuo
Sorologia: PPD, Gravi Test, CRPL,
RF Latex Widal, VDRL, RPR.
Imunologia: Antisoros, Conjugados,
Tampões.

Descart

Poliplaca placa de Petri autoclavável
Placas de microtitulação U e V
Tubos de centrifuga graduados
plásticos e transparentes.
Placas de Petri descartáveis

Gelman

Membranas Filtrantes Absolutas

Brizuela

Estreptolisina Mono-Teste
Multi-discos para Antibiotograma.

Imunoserum

Chagas-Kits Aglutinação rápida,
direta e Hemaglutinação
Toxoplasma Kits. Aglutinação direta
e Hemaglutinação.

Inlab

Produtos químicos PA
Papel Filtro, Lâminas com Treponema.
Papel de filtro
Toxo e Chagas para imunofluorescência.
Capilares, lancetas, lâminas e lâminulas para
microscopia.
Espectrofotômetro Spectra.

ASSISTÊNCIA TÉCNICA

Conserto e manutenção de aparelhos para
laboratórios. Peças originais.